

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 深 見 伸 一

本研究は脊椎動物初期神経発生過程において背腹軸に沿った細胞の特異化に重要な役割を演じている分泌性シグナル因子 Sonic hedgehog (Shh)による遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目的としている。主に Shh 応答性を保持する神経上皮細胞由来の細胞株(MNS-70)を用いた培養細胞系と、Shh シグナルの下流で主要な転写因子として機能していると考えられる Gli に依存したレポーターを用い、下記の結果を得ている。

1. Shh による遺伝子発現制御に関わる分子の候補としてショウジョウバエとの homology から、Suppressor of fused [Su(fu)]マウス相同遺伝子を cloning した。予想される Su(fu)遺伝子産物の1次構造はショウジョウバエ Su(fu)とほぼ全長にわたって類似していた。Northern blot による解析から Su(fu)転写産物は神経系を含む広い領域に発現していた。
2. MNS-70 細胞における Shh シグナル伝達構成分子の発現を定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果、Shh の添加前後での Shh シグナル伝達構成分子の発現は *in vivo* における発現パターンと一致して Shh 添加により Gli1,Ptc 等の標的遺伝子の発現が活性化され、*in vitro* のモデル系となることが示された。
3. Gli 依存性レポーターと Gli 結合配列に変異を導入したレポーターを用い、Shh による転写活性化における Gli の関与を検討したところ、Shh は Gli 結合配列依存的に転写活性化を起こすことが明かとなった。また、このレポーターは Gli1,2 の導入により活性化され、Gli1,2 が Shh の下流で主に機能していると考えられた。
4. Gli 依存性レポーターを用いて、Su(fu)の機能解析を行ったところ、Su(fu)の単独高発現によっても、レポーター活性の変化は観察されなかったが、Shh-N ,Gli1,2 の活性に対して抑制効果が観察された。従って、Su(fu)は Gli1,Gli2 のもつ転写活性化能に対して抑制的に作用し、結果として Shh による遺伝子発現を負に制御する因子であることが示唆された。
5. Su(fu)と Gli とのタンパク質レベルの相互作用を免疫沈降実験により検討した。Su(fu)は Gli1,2 いずれとも複合体を形成し得ることが示された。各種 Gli1 欠失変異体を用い、Su(fu)との相互作用に寄与するドメインについて検討し、DNA 結合能を担うとされる Zn-finger ドメインより N 末端側、C 末端側に各々独立に相互作用するドメインが存在することが示さ

- れた。
6. 転写活性化因子 VP16 と各種 Gli1 欠失変異体との融合タンパクを作成し、タンパク質レベルでの相互作用と Su(fu)の転写抑制効果の相関を調べたところ、N 末端側、C 末端側のいずれか一方の相互作用ドメインの有無が、Su(fu)による転写抑制に十分であることが明らかとなった。
 7. Su(fu),Gli1,2 の細胞内局在を間接蛍光抗体法により解析したところ、それぞれ単独高発現では、Su(fu)は核にも細胞質に一樣に存在し、Gli1 は主に核に存在することが示された。また、Su(fu)との共発現により、大部分の Gli1,2 の分布が細胞質に変化することが観察され、Su(fu)の抑制機構のひとつとして、Gli を細胞質に保持する機構が存在すると考えられた
 8. Su(fu)が核内においても機能していることが Nuclear localization signal の付加及びドミナントネガティブ変異体を用いた解析より示唆された。また、Histone deacetylase (HDAC)4 が Shh, Gli1,2 に対し抑制活性を持ち、Su(fu)と複合体を形成すること Shh 刺激によりその形成が阻害されることを明らかにした。さらに、HDACの特異的インヒビターである TrichostatinA が Su(fu)の Shh に対する抑制活性を解除することを明らかにした。

以上、神経系腹側特異化に必須の分泌性シグナル分子である Shh の下流で機能する分子として、Su(fu)を単離し、その機能は下流の転写因子である Gli を核および細胞質で抑制する分子であることを明らかにした。本研究は脳の形態形成の分子基盤の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。