

論文審査の結果の要旨

氏名 武井 ゆき

本論文は、ショウジョウバエ EXT 遺伝子群の新規変異体の同定と、変異体を用いた機能解析、特にモルフォゲンの勾配制御における寄与について述べられている。

武井はモルフォゲン勾配形成に影響を与える分子を、EMS による点変異導入とクローン技術を組み合わせたスクリーニングにより探索した。その結果新規変異体 *brother of ttv* (*botv*) と *sister of ttv* (*sotv*)、および既知の遺伝子 *tout-velu* (*ttv*) の新しいアレルを単離した。Botv、Ttv、Sotv は、糖蛋白のヘパラン硫酸鎖合成に必要なヒト EXTL3、EXT1、EXT2 にそれぞれ相同性が高く、またほ乳類 EXT 遺伝子群に共通の三つのドメイン (N 末端の膜貫通ドメイン、糖転移酵素に特徴的な DXD モチーフ、C 末端の活性ドメイン) を持つことを示した。三者間では互いにアミノ酸レベルで 26-32% の相同性を持ち、特に C 末端側で相同性が高いこと、またいずれも翅成虫原基においてユビキタスに発現していることを示した。変異細胞群を持つ翅原基では変異細胞群で細胞自律的にヘパラン硫酸レベルが著しく低下していたことから EXT 遺伝子群はヘパラン硫酸合成に必須であることを明らかにした。またどの一つが欠けてもヘパラン硫酸合成不全を引き起こしたことから、互いに高い相同性を持つにも関わらず、相補性は殆どないことを示した。

さらに Hh の標的遺伝子 Ptc の蛋白レベルおよび *dpp* の発現レベルは変異細胞群のほとんどの領域で低下することを明らかにした。これまでに、既知の遺伝子 *ttv* については Hh シグナルに選択的に寄与し、Wg や FGF といった他の成長因子のシグナルには寄与しないことが報告されている。しかし武井は Hh に対する寄与に加えて、Dpp の標的遺伝子 *Sal* および細胞内シグナル伝達因子のリン酸化 Mad のレベルも、これらの変異細胞群で低下することを示した。このことは *ttv* を含む EXT 遺伝子群が Hh 以外のモルフォゲンシグナルにも寄与する初めての証拠となった。Wg についてもこれまでの報告と異なり、標的遺伝子 *Dll* や *Vg* のレベルが若干低下する事を示した。さらに FGF シグナルについても、*botv* の変異により FGF シグナル依存的なトラキオブラストの増

殖と伸長が阻害されることを示した。以上の結果から、ショウジョウバエ EXT 遺伝子群は三つのモルフォゲン、および FGF のシグナルに寄与することを明らかにした。

またモルフォゲン蛋白自体に対する抗体を用いて蛋白量および分布を調べ、モルフォゲン発現領域では *wg* と *dpp* は発現レベルも蛋白レベルも減少することを示した。一方 *hh* は発現量に変化はなく、蛋白量のみが細胞自律的に激減する事を示した。さらにこの影響は、膜結合蛋白 Disp により膜から切り離された Hh にのみ見られ、*disp* の非存在下では見られなかったことから、蛋白の安定化に普遍的に機能するのではなく、遊離型の Hh のみを捕捉している可能性を示した。

さらに、モルフォゲンの受容領域では三つのモルフォゲン全てが EXT 変異細胞群の中で著しく減少することを明らかにした。この原因として、Hh 抗体を用いた蛋白の分布パターンの解析から、Hh 蛋白が拡散の際に変異細胞群の手前側に蓄積していること見いだした。同様に Dpp-GFP や Wg 蛋白質も、Hh の場合ほど顕著ではないが変異細胞群の手前に蓄積することも示した。これらの結果から、EXT の変異によるシグナルの低下は、モルフォゲン分子の拡散が阻害されるためであることを明らかにした。またこうした HSPG 依存的な拡散は三つのモルフォゲンの勾配形成過程において共通の機構であることを示した。

理論、実験の組み立ては十分高い水準にあり、得られた実験結果は、モルフォゲン勾配形成機構の解明に資するところが大きい。なお、本論文は小沢豊彦氏、佐藤純博士、渡辺晃氏、多羽田哲也博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、本研究は博士（理学）の学位に値するものと考える。