

学 位 審 査 報 告 書

(ふりがな) 氏 名	(のだ たけし) 野田 武志
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 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) カタユウレイボヤ初期発生における母性遺伝子の発現と機能に関するマイクロアレイによる解析	
論 文 調 査 委 員	(主査) 久保田 洋 准教授 佐藤ゆたか 准教授 曾田 貞滋 教授

理 学 研 究 科

京都大学	博士（理学）	氏名	野田 武志
論文題目	カタユウレイボヤ初期発生における母性遺伝子の発現と機能に関するマイクロアレイによる解析		
(論文内容の要旨)			
動物の体づくりにおいてはさまざまな遺伝子特に転写因子遺伝子と細胞間シグナル伝達分子遺伝子が重要な働きを担う。これらの発生関連遺伝子は発現する時期によりザイゴテック（接合子的）発現遺伝子とマターナル（母性的）発現遺伝子に区分される。ザイゴテックに発現する発生関連遺伝子の機能に関しては数多くの研究がなされ理解が進んでいるが、マターナルに発現する発生関連遺伝子についてはショジョウバエでの研究が進んでいるものの、脊索動物を含む脊索動物での知見は十分とはいえない。そこで申請者は、2002年にゲノムが解読されて以来、発生ゲノム科学のモデル系の一つとなりつつあるカタユウレイボヤを使って、母性遺伝子の発現と機能をマイクロアレイによって解析した。 研究の第一部では、カタユウレイボヤの初期発生において急速に分解される母性 mRNA をコードする遺伝子を、マイクロアレイを駆使してスクリーニングした。その結果、脊椎動物の癌抑制遺伝子である <i>p53/p73</i> の相同遺伝子 <i>Ci-p53/p73-a</i> がマターナルに発現し、その mRNA は受精後比較的すみやかに分解されることを見いだした。このマイクロアレイにより得られた結果は、whole mount <i>in situ</i> hybridization および qRT-PCR により確認された。次に特異的モルフォリーノ・オリゴを使ってこの遺伝子の機能を阻害すると、原腸陥入がおこらず、また脊索分化に関わる <i>Brachyury</i> 遺伝子（以下 <i>Bra</i>）およびその上流で働く <i>ZicL</i> 遺伝子の発現が阻害されることがわかった。そこでさらに <i>Ci-p53/p73-a</i> と <i>ZicL</i> の関係を明らかにすべく、<i>ZicL</i> 遺伝子の 5'上流 cis-調節配列解析を行った結果、上流約 300 bp 以内に存在する予測 p53 結合配列が <i>ZicL</i> 発現に寄与することが明らかになった。この結果は、母性 <i>Ci-p53/p73-a</i> から <i>ZicL</i> 遺伝子のザイゴテックな発現を経て <i>Bra</i> 遺伝子のザイゴテック発現を活性化させて脊索分化を導くという、これまでに知られていなかった新しい遺伝子カスケードを明らかにした。 ホヤは古くから典型的なモザイク的発生をする動物として知られており、細胞分化の自律性が指摘されていた。第一部で述べたような母性発現遺伝子の新規の機能がまだかなりあるとすれば、分化の自律性が予想以上に保たれている可能性がある。そこで研究の第二部では、受精から完全に細胞を解離した胚における遺伝子発現を、マイクロアレイを駆使して解析した。その結果、カタユウレイボヤの 16 細胞期から 64 細胞期にかけての初期発生において 26 の転写因子遺伝子、15 のシグナル伝達分子遺伝子の細胞自律的発現を検出した。その中にはこれまで自律分化組織と考えられている筋肉や内胚葉の遺伝子発現制御因子が多数見つかったが、細胞間相互作用が必要とされている <i>Bra</i> 遺伝子の自律的発現も認められた。加え解離胚と正常発生胚のマイクロアレイによる比較から、解離胚において 64 細胞期における <i>Bra</i> 発現量の増加、32、64 細胞期における <i>ZicL</i> 発現量の増加、16 細胞期における <i>FoxA-a</i> 発現量の減少、64 細胞期での <i>FoxA-a</i> 発現量の増加が検出された。これらはさらなる未知の細胞間相互作用の存在を示唆する。 このように本研究によって、カタユウレイボヤの初期発生における新たな母性遺伝子の発現と機能が明らかになり、また未知の細胞間相互作用の存在が示唆された。			

(論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨)

動物の発生においては卵に蓄えられたいわゆるマターナル・ファクター（母性因子）が重要な働きをする。母性因子の働きについてはショウジョウバエの突然変異体を駆使した解析から多くの知見が得られているが、突然変異体の作成と解析が容易ではない脊椎動物を含む脊索動物ではその知見はまだ限られている。申請者は、ゲノムが解読され、また発生における遺伝子の発現情報が他の動物に比べて格段に豊富なカタユウレイボヤを用いて、母性因子遺伝子の発現と機能の解析を行っている。

研究の第一部では、もし母性因子遺伝子がカタユウレイボヤの初期発生において役割を担うとすれば、その母性 mRNA は受精後比較的急速に分解されタンパク質として機能するであろうということに着眼し、受精卵と 32 細胞胚に存在する母性 mRNA のマイクロアレイによる比較から、後方で激減する母性 mRNA をコードする遺伝子をスクリーニングした。その結果、6 つの転写因子遺伝子が明らかになり、その中に *p53/p73* のカタユウレイボヤ相同遺伝子 *Ci-p53/p73-a* が存在することを発見した。申請者はこの事実を whole mount *in situ* hybridization および qRT-PCR により確認しており、この発見は申請者の高い研究能力を示すものである。申請者は次にこの遺伝子の機能を探るために、特異的モルフォリーノ・オリゴを使った機能阻害実験と mRNA の強制発現による過剰発現実験を行っている。その結果、*Ci-p53/p73-a* 遺伝子の機能を抑制すると、脊索分化のキー遺伝子である *Brachyury* 遺伝子（以下 *Bra*）とその上流で働く *ZicL* 遺伝子の発現が阻害されることがわかった。そこで申請者はさらに *Ci-p53/p73-a* が *ZicL* の発現に直接的に関与するかを明らかにすべく、*ZicL* 遺伝子の 5' 上流 cis-調節配列解析を行い、上流約 300 bp 以内に存在する p53 結合配列に変異を入れると *ZicL* の発現が減少することから、*Ci-p53/p73-a* が（単独ではないにしても）*ZicL* の発現に寄与することを明らかにした。この結果は、母性 *Ci-p53/p73-a* からザイゴテックな *ZicL* 遺伝子発現を経て *Bra* を活性化させて脊索分化を導くという、これまでに知られていなかった新しい遺伝子カスケードを明らかにしたという点で高く評価される。

胚を解離したまま発生させると胚細胞間の相互作用が阻害される。そのような胚では細胞自律的遺伝子は発現するが、細胞間相互作用が必要な遺伝子は発現しないことが期待される。したがって解離胚を正常発生胚や卵と比較することで、初期胚における遺伝子発現の制御における細胞間相互作用の役割を解析することができる。研究の第二部では、受精から完全に細胞を解離したまま発生させた胚（つまり細胞間相互作用を完全に除かれた胚）における遺伝子発現のマイクロアレイによる解析を展開している。その結果、カタユウレイボヤの 16 細胞期から 64 細胞期にかけての初期発生において、26 の転写因子遺伝子と 15 のシグナル伝達分子遺伝子の細胞自律的発現を確認した。その中には細胞間相互作用を必要とするとされている *Bra* 遺伝子の自律的発現も認められた。加え解離胚と正常発生胚のマイクロアレイによる比較から、解離胚において 64 細胞期における *Bra* 発現量が増加することも見いだした。正常発生胚において *Bra* 発現量が低いのは、現在隣接する細胞からの ephrin による *Bra* 発現抑制作用として理解されており、この研究はそれと呼応するものであった。このようにカタユウレイボヤの初期発生における新たな母性遺伝子の発現と機能を明らかにした申請者の研究能力は十分に高い。

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る。また、平成 23 年 1 月 23 日に論文内容とそれに関連した事項について口頭試問を行った結果、合格と認めた。