

氏 名	嶋 内 淑 恵
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2211 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	マボヤ胚における脊索分化関連遺伝子の解析

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

論 文 内 容 の 要 旨

脊索は脊索動物門を特徴づける最も重要な形質であるばかりでなく、脊椎動物の個体発生において中枢神経系や体節筋の誘導など、初期胚のパターニングに重要な役割を持つ。したがって、脊索形成の分子機序を明らかにすることは脊索動物の発生を理解する上で重要である。ホヤ胚における脊索運命の決定には、32細胞期後期において、予定脊索細胞とそれに隣接する内胚葉細胞との細胞間相互作用が必要であり、そのシグナルはbFGF処理によっても疑似することができる。また、マボヤ *Brachyury* 遺伝子 (*As-T*) の発現パターンやその mRNA の顕微注入の実験から、*As-T* がホヤの脊索分化に必須であることが示されているが、*As-T* 単独では全ての割球を脊索に誘導するには不十分であった。以上のような研究のバックグラウンドをもとに、申請者はホヤの脊索形成に関わる遺伝子の解析を行っている。

申請者はまず、*As-T* と協調的に働くと思われる *fork head/HNF-3* 関連遺伝子に着目した。マボヤからその相同遺伝子 (*HrHNF-3*) を単離しその発現パターンを調べた結果、16細胞期から予定脊索細胞、予定内胚葉、予定神経索細胞で発現することがわかった。後二者の細胞は *As-T* の mRNA の過剰発現によって脊索分化の誘導を受ける割球とはほぼ合致することから、申請者は、脊索分化に際してこの二つの遺伝子が中心的な役割を持つ可能性を考えた。そこでユウレイボヤの *fork head/HNF-3* 遺伝子 (*CsHNF-3*) を単離し、*As-T* と同時にマボヤ受精卵に注入する実験を行い、それぞれの遺伝子を単独で注入した場合よりも有意に脊索特異的抗体陽性細胞の数が増加するという結果を得た。このことは *HNF-3* と *Brachyury* の両方の働きが脊索の分化に重要であることを示唆する。申請者はさらに、*HrHNF-3* 遺伝子の機能を探る目的で、アンチセンスオリゴ顕微注入実験を行い、*HrHNF-3* 遺伝子が脊索形成に必須であることを示した。

また、第一卵割から連続的に割球を解離し細胞間相互作用を完全に阻害しても、*HrHNF-3* 遺伝子の発現が16細胞期から始まるという実験結果を得た。転写因子をコードする遺伝子としては16細胞期という早期から発現する遺伝子は今のところ *HrHNF-3* 遺伝子だけである。このことは、卵内に存在する母性因子によって *HrHNF-3* 遺伝子が自律的に活性化することを示している。

すでに脊索誘導を疑似する bFGF は *As-T* の発現を誘導することが明らかにされていたが、申請者はさらに bFGF の *HrHNF-3* 遺伝子発現に対する影響も調べ、この遺伝子の発現も bFGF によって誘導されることを明らかにした。そこで申請者は、ホヤ胚における FGF シグナルの役割を明らかにするために、ホヤの FGF 受容体をコードする遺伝子の cDNA クローンの単離を試み、それに成功した。この遺伝子はマターナルおよびザイゴティックに発現するが、マターナルな発現が *HrHNF-3* 遺伝子や *As-T* 遺伝子の発現に関与しているものと考えられる。申請者はさらに FGF 受容体の機能の解析を進めており、これらの研究結果からホヤ脊索形成の分子メカニズムが解明されだしている。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

脊索は、脊椎動物の個体発生において神経系の誘導や中・内胚葉の誘導など初期胚のパターニングに重要な役割を持つ。したがって、脊索形成の分子機序を明らかにすることは脊索動物の発生を理解する上で重要な意味をもつ。ホヤではオタマ

ジャクシ幼生の発生に伴って正確に 40 個の脊索細胞が分化し、その細胞系譜は完全に記載されている。その発生運命の決定には 32 細胞期後期での予定脊索細胞と内胚葉との細胞間相互作用が必要であり、その作用を受けてマスター遺伝子である *Brachyury* が発現する。一方これまでの両生類などの脊椎動物での研究から、*fork head/HNF-3* 関連遺伝子も脊索形成に重要であると考えられており、申請者はこの点を明らかにすべく研究を進めた。

申請者はまず、マボヤからその相同遺伝子 (*HrHNF-3*) を単離し発現パターンを調べた結果、予定脊索・内胚葉・神経索細胞で発現することを明らかにした。後二者の細胞は *Brachyury* の過剰発現によって脊索分化の誘導を受ける割球とほぼ合致する。そこで申請者はさらにユウレイボヤから単離した *CsHNF-3* と *Brachyury* の両者を同時に受精卵に注入する実験を行い、片方ずつを注入した場合よりも有意に脊索特異的抗体陽性細胞の数が増すことを明らかにした。このことは *HNF-3* と *Brachyury* の両方の働きが脊索の分化に重要であることを示す。申請者はさらに *HrHNF-3* の脊索形成における機能を調べる目的で、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる機能阻害の実験を行い、この場合脊索形成が起こらないことを明らかにした。以上述べたように申請者の研究は、ホヤの脊索形成における *HrHNF-3* 遺伝子の機能の重要性を明らかにしたものであり、重要な研究業績である。

一方、マボヤの脊索誘導には bFGF が重要であることが明らかにされていたので、申請者はさらに、ホヤ胚における FGF シグナルの役割を明らかにする目的でホヤの FGF 受容体を単離し、この遺伝子の発現パターンと機能の解析も行っている。

申請者はまた、第一卵割から連続的に割球を解離して細胞間相互作用を完全に阻害しても *HrHNF-3* 遺伝子の発現が 16 細胞期から始まるという実験結果を得ている。この結果は、卵内に存在する母性因子によって *HrHNF-3* 遺伝子が自律的に活性化することを示す重要な実験結果である。

以上述べたような研究成果を得るに至った申請者の研究方針、データの解釈、さらなる研究の進め方などは、申請者の高い研究能力を十分に示すものであると判断された。

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。