

論文審査の結果の要旨

氏名 望月 俊昭

本論文は、アフリカツメガエルの頭部オーガナイザーに発現する転写因子のホメオドメイン蛋白質 Xlim-1, Goosecoid (Gsc), Otx2 と転写補助因子 Ldb1 の機能的及び物理的相互作用について述べられている。

本研究は以下の予備的データを元に解析が始められた：(1) 活性型 Xlim-1 の過剰発現すると内在性 gsc 遺伝子を活性化すること、(2) 活性型 Xlim-1 は gsc プロモーター・レポーター遺伝子をアニマル・キャップ（外胚葉外植体）で活性化すること、(3) Xlim-1、Otx2、Gsc、PV.1 の DNA 結合ドメインであるホメオドメインが gsc プロモーター領域に結合すること、の3点である。これらの結果は、gsc 遺伝子が Xlim-1 の直接の標的遺伝子であることを示唆しており、また頭部オーガナイザーに発現する転写因子間での相互作用がその機能を発揮するために重要であることを予想させた。

以上の結果と予想を元に、gsc 発現制御における転写因子間相互作用を解析するため、Xlim-1 に加えて頭部オーガナイザー領域あるいはその隣接領域に発現するホメオドメイン蛋白質 Otx2、Gsc、PV.1 について、全長の蛋白質を用いて DNA への結合特異性を調べた。全長蛋白質を *Xenopus* 胚内で発現させ、その粗抽出液による electrophoresis mobility shift assay (EMSA) を行った結果、Xlim-1、Otx2、Gsc、PV.1 が gsc プロモーター上の予想結合領域 UE、DE、にホメオドメインと同様の選択性を持って結合することを確認した。さらに野生型 Xlim-1 は単独では DNA に対して弱い結合しか示さないが、LIM ドメイン結合蛋白質 Ldb1 を共発現させると複合体としてより強く DNA に結合することが示された。これは予想されていた Ldb1 による野生型 Xlim-1 の活性化機構を強く支持した。

次に各転写因子の gsc プロモーター活性における相互作用を検討するため、アニマルキャップにおいてレポーターアッセイを行った。野生型 Xlim-1 は単独では弱い活性化しか示さないが、Ldb1 と共発現させると強い活性化を示した。また興味深いことに Xlim-1 は Otx2 と共発現させても同様の強い活性を示し、Xlim-1、Ldb1、Otx2 の3者を共発現させると更に強い活性を示した。Ldb1 と Otx2 だけでは活性化しないことから、Xlim-1 が協調的活性化に必要な要素であると考えられる。この3者による協調的活性化はアニマルキャップにおいて内在性 gsc に対しても観察されたことより、Xlim-1、Ldb1、Otx2 が gsc の発現制御に関わることがさらに支持された。

gsc プロモーター領域において Xlim-1、Ldb1、Otx2 の3者による協調的活性化に必要な

領域を結合領域 UE、DE、PE に欠失あるいは変異を導入したレポーター遺伝子を作製し検討した。その結果、いずれの単独の変異でも活性が減少したが、完全には消失しなかったことより、これら複数の領域が全体の活性を担っていることが示唆された。一方 Gsc、PV.1 は、Xlim-1、Ldb1、Otx2 の 3 者による協調的活性化を強く抑制した。結合領域の変異レポーター遺伝子を用いた解析より Gsc は DE が主要な反応領域であること、PV.1 は複数の領域が関与していることが示唆された。次にこれらの反応領域が内在性因子による制御にも関与するのかを検討した結果、オーガナイザー領域での *gsc* プロモーターの活性化においても UE、DE を含む複数の領域が関与することが示唆された。

Xlim-1、Ldb1、Otx2 の 3 者による協調的活性化について蛋白質間相互作用によるものかを検討するため *in vitro* における GST pull-down assay を行った。その結果、Xlim-1 と Ldb1 との相互作用に加えて、Xlim-1 と Otx2、Ldb1 と Otx2 の間で相互作用が見いだされた。しかし EMSA による検討では DNA 上での複合体形成を示す結果は得られなかったことより、この点に関してはさらなる検討が必要である。

以上の結果と、脊索、腹側中胚葉に発現する転写因子 *Xbra* の発現が *gsc* によって抑制されること、更に *Xbra* により間接的に *otx2* の発現が抑制されるという知見も加えて考え、中胚葉のパターン形成におけるモデルを提示した。すなわち頭部オーガナイザー領域では Xlim-1、Ldb1、Otx2 が発現することで *gsc* の発現が維持され、この *gsc* により *Xbra* の発現が抑制される。一方、胴部オーガナイザー Xlim-1、Ldb1 と共に *Xbra* が発現し、*Xbra* より *otx2* は間接的ではあるが発現が抑制されることにより、*gsc* の発現が維持されない。一方腹側中胚葉では PV.1 が発現し、*gsc* の発現を直接抑制すると共に、同じく発現する *Xbra* により *otx2* の発現が抑制され、胴部オーガナイザーと同様に *gsc* の発現が起これないと考えられる。

本論文の約 4 分の 3 の部分は既に 1 篇の論文として公表されており、A. A. Karavanov, P. E. Curtiss, K. T. Ault, N. Sugimoto, T. Watabe, K. Shiokawa, M. Jamrich, K. W. Y. Cho, I. B. Dawid and M. Taira との共同研究となっているが、これは研究の発端で複数の研究室の未発表データを元に開始したためである。これらの著者の中で第 2 と第 3 の著者 (Karavanov と Curtiss) が先に述べた予備的データを得るのに特に貢献した。

本論文は塩川光一郎、平良眞規との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与は十分であると判断する。

したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。