

## 論文審査の結果の要旨

氏名 阿部剛典

本論文は1章からなる。それは、内容について一貫性があり、分割して2つの章にするよりは、1つのまとまった学位論文とみなすことができる。

イントロダクションでは、脊椎動物の初期発生における中胚葉誘導減少とそれに関わる分子であるアクチビンについて述べられ、その分子が発生過程でどのような時期に作用しているか、応答能の時間的変化の重要性について述べている。それは、中胚葉誘導は時間特異的なものであり、発生過程のある段階で細胞が誘導因子に対する応答能を失い、中胚葉誘導を終了させる“Loss of Mesodermal Competence (以下 LMC と略記)”という現象が起きることを示している。そこで阿部氏は LMC の起きるメカニズムや原因因子については殆んど解明されていなかったため、Notch シグナルとの関係を明らかにし、そのメカニズムの解明が必要であることを述べている。LMC の起きるメカニズムを解明することを目的として実験を行った。

本研究ではまず、Notch シグナルを活性化することで LMC の時期に変化が生じるかどうかを検証した。Notch シグナルの活性化により中胚葉遺伝子が発現し、アニマルキャップにおいて LMC の時期を遅らす作用があることを明らかにした。さらに、アクチビンを染み込ませたビーズを埋め込む“アクチビンビーズ移植実験”を開発し、アクチビンビーズを胞胚期に埋め込むと異所的な中胚葉誘導が引き起こされ二次軸が形成されたが、中期原腸胚期にアクチビンビーズを埋め込んでも二次軸は形成されなかった。一方、Notch シグナルを活性化させた中期原腸胚期の胚にアクチビンビーズを埋め込むと二次軸が形成された。この結果は *in vivo* においても LMC が胞胚期から原腸胚期の間で起き、Notch シグナル活性化により LMC の時期が遅くなったことを示した。

次に LMC の起きるメカニズムの解明を試みた。アクチビンシグナル経路は大きく分けて以下の 5 ステップから構成されている。リガンドであるアクチビンが受容体と結合する。活性化した受容体により smad2 の C 端がリン酸化される(以下 Psmad2C と表記)。

Psmad2C が smad4 と複合体を形成する。Psmad2C/smاد4 複合体が核へと移行する。Psmad2C/smad4 複合体が DNA と結合し標的遺伝子の転写を引き起こす。各段階での検証の結果から、LMC は発生の過程で Psmad2C が smad4 と結合する能力を失い、複合体が核に移行できなくなるため中胚葉遺伝子の転写が起きなくなることで生じ、Notch シグナルは Psmad2C と smad4 との結合を調節することで LMC の時期を調節していることを明らかにした。

さらに阿部氏は LMC の前後で Psmad2C/smad4 複合体形成を調節するメカニズムの解明を試みた。Notch シグナル経路で転写因子として働く Hairless 抑制遺伝子(Su(H))の作用を阻害すると、LMC の時期を遅くするという Notch シグナルの効果が抑制されることを見つけた。この結果は Notch シグナルが標的遺伝子の転写を介し LMC の時期を調節していることを示している。そこで私は DNA マイクロアレイを用い、Notch シグナルの下流で働き、LMC の時期を調節している遺伝子を検索した。その結果、Type I 候補遺伝子として *sox12* と *RGS4 protein* の存在を明らかにした。Type II 候補遺伝子として *GATA-2*、*Xoct-91*、*eukaryotic initiation factor 5*、*X-box binding protein*、*Xgadd45-gamma* の存在を示すことができた。

これら一連の研究によって LMC がアニマルキャブ、*in vivo* ともに起きその時期は Notch シグナルにより調節されていること、また LMC は Psmad2C が smad4 と結合できなくなり、複合体が核に移行できなくなるため中胚葉遺伝子の転写が起きなくなることが原因で起きていることが明らかとなった。そして、時間的・空間的発現パターン、機能解析の結果から Notch シグナルの下流で働き LMC の時期を調節している可能性のある 6 つの候補遺伝子が特定された。

これら一連の実験方法、結果ともにオリジナル性が非常に高いことが全審査員から述べられた。古江美保、近藤晶子、浅島誠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、論文提出者の寄与が充分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。