

氏 名	あわづ さとこ 栗 津 智 子
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3039 号
学位授与の日付	平 成 18 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	ホヤ類でのトランスポゾン活性の検証とカタユウレイボヤにおけるエン ハンサートラップ

論文調査委員 (主 査)
教 授 佐 藤 矩 行 教 授 米 井 脩 治 教 授 片 山 一 道

論 文 内 容 の 要 旨

動物の発生における遺伝子機能の解明は現代発生生物学における最も重要な研究課題であり、その解明に向けた多くの研究がなされている。なかでも、遺伝学研究手法を用いた遺伝子機能の解明に多くの動物で多くの労力が費やされている。トランスポゾンを用いたトランスジェニック生物の作製は、挿入変異体を得ることだけでなく、ジーントラップ法、エンハンサートラップ法などへの幅広い応用の可能な技術であり、脊索動物のホヤにおける遺伝子の機能解析に際してその技術を導入することは大いに有用である。しかしながら、これまでホヤにおいて遺伝学的ツールとして利用可能なトランスポゾンの報告はなかった。そこで本論文では、各種生物において種間を越えた活性の報告されているトランスポゾン、特に *Tc1/mariner* スーパーファミリーに分類されるものに注目して、カタユウレイボヤとユウレイボヤの2種を用いてホヤにおけるトランスポゾンの活性を検証した。

本論文では、まず、それぞれのトランスポゾンがホヤ生体内において正しく「切り出し」活性を持つかどうかを、トランスポゾン DNA と転移酵素 mRNA のホヤ胚への顕微注入と、その後の PCR 解析によって検証している。続いて「切り出し」活性を持つことが明らかとなったトランスポゾンについては、ホヤの生体内において2種類のプラスミド間での DNA の「転移」反応が見られるかどうかを、薬剤耐性の違いを利用した培地上での大腸菌の形質転換による選択実験で確かめている。その結果、カタユウレイボヤとユウレイボヤの両種において、*Tc1/mariner* スーパーファミリーのトランスポゾン *Minos* が完全な活性を持つことが明らかとなった。

次に *Minos* を用いたホヤ・トランスジェニック体の作製を試みたところ、ホヤのゲノム中に *Minos* が挿入され、その挿入が世代を越えて受け継がれることが明らかとなった。さらにはエンハンサートラップ系統ではないかと思われる、通常とは異なるパターンでの GFP の発現を示すホヤを得ることができた。その後、この系統を詳細に解析することにより、カタユウレイボヤのこの系統においては、ゲノム中へのトランスポゾンの挿入によって、エンハンサートラップが生じていることを明らかにした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

遺伝子の発現と機能の解析は現代生物科学の最も重要な研究課題の一つであり、特に動物の発生における遺伝子の機能についてさらなる解析が求められている。遺伝子機能の解析には順遺伝学的手法と逆遺伝学的手法がある。本論文において、申請者はカタユウレイボヤにおける順遺伝学的研究手法（突然変異体の作製とその解析）の開発を行っている。突然変異体の作製には化学変異源によるものと、トランスポゾンなど挿入変異源を用いたものがある。原因遺伝子の同定という観点からすると挿入変異体の作製が望ましい。またトランスポゾンを用いたトランスジェニック生物の作製は、挿入変異体を得ることだけでなく、ジーントラップ法、エンハンサートラップ法などへの幅広い応用の可能な技術であり、脊索動物のホヤにおける遺伝子の機能解析と関連してその技術の開発・導入が望まれていた。しかし、これまでにホヤにおいて遺伝学的ツ

ルとして利用可能なトランスポゾンの報告はなかった。

そこで本論文ではまず、各種生物において種間を越えた活性の報告されているトランスポゾンのうち、Tc1/*mariner* スーパーファミリーに分類されるトランスポゾンのホヤにおける活性を徹底的に調べた。すなわち、まずそれぞれのトランスポゾンがホヤ生体内において正しく「切り出し」活性を持つかどうかを、トランスポゾン DNA と転移酵素 mRNA のホヤ胚への顕微注入とその後の PCR 解析によって調べた。続いて「切り出し」活性を持つことが明らかになったトランスポゾンについては、ホヤの生体内において2種類のプラスミド間での DNA の「転移」反応が見られるかどうかを、薬剤耐性の違いを利用した培地上での大腸菌の形質転換による選択実験で確かめた。その結果、カタユウレイボヤとユウレイボヤの両種において、Tc1/*mariner* スーパーファミリーのトランスポゾン *Minos* が完全な活性を持つことが明らかとなった。これは、ホヤの順遺伝学的研究の可能性を示した大きな功績である。

次に *Minos* を用いたホヤ・トランスジェニック体の作製を試みたところ、ホヤのゲノム中に *Minos* が挿入され、その挿入が世代を越えて受け継がれることが明らかとなった。さらには通常とは異なる GFP 発現パターンを示し、エンハンサートラップ系統ではないかと思われるホヤを得ることに成功した。そしてこの系統を詳細に解析することにより、この系統においてはゲノム中へのトランスポゾンの挿入によって、エンハンサートラップが生じたことが明らかとなった。これもホヤにおけるエンハンサートラップの初めての報告である。本論文はすべての面において非常に緻密に研究が進められており、申請者の高い研究能力を示すものとして評価される。

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る。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。