

氏 名	ほつ た こう じ 堀 田 耕 司
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2512 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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	カタユウレイボヤ <i>Brachyury</i> 下流遺伝子群の解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 佐 藤 矩 行 教 授 米 井 脩 治 教 授 今 福 道 夫

論 文 内 容 の 要 旨

最近の研究から、転写因子をコードする遺伝子やシグナル分子をコードする遺伝子が動物の発生に重要な働きを担うことが明らかにされている。現代発生生物学のもっとも重要な研究課題の一つは、これらの遺伝子の機能のカスケードを解明することである。本論文においては、*Brachyury* 遺伝子の機能カスケードを追跡している。*Brachyury* は T ドメインと呼ばれる DNA 結合能を持つ転写制御因子をコードしており、脊索動物の脊索の形成や体軸の伸長に必須であることが多くの動物において示されている。ホヤではこの遺伝子を過剰発現させると異所的な脊索の形成が起こることなどから、*Brachyury* が下流の脊索形成のための構造遺伝子の転写を活性化していると考えられる。

本論文ではまず、カタユウレイボヤの *Brachyury* (*Ci-Bra*) 過剰発現胚を駆使したサブトラクション法により、*Ci-Bra* の下流候補遺伝子を923クローン単離した。そしてその中から *Ci-Bra* によって転写が活性化される独立な cDNA クローンを絞り込み、さらにこれらの遺伝子すべてにつきその発現パターンを解析した結果、脊索で特異的もしくは優勢に発現する39の遺伝子の cDNA クローンの単離に成功した。さらに、その中の20について cDNA の全長の塩基配列を決定して、これらの遺伝子がコードするタンパク質の特徴付けを行った。その結果、*Ci-Bra* 下流遺伝子として、ショウジョウバエの *prickle* 相同遺伝子やトロポニン様遺伝子などが同定された。それらの細胞機能は実に多様であり、脊索形成のいろいろな過程で機能していると思われることがわかった。また、これまでに報告のない新規遺伝子も数個含まれていた。

また、脊索は神経の誘導や隣接する筋肉や内胚葉の形成にも重要な役割を担うことが知られているが、本論文では、*Ci-Bra* 下流で神経系に特異的に発現する9つの遺伝子の全長塩基配列決定も行っており、それらの多くはこれまで知られている神経特異的タンパク質をコードしていることを明らかにしている。さらに脊索で発現する以外の遺伝子クローンについても網羅的に調べ、その結果、サブトラクションライブラリーでは正常胚ライブラリーに比べ、細胞間コミュニケーションに関わる遺伝子群の割合が増加していることなどがわかった。

本論文ではさらに、現在進行中のカタユウレイボヤ・ゲノムプロジェクトのデータベースを利用して、*Ci-Bra* の下流の遺伝子の多くに、その発現調節領域中に T ドメインの結合配列が存在することを明らかにしている。このように、本研究によって、*Ci-Bra* 遺伝子カスケードに関わる遺伝子群を解明する足がかりができたといえる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

さまざまな動物の突然変異体の解析から動物の発生に重要な働きを担う転写因子をコードする遺伝子の存在が明らかにされているが、これらの転写制御因子遺伝子が実際どのように働いてその機能を果たすのかについては不明な点が多く、この解明が現代発生生物学のもっとも重要な研究課題の一つとなっている。

Brachyury 遺伝子は T と呼ばれる新規の DNA 結合ドメインを持つ転写制御因子をコードする。ホヤではこの遺伝子は脊索でのみ発現する脊索形成のキー遺伝子である。本論文で申請者は、ホヤの *Brachyury* の標的遺伝子としての脊索形成

遺伝子群の解析を行っている。まず共同研究者とともに、カタユレイボヤの *Brachyury* (*Ci-Bra*) 過剰発現胚から正常胚を差し引いたサブトラクション法により、*Ci-Bra* の下流候補遺伝子を923クローン単離することに成功した。その中からまず *Ci-Bra* によって転写が活性化される独立な cDNA クローンを選び、さらにその発現を調べた結果、最終的に脊索で特異的もしくは優勢に発現する39の遺伝子の同定に成功した。これは、脊椎動物の脊索で発現する遺伝子がほとんど同定されていないという研究状況で、画期的な研究成果といえ、申請者の高い研究能力を示している。申請者はさらにそのうちの20クローンの cDNA の全長の塩基配列を決定することによってこれらの遺伝子の特徴付けを行い、同定された *Ci-Bra* 下流遺伝子の機能が多岐にわたり、脊索形成のさまざまな過程で働くことを示唆した。今後これらの遺伝子が実際にどのように機能を発揮して脊索を形成するのが注目されよう。また、申請者は、*Ci-Bra* とこれらの *Ci-Bra* 下流遺伝子との発現調節機構を解析する手始めとして、これら遺伝子の発現調節領域中に T ドメインの結合配列が存在するか否かを、現在進行中のカタユレイボヤ・ゲノムプロジェクトのデータベースを利用して調べ、これらの遺伝子の多くの発現調節領域中に T ドメインの結合配列が存在することを明らかにしている。

脊索は神経の誘導など隣接する組織の形成とその維持に重要な働きを担う。申請者は、この *Ci-Bra* 下流遺伝子の研究のなかで、*Ci-Bra* の間接的下流として神経系に特異的に発現する9つの遺伝子の cDNA の全長塩基配列の決定も行い、それらの多くが神経特異的タンパク質をコードしていることを明らかにした。また、*Ci-Bra* 過剰発現胚で活性化され脊索以外で発現するクローンについても網羅的に調べ、細胞間コミュニケーションに関わる遺伝子群の割合が増加していることなどを明らかにしている。このように本論文は *Brachyury* 遺伝子の機能カスケードを明らかにしたものとして、高く評価されよう。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文に値するものと認められた。なお、添付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、適切な回答が得られたので合格と認定した。