

論文審査の結果の要旨

氏名 平谷 伊智朗

本論文は2章からなり、第1章ではオーガナイザーに特異的に発現する転写因子 Xlim-1 のホメオドメインの C 末側領域の詳細な機能ドメイン解析の結果について述べている。第2章では Xlim-1 の制御因子の候補と考えられた XRnf12 を単離し Xlim-1、Ldb1 との機能的相互作用を検討した結果について述べている。

シュペーマン・オーガナイザーは脊椎動物の初期形態形成において中心的役割を担う。Xlim-1/Lim1 は種を越えてオーガナイザーに特異的に発現し重要な役割を担う転写因子であるが、その作用機序および活性調節機構に関しては不明な点が多い。本論文は Xlim-1 の活性調節機構に焦点を当てアフリカツメガエル胚を用いて機能解析を行い、オーガナイザーの分子基盤の一端を明らかにすることを目的としている。

第1章ではこれまで解析が不十分だった Xlim-1 のホメオドメインの C 末側領域 (amino acids (aa) 239-403; 以下、CT239-403) を進化的保存性をもとに5つの領域 CCR1-5 (C-terminal conserved regions) に分けて種々の CCR 変異体を作製し、活性型 Xlim-1 の持つ2次軸形成能を指標に各領域の役割を検討した。その結果、CCR1 及び CCR2 が負の制御領域であること、C 末側領域の最大活性には CCR2 と CCR4 が必要であり活性の大部分は CCR2 を含む領域 CT261-315 に依存することが示された。Xlim-1 と Ldb1 の複合体形成を模倣した融合蛋白質 Ldb-Xlim1 を用いた解析でもほぼ同様の結果を得、また同定した複数の機能ドメインは他の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインと融合させても同様に機能した。さらに CCR2 を含む領域 CT261-315 に関しては既知のコアクティベーター CBP、SRC-1、TIF2 との相互作用は認められなかったことから、CT239-403 と相互作用して Xlim-1 の転写活性に影響を与える複数の未知の転写共役因子の存在が示唆された。

第2章では Xlim-1 の制御因子の候補として LIM ホメオドメイン蛋白質 (以下、LIM-HD 蛋白質) Lim3 の新規の制御因子として報告された RING フィンガー蛋白質 Rnf12/RLIM に注目し、そのアフリカツメガエル・オーソログ XRnf12 を同定し Xlim-1、Ldb1 との機能的相互作用を検討した。Xlim-1、Ldb1、XRnf12 の mRNA は原腸胚期の背側中胚葉で共発現していた。さらに XRnf12 が過剰発現により Xlim-1 と Ldb1 による2次軸形成を RING フ

インナー依存的に抑制したこと及び RING フィンガー蛋白質の多くがユビキチン・リガーゼ活性を持つとする最近の知見を併せて検討した結果、XRnf12 はユビキチン・プロテアソーム経路による Ldb1 蛋白質の分解を介して Xlim-1 の活性を抑制することが示唆された。

一方、興味深いことに Xlim-1 の共発現により、XRnf12 による Ldb1 の分解が抑制されることを見出した。この抑制には Xlim-1 の LIM ドメインと Ldb1 の LIM 結合ドメインが必要であり、Ldb1 は Xlim-1 と結合することで XRnf12 による分解を免れることが示唆された。これはオーガナイザーにおいて必要と考えられる Xlim-1/Ldb1 の活性が XRnf12 の存在下でどのように保証されているかを上手く説明すると思われた。また Xlim-1 と Ldb1 は両者 2 分子ずつからなる 4 量体を形成し転写を活性化させると考えられているが、この結果は XRnf12 が Xlim-1 と未結合の余剰の Ldb1 蛋白質を分解することで両者の適切な量比の制御を行い、正常な 4 量体形成を促す可能性を示唆している。そこで余剰の Ldb1 による影響を検討した結果 Xlim-1/Ldb1 による 2 次軸誘導活性は Xlim-1 の発現量を固定し Ldb1 の発現量を増大させると量依存的に減少し、また Xlim-1 の発現量を上げることで活性が回復した。さらに、Ldb1 は背側帯域への過剰発現により Xlim-1 の標的遺伝子 *gooseoid* 及びその候補遺伝子 *chordin* の発現を強く抑制し、この抑制は XRnf12 の共発現によって RING フィンガー依存的に回復したことと併せて前述の可能性が支持された。

以上の結果は、これまでほとんど報告のない LIM-HD 蛋白質と Ldb1 の量比制御に関して新たな知見を与えると共に、オーガナイザーにおける Xlim-1 の活性調節に関する重要な知見を提供するものである。

なお、本論文第 1 章は望月俊昭、栃本直子、平良真規との、第 2 章は山本直子、望月俊昭、大森慎也、平良真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と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。