

氏名	はな 花	ふさ 房	ひろし 洋
学位(専攻分野)	博士(理学)		
学位記番号	理博第2364号		
学位授与の日付	平成13年3月23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	TGF- β ファミリー activin によって誘導される遺伝子 <i>derriere</i> と <i>Sprouty</i> の機能解析		

論文調査委員 (主査) 教授 西田 栄介 教授 竹市 雅俊 教授 七田 芳則

論文内容の要旨

学位論文題目：TGF- β ファミリー activin によって誘導される遺伝子 *derriere* と *Sprouty* の機能解析

論文内容の要旨

初期発生において重要な TGF- β ファミリーの一つ activin が誘導する遺伝子を、サブトラクティブスクリーニングにより単離することを試みた。その結果単離された2つの遺伝子 *derriere* と *Sprouty* について解析を行った。

第1部において、TGF- β ファミリーに属する遺伝子 *derriere* の左右軸形成における機能を解析した。*derriere* を初期胚の右側に異所的に発現させると、心臓や腸の左右軸が完全に逆転した。また神経胚期に左側に左右非対称に発現がみられる遺伝子 *Xnrl* の発現パターンも右側へと逆転していた。さらにプロセッシング不能型 *derriere* (Cm-*derriere*) が、野生型 *derriere* に対し優勢不能型として機能することを明らかにし、Cm-*derriere* を初期胚の左側に発現させると左右軸がランダムになることが示された。これらのことから *derriere* は *Xenopus* 初期胚の左側で左右軸形成に関与していることが示唆された。さらに Cm-*derriere* は、Vg-1 による二次軸形成や中胚葉遺伝子の発現誘導は阻害しないにも関わらず、Vg-1 によって誘導される左右軸反転を阻害することがわかった。*derriere* の発現は Vg-1 によって誘導されることから、*derriere* は左右軸形成の初期過程において、Vg-1 の下流、*Xnrl* の上流で“左”を決定するのに関与している可能性が明らかとなった。

第2部において、近年 *Drosophila* で FGF シグナルのインヒビターとして同定された遺伝子 *Sprouty* の、*Xenopus* ホモログ (xSpry) の単離と機能解析を行った。xSpry は、原腸胚期には帯域部分に、神経胚期には神経板の後方に、尾芽胚期には尾部と頭部に発現がみられた。また FGF 刺激により xSpry の発現が誘導された。xSpry を *Xenopus* 初期胚に異所的に発現させると、優勢不能型 FGF レセプター (XFD) を発現させた時と同様、背中が開いたままで後部構造を欠失した表現型を示した。またアニマルキャップアッセイによる解析から、xSpry は FGF シグナル経路の Ras より上流、FRS2, Shp2 より下流で、FGF シグナルを阻害していることが示唆された。

Spry は Negative Feedback 機構に関与していると考えられるが、分子メカニズムについては明らかにされていなかった。そこで Spry の作用機序の解明を試みた。その結果、Spry は FGF 刺激依存的に種間で保存されたチロシン残基がリン酸化され、Grb2 と結合することが明らかとなった。Spry は Grb2 と結合することで、Ras 活性化因子 Sos の FRS2/Grb2 あるいは Shp2/Grb2 複合体へのリクルートを阻害し、結果として RTK シグナルを阻害することが明らかとなった。またチロシンフォスファターゼ Shp2 が、FGF 刺激によってリン酸化された Spry の Tyr 残基を脱リン酸化し、Spry の阻害活性を消失させることが明らかになった。以上の結果から、Spry は刺激によるチロシンリン酸化と Shp2 による脱リン酸化という翻訳後修飾によって阻害活性が調節され、RTK シグナルの制御をとおして、MAPK の活性化時間をコントロールしていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

初期胚における左右軸の形成メカニズムは、前後軸、背腹軸に比べ、解析が遅れていたが、最近ようやく分子レベルでの解析が進みはじめた。申請者は、*Xenopus* 初期胚のシステムを用い、 $TGF\beta$ ファミリーのひとつである *derriere* が左右軸形成の初期過程に関与していることを明らかにした。これまで左右非対称性の確立する過程は詳細な研究が行われてきたが、左右非対称性の獲得に関しては、ほとんど明らかにされていなかった。*derriere* は、左右軸形成の非常に初期の過程に関与しており、左右非対称性獲得のメカニズム解明について貢献するところが大きい。

次に申請者は、*Xenopus Sprouty* (xSpry) の単離と解析を行い、*Sprouty* が種を越えて保存された、RTK シグナルのインヒビターであることを明らかにした。さらに培養細胞を用いた分子細胞生物学的手法により、*Sprouty* が新しいタイプの Negative Feedback Regulator であることを明らかにした。これまでに知られている Negative Feedback Regulator は、恒常的に阻害活性を持つためその発現調節が阻害活性の唯一の制御手段であった。これに対し申請者は、*Sprouty* が刺激依存的なチロシンリン酸化という翻訳後修飾によって、阻害活性が制御されていることを明かにした。さらにチロシンフォスファターゼ Shp2 が、*Sprouty* を脱リン酸化することも見い出した。このように *Sprouty* の阻害活性がリン酸化/脱リン酸化によって制御されることは、シグナルの素早い遮断と、次のシグナルに対する応答能の素早い回復が可能となる。本研究は新しいタイプの Negative Feedback 機構を提唱し、細胞内情報伝達機構の解明にむけ非常に大きな貢献を果たしたと考えられる。

以上本申請論文は、左右軸形成過程における *derriere* の機能解析と、新しいタイプの Negative Feedback 機構における *Sprouty* の機能解析を行ったものであり、博士(理学)の学位論文として十分に価値あるものとして認められる。

なお、平成13年2月5日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。