

氏名	こ いで てつ や 小 出 哲 也
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2408 号
学位授与の日付	平 成 13 年 11 月 26 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	RAR シグナルの抑制は頭部形成過程に必須である

論文調査委員 (主査) 教授 竹市雅俊 教授 上村 匡 教授 七田芳則

論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の初期原腸胚をレチノイン酸 (RA) で処理すると頭部が欠損し、後方の神経マーカーの発現が誘導されることから RA は後分化因子として知られている。RA はレチノイン酸レセプター (RAR) に結合し転写を活性化することが知られているが、何故、頭部の縮小、欠損を誘導するのか全く分かっていなかった。

近年、RAR を含む核内レセプターはリガンド存在下でコアクチベーターと結合して転写を活性化し、リガンド非存在下ではコリプレッサーと結合し転写を抑制することが明らかになった。しかしながら、転写抑制について分子レベルでの理解は進んでいるが、実際に生体内での必要性を示唆するデータは少ない。本論文では、生体内での RAR による転写抑制が頭部形成過程に必須であることを報告している。

申請者は、アフリカツメガエル胚における RAR の転写抑制の有無を調べるため、GAL4DNA 結合ドメインと RAR のリガンド結合ドメインの融合タンパク (GAL4-RAR)、及びそのルシフェラーゼレポーターを用いて予定頭部領域にマイクロインジェクションを行い、初期神経胚でのルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、RAR は初期胚において基本転写活性を約1/5に抑制することを見出した。次に、申請者はドミナントネガティブなコリプレッサー (c-SMRT) を胚に過剰発現することによって、RA 処理と同様に頭部の欠損が起こることを形態的にも分子的にも明らかにした。これにより、転写活性化ではなく、転写抑制の解除が頭部の欠損を誘導するのに十分であることを証明している。さらに申請者は、内在の RAR mRNA の翻訳を阻害するモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) の過剰発現によって、RA 処理胚と同様な頭部欠損が引き起こされることを示し、c-SMRT の表現型が RAR を介するものであることを確認した。

RAR の転写抑制の解除が、頭部の欠損及び前方マーカーの発現レベルの減少を招いたことから、転写抑制の増強は逆の効果をもつことが考えられた。これを検証するために、申請者はアゴニストとは逆の作用を持ち、転写抑制の増強をもたらすことが可能な合成レチノイド AGN 処理胚によって、頭部の肥大、前方マーカーの発現レベルの上昇を明らかにした。つまり、RAR の転写抑制の解除が頭部を欠損させ、RAR による転写抑制の増強が前方マーカーの発現を増加させることが判明した。

以上の研究により、申請者は RA 処理胚の頭部欠損を誘導する機構が、従来考えられていた転写活性化ではなく転写抑制の解除によるものであること、この転写抑制が正常な頭部の形成に必須であることを初めて明らかにした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

脊椎動物の胚を初期原腸胚期にレチノイン酸 (RA) 処理すると頭部が欠損し、後方の神経マーカーの発現が誘導される。この観察から RA は後分化因子として知られてきた。RA はレチノイン酸レセプター (RAR) に結合し転写を活性化するが、どのように頭部の縮小、欠損を引き起こすのか全く分かっていなかった。一方、RAR を含む核内レセプターはリガンド存在下でコアクチベーターと結合して転写を活性化し、リガンド非存在下ではコリプレッサーと結合し転写を抑制するこ

とが知られるようになった。しかしながら、転写抑制について分子レベルでの理解は進んでいるが、この機構の生体内における必要性を論ずる研究は少ない。本論文は、アフリカツメガエル胚を用い、生体内での RAR による転写抑制が頭部形成にとって必須であることを示した初めての報告である。

まず申請者は、リポーターアッセイを用い、RAR が初期胚において basal promoter 活性を抑制することを発見した。次に、ドミナントネガティブ・コリプレッサー (c-SMRT) を胚に過剰発現することにより、RA 処理と同様に頭部の欠損が誘導されることを形態的・分子的に明らかにした。この結果は、RAR・コリプレッサー複合体による転写抑制が生体内で実際に機能していることを初めて示したという点で重要な発見である。申請者は、さらに内在の RAR の翻訳を阻害するモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) の過剰発現によって、RA 処理胚と同様な頭部欠損が引き起こされることを分子マーカーを使って示した。この結果は、転写活性化ではなく、転写抑制の解除が頭部の欠損を誘導するのに十分であることを初めて証明したものである。

次に申請者は、RAR の転写抑制の解除が、頭部の欠損及び前方マーカーの発現レベルの減少を招いたことから、転写抑制の増強は逆の効果をもつと考えた。これを検証するために、アゴニストとは逆の作用を持ち、転写抑制の増強をもたらすことが可能な合成レチノイド AGN193109 を用いた。そして、AGN193109 処理胚によって、頭部の肥大、前方マーカーの発現レベルの上昇を明らかにしている。つまり、RAR の転写抑制の解除が頭部を欠損させ、RAR による転写抑制の増強が前方マーカーの発現を増加させたわけである。これは、内在の RAR の転写抑制の程度が前方マーカーの正常な発現に必須であることを示唆している。

RA 処理胚の頭部欠損を誘導する機構が、従来考えられていた転写活性化ではなく転写抑制の解除によるものであることを明らかにしたこの研究は、初期発生におけるコリプレッサーの機能、及び生体内での RAR の転写抑制機構の重要性を指摘した初めての報告である。

よって申請論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認められる。なお、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について諮問した結果、申請者の高い学識と研究能力を十分評価することができ、合格と認めた。