

氏 名	佐 藤 ゆ た か
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2079 号
学位授与の日付	平 成 11 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	ホヤ胚における局在 mRNA をコードする母性遺伝子の研究 : <i>posterior end mark 3 (pem-3)</i> は KH ドメインを持つタンパク質をコードする

(主査)

論文調査委員	教 授 佐 藤 矩 行	教 授 米 井 脩 治	教 授 堀 道 雄
--------	-------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

ホヤは典型的なモザイク的発生を行う動物として知られており、幼生のいくつかの組織は卵内に存在する母性因子によって自律的に分化する。特に受精卵の植物半球後極の細胞質に局在する母性因子は筋肉細胞の分化および胚の前後軸決定に必須であることが明らかにされている。従って、ホヤ卵内に局在する分子の同定、これら分子の局在機構およびその機能の解明は、ホヤ胚発生を分子レベルで理解するために必須である。そこで本研究では、母性に発現し、そのmRNAが局在する遺伝子を同定する目的で、ユウレイボヤ (*Ciona savignyi*) の受精卵RNAを用い、原腸胚RNAとのサブトラクティブハイブリダイゼーションによるcDNAライブラリーを作製した。そして、このライブラリーからランダムにcDNAクローンを選び、そのmRNAが局在するものであるかどうかを調べることによって、母性に発現している新規遺伝子 *posterior end mark 3 (pem-3)* を単離した。*pem-3* の母性mRNAは、すでに報告されている *pem* mRNAと同じく、受精後に卵の植物半球後極に局在を始め、その後の胚発生において、胚の最後部に位置するB7.6系列の細胞へと受け継がれていくことがわかった。大腸菌で発現させたタンパク質をもとに抗体を作製し、PEM-3タンパク質の発生にともなう局在性を調べたところ、初期胚においてはPEM-3タンパク質も最後方の割球に局在するように発現していた。また、*pem-3* mRNAおよびそのタンパク質のザイゴティックな発現が神経板期以降に神経板、間充織および表皮細胞の一部の細胞で認められた。塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、PEM-3が2つのKHドメインを持つRNA結合タンパク質であることを示唆する。PEM-3アミノ酸配列は特に*C.エレガンス*の筋肉細胞分化に関与するMEX-3との類似性が高く、ホヤ筋肉細胞分化への関与が期待されたが、*pem-3* 母性mRNAの機能阻害実験の成功には至らなかった。しかしアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてザイゴティックなmRNAの機能を阻害したところ、筋肉細胞・表皮細胞・内胚葉細胞の分化には影響を与えないものの、色素細胞を欠く幼生が生じ、PEM-3が神経系の発生において機能していることが示唆された。こうした分子の探索は、今後ホヤの発生を初めとして、動物の初期発生における母性因子の分子の実体とその作用機構を理解するために重要であると思われる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ホヤの未受精卵には、筋肉細胞・表皮細胞・内胚葉細胞の分化や胚の軸形成に関わる細胞質因子(決定因子)が存在することが明らかになっている。特に受精卵の後極に局在する決定因子は筋肉細胞分化や軸形成に関わることが示されているが、その分子の実体についてはまだほとんど不明である。申請者は特に筋肉細胞分化決定因子に注目し、①筋肉細胞で特異的に発現する構造遺伝子の上流解析からトランス因子の同定という方法と、②局在する母性mRNAをコードする遺伝子を単離しその標的遺伝子を探るという方法でアプローチしてきた。①については、筋肉アクチン遺伝子の特異的発現に関わる調節

領域の解析から、転写開始点から上流-103から-66の間に2つの重要なシス・エレメントが存在し、そこに核タンパク質が特異的に結合することを見出している。本申請論文は②の一部を占めるものである。申請者は受精卵mRNAと囊胚mRNAのサブトラクションによって受精卵mRNA特異的cDNAライブラリーを作製した。その中から局在するmRNAを解析した結果、*pem-2* ~ *pem-6* の5つの局在mRNAをコードする遺伝子のcDNAクローンの単離に成功した。申請論文では特に *pem-3* の解析を行っている。*pem-3* はRNA結合能を有するKHドメインをもつタンパク質 (PEM-3) をコードする。PEM-3はC. エレガンスの筋肉細胞分化に関わるMEX-3と類似性が高いことから、*pem-3* がホヤの筋肉細胞分化に関わることが期待されたが、*pem-3* 母性mRNAの機能を探索することが現時点では不可能なため、その点については不明である。しかしながら、ザイゴティックなmRNAの機能阻害実験から、この遺伝子が神経系の分化に関与していることを示した。本研究の成果発表に至るまでの、新規遺伝子の単離、抗体の作製、機能阻害実験、論文の作成など申請論文の内容は申請者の十分な研究能力を示していると判断された。

申請者はその後も発現ベクターにより筋肉細胞分化に関わる母性mRNAの単離なども試みており、その研究態度は意欲的であると評価される。このことは申請者がすでに申請論文を含めて7編の論文を公表していることから判断される。

また申請者はすでに自己の業績を中心にした総説も公表しており、自身の研究の位置づけも十分なされていると判断された。よってこの論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認めた。

なお本論文および参考論文に示されている研究業績の他、関連する諸分野について試問を行った結果、合格と認めた。