

氏 名	佐 藤 薫
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2654 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	Isolation and characterization of β -catenin downstream genes in early embryos of the ascidian <i>Ciona savignyi</i> . (ホヤ初期発生における β カテニンの役割: β カテニン標的遺伝子の同定と解析) (主 査)
論文調査委員	教 授 佐 藤 矩 行 教 授 米 井 脩 治 教 授 西 田 利 貞

論 文 内 容 の 要 旨

ホヤ幼生の筋肉、表皮、内胚葉の分化は母性の決定因子によって自律的に起こるが、脊索や間充織などの中胚葉組織の分化には内胚葉からの誘導が必要であることが示されている。申請者はホヤ胚を研究材料にして、内胚葉分化や中胚葉誘導などをつかさどる一連の遺伝子カスケードを明らかにしたいと考え次のような研究を進めた。申請者はまず、ユウレイボヤの内胚葉分化には β -カテニンの働きが必須であることを明らかにした。すなわち母性に供給された β -カテニンタンパク質は32細胞期までに植物極側割球の核に移行し、 β -カテニンを過剰発現させると筋肉（筋肉は自律的に分化する）以外のすべての組織が内胚葉に分化し、逆にカドヘリンを過剰発現させることにより β -カテニンの核移行を阻害すると、筋肉以外のすべての組織が表皮に分化する。

そこで、 β -カテニンの下流で内胚葉分化や内胚葉から中胚葉への誘導に働く遺伝子を単離する目的で、 β -カテニン過剰発現胚と β -カテニン機能抑制胚との間でサブトラクションを行い、計13個の β -カテニン下流遺伝子を同定した。これらの遺伝子はすべて16細胞期から110細胞期までの間に内胚葉を含む植物極側の細胞で発現し、 β -カテニン過剰発現胚では異所的な発現が誘導され、 β -カテニン抑制胚では発現が抑制される。これら13個の遺伝子とは、*Cs-netrin*, *frizzled*, *Cs-ephrin*, *type2cadherin*, *protocadherin*, *Cs-ZicL*, *Cs-FoxD*, *Cs-FoxA5*, *Cs-otx*, *Cs-TTF1*, *Cs-lhx3*, *Cs-FGF4/6/9* と新奇遺伝子1つである。

申請者はさらに、このうちの *Cs-lhx3*, *Cs-FGF4/6/9*, *Cs-ZicL*, *Cs-FoxD* について機能解析を行っている。*Cs-FoxD* は forkhead ドメインを持つ転写因子で16細胞期では植物極側のほとんどの割球で発現し、32細胞期では予定内胚葉割球で発現しその後発現は消失する。*Cs-FoxD* の転写開始点から1138bp 上流領域には TCF 結合配列が3つ存在し、上流解析実験の結果からこれらの配列は *Cs-FoxD* の発現に不可欠である。すなわち *Cs-FoxD* が β -カテニンの直接のターゲット遺伝子であることを示している。*Cs-FoxD* の機能をアンチセンスモルフォリノで阻害すると、脊索細胞が全く分化せず、予定脊索細胞は内胚葉細胞へと分化していた。また、A-line の神経索も分化しない。したがって、*Cs-FoxD* は主に植物極前方の割球の specification に関わっていると思われる。次に、Zinc finger 転写因子をコードする *Cs-ZicL* は32細胞期から予定脊索細胞と筋肉割球で発現を始めるが、*Cs-ZicL* の A-line の脊索細胞での発現は *Cs-FoxD* の下流であることが明らかになった。*Cs-ZicL* の機能をモルフォリノで阻害すると B-line の脊索細胞は分化するが、A-line の脊索細胞は分化せず、ホヤ胚の脊索形成のマスター遺伝子である *Brachyury* の発現も抑制される。つまりこれまでのところ A-line の脊索細胞に関しては、 β -カテニン $\rightarrow$ *Cs-FoxD* $\rightarrow$ *Cs-ZicL* $\rightarrow$ *Brachyury* $\rightarrow$ A-line の脊索細胞分化というカスケードが明らかになりつつある。

また *Cs-ZicL* の機能をモルフォリノで阻害すると A-line の神経索細胞も分化しないことが分かった。つまり A-line の神経索においても β -カテニン $\rightarrow$ *Cs-FoxD* $\rightarrow$ *Cs-ZicL* というカスケードが存在していることを示している。一方、*Cs-FGF4/6/9* は16細胞期から予定内胚葉と脊索割球で発現し、機能阻害実験は *Cs-FGF4/6/9* が間充織細胞の誘導に必要・

十分であることを示している。しかし、機能阻害実験によっても脊索細胞分化は完全には抑制されず、他の誘導因子が必要である可能性を示している。*Cs-FGF4/6/9*と*Cs-FoxD*、および*Cs-FGF4/6/9*と*Cs-ZicL*の発現は互いに非依存的なので、これらのパスウェイは独立に働いていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

多くの動物の初期発生において、まず内胚葉が自律的に分化し、続いて内胚葉が中胚葉を誘導することが明らかにされている。従って、この過程にどのような分子・遺伝子が働いているかを明らかにすることは現代発生生物学の大きな研究課題の一つである。申請者はホヤを材料にして、ホヤという実験系の特徴を生かし、母性に供給された β -カテニンに始まり幾つかの転写因子をコードする遺伝子の働きを通して中胚葉が誘導される過程を精力的に明らかにしている。

申請者はまず、母性に供給された β -カテニタンパク質が32細胞期までに植物極側割球の核に移行し、 β -カテニンを過剰発現させると筋肉以外のすべての組織が内胚葉に分化し、逆に β -カテニンの核移行を阻害すると筋肉以外のすべての組織が表皮に分化することから、ユウレイボヤの内胚葉分化には β -カテニンの働きが必須であることを明らかにした。そこで、 β -カテニンの下流で内胚葉分化や内胚葉から中胚葉への誘導に働く遺伝子を単離する目的で、 β -カテニン過剰発現胚と β -カテニン抑制胚との間でサブトラクションを行い、計13個の β -カテニン下流遺伝子を同定した。これら13個の遺伝子には、*Cs-netrin*, *frizzled*, *Cs-ephrin*, *type2cadherin*, *protocadherin*, *Cs-ZicL*, *Cs-FoxD*, *Cs-FoxA5*, *Cs-otx*, *Cs-TTF1*, *Cs-lhx3*, *Cs-FGF4/6/9*と新奇遺伝子1つが含まれ、これらの遺伝子はすべて16細胞期から110細胞期までの間に内胚葉を含む植物極側の細胞で発現し、 β -カテニン過剰発現胚などの実験から、 β -カテニンの下流で発現することを明らかにした。この研究成果は両生類などで、数個の β -カテニン標的遺伝子が明らかにされているだけの今日の研究状況で高く評価されるべきものである。

申請者はさらに*Cs-lhx3*, *Cs-FGF4/6/9*, *Cs-ZicL*, *Cs-FoxD*について機能解析を行い、まず*Cs-lhx3*が内胚葉の分化に必須であることを示した。続いて*Cs-FoxD*を解析し、*Cs-FoxD*の上流解析から*Cs-FoxD*が β -カテニンの直接のターゲット遺伝子であることを示した。*Cs-FoxD*は16細胞期および32細胞期の植物極側の割球で一過的に発現するが、*Cs-FoxD*の機能をアンチセンスモルフォリノで阻害すると脊索細胞は全く分化せず、この遺伝子が脊索細胞の分化に重要な働きをしていることを明らかにした。次に*Cs-ZicL*は32細胞期から予定脊索細胞と筋肉割球で発現を始め、A-lineの脊索細胞での発現は*Cs-FoxD*の下流であること、機能をモルフォリノで阻害するとB-lineの脊索細胞は分化するが、A-lineの脊索細胞は分化せず、ホヤ胚の脊索形成のマスター遺伝子である*Brachyury*の発現も抑制されることを見いだした。したがってA-lineの脊索細胞に関して β -カテニン $\rightarrow$ *Cs-FoxD* $\rightarrow$ *Cs-ZicL* $\rightarrow$ *Brachyury* $\rightarrow$ A-lineの脊索細胞分化というカスケードを明らかにした。

さらに*Cs-FGF4/6/9*は16細胞期から予定内胚葉と脊索割球で発現し、機能阻害実験は*Cs-FGF4/6/9*が間充細胞の誘導に必要かつ十分であることを示している。しかし、機能阻害実験によっても脊索細胞分化は完全には抑制されず、他の誘導因子が必要である可能性を示している。

申請者の学位申請論文は、 β -カテニン標的遺伝子の単離・同定を中心にまとめたものである。申請者はさらにこれらの遺伝子の機能に関連した一連の論文をこの研究分野では最もレベルの高い国際誌に公表し、 β -カテニンに始まって転写因子遺伝子の働きを経て中胚葉の誘導の主流を明らかにしたことは、国際的にも高い評価を得ている。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認めた。なお、論文に報告されている研究業績を中心に関連分野に関する試問を行った結果、適切な解答が得られたので合格と認めた。