

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	形態形成過程の四肢においてAP-1 転写因子のコンビネーションがプログラム細胞死を制御する新規メカニズムの解明
Title(English)	
著者(和文)	須田夏野
Author(English)	Natsuno Suda
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9675号, 授与年月日:2014年11月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田中 幹子,駒田 雅之,梶川 正樹,鈴木 崇之,増田 真二
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9675号, Conferred date:2014/11/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

平成 26 年度 博士論文要約

形態形成過程の四肢において  
AP-1 転写因子のコンビネーションが  
プログラム細胞死を制御する新規メカニズムの解明

東京工業大学大学院生命理工学研究科  
生体システム専攻 田中幹子研究室

須田 夏野

指導教官 田中 幹子 准教授

<目次>

要旨・・・4-5

序論・・・6-8

第1節 ニワトリ胚の肢芽形成過程におけるプログラム細胞死

第2節 AP-1 転写因子群

第3節 本研究の目的と方向

材料と実験方法・・9-14

1) ニワトリ胚

2) Whole-mount *in situ* hybridization

3) コンストラクト作成

4) *In ovo* electroporation

5) 形態観察

6) 免疫共沈降

7) ビーズ移植

8) 免疫組織学染色

9) siRNA

10) 細胞培養

11) クロマチン免疫沈降-シーケンス (ChIP-seq) および -qPCR (ChIP-qPCR)

結果・・・15-21

第1章 ニワトリ胚肢芽における AP-1 転写因子の網羅的発現解析

第2章 MafB/cFos ヘテロ 2 量体はプログラム細胞死を負に、MafB/cJun ヘテロ 2 量体はプログラム細胞死を正に制御する

第3章 *cFos*、*cJun* の単独強制発現実験および抑制実験

第4章 他の AP-1 転写因子の機能解析

第5章 肢芽における *MafB* の発現は BMP シグナルによって制御されている

第6章 MafB はマクロファージとそうでない細胞の両方に存在している

第7章 Maf および Jun 結合サイトの探索

考察・・・ 22–25

第1章 枝芽でのプログラム細胞死と *p63*、*p73*

第2章 AP-1 転写因子群と枝芽でのプログラム細胞死

第3章 ROS ストレス

第4章 総括

参考文献・・ 26–35

謝辞・・ 36–37

## <要旨>

四肢の原基である肢芽では、細胞が特定のタイミング・場所において自主的に死ぬプログラム細胞死が起き、不要な細胞を除去することで正常な形態形成がおこなわれる。肢芽のプログラム細胞死は BMP によって制御されることがすでに知られているが、BMP からプログラム細胞死へと至るシグナル経路についてはほとんど明らかになっていなかった。

そこで本研究では、肢芽の形態形成過程において、プログラム細胞死を調節する機構を明らかにすることを目的として研究を行った。この目的で、私は AP-1 転写因子に着目した。AP-1 転写因子は、細胞死や細胞生存に関連した遺伝子の転写調節をおこなうだけでなく、いくつかの AP-1 転写因子については、BMP シグナルにより制御されることや、肢芽以外の多様な器官の形態形成にも関わることが知られていた。そこで私は、AP-1 転写因子が BMP シグナル経路とプログラム細胞死のシグナル経路をつなぎ、細胞死を起こす細胞数の調節をおこなう可能性を検証することとした。

まず、プログラム細胞死に関わる AP-1 転写因子の候補を選定するため、ニワトリ胚肢芽において AP-1 転写因子群の網羅的発現解析をおこなった。その結果、肢芽の細胞死領域特異的に発現する *MafB* 遺伝子が候補として挙げられた。そこで、ニワトリ胚肢芽における *MafB* の機能を調べるため、機能抑制実験と強制発現実験をおこなったところ、肢芽内において *MafB* はヘテロ二量体で機能し、二量体の組み合わせによって細胞死を正と負のどちらにも制御している可能性が示唆された。

さらに、*MafB* と二量体を形成できる AP-1 転写因子の中から、肢芽の細胞死領域に分布しているものを探索したところ、*cFos* と *cJun* が二量体パートナーの候補と考えられた。次に *MafB* と *cFos*、および *MafB* と *cJun* ヘテロ二量体がそれぞれプログラム細胞死を制御する可能性を検証するため、*MafB* と *cFos*、もしくは *MafB* と *cJun* を同時にニワトリ胚肢芽で強制発現させた。その結果、*MafB/cFos* ヘテロ二量体は細胞死を負に、*MafB/cJun* ヘテロ二量体は細胞死を正にそれぞれ制御している可能性が示された。

また、*MafB* や *cFos*、*cJun* の発現が BMP シグナルにより制御される可能性を検証するために、BMP2 を染み込ませたビーズを肢芽に移植して、これらの AP-1 遺伝子の発現を解析した。その結果、*MafB* のみが肢芽で BMP シグナルによって発現が調節されていることが明らかになった。

さらに私は、肢芽での細胞死を促進する *MafB/cJun* ヘテロ二量体の標的遺伝子を明らかにするために、ニワトリ胚肢芽の抽出液に対して *MafB*、*Jun*、あるいは *p300* の抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を行った。標的遺伝子の探索については、まず ChIP-seq の解析から、*Maf*、*Jun*、*p300* が重なって有意に結合しているサイト (fold enrichment>2.5 かつ peak 幅>400 bp) を明らかにし、それらの結合サイトから± 50 kbp 以内に転写開始点を持つ遺伝子を探し出した。さらに、標的遺伝子候補を絞り込むために、先行研究のトランスクリプトーム解析で肢芽での発現が確認されている遺伝子を探索した。これらの標的遺伝子候補のうち、細胞死の制御に関わり、且つ肢芽で発現することを確認

できた遺伝子について最終的な標的遺伝子候補とした。また、ChIP-seq 解析より絞り込まれた標的遺伝子候補には含まれなかったものの、他の系で AP-1 転写因子の標的として知られていたり、細胞死や細胞生存のプロセスにおいて鍵となる機能を持つことが知られる遺伝子についても併せて標的遺伝子候補とした。

そこで、これらの標的遺伝子候補が胚芽内で MafB/cJun ヘテロ二量体によって発現を制御されるかを調べたところ、*p63* および *p73* の発現が MafB/cJun ヘテロ二量体の影響を受けることが明らかとなった。さらに、MafB/cJun の結合サイトを含む配列がエンハンサー活性を持つかをルシフェラーゼアッセイにより確認したところ、*p63* と *p73* については MafB/cJun ヘテロ二量体の直接の標的遺伝子である可能性が示された。

以上の結果から、ニワトリ胚の胚芽形成過程では MafB/cFos ヘテロ二量体がプログラム細胞死を負に調節する一方、MafB/cJun ヘテロ二量体が直接 *p63* や *p73* など細胞死に関わる遺伝子の発現を制御することでプログラム細胞死を正に調節していることが考えられた。したがって、ニワトリ胚の胚芽でプログラム細胞死を起こす細胞数は、MafB/cFos と MafB/cJun ヘテロ二量体の存在量のバランスによって制御されていることが示唆された。

## <序論>

### 第1節 ニワトリ胚の肢芽形成過程におけるプログラム細胞死

生物の胚発生過程においては、胚体を構成する細胞の一部が適切な場所・タイミングで自主的に死ぬプログラム細胞死を起こすことが知られている。プログラム細胞死により余剰な細胞を除去することは、正常な形態形成をおこなう上で欠かせないプロセスである。

四肢動物が持つ四肢は発生過程において肢芽という原基から形成される。肢芽の発生過程においてもプログラム細胞死が観察され、四肢の最終的な形態形成に寄与することから、肢芽はプログラム細胞死を研究する上で良いモデル器官として使われてきた。四肢動物に含まれるニワトリの胚発生においては、肢芽の間充織と外胚葉のいくつかの領域でプログラム細胞死が起きることが報告されている (Fernandez-Teran et al., 2006)。ニワトリ胚肢芽の間充織では、プログラム細胞死が起こる領域は大きく分けて 4 箇所存在し、肢芽の頭部側に前側壊死領域 (Anterior Necrotic Zone; ANZ)、尾部側に後側壊死領域 (Posterior Necrotic Zone; PNZ)、肢芽の中心部に Opaque Patch (OP)、そして指間領域に指間壊死領域 (Interdigital Necrotic Zones; INZ) が存在する (図 1)。各領域は間充織の細胞数を調節することで四肢の形態形成に関わっていると考えられており、例えば両生類より進化的に新しい羊膜類においては、指間領域のプログラム細胞死により指が分離されることが知られている (Zuzarte-Luis et al, 2002; Yokouchi et al, 1996; Ros MA et al, 1997)。また、ニワトリ胚の外胚葉においては、肢芽の先端部に存在する肥厚した特殊な外胚葉であり、一過性の器官である外胚葉性頂堤 (Apical Ectodermal Ridge; AER) でもプログラム細胞死が観察される (図 1; Todt and Fallon, 1984)。AER は肢芽の伸長に重要な役割を持っており、AER で起きるプログラム細胞死が AER の細胞数を適切に調節することで正常な四肢が形作られると考えられている (Todt and Fallon, 1986)。

このように、肢芽でのプログラム細胞死は四肢の正常な形態形成に必須であるが、細胞死を起こす細胞の数がどのように調節されているか、詳細は明らかになっていない。これまでの先行研究から、肢芽で発現する骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein; BMP) シグナルが間充織でのプログラム細胞死 (Ganan et al., 1996; Macias et al., 1997; Tang et al., 2000; Yokouchi et al., 1996; Zou and Niswander, 1996) と AER でのプログラム細胞死 (Wang et al., 2004) の両方を制御しているという報告がなされている。具体的には、細胞内のリン酸化ドメインを除去したドミナントネガティブ (Dominant negative; DN) 型の BMP 受容体 1a、1b をニワトリ胚の肢芽で発現させると INZ でのプログラム細胞死が抑えられることや (Yokouchi et al., 1996; Zou and Niswander, 1996)、BMP を染み込ませたビーズを肢芽の間充織に移植するとプログラム細胞死が促進されることが分かっている (図 2; Ganan et al., 1996; Macias et al., 1997; Tang et al., 2000)。しかしながら、肢芽において BMP シグナルからプログラム細胞死を調節する経路へと至る間の詳細はいまだ明らかになっていなかった。そこで私は、肢芽以外の系において細胞死や細胞生存に関連する遺伝子の転写調節を行う

ことが知られる AP-1 転写因子群に着目した。

## 第2節 AP-1 転写因子群

AP-1 転写因子群は種間でよく保存された転写因子の1群で、群内の転写因子同士でホモ2量体、またはヘテロ2量体を形成し標的遺伝子の転写を調節する事が知られている(図3; Shaulian and Karin, 2002)。枝芽でプログラム細胞死を調節するものの候補として AP-1 転写因子に着目した理由は、骨や水晶体、肝臓、心臓など多くの器官・組織の正常な発生に AP-1 転写因子が関係する点(Ogino and Yasuda, 1998; Rather et al., 1987; Hilberg et al., 1993; Kim-Mitsuyama et al., 2006)、AP-1 転写因子が細胞死や細胞生存に関連する遺伝子の転写調節をおこなうことが報告されている点(Shaulian and Karin, 2002)、いくつかの AP-1 転写因子は BMP シグナルにより発現を制御されることが知られている点(Shaulian and Karin, 2002)、の3つが挙げられる。

また AP-1 転写因子はフリーラジカルによって転写を誘導される遺伝子の発現調節をしていることも知られている(Sen and Packer, 1996)。また、先行研究から高レベルの活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)が INZ に存在することや、抗酸化剤が枝芽でのプログラム細胞死を抑制できることが分かっており(Salas-Vidal et al., 1998; Schnabel et al., 2006)、ROS ストレスが INZ でのプログラム細胞死を引き起こす一因である可能性を示唆している。さらに、AP-1 転写因子群のメンバーである cFos や cJun の発現は転写レベル・翻訳レベルで ROS に制御されていることが知られている(Sen and Packer, 1996)。以上の理由から、枝芽でのプログラム細胞死制御メカニズムに AP-1 転写因子群が関わっている可能性を検証することとした。

## 第3節 本研究の目的と方向

本研究では、ニワトリ胚の枝芽形成過程において AP-1 転写因子がプログラム細胞死を起こす細胞数の調節をおこなう可能性を検討した。

私はまず、プログラム細胞死に関わる AP-1 転写因子の候補を選定するために、ニワトリ胚の枝芽において AP-1 転写因子群の網羅的発現解析をおこない、枝芽の細胞死領域特異的に発現していた *MafB* 遺伝子とそのヘテロ2量体のパートナー候補である *cFos*、*cJun* 遺伝子に着目した。ニワトリ胚枝芽において *MafB*、*cFos*、*cJun* の抑制・強制発現実験をおこなった結果 *MafB/cFos* ヘテロ2量体がプログラム細胞死を負に、*MafB/cJun* ヘテロ2量体がプログラム細胞死を正にそれぞれ制御している可能性が示された。またビーズ移植実験から *MafB*、*cFos*、*cJun* のうち *MafB* のみが枝芽でプログラム細胞死を制御している BMP シグナルによって発現が調節されていることが明らかになった。

次に、*MafB/cJun* ヘテロ2量体の標的遺伝子を、クロマチン免疫沈降-シーケン

ス (Chromatin immunoprecipitation - sequence; ChIP-seq) 法を用いてゲノムワイドに探索し、さらに実際に MafB/cJun ヘテロ 2 量体によって標的候補遺伝子の発現が制御されているかを調べた結果、MafB/cJun ヘテロ 2 量体の標的候補遺伝子として *p63* および *p73* が挙げられた。また ChIP-seq 法により得られた MafB/cJun 結合サイトを含む配列を用いたレポーターアッセイから *p63* と *p73* が MafB/cJun ヘテロ 2 量体の直接の標的遺伝子である可能性を示すことができた。

以上の結果から、ニワトリ胚の肢芽形成過程では MafB/cFos ヘテロ 2 量体がプログラム細胞死を負に調節し、一方 MafB/cJun ヘテロ 2 量体は直接 *p63* や *p73* など細胞死に関わる遺伝子の発現を制御することでプログラム細胞死を正に調節していると考えられる。

## <材料と実験方法>

### 1) ニワトリ胚

ニワトリ (*Gallus gallus*) の受精卵 は、(有) 城山鶏園、株式会社三宅孵卵場、または日生研株式会社より購入したものを使用した。ニワトリ胚は 38.5°C の恒温器内で孵卵し、Hamberger and Hamilton のステージ表によってステージ分けした (Hamberger and Hamilton, 1951)。

### 2) Whole-mount *in situ* hybridization

*A9300001N09Rik, Atf1, Atf2, Atf3, Atf4, Atf6, Bach1, Bach2, Batf, Batf3, CEBPd, CEBPg, Creb1, Creb3, Creb3l1, Creb3l2, Creb3l3, Creb5, Crebl2, Crem, cFos, HLF, cJun, Nfe2l1, Nfe2l2, Nfil3*, および *Xbp1* プローブは Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC; <http://www.chick.manchester.ac.uk/>) よりニワトリの EST クローン (ChEST595m10, ChEST547e5, ChEST913d17, ChEST927o11, ChEST390a19, ChEST222o13, ChEST926l10, ChEST1024h14, ChEST543k2, ChEST372f15, ChEST704p8, ChEST86h12, ChEST50d14, ChEST256g16, ChEST335l1, ChEST553f15, ChEST98d7, ChEST964l8, ChEST860a20, ChEST72i15, ChEST262m21, ChEST837k20, ChEST520g15, ChEST719p8, ChEST813j4, ChEST567h3, および ChEST151f18 ; Boardman et al., 2002; Hubbard et al., 2005) を購入し T7 または T3 RNA ポリメラーゼで合成して作成した。 *Atf7* および *CEBPα, CEBPβ, Fosl2, Jund* プローブはデラウェア大学よりニワトリの EST クローン (pgf1n.pk008.b16, pgl1n.pk007.g3, pgm2n.pk007.i18, pgn1c.pk014.g7, pgl1n.pk012.d17, respectively; <http://www.chickest.udel.edu/>) を購入し T7 または SP6 RNA ポリメラーゼで合成して作成した。 *Crebzf, JDP, MafF, MafG, MafK, TEF, p63, p73, Chk1, DAPK1* の塩基配列は stage 20-28 のニワトリ胚より得た cDNA プールからプライマー (表1) を用いて PCR で増幅し、それを鋳型として RNA プローブを合成した。 *L-Maf* および *MafB, cmaf, Fgf8* プローブは先行研究の通り合成して作成した (Crossley et al., 1996; Kataoka et al., 1994a)。 Whole-mount *in situ* hybridization の操作に関しては先行研究における手法 (Wilkinson, 1992) に改変を加えておこなった。具体的には、75, 50, 25% のメタノール/PBT で胚の再水和をおこなったのち、stage 23-25 の胚は 3 ug/ml の proteinase K/PBT で 7 min、stage 26-29 の胚は 10 ug/ml の proteinase K/PBT で 15 min、stage 30-31 の胚は 10 ug/ml の proteinase K/PBT で 20 min 処理をし、4% formaldehyde, 0.1% glutaraldehyde/PBT で再固定した。プローブは DIG 標識したものを用い、ハイブリダイズは 65-75°C でおこない、その後 65-75°C で 50% formamide, 5 × SSC (pH 5), 1% SDS および 50% formamide, 2 × SSC (pH 5) の溶液で2-3 回、30分ずつ洗浄をおこなった。常温において PBST で3回リンスし、抗 DIG 抗体を用いた抗体抗原反応でプローブを検出した。

### 3) コンストラクト作成

RCAS-*MafB* コンストラクト; *MafB* の塩基配列をクローニングする際は N 末端側に *EcoRI* サイト、Kozak 配列、FLAG エピトープ配列、C 末端側に *HindIII* サイトを付加した以下の配列のプライマーを用いて stage 20 のニワトリ胚から得た cDNA を鋳型に PCR で増幅した。

(5'-CCGGAATTCCCCACCATGGACTACAAGGACGATGACGATAAGATCGGCTCCCACCAAGTGTC-3'・5'-CCCAAGCTTGCACCTCACATGAAGAACTCG-3'; 以下 PCR のプライマーはフォワードプライマー・リバープライマーの順で記載)。得られた DNA 断片を pGEM-T Easy ベクター (Promega; pGEMTeasy-*MafB*) とライゲーションした後 *EcoRI*–*HindIII* 断片をカセットベクターである SLAX12 NCO (Morgan and Fekete, 1996) に挿入した。SLAX12 NCO にある 2 つの *ClaI* サイトで挟まれた断片をレトロウイルスベクター RCAS-AP (Homburger and Fekete, 1996; Hughes et al., 1987) に挿入した。

DN-*MafB* コンストラクト; *MafB* のアミノ酸配列 111–311 aa. にあたる塩基配列を *EcoRI* サイト、Kozak 配列、FLAG エピトープ配列を含んだフォワードプライマーと、*HindIII* サイトを含んだリバープライマーを用いて pGEMTeasy-*MafB* を鋳型に PCR にて増幅した

(5'-CCGGAATTCCCCACCATGGACTACAAGGACGATGACGATAAGGGTGGTATGGCCGGA GAGCTGAGCATC-3'・5'-CCCAAGCTTGCACCTCACATGAAGAACTCG-3')。得られた DNA 断片を pGEM-T Easy ベクター (Promega; pGEMTeasy-*MafB*) とライゲーションした後 *EcoRI*–*HindIII* 断片をカセットベクターである SLAX12 NCO (Morgan and Fekete, 1996) に挿入した。SLAX12 NCO にある 2 つの *ClaI* サイトで挟まれた断片をレトロウイルスベクター RCAS-AP (Homburger and Fekete, 1996; Hughes et al., 1987) に挿入した。

pEF-*MafB*; *MafB* のコード配列を以下の PCR プライマーで増幅し (5'-ATCCTCTAGAGTCGACCCACCATGGACTACAAGGA-3'・5'-TAAAGGGAAGCGGCCGCACTCACATGAAGAACTCG-3') pHyg-EF2 ベクター (Nishizawa et al., 2003) の *NotI*–*Sall* サイトに In-Fusion 反応にて挿入した。

pT2AL-*MafB*-BI-CMV-*cFos* および pT2AL-*MafB*-BI-CMV-*cJun*; まず pBI-CMV1 ベクター (Clontech) の *SacI*–*Sall* 断片 (CMV1) または *XhoI*–*XbaI* 断片 (CMV2) を pBSK- ベクターに挿入した (各々 pBSK-CMV1、pBSK-CMV2 と以下記載)。その後 polyA 配列を pT2AL200R150G (Urasaki et al., 2006) を鋳型に以下のプライマーで増幅し

(pBSK-CMV1 挿入用; 5'-TAAAGCGGCCGCCACCGCGG-3'・

5'-ACGCGTCTGACTAGATCTGATCTAGAGGATC-3'、pBSK-CMV2 挿入用;

5'-CGCGGATCCAAGCTTGATGATCCAGACATGATAAG-3'・

5'-GGACTAGTCTCGAGGATCTAGAGGATCATAATCA-3')、それぞれ pBSK-CMV1 の *NotI*–*Sall* サイトまたは pBSK-CMV2 の *BamHI*–*SpeI* サイトに挿入した (各々

pBSK-CMV1-pA、pBSK-CMV2-pA と以下記載)。pGEM4-*cFos* または pGEM4-*cJun* (Kataoka

et al., 1994a)から *cFos* または *cJun* のコード配列を含む *HindIII*–*EcoRI* 断片を切り出してそれぞれ SLAX 12 *Nco* に挿入し、そこからさらに *HindIII*–*ClaI* 断片を切り出して pBSK-ベクターに挿入した。そして *cFos* または *cJun* のコード配列を pBSK-CMV1-pA の *NotI*–*ClaI* サイトに挿入した (以下各々 pBSK-CMV1-*cFos*-pA および pBSK-CMV2-*cJun*-pA と記載)。また pGEMTeasy-*MafB* から *MafB* のコード配列を含む *EcoRI*–*HindIII* 断片を pBSK-CMV2-pA に挿入した (pBSK-CMV2-*MafB*-pA と以下記載)。pBSK-CMV1-*cFos*-pA または pBSK-CMV2-*cJun*-pA から *XhoI*–*BglII* 断片を切り出し pT2AL200R150G ベクター (Kawakami and Noda, 2004) に挿入した (各々 pT2AL200R150G-CMV1-*cFos*-pA および pT2AL200R150G-CMV2-*cJun*-pA と以下記載)。そのうち pBSK-CMV2-*MafB* から2つの *XhoI* サイトで挟まれた配列を切り出して pT2AL200R150G-CMV1-*cFos*-pA と pT2AL200R150G-CMV2-*cJun*-pA の *XhoI* サイトに In-Fusion 反応を用いて挿入した (各々 pT2AL-*MafB*-BI-CMV-*cFos* および pT2AL-*MafB*-BI-CMV-*cJun* と以下記載)。

レポーターコンストラクト; ChIP-seq より明らかになった AP-1 転写因子結合サイトを含む配列は 表 1 に記載されているプライマーペアを用いて、ニワトリゲノムを鋳型とした PCR により増幅し pGL4.23 [luc2/miniP] ベクター(Promega)の minimal プロモーター前に挿入した。

#### 4) *In ovo* electroporation

エレクトロポレーター (NEPA GENE) による、ニワトリ胚芽への DNA 溶液の導入方法は小椋らの方法 (Ogura, 2002) を改変した。−電極にはタングステンと+電極には白金を使用し、stage 14~16 のニワトリ胚の体腔にプラスミドを注入した後、電極を配置して 8-12V/ 90 Ponn/ 110 Poff/ 2 回の条件で電流を流した。また、ニワトリ胚芽の外胚葉への DNA 導入方法として、ニワトリ胚と漿膜の間にプラスミドを注入した後、電極を配置して電流を流した。

コンストラクト溶液は 2.5%w/v FastGreen (nacalai tesque, code15939-54) および pCAGGS-*EGFP* (Niwa et al., 1991) または pAGGS-*RFP* (Das et al., 2006) を混合して使用した。各コンストラクトと siRNA の濃度は以下の通りである; RCAS-DN-*MafB*, 5.8 mg/ml; RCAS-*MafB*, 6.2 mg/ml; pEF-*cFos*, 6.6 mg/ml; pEF-*cJun*, 6.4 mg/ml; pCAGGS-*EGFP*, 3.5 mg/ml; pCAGGS-*RFP*, 6.0 mg/ml; pT2AL-*MafB*-BI-CMV-*cFos*, 5.2 mg/ml; pT2AL-*MafB*-BI-CMV-*cJun*, 6.9 mg/ml; pCAGGS-T2TP, 8.0 mg/ml; RCAS-*AP*, 5.5 mg/ml; pHygEF2, 4.7 mg/ml; pEF-*cmaf*, 9.8 mg/ml; pMSCV-*Nfe2l1*, 7.0 mg/ml; pcDNA3-*Nfe2l2*, 8.1 mg/ml; pCMV-*Xbp1*, 6.4 mg/ml; control siRNA, 250  $\mu$ M; *cFos* siRNA, 250  $\mu$ M; and *cJun* siRNA, 250  $\mu$ M。

#### 5) 形態観察

胚芽の表現型が変化したかどうかの観察にはアルシアンブルーによる軟骨染色をおこなった (Dingerkus et al., 1977)。また、胚芽でのプログラム細胞死の検出には Nile blue

染色および LysoTracker Red (Invitrogen) による染色をおこなった (Mariani et al., 2008)。Nile blue 染色は細胞死を観察したい胚を、PBS を満たしたシャーレに取り出し、0.001% Nile Blue/PBS に入れ 30 分室温で振とうした後、PBT でリンスして観察をおこなった。LysoTracker Red の染色は細胞死を観察したい胚を、PBS を満たしたシャーレに取り出し、0.5 ul/ml の LysoTracker Red/PBS に入れ 30 分 37°C で振とうした後、PBS で 3 回洗浄して蛍光観察をおこなった。

#### 6) 免疫共沈降

免疫共沈降は先行研究の手法を参照にしておこなった (Chen et al., 2004)。実際の手順を以下に記す。stage 30 のニワトリ胚 10 匹から切り出した指間領域を、細胞溶解用の緩衝液 (10 mM HEPES, pH 7.5; 420 mM NaCl; 0.5% NP-40; 0.2 % protease inhibitors (BioVision)) に入れ氷上で 25 分放置後、2500 g で 5 分遠心し不溶画分を除いた上清を使用した。抗 Maf 抗体 (Santa Cruz; sc-7866)、抗 Fos 抗体 (Santa Cruz; sc-52)、抗 Jun 抗体 (Santa Cruz; sc-1694)、またはコントロールとして normal rabbit IgG (Pepro Tech EC, Ltd) を Dynabeads (Veritas) と反応させたのち、前述した細胞溶解液の上清を加え一晩低温化でインキュベートをおこなった。抗体と反応したタンパク質は抗 Maf 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。

#### 7) ビーズ移植

stage 21-22 のニワトリ胚の前肢 PNZ または stage 28 のニワトリ胚の後肢 INZ にビーズを移植し、24 時間後に 4% パラホルムアルデヒド/PBS で固定した。使用したビーズと染み込ませたタンパク質、化学物質は以下に記す。CM Affi-Gel Blue Gel (Bio-Rad) ビーズには 0.1 mg/ml BMP2 (R&D Systems)、1 mg/ml Noggin (R&D systems) または PBS (Tumpel et al., 2002) を染み込ませて移植した。AG1-X2 resin ビーズ (Bio-Rad) には 10 mg/ml all-trans retinoic acid (Sigma) または dimethyl sulfoxide (DMSO) を染み込ませて移植した。

#### 8) 免疫組織学染色

蛍光免疫染色は stage 30 でのニワトリ胚肢芽の 14 um の凍結切片を用いて、先行研究を参考におこなった (Bangs et al., 2011)。一次抗体として抗 MafB 抗体 (Santa Cruz; sc-10022)、抗 Fos 抗体 (Santa Cruz; sc-52)、抗 Jun 抗体 (Santa Cruz; sc-1694) と、単球/マクロファージを認識する抗体 (Acris Antibodies; AM08143PU-N) を使用した。二重蛍光抗体染色にはまず初めに抗 Fos、Jun またはマクロファージ抗体と凍結切片を反応させ、続いて数度の洗浄の後、抗 MafB 抗体を反応させた。それぞれの分布を見る為に LSM780 共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss) を使用して画像を取得した。

## 9) siRNA

ニワトリの *cFos* と *cJun* 特異的に反応する siRNAs およびコントロールの scramble siRNA は Invitrogen (Stealth™ RNAi) にて合成したものを購入した。*cFos* siRNA の標的配列は 5'-TCAACGACTTCGACCTGATGAAGTT-3' (ニワトリ *cFos* のコード領域 127-151; GenBank accession 番号 NM\_205508) とし、*cJun* siRNA の標的配列は 5'-AGAAGAGCCTCAGACTGTACCTGAA-3' (ニワトリ *cJun* のコード領域 615-639; GenBank accession 番号 NM\_001031289) とした。

## 10) 細胞培養

細胞培養系を用いた実験には COS7 細胞を使用した。細胞は 10% FBS (Lifetechnologies)、100 U/ml ペニシリン (Sigma)、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン (Sigma) を含む DMEM 培地 (ナカライテスク) で培養した。siRNA の阻害効果評価では、細胞を 6 穴シャーレ (BM 機器) にまき siRNA の標的となるプラスミド (pAc-cFos-GFP または pAc-cJun-GFP) と siRNAs を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて同時に細胞へ導入した。阻害効果の評価には siRNA 導入後 24 時間で単位面積当たりの GFP 陽性細胞の数を計測した。この操作を 3 回試行し、データの統計学的な処理としてスチューデントの t 検定をおこない、有意差を確かめた ( $P < 0.00001$ )。また、レポーターアッセイでは、細胞を 24 穴シャーレ (BM 機器) にまき Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてルシフェラーゼを発現するレポーターコンストラクトとともに 0.8  $\mu$ g の *MafB* および/または *cFos*、*cJun* 発現コンストラクト、さらにウミシイタケのルシフェラーゼを発現するプラスミド (pGL3-CMV-Renilla; Promega) を導入した。プラスミド導入後 24 時間で細胞溶解液を回収し、デュアルルシフェラーゼアッセイキット (Promega) に沿ってエンハンサー活性の測定をおこなった。この操作を 2 回試行して、データをスチューデントの t 検定により統計学的に処理した。

## 11) クロマチン免疫沈降-シーケンス (ChIP-seq) および -qPCR (ChIP-qPCR)

ChIP-seq をおこなうにあたり、ChIP には stage 30 のニワトリ胚 30 匹から後肢芽先端部を切り出して使用した。切り出した組織片を 1% ホルムアルデヒドで 10 分間室温で固定し、PBS で洗浄後、-80 度で保存した (Visel et al., 2009)。ChIP には抗 *Maf* 抗体 (Santa Cruz; sc-7866)、抗 *Fos* 抗体 (Santa Cruz; sc-52)、抗 *Jun* 抗体 (Santa Cruz; sc-1694)、または抗 p300 抗体 (Santa Cruz; sc-584) を使用して免疫沈降をおこなった。ニワトリ胚肢芽の組織から取り出した DNA はソニケーターにより断片化し、一部を whole-cell extract (WCE) サンプルとして保存したのち、ChIP をおこなった。精製したサンプルは白髭研究室と伊藤研究室の方々のご協力のもと、次世代シーケンサーによって塩基配列をよみ、解析のためにニワトリのリファレンスゲノムデータ (galGal3) と照らし合わせてマッピングをおこなった。読んだ 50 bp 長のリード数は正規化し ChIP サンプルと WCE サンプルで値を比

較計算し enrichment の値を定めた (Lengronne et al., 2004)。

また ChIP-qPCR をおこなうにあたり、ChIP には抗 p300 抗体 (Santa Cruz; sc-584) を使用した。WCE と ChIP サンプルを鋳型として ChIP-seq から明らかになった AP-1 転写因子の結合領域と思われる場所を下記のプライマーを用いて qPCR にかけた。

ネガティブコントロール : 5'-CAGAGACATAATCTAAGAGG-3' ・ 5'-AATTCTGCCTTCAGTTACAC-3'

BS-p63: 5'-CAGCTCAGAATCACTCACGTC-3' ・ 5'-CTACACGCAGCTGTGGTGACC-3'

BS-p73: 5'-TTCTCCAGGAGCAGTCACCT-3' ・ 5'-CAGGCATGTCTTCACTGACT-3'

ネガティブコントロールとの有意差はスチューデントの t 検定によって確かめた。

## <結果>

### 第1章 ニワトリ胚肢芽における AP-1 転写因子の網羅的発現解析

脊椎動物において AP-1 転写因子は、胚発生に重要な多くの過程に関わっていることが知られ、種々の器官や組織の正常発生に必要であることが報告されている (Shaulian and Karin, 2002)。私はまず、ニワトリ胚の肢芽においてプログラム細胞死に関わる AP-1 転写因子を明らかにすることにした。そのためニワトリゲノムに存在することが確認された 41 の AP-1 転写因子の全てについて stage 26 の前肢と stage 31 の後肢で発現解析をおこなった。その結果、先行研究でも報告があった通り *MafB* 遺伝子が stage 26 では細胞死の起こる ANZ や PNZ、AER で発現し、stage 31 でも細胞死の起こる INZ で発現することが分かった (Lecoin et al., 2004)。また Deppmann らにより塩基配列から 2 量体を形成できる AP-1 転写因子の組み合わせが予測されており (Deppmann et al., 2006)、*MafB* とヘテロダイマーを形成できるものとして Fos サブファミリー、Jun サブファミリーの AP-1 転写因子が挙げられている。Fos サブファミリーと Jun サブファミリーの中で、網羅的発現解析から肢芽で発現しているものを探したところ、*cFos* および *cJun* が stage 26 の前肢芽と stage 31 の後肢芽で全体的に発現していた。以上の結果から、肢芽の形態形成過程でプログラム細胞死に関わる AP-1 転写因子の候補として、*MafB*、*cFos*、*cJun* の 3 つの遺伝子が考えられた。

### 第2章 *MafB/cFos* ヘテロ 2 量体はプログラム細胞死を負に、*MafB/cJun* ヘテロ 2 量体はプログラム細胞死を正に制御する

ニワトリ胚の肢芽で *MafB* 遺伝子が細胞死領域特異的に発現していたため、まず *MafB* 遺伝子が実際に肢芽でのプログラム細胞死に関与するのかどうかを調べた。*MafB* が持つ転写活性化ドメインを除いたドミナントネガティブ型の *MafB* (DN-*MafB*) を発現するコンストラクト RCAS-DN-*MafB* を作成し、stage 14-16 においてニワトリ胚の予定前肢芽領域に導入して 48 時間後に細胞死が起きている細胞を染める Nile Blue 染色をおこなった。その結果 DN-*MafB* を導入した肢芽の PNZ では細胞死を起こす細胞の数が減少し (5/6)、AER では増加する (4/6) 表現型が得られた。またコントロールとしてアルカリフォスファターゼを発現するコンストラクト RCAS-AP を導入した肢芽では、PNZ や AER で細胞死を起こす細胞数に大きな変化は見られなかった (PNZ 4/4, AER 4/4)。これらの結果から DN-*MafB* に機能を阻害される因子が、肢芽の間充織や AER でのプログラム細胞死に関与していることが明らかになった。しかし一方で全長の *MafB* を発現する RCAS-*MafB* コンストラクトを導入した肢芽では一部で AER の形態に異常が見られたものの (2/5)、細胞死を起こす細胞数に大きな変化は観察されなかった (6/7)。このことから、DN-*MafB* によって引き起こされた表現型は *MafB* だけではなく、*MafB* のヘテロ 2 量体のパートナーの機能まで抑制された結果だと考えられた。

そこでまず私は *MafB* とヘテロ 2 量体のパートナー候補である *cFos*、*cJun* が実

際にニワトリ胚の肢芽内で結合しているかどうかを調べた。stage 30 のニワトリ胚肢芽から INZ を切り出し、そこから抽出したタンパク質を用いて免疫共沈降をおこなった結果、Maf と Fos、Maf と Jun が相互作用していることが明らかになった。さらに MafB、Fos、Jun の肢芽内での局在を抗体染色によって調べたところ、Fos と MafB および Jun と MafB が stage 30 の指間領域で共局在していることが明らかになった。これらの結果から、MafB と cFos、MafB と cJun が stage 30 のニワトリ胚肢芽 INZ においてヘテロ 2 量体を形成している可能性が示された。次に、MafB/cFos、MafB/cJun ヘテロ 2 量体が肢芽でのプログラム細胞死に関与しているかを調べた。まず *MafB* と *cFos* を肢芽で同時に強制発現するため、RCAS-*MafB* と *cFos* を発現する pEF-*cFos* コンストラクト (Kataoka et al., 1994a) を stage 14-16 のニワトリ胚予定前肢芽領域に導入し 48 時間後に、Nile Blue 染色による細胞死の検出をおこなったところ、細胞死を起こす細胞数が間充織や AER で減少していた (5/5)。加えて、RCAS-*MafB* と pEF-*cFos* を導入した肢芽で AER のマーカー遺伝子である *Fgf8* の発現を確認したところ、AER の形態に異常が確認された (5/7)。他方、*MafB* と *cJun* を肢芽で同時に強制発現するため、RCAS-*MafB* と *cJun* を発現する pEF-*cJun* コンストラクト (Kataoka et al., 1994a) を前肢芽に導入し細胞死の検出をしたところ、RCAS-*MafB* と pEF-*cJun* を導入した場所で異所的に細胞死を起こす細胞が観察された (4/5)。これらの結果は MafB/cFos ヘテロ 2 量体がプログラム細胞死を負に、MafB/cJun ヘテロ 2 量体がプログラム細胞死を正に制御する可能性を示している。

そこでこの仮説をさらに検証するため、両方向性のプロモーターにより *MafB* と *cFos*、または *MafB* と *cJun* を同じ細胞で発現する配列を Tol2 トランスポゾン配列で挟んだコンストラクト (pT2AL-*MafB*-BI-CMV-*cFos*, pT2AL-*MafB*-BI-CMV-*cJun*) を作成し、トランスポゼースをコードする発現ベクター pCAGGS-*T2TP* と共に stage 14-16 のニワトリ胚予定前肢芽領域に導入した。細胞死の検出はコンストラクト導入後 48 時間に LysoTracker という試薬を用いておこなった。pT2AL-*MafB*-BI-CMV-*cFos* を導入した前肢芽では PNZ と、AER で細胞死を起こす細胞数の減少が観察された (10/13)。一方で pT2AL-*MafB*-BI-CMV-*cJun* を導入した前肢芽では間充織や外胚葉において、異所的に細胞死を起こす細胞が観察された (11/17)。このことからニワトリ胚の肢芽において *MafB* と *cFos* が同時に細胞内に存在することで細胞死が抑制され、*MafB* と *cJun* が同時に細胞内に存在すると細胞死が促進されることが明らかとなった。

### 第 3 章 *cFos*、*cJun* の単独強制発現および抑制実験

*cFos* と *cJun* の肢芽細胞死制御における機能を調べるために、まず、pEF-*cFos* と pEF-*cJun* の単独強制発現による機能解析をおこなった。stage 14-16 のニワトリ胚の予定前肢芽領域にそれぞれのコンストラクトを導入し、48 時間後に Nile Blue 染色による細胞死の検出と、*Fgf8* の発現解析による AER の形態観察をおこなった。pEF-*cFos* を導入した肢芽では細胞死を起こす細胞数の減少と増加がどちらも観察されたが (n=5)、AER の形態に

大きな変化は見られなかった (5/5)。一方 pEF-*cJun* を導入した肢芽では一部で細胞死を起こす細胞数の増加が見られたが (5/7)、AER の形態に大きな変化は見られなかった (6/6)。これら *cFos* や *cJun* の単独強制発現実験では、*MafB* の単独強制発現と異なり肢芽のプログラム細胞死に変化が見られたが、これは *cFos* や *cJun* が他にも多くの AP-1 転写因子とヘテロ 2 量体を形成できるため、*MafB* 以外の AP-1 転写因子と 2 量体を形成して細胞死に影響を与えた可能性が考えられた。

次に、内在性の *cFos*、*cJun* の機能を調べるために siRNA を用いた機能阻害実験をおこなった。まず、*cFos* あるいは *cJun* を標的とする siRNA の抑制効果を細胞培養系において評価した。*cFos*-GFP または *cJun*-GFP の融合タンパク質を発現させるコンストラクト pAc-*cFos*-GFP および pAc-*cJun*-GFP を作成し、それぞれ *cFos* siRNA、*cJun* siRNA またはコントロールの scramble siRNA と共に COS7 細胞に導入した。導入後 24 時間で GFP 陽性細胞の数を数えることで siRNA の抑制効果を評価したところ、コントロールの scramble RNA を導入した dish と比較して *cFos* siRNA、*cJun* siRNA を導入した dish では GFP 陽性細胞の数が十分に減少していることが確認された ( $P < 0.00001$ 、スチューデント *t* 検定)。そこで、効果が実証された *cFos* siRNA、*cJun* siRNA を stage 14-16 のニワトリ胚において予定前肢芽領域に導入し、内在性の *cFos*、*cJun* の機能解析をおこなった。siRNA を導入して 48 時間後に Nile Blue 染色による細胞死の検出をおこなったところ、*cFos* siRNA を導入した肢芽では細胞死を起こす細胞数がわずかに増減する表現型が確認され ( $n=5$ )、*cJun* siRNA を導入した肢芽では細胞死にあまり大きな変化は見られなかった ( $n=5$ )。またコントロールの scramble siRNA を導入した肢芽では細胞死に異常は見られなかった ( $n=3$ )。

#### 第 4 章 その他の AP-1 転写因子の機能解析

AP-1 転写因子の網羅的発現解析の結果より *MafB*、*cFos*、*cJun* 以外にもニワトリ胚肢芽の細胞死領域で発現している遺伝子が確認された。そこで私は細胞死領域で発現が見られる 4 つの遺伝子、*c-maf*、*Nfe2l1*、*Nfe2l2*、*Xbp1* についても肢芽でのプログラム細胞死への関与の可能性を調べることにした。*c-maf*、*Nfe2l1*、*Nfe2l2*、*Xbp1* を発現するコンストラクト pEF-*cmaf*、pMSCV-*Nfe2l1*、pCDNA3-*Nfe2l2*、pCMV-*Xbp1* を stage 14-16 のニワトリ胚において予定前肢芽領域に導入し Nile Blue 染色を用いて細胞死の検出をおこなった。その結果、*c-maf*、*Nfe2l2*、*Xbp1* を導入した肢芽では細胞死を起こす細胞数に大きな変化は見られなかったものの (*c-maf* 3/5; *Nfe2l2* 5/6; *Xbp1* 4/5)、*Nfe2l1* を導入した肢芽の一部ではわずかながら細胞死を起こす細胞数が減少している表現型が見られた (4/6)。この結果から、*MafB* や *cFos*、*cJun*、*Nrf2l1* 以外にも他の AP-1 転写因子とそのヘテロ 2 量体のパートナーがニワトリ胚肢芽のプログラム細胞死に関与している可能性が示唆された。

#### 第 5 章 肢芽における *MafB* の発現は BMP シグナルによって制御されている

肢芽でのプログラム細胞死は BMP シグナルによって制御されていることが知ら

れている (Ganan et al., 1996; Macias et al., 1997; Tang et al., 2000; Yokouchi et al., 1996; Zou and Niswander, 1996)。そこで私は、枝芽の細胞死に関与することが明らかになった *MafB*、*cFos*、*cJun* の発現が BMP シグナルの影響を受けるかどうかを調べた。BMP2、Noggin または PBS を染み込ませたビーズを stage 28 のニワトリ胚の INZ に移植し、24 時間後に固定して *MafB*、*cFos*、*cJun* の発現解析をおこなった。その結果、*MafB* の発現は、BMP2 ビーズにより活性化し (5/8)、Noggin ビーズによって抑制されることが明らかになった (6/7)。PBS を染み込ませたビーズでは *MafB* の発現に変化は見られなかった (4/4)。一方で、*cFos* および *cJun* の発現は BMP2、Noggin、PBS のどのビーズでも発現が変化することはなかった (*cFos*, BMP2 5/5; Noggin 5/5; PBS 5/5; *cJun*, BMP2 5/5; Noggin 4/4; PBS 5/5)。同様に、PNZ においても *MafB* の発現が BMP シグナルの影響を受けるのかどうかを調べるために、stage 21-22 のニワトリ胚の PNZ に BMP ビーズを移植し 24 時間後に固定して *MafB* の発現を確認した。コントロールとして PBS を染み込ませたビーズを移植した枝芽では *MafB* の発現に変化は見られなかったが (4/4)、BMP ビーズを移植した周辺では異所的な *MafB* の発現が確認された (7/7)。これらの結果からニワトリ胚枝芽の INZ、PNZ においては *MafB* の発現が BMP シグナルによって制御される一方で、*cFos* と *cJun* の発現は BMP シグナルの制御を受けないことが明らかになった。さらに、stage 28 のニワトリ胚の INZ にビーズを移植して 3 時間後の *MafB* の発現の変化も確認したところ、PBS ビーズでは発現に変化が見られなかったのに対し (5/5)、BMP ビーズを移植した枝芽では異所的な *MafB* の発現が確認された (6/6)。この実験より BMP ビーズの移植からあまり時間をおかず *MafB* の発現が誘導されていることが分かったので、*MafB* の発現は BMP シグナルで機能する転写因子である Smads によって制御されている可能性が高いことが示された。

レチノイン酸シグナルは指間領域で活性化していることが知られており (Lussier et al., 1993; Rodriguez-Leon et al., 1999)、またそのレチノイン酸シグナルによって指間領域でのプログラム細胞死が誘導されることも知られている (Alles and Sulik, 1989; Dupe et al., 1999; Hernandez-Martinez et al., 2009)。そこで *MafB* の発現がレチノイン酸によって制御されているかどうかを調べることにした。stage 21-22 のニワトリ胚枝芽の PNZ および stage 28 のニワトリ胚枝芽の INZ にレチノイン酸か、またはコントロールとして DMSO を染み込ませたビーズを移植し 24 時間後に固定して *MafB* の発現を確認した。PNZ においては DMSO を染み込ませたビーズを移植した枝芽で *MafB* の発現に変化がなかったのに対し (5/5)、レチノイン酸ビーズの周辺では弱く *MafB* の発現が上昇しており (3/4)、INZ においてはやはり DMSO を染み込ませたビーズでは *MafB* の発現に変化がなく (6/6)、レチノイン酸ビーズを移植した枝芽では 1 例のみビーズの周辺で *MafB* の発現が活性化していた (1/9)。このことからニワトリ胚の枝芽においては、レチノイン酸シグナルは *MafB* の発現に対し弱い影響力を持っていることが分かった。

## 第6章 MafB はマクロファージとそうでない細胞の両方に存在している

血球の分化において、*MafB* が高レベルにマクロファージで発現しその分化を促進することが知られている (Bakri et al., 2005; Kelly et al., 2000)。そこで私は、肢芽で発現している *MafB* がマクロファージの分化を通してプログラム細胞死に関与しているのかどうかを明らかにするために、マクロファージと *MafB* のニワトリ胚肢芽における分布を確かめることにした。stage 30 のニワトリ胚の肢芽で水平方向の凍結切片を作成し、*MafB* を認識する抗体とマクロファージを認識する抗体によって二重染色をおこなった。その結果、ニワトリ胚の INZ では *MafB* タンパク質がマクロファージに存在しており、またマクロファージでない細胞にも存在していることが確認された。

## 第7章 Maf および Jun 結合サイトの探索

私は次に *Maf*、*Jun* の標的遺伝子と結合サイトをゲノムワイドに明らかにする目的で、クロマチン免疫沈降-sequence (ChIP-seq) 解析をおこなうことにした。stage 30 のニワトリ胚 30 匹から後肢芽先端部を切り出し、その組織片から断片化した DNA を抽出して ChIP をおこなった。使用した抗体は抗 *Maf* 抗体、抗 *Jun* 抗体と、抗 p300 抗体である。p300 は転写の小ファクターとして知られており (Visel et al., 2009)、実際に転写を活性化しているエンハンサー領域の特定のために使用した。免疫沈降により精製した DNA 断片は白髭研究室、伊藤研究室の皆様のご協力のもと次世代シーケンサーで塩基配列をよみ、得られた 50 base pair (bp) のリードをニワトリのリファレンスゲノムデータ (galGal3) に照らし合わせてマッピングをおこなった。

ChIP-seq の解析から fold enrichment > 2.5 かつピーク幅 > 400 bp という条件でピークを選出したところ、*Maf*、*Jun*、p300 それぞれについて 26009、29815、18303 のピークが検出された。まず、*MafB/cJun* ヘテロ 2 量体の直接の標的遺伝子を探索するために、*Maf* と *Jun* および p300 で重なっているピークを絞り込むと 1347 箇所あることが分かった。絞り込まれたピークの近傍 ± 50 kb 以内に転写開始点を持つ遺伝子で、かつ 2011 年の Wang らによる指間領域の組織を使ったトランスクリプトーム解析 (Wang et al., 2011) において発現の確認された遺伝子 (シーケンスにおいてよめたリード数を正規化した値が 100 以上の遺伝子を"発現している"と判断した) を *MafB/cJun* ヘテロ 2 量体の標的遺伝子として絞り込んだ結果、1717 個の候補が挙げられた。そこでこれらの遺伝子を *MafB/cJun* ヘテロ 2 量体の潜在的な標的遺伝子として考え、これまで報告されている機能から細胞生存や細胞死に関わる可能性のあるものを選定することにした。このようにして選定した *MafB/cJun* の標的遺伝子候補のうち、細胞周期や細胞死を調節している主要な 99 の因子をコードする遺伝子が含まれるかを調べたところ、*p73*、*Chk1* と *DAPK1* が標的遺伝子候補のリストに含まれていた。*caspase 6* という遺伝子についても転写開始点の近傍で *Maf*、*Jun*、p300 のピークが重なっており標的遺伝子候補のリストに残っていたが、*caspase 6* のノックアウトマウスが四肢に異常を持たないという報告があったため (Zheng et al., 1999)、今回は

MafB/cJun の標的候補から除外した。さらに、標的遺伝子候補のリストからは外れていたが、*p63* という細胞死の調節に関わる遺伝子についても MafB/cJun の標的候補遺伝子として解析を続けることにした。その理由としては、転写開始点の近傍 ±50 kbp 以内に、ピークとしては検出されないものの Maf、Jun、p300 の結合サイトが確認できたことに加え、*p63* は AP-1 により転写が調節されていることが既に報告されていたためである (Yao et al., 2010)。このようにして絞り込んだ AP-1 転写因子の標的候補遺伝子が実際に肢芽でのプログラム細胞死に関与しているのかを確かめるため、stage 26 の前肢および stage 31 の後肢において標的候補遺伝子の発現解析をおこなった。その結果、標的候補の中で *p63*、*p73*、*Chk1* の発現が細胞死領域を含めた肢芽で強く発現していることが明らかになった。*p63* は AER での発現が見られ、*p73*、*Chk1* は間充織での発現が確認された。これらの候補のうち、*Chk1* は ATM や ATR が DNA の損傷を感知すると細胞周期を停止させ、*p73* の発現を誘導する (Urist et al., 2004)。*p63* は、細胞死を誘導できることも知られている (Pyati et al., 2011)。

次に、ニワトリ胚の肢芽で発現していた標的候補遺伝子が MafB/cJun ヘテロ 2 量体によって制御されるかどうかを調べた。MafB/cJun ヘテロ 2 量体の標的候補遺伝子について調べるため、RCAS-MafB と pEF-cJun を stage 14 のニワトリ胚において前肢芽予定領域に導入し MafB と cJun を同時に強制発現させ、36 時間後に *p63*、*p73*、*Chk1* の発現の変化を観察した。実験操作を加えていない左の肢芽と比較して、コンストラクトを導入した右の肢芽では *p63* と *p73* の異所的な発現が見られたが (*p63* 6/6、*p73* 5/7)、*Chk1* については変化が見られなかった (6/6)。コントロールとして RCAS-AP と pEF 空ベクターを一緒に導入した肢芽では、*p63* と *p73* の発現に異常は見られなかった (*p63* 5/8、*p73* 2/3)。これらの結果から *p63* と *p73* の発現が MafB/cJun ヘテロ 2 量体によって制御されていることが示された。

ChIP-seq の結果から、*p63* の 1 番目のイントロンと (binding site of *p63*: BS-*p63*)、*p73* の上流 8.5 kb に (binding site of *p73*: BS-*p73*) MafB と cJun が結合していることが明らかとなった。そこで BS-*p63*、および BS-*p73* に転写のコファクターである p300 が結合しているかを確かめることにした。stage 30 のニワトリ胚から後肢芽の先端部を切り出して、抗 p300 抗体を用いて ChIP をおこない、得られた DNA 断片をもとに BS-*p63*、および BS-*p73* の領域について qPCR をおこなった。その結果、それぞれの領域に十分な p300 の結合が認められた。このことから、MafB や cJun とともに p300 が結合していることが明らかになった。そこで 3 つの AP-1 結合サイトにエンハンサー活性があるのかどうかを細胞培養系を用いたレポーターアッセイによって確かめた。BS-*p63*、BS-*p73* のそれぞれの領域を minimal プロモーターの前に挿入したルシフェラーゼ発現コンストラクトを作成し、MafB/cJun に対する応答能を計測した。BS-*p63* と BS-*p73* は MafB と cFos をそれぞれ単独で発現させた場合と比較して、共発現させた場合に高い応答能を見せたことから、BS-*p63* と BS-*p73* が MafB と cJun に依存したエンハンサー活性を有していることが示された。

これまで示してきた結果から、MafB/cFos ヘテロ 2 量体は肢芽でのプログラム細

胞死を抑制する方へ制御していること、一方で MafB/cJun ヘテロ 2 量体は直接 *p63* や *p73* などの発現を制御することで枝芽でのプログラム細胞死を促進させる方へ制御していることが示唆された。このことは、MafB、cFos、cJun といった AP-1 転写因子の 2 量体の組み合わせが、*p63* および *p73* など細胞死や細胞生存に関わる遺伝子の発現を制御することで、枝芽で細胞死を起こす細胞数の調節をおこなっている可能性を示すものである。

## <考察>

本研究ではニワトリ胚枝芽の形態形成過程において、AP-1 転写因子である MafB が cFos や cJun とヘテロ 2 量体を形成し、その組み合わせによって細胞生存や細胞死に関わる様々な遺伝子の発現を制御することで、プログラム細胞死を起こす細胞数を調節していることを示した。

### 第 1 章 枝芽でのプログラム細胞死と p63、p73

機能解析実験から MafB/cJun ヘテロ 2 量体が枝芽の間充織と外胚葉で細胞死を促進すること、MafB/cJun ヘテロ 2 量体の標的遺伝子として p63 と p73 が下流に存在することが分かった。p63 と p73 はその発現領域の違いから、それぞれ制御している細胞死領域が異なることが予想される。p63 は外胚葉に発現していることから、AER での細胞死に関与していることが考えられる。AER での細胞死を制御していることが知られる数少ない因子の一つである *Jagged1* (Francis et al., 2005) は、その 2 番目のイントロンに p63/p73 応答エレメントが存在することが知られている (Sasaki et al., 2002)。さらに、p63 と p73 は DNA 損傷に応答し p53 依存的な細胞死を誘導する (Flores et al., 2002)。また他方で AER 中央部での細胞増殖を促進する *Dlx5* (Robledo et al., 2002) の発現を、p63 が直接活性化することも知られており (Kouwenhoven et al., 2010)、p63 のノックアウトマウスでは AER が形成されないことが報告されている (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999)。これらの先行研究の結果は、p63 が他の系と同様に (Melino et al., 2003)、AER で多様な遺伝子の発現を活性化している可能性を示唆するものである。AER において p63 に発現を制御される遺伝子には *Jagged* のような細胞死を活性化するものと、*Dlx5* のような細胞増殖に関わるものがあり、それらシグナルの総和が細胞の運命を決定しているのだと考えられる。AER 形成に関与する p63 の標的遺伝子とその機能については今後さらに詳しく調べる必要があるであろう。また、p73 は p53 依存的な細胞死経路で機能する *Noxa* の発現を誘導する (Flinterman et al., 2005)。一方で p73 は、*PUMA* や *Bax*、*p21* の発現の活性化を通して p53 非依存的な細胞死にも寄与する (Urist et al., 2004)。さらに *BAX* が INZ 特異的に発現しており (Dupe et al., 1999)、*Bax* と *Bak* のダブルノックアウトマウスは指間領域が残って合指症を引き起こす (Lindsten and Thompson, 2006)。これらのことから、ニワトリ胚の枝芽において p73 が p53 非依存的なプログラム細胞死経路を誘導し、細胞死領域での *Bax* の発現を活性化しているという可能性が示唆される。一方で、マウスにおいて p73 の欠損は枝芽の形態形成には影響を及ぼさない (Yang et al., 2000)。このことはニワトリ胚の枝芽における p73 の発現と比較すると、マウス胚の枝芽における p73 の発現が非常に薄いこと (EMBRYOS; <http://embryos.jp/embryos/html/MainMenu.html>) が原因である可能性が考えられる。

## 第2章 AP-1 転写因子群と胚芽でのプログラム細胞死

本研究では、MafB/cFos と MafB/cJun の機能に着目し、それぞれ細胞死を正と負に制御することを見出した。しかし、いくつかの AP-1 転写因子は抗アポトーシス因子とアポトーシス促進因子のどちらも発現を活性化できることが知られている。Shaulian と Karin らは 2002 年の論文において、抗アポトーシス因子とアポトーシス促進因子とのバランスが最終的な個々の細胞の生存と死を決定していると示唆している (Shaulian and Karin, 2002)。したがって、MafB/cFos や MafB/cJun が抗アポトーシス因子とアポトーシス促進因子、両方の発現を活性化し、そのバランスが細胞生存・細胞死を決めているという可能性が考えられる。さらに、先行研究では MafB/cJun ヘテロ 2 量体が *Hoxb9* の制御領域に結合し転写を抑制しているという報告や (Mechta-Grigoriou et al., 2003)、cFos/cJun ヘテロ 2 量体が安定的に結合して多くの遺伝子の発現を制御しているという報告がある (Shaulian and Karin, 2002)。このことから、今回着目した MafB/cFos、MafB/cJun ヘテロ 2 量体が標的遺伝子の発現を活性化するという AP-1 転写因子の機能だけでなく、MafB/cFos、MafB/cJun ヘテロ 2 量体が細胞死や細胞生存に関わる遺伝子の発現を抑制したり、cFos/cJun ヘテロ 2 量体が胚芽でのプログラム細胞死に関与している可能性も考えられる。

MafB は cFos または cJun と 2 量体を形成できるが、cFos や cJun は MafB の他に 10 以上ものパートナー候補が存在する (Deppmann et al., 2006)。本研究でおこなった *cJun* の単独強制発現および抑制実験では、わずかばかり細胞死を起こす細胞数の増加または減少が見られた一方で、*cFos* の単独強制発現および抑制実験では 1 つの胚芽でも細胞死を起こす細胞数が増えている場所と減っている場所が存在する例が見られた。これらの結果から、cFos や cJun が MafB 以外の AP-1 転写因子と 2 量体を形成して、プログラム細胞死を促進・抑制する因子の発現を活性化している可能性が考えられる。さらに MafB、cFos、cJun 以外の AP-1 転写因子が 2 量体を形成し胚芽でのプログラム細胞死に関与している可能性も十分に考えられる。実際、*Nfe2l1* の強制発現をおこなった胚芽では細胞死がわずかながら抑制されるという結果が得られている。また、*cmaf*、*Nfe2l2*、*Xbp1* の強制発現では胚芽での細胞死に変化は見られなかったが、これらの AP-1 転写因子がヘテロ 2 量体で機能する可能性や、胚芽ではない器官でのプログラム細胞死に関与している可能性も十分に考えられる。多様な AP-1 転写因子群の組み合わせが種々の形態形成にどのように関わっているのか、更なる研究が必要である。

本研究では MafB がニワトリ胚芽で細胞死の調節に関わっていることを示した。近年のマウスにおける研究で、MafB が泡沫細胞の細胞死を抑制することで動脈硬化を促進するという報告がなされた (Hamada et al., 2014)。一方で *MafB* 欠損マウスでは四肢形態に異常は見られない (高橋智先生未発表データ)。その原因として、*MafB* や *cFos* を含め多くの AP-1 転写因子が、ニワトリとマウスの胚芽で異なる発現をしていることが考えられる (EMBRYS; Yokoyama et al., 2009)。例えばマウスの胚芽においては、*MafB* は AER での発現が見られないし、*cFos* の発現も確認できない (EMBRYS)。今後は、マウスの胚芽における

プログラム細胞死に、ニワトリ胚での *MafB* や *cFos* のような機能を持った他の AP-1 転写因子が関与しているかどうかを調べていく必要があるであろう。

*Maf* と *Fos*、および *Maf* と *Jun* が 2 量体を形成する頻度は、これらのタンパク質の細胞内における存在量比が関係する可能性が考えられる。*in vitro* な系における実験報告によると、タンパク質が 2 量体を形成する時には、系の中における 2 量体構成因子の濃度と、2 量体形成反応に必要な活性化エネルギーに依存することが分かっており (Ecevit et al., 2010)、*Maf* と *Fos* あるいは *Jun* が量依存的にヘテロ 2 量体を形成することも *in vitro* の実験で示されている (Kataoka et al., 1994b)。

### 第 3 章 ROS ストレス

AP-1 転写因子はフリーラジカルによって誘導される遺伝子の発現を制御している (Sen and Packer, 1996)。マウスにおいては、高レベルの ROS が指間領域に存在することや、抗酸化剤が胚芽でのプログラム細胞死を抑制できることが報告されている (Salas-Vidal et al., 1998; Schnabel et al., 2006)。また *cFos* や *cJun* は ROS ストレスによって転写レベル・翻訳レベルで発現を制御されることが知られている (Sen and Packer, 1996)。以上のことから、ニワトリ胚の胚芽における *MafB* の発現が ROS ストレスによって誘導されるという可能性が十分に考えられる。今後は、ニワトリ胚胚芽のプログラム細胞死において *MafB* が持つ役割と ROS ストレスとの関連を探る必要があるであろう。

本研究では *MafB* の胚芽での発現が、胚芽でプログラム細胞死を引き起こしている BMP シグナルによって制御されることを示した。加えて機能解析実験から *MafB* がヘテロ 2 量体のパートナーを変えることで、胚芽のプログラム細胞死を抑制も活性化もできることを示した。これらのことから、おそらく BMP シグナルは *MafB* 以外にも胚芽でプログラム細胞死を誘導する他の因子を活性化しているのではないかと考えることができる。骨芽細胞の分化においては BMP が *Nox4* による ROS 産生を誘導することが知られている (Mandal et al., 2011)。先行研究で示唆される通り、BMP シグナルが胚芽で ROS や抗酸化酵素のレベルを調節している可能性は十分あると考えられる (Schnabel et al., 2006)。

### 第 4 章 総括

本研究で明らかになったこととこれまで述べてきた事柄をまとめて、AP-1 転写因子が胚芽で起こるプログラム細胞死を制御する機構のモデルを提唱する (図 4)。*MafB/cFos* ヘテロ 2 量体はニワトリ胚胚芽のプログラム細胞死を負に制御する。一方で、*MafB/cJun* ヘテロ 2 量体は細胞周期を停止させ細胞死を誘導する因子である *p63* や *p73* の発現を直接活性化することで、ニワトリ胚胚芽のプログラム細胞死を正に制御している。また BMP シグナルが *MafB* の発現を活性化し、加えて、おそらく ROS のレベルを胚芽の細胞死領域で上昇させているのではないかと考えられる (Schnabel et al., 2006)。さらに他の系で見られるように ROS ストレス自体が *MafB* や *cFos*、*cJun* の発現を活性化できる可能性も大い

に考えられる (Sen and Packer, 1996)。以上より、ニワトリ胚肢芽においては MafB/cFos と MafB/cJun ヘテロ 2 量体のバランスが、*p63*、*p73* といった遺伝子の発現調節を通して細胞死と細胞生存のコントロールをおこない、細胞死を起こす細胞数を適切に保つことで、肢芽の正常な形態形成を支えているのではないかと結論付けた。

<参考文献>

**Alles, A. J. and Sulik, K. K.** (1989). Retinoic-acid-induced limb-reduction defects: perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenetic mechanism. *Teratology* **40**, 163-71.

**Bakri, Y., Sarrazin, S., Mayer, U. P., Tillmanns, S., Nerlov, C., Boned, A. and Sieweke, M. H.** (2005). Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate. *Blood* **105**, 2707-16.

**Bangs, F., Antonio, N., Thongnuek, P., Welten, M., Davey, M. G., Briscoe, J. and Tickle, C.** (2011). Generation of mice with functional inactivation of talpid3, a gene first identified in chicken. *Development* **138**, 3261-72.

**Boardman, P. E., Sanz-Ezquerro, J., Overton, I. M., Burt, D. W., Bosch, E., Fong, W. T., Tickle, C.,**

**Brown, W. R., Wilson, S. A. and Hubbard, S. J.** (2002). A comprehensive collection of chicken cDNAs. *Curr Biol* **12**, 1965-9.

**Chen, Y., Knezevic, V., Ervin, V., Hutson, R., Ward, Y. and Mackem, S.** (2004). Direct interaction with Hoxd proteins reverses Gli3-repressor function to promote digit formation downstream of Shh. *Development* **131**, 2339-47.

**Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A. and Martin, G. R.** (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* **84**, 127-36.

**Das, R. M., Van Hateren, N. J., Howell, G. R., Farrell, E. R., Bangs, F. K., Porteous, V. C., Manning, E. M., McGrew, M. J., Ohyama, K., Sacco, M. A. et al.** (2006). A robust system for RNA interference in the chicken using a modified microRNA operon. *Dev Biol* **294**, 554-63.

**Deppmann, C. D., Alvania, R. S. and Taparowsky, E. J.** (2006). Cross-species annotation of basic leucine zipper factor interactions: Insight into the evolution of closed interaction networks. *Mol Biol Evol* **23**, 1480-92.

**Dingerkus, G., and Uhler, L.D.** (1977) Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technol.* **52**. 229-32.

**Dupe, V., Ghyselinck, N. B., Thomazy, V., Nagy, L., Davies, P. J., Chambon, P. and Mark, M.** (1999). Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Dev Biol* **208**, 30-43.

**Ecevit, O., Khan, M. A. and Goss, D. J.** (2010). Kinetic analysis of the interaction of b/HLH/Z transcription factors Myc, Max, and Mad with cognate DNA. *Biochemistry* **49**, 2627-35.

**Flinterman, M., Guelen, L., Ezzati-Nik, S., Killick, R., Melino, G., Tominaga, K., Mymryk, J. S., Gaken, J. and Tavassoli, M.** (2005). E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **280**, 5945-5959.

**Flores, E. R., Tsai, K. Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F. and Jacks, T.** (2002). p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* **416**, 560-564.

**Fernandez-Teran, M. A., Hinchliffe, J. R. & Ros, M. A.** (2006). Birth and death of cells in limb development: a mapping study. *Dev. Dyn.* **235**, 2521–2537.

**Francis, J. C., Radtke, F. and Logan, M. P.** (2005). Notch1 signals through Jagged2 to regulate apoptosis in the apical ectodermal ridge of the developing limb bud. *Dev Dyn* **234**, 1006-15.

**Ganan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M. A. and Hurle, J. M.** (1996). Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* **122**, 2349-57.

**Hamburger and Hamilton.** (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* **88**, 49-92.

**Hamada, M., Nakamura, M., Tran, M. T., Moriguchi, T., Hong, C., Ohsumi, T., Dinh, T. T., Kusakabe, M., Hattori, M., Katsumata, T., et al.** (2014). MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis. *Nature communications* **5**, 3147.

**Hernandez-Martinez, R., Castro-Obregon, S. and Covarrubias, L.** (2009). Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development* **136**, 3669-78.

**Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N., Wagner, E. F.** (1993). c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* **365**. 179-81.

**Homburger, S. A. and Fekete, D. M.** (1996). High efficiency gene transfer into the embryonic chicken CNS using B-subgroup retroviruses. *Dev Dyn* **206**, 112-20.

**Hubbard, S. J., Grafham, D. V., Beattie, K. J., Overton, I. M., McLaren, S. R., Croning, M. D., Boardman, P. E., Bonfield, J. K., Burnside, J., Davies, R. M. et al.** (2005). Transcriptome analysis for the chicken based on 19,626 finished cDNA sequences and 485,337 expressed sequence tags. *Genome Res* **15**,

174-83.

**Hughes, S. H., Greenhouse, J. J., Petropoulos, C. J. and Sutrave, P.** (1987). Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors. *J Virol* **61**, 3004-12.

**Kataoka, K., Fujiwara, K. T., Noda, M. and Nishizawa, M.** (1994a). MafB, a new Maf family transcription activator that can associate with Maf and Fos but not with Jun. *Mol Cell Biol* **14**, 7581-91.

**Kataoka, K., Noda, M. and Nishizawa, M.** (1994b). Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol Cell Biol* **14**, 700-12.

**Kawakami, K. and Noda, T.** (2004). Transposition of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells. *Genetics* **166**, 895-9.

**Kelly, L. M., Englmeier, U., Lafon, I., Sieweke, M. H. and Graf, T.** (2000). MafB is an inducer of monocytic differentiation. *Embo J* **19**, 1987-97.

**Kim-Mitsuyama, S., Izumi, Y., Izumiya, Y., Namba, M., Yoshida, K., Wake, R., Yoshiyama, M., Iwao, H.** (2006). Dominant-negative c-Jun inhibits rat cardiac hypertrophy induced by angiotensin II and hypertension. *Gene Ther* **13**, 348-55.

**Kouwenhoven, E. N., van Heeringen, S. J., Tena, J. J., Oti, M., Dutilh, B. E., Alonso, M. E., de la Calle-Mustienes, E., Smeenk, L., Rinne, T., Parsaulian, L. et al.** (2010). Genome-wide profiling of p63 DNA-binding sites identifies an element that regulates gene expression during limb development in the 7q21 SHFM1 locus. *PLoS Genet* **6**, e1001065.

**Lecoin, L., Sii-Felice, K., Pouponnot, C., Eychene, A. and Felder-Schmittbuhl, M. P.** (2004). Comparison of maf gene expression patterns during chick embryo development. *Gene Expr Patterns* **4**, 35-46.

**Lengronne, A., Katou, Y., Mori, S., Yokobayashi, S., Kelly, G. P., Itoh, T., Watanabe, Y., Shirahige, K. and Uhlmann, F.** (2004). Cohesin relocation from site of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature* **430**, 573-8.

**Lindsten, T. and Thompson, C. B.** (2006). Cell death in the absence of Bax and Bak. *Cell Death Differ* **13**, 1272-6.

**Lussier, M., Canoun, C., Ma, C., Sank, A. and Shuler, C.** (1993). Interdigital soft tissue separation induced by retinoic acid in mouse limbs cultured in vitro. *Int J Dev Biol* **37**, 555-64.

**Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A. and Hurle, J. M.** (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* **124**, 1109-17.

**Mandal, C. C., Ganapathy, S., Gorin, Y., Mahadev, K., Block, K., Abboud, H. E., Harris, S. E., Ghosh-Choudhury, G. and Ghosh-Choudhury, N.** (2011). Reactive oxygen species derived from Nox4 mediate BMP2 gene transcription and osteoblast differentiation. *Biochem J* **433**, 393-402.

**Mariani, F. V., Ahn, C. P. and Martin, G. R.** (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature* **453**, 401-5.

**Mechta-Grigoriou, F., Giudicelli, F., Pujades, C., Charnay, P. and Yaniv, M.** (2003). c-jun regulation and

function in the developing hindbrain. *Dev Biol* **258**, 419-31.

**Melino, G., Lu, X., Gasco, M., Crook, T. and Knight, R. A.** (2003). Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci* **28**, 663-70.

**Mills, A. A., Zheng, B., Wang, X. J., Vogel, H., Roop, D. R. and Bradley, A.** (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**, 708-13.

**Morgan, B. A. and Fekete, D. M.** (1996). Manipulating gene expression with replication-competent retroviruses. *Methods Cell Biol* **51**, 185-218.

**Nishizawa, M., Fu, S. L., Kataoka, K. and Vogt, P. K.** (2003). Artificial oncoproteins: modified versions of the yeast bZip protein GCN4 induce cellular transformation. *Oncogene* **22**, 7931-41.

**Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J.** (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193-9.

**Ogino, H. and Yasuda, K.** (1998). Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-Maf. *Science* **280**, 115-8.

**Ogura, T.** (2002). In vivo electroporation: a new frontier for gene delivery and embryology. *Differentiation* **70**, 163-71.

**Pyati, U. J., Gjini, E., Carbonneau, S., Lee, J. S., Guo, F., Jette, C. A., Kelsell, D. P. and Look, A. T.** (2011). p63 mediates an apoptotic response to pharmacological and disease-related ER stress in the developing epidermis. *Dev Cell* **21**, 492-505.

**Rather, U., Garber, C., Komitowski, D., Muller, R., Wagner, E. F.** (1987). Deregulation of c-fos expression interferes with normal bone development in transgenic mice. *Nature* **325**, 412–6

**Robledo, R. F., Rajan, L., Li, X. and Lufkin, T.** (2002). The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev* **16**, 1089-101.

**Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Macias, D., Ganan, Y., Santesteban, E. and Hurle, J. M.** (1999). Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nat Cell Biol* **1**, 125-6.

**Ros, M. A., Piedra, M. E., Fallon, J. F. and Hurle, J. M.** (1997). Morphogenetic potential of the chick leg interdigital mesoderm when diverted from the cell death program. *Dev Dyn* **208**, 406-19.

**Salas-Vidal, E., Lomeli, H., Castro-Obregon, S., Cuervo, R., Escalante-Alcalde, D. and Covarrubias, L.** (1998). Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Exp Cell Res* **238**, 136-47.

**Sasaki, Y., Ishida, S., Morimoto, I., Yamashita, T., Kojima, T., Kihara, C., Tanaka, T., Imai, K., Nakamura, Y. and Tokino, T.** (2002). The p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway. *J Biol Chem* **277**, 719-24.

**Schnabel, D., Salas-Vidal, E., Narvaez, V., Sanchez-Carbente Mdel, R., Hernandez-Garcia, D., Cuervo, R. and Covarrubias, L.** (2006). Expression and regulation of antioxidant enzymes in the developing limb support a function of ROS in interdigital cell death. *Dev Biol* **291**, 291-9.

**Sen, C. K. and Packer, L.** (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J* **10**,

709-20.

**Shaulian, E. and Karin, M.** (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**, E131-6.

**Tang, M. K., Leung, A. K., Kwong, W. H., Chow, P. H., Chan, J. Y., Ngo-Muller, V., Li, M. and Lee, K. K.**

(2000). Bmp-4 requires the presence of the digits to initiate programmed cell death in limb interdigital tissues.

*Dev Biol* **218**, 89-98.

**Todt, W. L. and Fallon, J. F.** (1984). Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud.

*J Embryol Exp Morphol* **80**, 21–41.

**Todt, W. L. and Fallon, J. F.** (1986). Development of the apical ectodermal ridge in the chick leg bud and a

comparison with the wing bud. *Anat Rec* **215**, 288-304.

**Tumpel, S., Sanz-Ezquerro, J. J., Isaac, A., Eblaghie, M. C., Dobson, J. and Tickle, C.** (2002).

Regulation of Tbx3 expression by anteroposterior signalling in vertebrate limb development. *Dev Biol* **250**,

251-62.

**Urasaki, A., Morvan, G. and Kawakami, K.** (2006). Functional dissection of the Tol2 transposable element

identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for

transposition. *Genetics* **174**, 639-49.

**Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V. and Prives, C.** (2004). p73 induction after DNA damage is

regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev* **18**, 3041-54.

**Visel, A., Blow, M. J., Li, Z., Zhang, T., Akiyama, J. A., Holt, A., Plajzer-Frick, I., Shoukry, M., Wright, C.,**

**Chen, F. et al.** (2009). ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature* **457**, 854-8.

**Wang, C. K., Omi, M., Ferrari, D., Cheng, H. C., Lizarraga, G., Chin, H. J., Upholt, W. B., Dealy, C. N. and Kosher, R. A.** (2004). Function of BMPs in the apical ectoderm of the developing mouse limb. *Dev Biol* **269**, 109-22.

**Wang, Z., Young, R. L., Xue, H. and Wagner, G. P.** (2011). Transcriptomic analysis of avian digits reveals conserved and derived digit identities in birds. *Nature* **477**, 583-6.

**Wilkinson, D. G.** (1992). *In Situ Hybridization: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press/Oxford University Press.

**Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C. et al.** (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714-8.

**Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A. et al.** (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **404**, 99-103.

**Yao, J. Y., Pao, C. C. and Chen, J. K.** (2010). Transcriptional activity of TAp63 promoter is regulated by c-jun. *Journal of cellular physiology* **225**, 898-904.

**Yokouchi, Y., Sakiyama, J., Kameda, T., Iba, H., Suzuki, A., Ueno, N. and Kuroiwa, A.** (1996). BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development* **122**, 3725-34.

**Yokoyama, S., Ito, Y., Ueno-Kudoh, H., Shimizu, H., Uchibe, K., Albini, S., Mitsuoka, K., Miyaki, S.,**

**Kiso, M., Nagai, A. et al.** (2009). A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. *Dev Cell* **17**, 836-48.

**Zheng, T. S., Hunot, S., Kuida, K. and Flavell, R. A.** (1999). Caspase knockouts: matters of life and death. *Cell death and differentiation* **6**, 1043-1053.

**Zou, H. and Niswander, L.** (1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* **272**, 738-41.

**Zuzarte-Luis, V. and Hurle, J. M.** (2002). Programmed cell death in the developing limb. *Int J Dev Biol* **46**, 871-6.

<謝辞>

本研究は東京工業大学大学院の田中幹子研究室の皆様をはじめ、多くの方々の温かいご指導とご協力を得て行うことができました。

pCAGGS-T2TP および pT2AL200R150G プラスミドは国立遺伝学研究所・川上浩一教授より、RCAS ベクターはアメリカ国立がん研究所・Stephen H. Hughes 博士より、Maf プラスミドは奈良先端大学・安田國雄名誉教授より、pCAGGS-EGFP は大阪大学・宮崎純一教授と東北大学・小椋利彦教授よりご供与いただきました。

また、東北大学・小椋利彦教授、名古屋大学・鈴木孝幸助教、福島県立医科大学・渡邊裕二助教、熊本大学・横内裕二教授、アメリカ国立がん研究所・Bau-Lin Huang 博士には技術的なご助言をいただきました。

筑波大学・高橋智教授には、未発表データである MafB ノックアウトマウスをご供与いただきました。ウィスコンシン大学・John F. Fallon 博士には本研究をまとめるにあたり重要なご助言をいただきました。

本研究をおこなう上で公益財団法人日本科学協会の笹川科学研究助成金は大いに励みとなりました。

共著者である、東京工業大学・伊藤武彦教授、東京大学・中戸隆一郎助教、東京工業大学・白川大輔さん、東京大学・坂東優篤助教、東京大学・加藤由起助教、横浜市立大学・片岡浩介教授、東京大学・白髭克彦教授、バース大学・Cheryll Tickle 教授には本研究を完成させる上で本当に多大なるご助力を賜りました。

過去から現在まで、田中幹子研究室に在籍された皆様のおかげで、充実した研究生活

となりました。特に、研究の基礎を教えていただいた金沢一鬼丸康子先輩、同じニワトリ班として長く同席した植田翔悟君、同期であり研究者の手本でもあった鬼丸洗君に感謝いたします。

最後に、指導教官である東京工業大学の田中幹子准教授には、お忙しい中、実際の研究の手法から研究者の心得に至るまで、常に厳しくも温かいご指導ご鞭撻と格別のご助言を頂きましたことに深く深く感謝いたします。ここまで導いて頂いたこと本当にありがとうございました。

須田 夏野

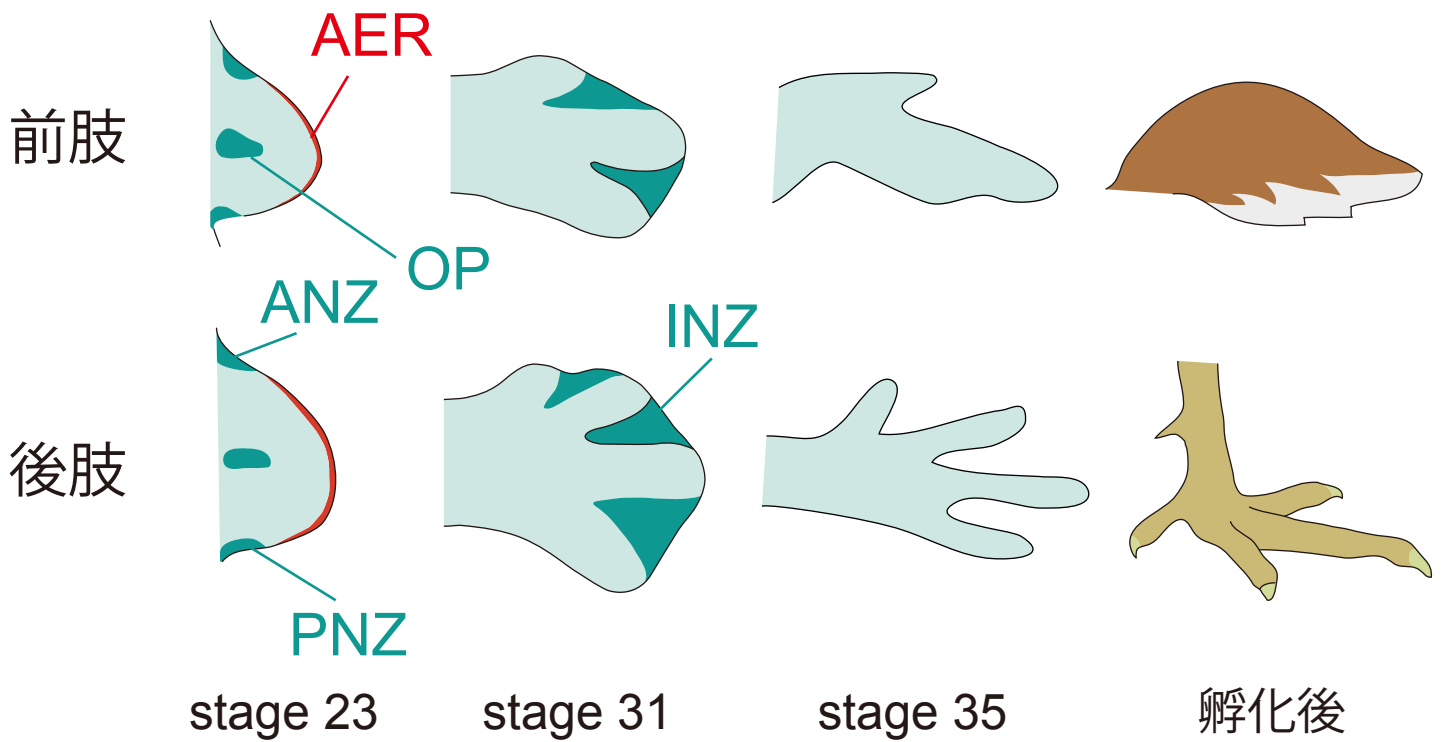
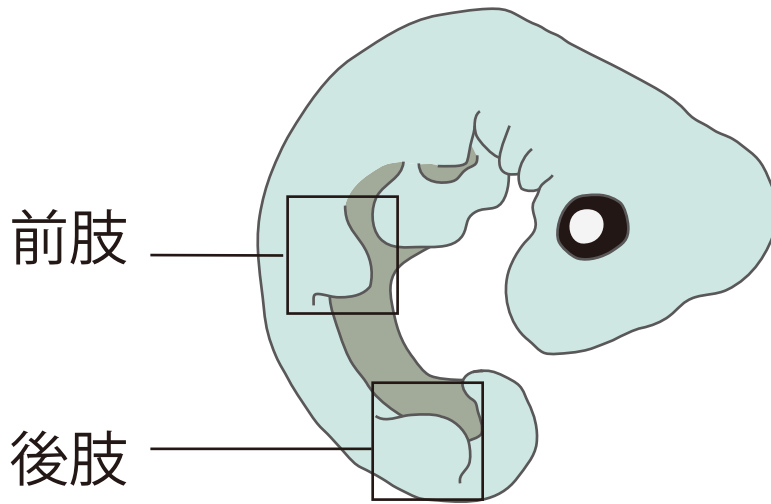


図1 ニワトリ胚肢芽での細胞死

ニワトリの胚発生においては、肢芽の間充織と外胚葉で細胞死が起きる。間充織には、前側壊死領域 (Anterior Necrotic Zone; ANZ)、後側壊死領域 (Posterior Necrotic Zone; PNZ)、Opaque Patch (OP)、指間壊死領域 (Interdigital Necrotic Zones; INZ) が存在する (Fernandez-Teran et al., 2006)。また特殊な肥厚した外胚葉である AER (apical ectodermal ridge) でも細胞死が起きる (Todt and Fallon, 1984)。

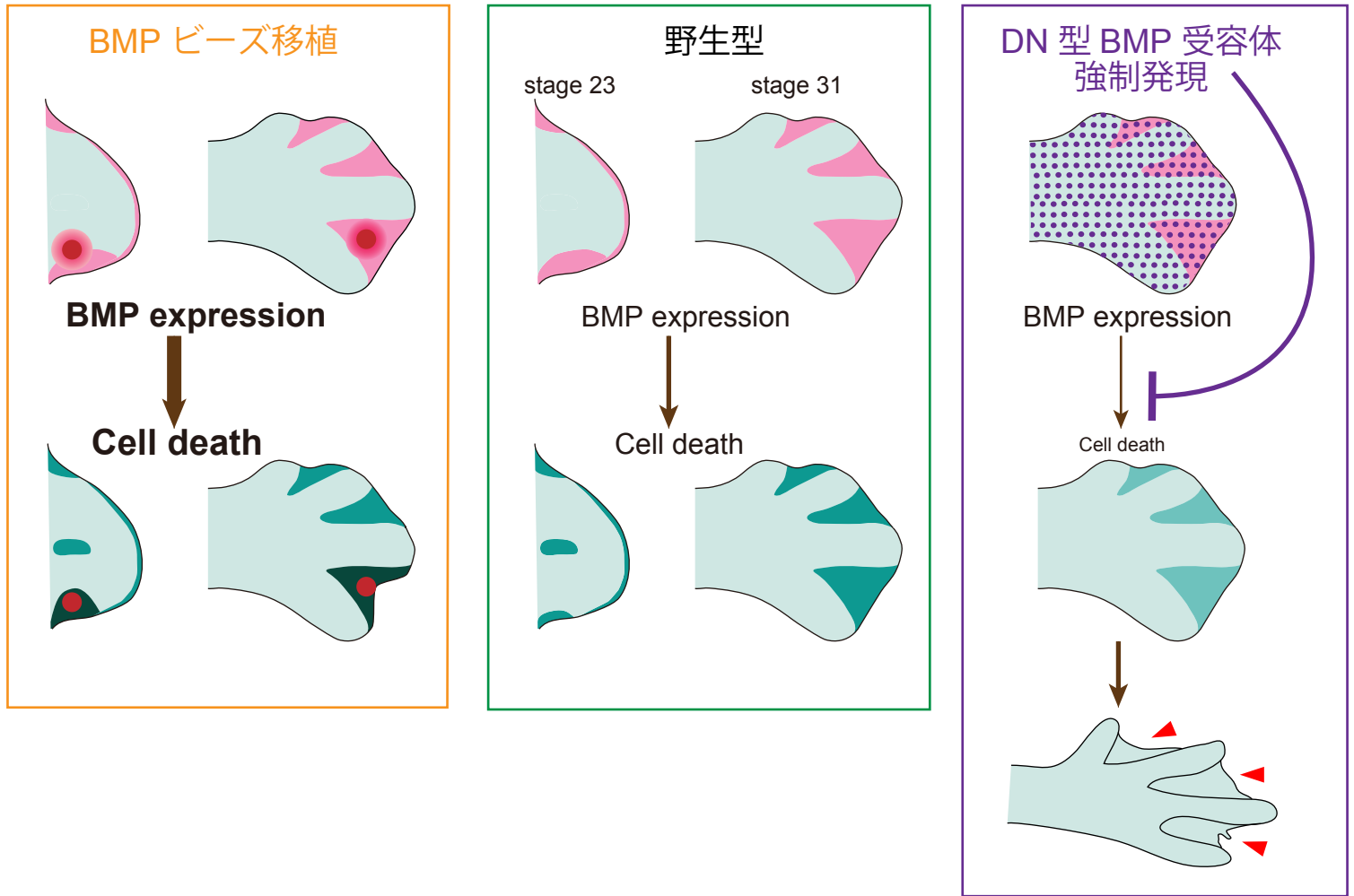


図 2 BMP シグナルとニワトリ胚肢芽での細胞死

ニワトリ胚肢芽の細胞死は、肢芽で発現する BMP によって制御されている (中央・緑の box; Ganan et al., 1996; Macias et al., 1997; Tang et al., 2000; Yokouchi et al., 1996; Zou and Niswander, 1996; Wang et al., 2004)。BMP タンパク質を染み込ませたビーズを肢芽の間充織に移植すると細胞死が促進される (左・橙の box; Macias et al., 1997)。細胞内のリン酸化ドメインを除去したドミナントネガティブ (Dominant negative; DN) 型の BMP 受容体をニワトリ胚の肢芽で強制発現させると INZ でのプログラム細胞死が抑えられ、水かきを持った肢ができる (右・紫の box; Yokouchi et al., 1996)。

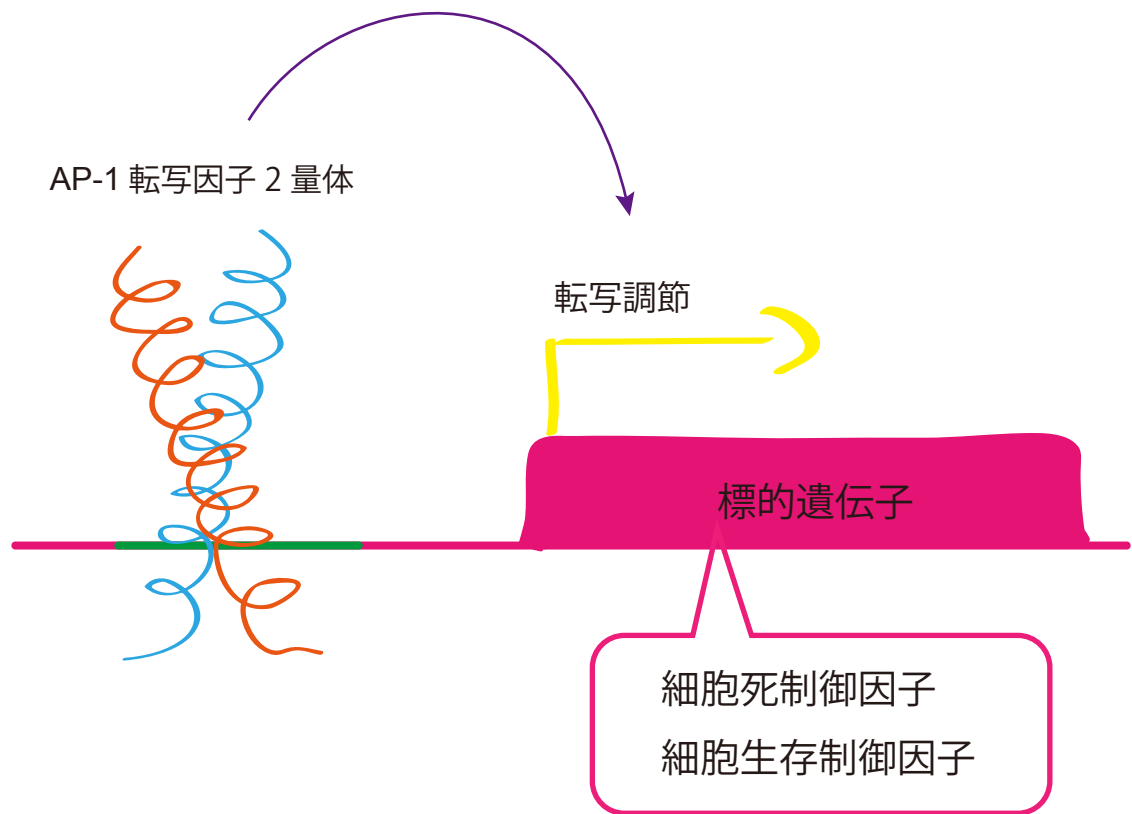


図 3 AP-1 転写因子

AP-1 転写因子群は群内の転写因子同士で、ホモ 2 量体、またはヘテロ 2 量体を形成し標的遺伝子の転写を調節する事が知られている (Shaulian and Karin, 2002)。AP-1 転写因子の標的遺伝子には、細胞死や細胞生存を制御する遺伝子が存在することが知られている (Shaulian and Karin, 2002)。

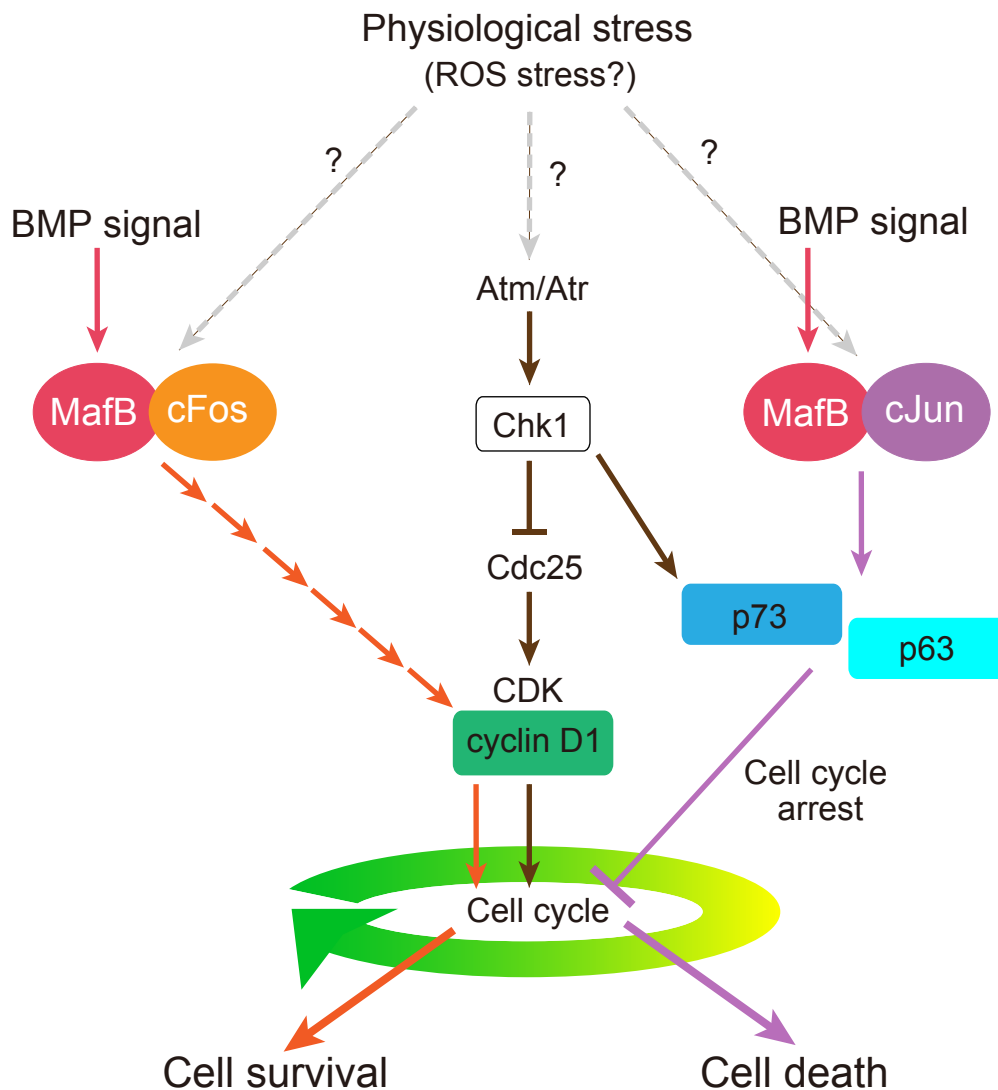


図 4 MafB/cFos、MafB/cJun によって胚芽における細胞死—細胞生存のバランスを調節している

MafB/cFos は *cyclin D1* の上流で発現を活性化し、ニワトリ胚芽のプログラム細胞死を負に制御する。一方で、MafB/cJun は *p63* や *p73* といった細胞周期を停止させ細胞死を誘導する因子の発現を直接活性化することで、ニワトリ胚芽のプログラム細胞死を正に制御している。BMP シグナルは MafB の発現を活性化する。ROS ストレスについても他の系で見られるように MafB や cFos、cJun の発現を活性化できる可能性があると思われる (Sen and Packer, 1996)。

表1. *in situ* ハイブリダイゼーション用プローブを作成する鋳型 cDNAs を得るためのプライマーおよび、ルシフェラーゼアッセイに用いた AP-1 結合サイトであるゲノム領域を得るためのプライマー一覧

Locus		sequence (5'→3')
<i>Crebzf</i>	Forward	ATGCGGCACAGCCTGACCCA
	Reverse	GAGCGCAGATGGAGCAGAAC
<i>JDP</i>	Forward	GAGTCCGAGCGCCTGGAGCTC
	Reverse	GGTCCATAGTTCCCAAGGAAG
<i>MafF</i>	Forward	TGTCGAGTGAAGCGTGTCTGCC
	Reverse	GCTCACCTCAACCTGCAGCCAC
<i>MafG</i>	Forward	AGCTGGTGACCATGTCTGTGC
	Reverse	AGAGCGATCAGCAGGCCAGTC
<i>MafK</i>	Forward	AGTGCTGAGCGATGATGAACTCG
	Reverse	AGATGCCAATTCTTGACGTGACC
<i>TEF</i>	Forward	TGACTTATCTGATTCCGAGTG
	Reverse	TACAACCTTATTCTACTGCAGG
<i>p63</i>	Forward	GCTTCCAGTAGCATCACATACC
	Reverse	CTACACAGCTGCTGCTGTTACACATG
<i>p73</i>	Forward	CAATGGGACCTGGAATGCTG
	Reverse	AATTATGCATCTCTCCAGATGCTC
<i>Chk1</i>	Forward	ATCGACTCTGCACCATTAGC
	Reverse	TGGGTGCTGACCACGTCGCTCAG
<i>STAT5B</i>	Forward	AGTCGGTGACGGAGGAGAAGTTC
	Reverse	CACGTACCCATCCACAGCTTTAG
<i>cyclin D1</i>	Forward	GCTGTAGCGGCAGTAGCAGC
	Reverse	ATGTGTGAGGCATTGATAGG
<i>cyclin D3</i>	Forward	TTACTGTGGAGAAGCTCTGC
	Reverse	GGCTGCCTCAATCTGCTCCTGAC
<i>DAPK1</i>	Forward	GCTTCTCCGAAATCACTTACAAG
	Reverse	CCTTGAATCCGCAGAGTGAAGTC
BS- <i>cyclinD1</i>	Forward	ACTGGCCGGTACCTGCTCGAGATTACTATTATTACGTATTATTG
	Reverse	TCCTCGAGGCTAGCGGATATCCTTACTACAATTGTTCCACCCC
BS- <i>p63</i>	Forward	CCGGATATCCCTTGAGGGACACAGTTGCACAG
	Reverse	CCGCTCGAGGGCAGCTCGGAGCTAATGGCACC
BS- <i>p73</i>	Forward	CCGGATATCGGTAGAGTCCAGATGAGTCTGTG
	Reverse	CCGCTCGAGCTGTCAGGCATGTCTTCACTGAC