

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 宇田川義之

本研究は TGF- β (Dpp) シグナル伝達において重要な役割を演じていると考えられる Schnurri (Shn) という転写因子の機能を明らかにするため、培養細胞に複数の遺伝子を導入することによって、蛋白同士の結合や転写能を調べ、それらを *in vivo* において確認するため、遺伝子導入した *Drosophila* において Dpp によって誘導される遺伝子の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Shn の deletion mutant を作製し、それらにエピトープを付加させ、Yeast two-hybrid system と培養細胞を用いた Western blot と免疫沈降を組み合わせることで 2529 アミノ酸ある Shn の 567-909 アミノ酸の領域にて二量体を形成していることが明らかとなった。ただし Dpp シグナル伝達における二量体形成の意味については現在解析中である。
2. Dpp のレセプターの直接の基質である Mother against dpp (Mad) の deletion mutant を作製し、Shn と共に遺伝子導入し免疫沈降、Western blot により、Shn は Mad とシグナル依存的に結合し、その結合領域は 910-1888 アミノ酸であることを示した。
3. 培養細胞に遺伝子導入した Shn を免疫染色することによって、Shn は核内蛋白であることが示された。また様々な deletion mutant を用いることによって Shn 内に核移行シグナルが複数存在することを明らかにした。これは Shn が核内に存在する転写因子であることを示している。
4. Dpp-responsive gene の 1 つである Ultrabithorax のエンハンサー領域をプローブとして Shn 内の Zinc Finger motif 4/5 (Shn ZF4/5) の GST 蛋白を作製し footprint assay を行うとこのエンハンサー領域内の C 末端の連続する G 塩基に結

合することが明らかとなり、エンハンサー全体と Shn の結合を gel shift assay によって確認した。このことから Shn は Mad と複合体を形成して DNA に結合することが明らかとなりその結合領域は Ubx エンハンサー内の連続する G 塩基であることが示された。

5. *Drosophila* embryo を用いることによって、in vivo での Shn の Ubx 蛋白の発現への影響を解析することによって Shn の機能を検討した。核内 β ガラクトシダーゼに Ubx のエンハンサー連続させた遺伝子の transgenic embryo では β ガラクトシダーゼは parasegment 6-9 に集積するのに対し、embryo 内に Dpp が発現しない DppS4 の embryo と Ubx エンハンサー内の Shn 結合部位の変異体の embryo は共通して parasegment 6-9 の細胞に β ガラクトシダーゼの集積は認められなかった。つまり Ubx の発現に対し、Shn は必須な転写因子として機能することが明らかになった。

以上、本論文は培養細胞系における免疫沈降、Western blot を用いることによって Dpp のシグナル伝達、特に今までほとんど解明されていなかったレセプター以降から DNA における転写調節にいたるまでの経路を明らかにすると同時に *Drosophila* の巨大転写因子 Schnurri の機能を明らかにした。本研究は今後、癌抑制遺伝子の 1 つである TGF- β のシグナル伝達を解明する上でその転写因子の機能解析に道を開くものと確信する。よって学位授与に十分に値するものと考えられる。