

氏 名	石 田 浩 一
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2206 号
学位授与の日付	平成 12 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	動物の発生における計時機構の研究：ホヤ初期胚での組織特異的遺伝子の発現開始のタイミング

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

論 文 内 容 の 要 旨

発生現象を本来の流動的なプロセスとして理解するためには、発生が進行する際の時間的秩序に関する知識が重要である。申請者はそうした知識を得る手段として、発生現象におけるタイミング・メカニズムの研究が必要であると考え、本学位論文では、マボヤ初期胚における組織特異的遺伝子の発現開始のタイミングを決めている分子メカニズムについて実験を行っている。

まず初めに、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法によって、マボヤの8つの表皮特異的遺伝子の時間的・空間的発現パターンを調べ、これらの遺伝子の発現が約4つのパターンに分類できることを示した。その中でも *HrEpiC* 遺伝子は初期胚で予定表皮細胞全体で発現することから、この遺伝子が本研究に最も適したものであることを確かめた。

次に、マボヤ未受精卵を赤道面で1/2に分割して得られた動物極側および植物極側の卵片を各々媒精して、動物極側および植物極側1/2卵体積胚を作製した。これらの卵片では、核相、未受精卵に分布する細胞質の量、核と細胞質の比などがそれぞれの卵片に応じて変更されている。申請者はまず、この2つの卵片が正常卵と正確に同じタイミングで発生することを確認した上で、これらの1/2卵体積胚における表皮特異的遺伝子 *HrEpiC*、筋肉特異的遺伝子 *HrMA4*、脊索特異的遺伝子 *As-T* の3つの遺伝子の発現開始のタイミングをホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法によって調べた。その結果、*HrMA4*、*As-T* の発現開始のタイミングはどちらの1/2卵体積胚でも変化しないが、*HrEpiC* の発現開始のタイミングが植物極側1/2卵体積胚で1細胞周期遅れることを明らかにした。このことは、未受精卵の動物半球に多く分布する表皮決定因子の量が *HrEpiC* の発現開始のタイミングに関係する可能性を示唆する。そこで申請者はさらに、70% 卵体積胚を作製し、この卵片における *HrEpiC* の発現開始のタイミングの解析から、この遺伝子の発現開始のタイミングが上に述べた決定因子の量と相関することを示した。

さらに申請者は、*HrEpiC* の時間的・空間的発現パターンに関わる5'上流域のシスエレメントについて、さまざまなデレション・コンストラクトを作製し、それらを受精卵へ顕微注入した際のリポーター遺伝子の発現パターンの詳細な解析を行った。その結果、*HrEpiC* 5'上流域約450 bp以内に存在する、この遺伝子の発現を制御する2つのシスエレメントの同定に成功した。それらのうち近位(−103 bp)にあるものはレポーター遺伝子の表皮特異的な最小限の発現に必要であり、また遠位(−281 ~ −198 bp)のものは尾芽胚でのレポーター遺伝子の発現領域の増幅と、内在性の *HrEpiC* と同じタイミングでレポーター遺伝子を活性化することに必要であることが示された。こうした結果から、遠位にあるシスエレメントに結合するトランス因子が未受精卵の動物半球に多く分布し、その量が *HrEpiC* の発現開始のタイミングに関わっている可能性が考えられると結論づけている。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

動物の胚発生は四次元で展開する動的な生物現象である。発生に関与する遺伝子の空間的発現パターンとそれを制御する

メカニズムについては比較的よく調べられているが、遺伝子の時間的発現パターンとそれを制御するメカニズムについては、両生類などの MBT（中期胞胚での発生学的移行）のタイミング以外はほとんど解析されていない。こうしたバックグラウンドのもとで、申請者は、マボヤ初期胚における組織特異的遺伝子の発現開始のタイミングを決めている分子メカニズムについて研究を行っている。

申請者は、表皮特異的遺伝子 *HrEpiC*、筋肉特異的遺伝子 *HrMA4*、脊索特異的遺伝子 *As-T* の 3 つの遺伝子について、その発現開始のタイミングを、マボヤ未受精卵を赤道面で 1/2 に分割して得られた動物極側および植物極側の卵片を各々媒精して作った動物極側および植物極側 1/2 卵体積胚を利用して調べた。その結果、*HrEpiC* の発現開始のタイミングが植物極側 1/2 卵体積胚で 1 細胞周期遅れることを明らかにした。申請者は、この原因が、*HrEpiC* の発現開始のタイミングが未受精卵の動物半球に多く分布する母性因子の量と相関すると考え、さらに 70% 卵体積胚の実験を行い、このことを確かめた。これらの結論に至る研究は非常に精密にかつ十分な量的データによって裏付けられており、申請者のこの問題に対する熱意をうかがわせる。と同時に、忍耐強くデータを蓄積していく申請者の研究能力の高さがうかがえる。

申請者は次に、*HrEpiC* の時間的空間的発現パターンに関わる 5' 上流配列の解析を行い、*HrEpiC* 5' 上流配列中に 2 つのシスエレメントを同定することに成功した。そしてさらに、それらのうち特に遠位のものは尾芽胚でのレポーター遺伝子の発現領域の増幅と、内在性の *HrEpiC* と同じタイミングでレポーター遺伝子を活性化することに必要であることを示した。この解析でも数多くのディレーション・コンストラクトを受精卵へ顕微注入するという研究を精力的に進め、十分信頼性のある実験結果として示している。申請者は、これらの結果から、未受精卵の動物半球に多く分布し、遠位にあるシスエレメントに結合するトランス因子の量が *HrEpiC* の発現開始のタイミングに関わっている可能性を明らかにした。

HrEpiC 遺伝子の発現開始のタイミングに関わっているトランス因子の分子的同定には至っていないが、本研究は、母性因子の量が特定の遺伝子の発現のタイミングに関わっていることを示した重要な研究といえる。申請者は、本研究に関してすでに 3 編の論文を国際誌で発表しており、また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。本研究の学問上の意義は大きいと同時に、申請者の学術研究に対する熱意と能力の高さが推察できた。

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。