

論文審査の結果の要旨

氏名 伊藤弓弦

動物の特徴的な形態が発生する過程では、初期胚において様々な形態形成因子が決められた時間と場所で発現し、細胞に作用することが重要である。そのような形態形成因子の一つ、hedgehog(hh)はショウジョウバエで発見された分泌性因子であるが、脊椎動物にも相同の蛋白質が存在して重要な働きをしていることが知られている。本研究では hh がアフリカツメガエルの初期胚において、どのような発現制御を受けているかを検討したものである。

本論文は4章からなる。第1章では、ツメガエルより *hedgehog* 遺伝子を単離し、その発現場所を同定した。3種の hh 遺伝子が同定された。そのうちのひとつ *Xshh* は中胚葉の原口背唇部、脊索、外胚葉の神経底板、脳に局限した発現が見られた。発生が進むと内胚葉の咽頭、後腸、胆嚢での発現も見られた。一方 *Xchh* は内胚葉の前端及び後端に偏って発現していた。以上のことから、この2種の hh は発生過程の様々な局面において細胞分化、形態形成に関与していると示唆された。

第2章では、内胚葉で発現する *Xchh* の発現制御機構を解析した。胞胚期で取り出して培養した植物極の細胞において、自律的な *Xchh* の発現が検出された。これより *Xchh* の発現は胞胚期植物極に存在する母性成分の制御を受けていることが示唆された。さらに、内胚葉分化に関与することが知られている TGF- β family に属する Vg-1 や activin などの因子が *Xchh* の発現制御に重要であることを明らかにした。

第3章では脊索と神経底板における *Xshh* の発現制御機構を解析した。胞胚期に切り出した動物極、植物極どちらの細胞も、無処理の条件下では *Xshh* を発現しなかった。植物極においては TGF- β family のアンタゴニストの存在下で *Xshh* の発現が誘導されたが、動物極においては同様の条件下で誘導されなかった。このことから、*Xshh* の発現には TGF- β family のアンタゴニストと植物極側に局在する因子の2つが必要であると推論された。そこで内在性の TGF- β family のアンタゴニストとして *noggin* と *follistatin*、植物極に局在する因子として *Xenopus nodal related*

gene-1 (Xnr-1)に注目した。胚内にこれらの因子を発現させたところ、Xnr-1、noggin、follistatin 単独では Xshh の発現を誘導しなかったが、Xnr-1 と noggin もしくは Xnr-1 と follistatin を共発現させると、Xshh の発現が見られた。よって、Xshh の発現はそのような2つのシグナルが共存する部位において協調的に制御されることが示された。

以上の結果を踏まえ、第4章では Xnr-1 と noggin が Xshh のゲノム領域にどのように作用するかを解析した。ゲノムライブラリーより Xshh をコードするゲノム領域を単離した。次に Xnr-1 と noggin によって協調的に活性化される領域をセカンドイントロン内に同定した。この部位 (Xnr-1/noggin response element : NNRE) には転写因子 HNF3 の結合部位及び、Smad の結合部位と考えられる配列が存在した。続いて NNRE を含む断片を組み込んだ GFP ベクターを胚に導入したところ、Xshh と同様に、脊索、神経底板において発現が見られた。これらのことから、NNRE が脊索、神経底板における Xshh の発現を制御している cis-element であることが明らかとなった。

以上のように本研究では、形態形成因子である hh が限局して発現する機構として、細胞外からの2つのシグナルのバランスによって調節をうけるシステムが存在することを明らかにするとともに、その調節に関与するゲノム上の部位を同定することに成功した。これまで、形態形成因子の発現制御解析はほとんどなされていなかったもので、多細胞生物の形態形成に本質的に重要な hh 遺伝子群の転写制御を明らかにしたことは、基礎生物学、特に分子発生生物学の分野において重要な成果であると考えられる。

なお、本論文第1章は塩川光一郎、田代康介と、また第2～4章は久原哲、田代康介との共同研究であるが、一貫して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、論文提出者の寄与が充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。