

博士審査の結果の要旨

氏名 寺 崎 晴 美

本研究は、体節形成における主要な遺伝子であるメダカ *mesp-b* の発現制御機構について、メダカトランスジェニック法によって解析したものである。

本研究ではまず、近年本研究室の村上らによって単離されたメダカ *mesp* 遺伝子の配列および発現パターンの再解析の結果を示し、異なる生物種間での配列比較や系統樹作成などの結果、これらが *mesp* 遺伝子ファミリーに属することを報告している。次に、再解析したメダカ *mesp* 遺伝子のうち、体節形成への関与が他の種でより強く示唆されている *mesp-b* に着目し、その翻訳開始点から 5kb 上流に、未分節中胚葉でその発現の特徴を再現できるエンハンサー領域を特定したことを報告している。この上流 5kb によって誘導された EGFP トランスジーンは、内在性 *mesp-b* の発現開始のタイミングと体節前方への局在を再現した。そこでこれらの発現に必要な領域をさらに絞り込んだ結果、特に上流 1.4 ~ 2.8kb の領域が重要であることを突き止めた。ここで特定した領域の中には、予想される制御因子に対する結合配列として Tbx、レチノイン酸、Notch シグナル、Wnt シグナルに応答する保存配列が存在していた。そこで、これらの配列の機能解析を行うため、これらの配列を 2.8kb エンハンサー内でそれぞれ削ったエンハンサーの活性をトランスジーン発現をもとに検証した。その結果、これらのうち、Tbx 結合配列、RBPJ κ 結合配列、および Tcf 結合配列の一部が発現強度に必要であるが、レチノイン酸応答配列はエンハンサー活性には重要でないことが明らかになった。最後に、各結合配列のうち、Tbx、Notch シグナル、レチノイン酸シグナルに応答する配列について、予想された制御因子が実際に生体内で作用しているかどうかの確認を行った。具体的には、2.8kb トランスジーンおよび 2.8kb から各結合配列を削ったトランスジーンを持つメダカ胚に対して、上流因子の抑制実験を行って反応性の違いをトランスジーン発現強度やパターンの変化を指標にして検証した。その結果、Tbx24 が予想される結合配列を介して *mesp-b* の発現を上昇させること、Notch シグナルは RBPJ κ 結合配列を介して *mesp-b* の発現を上昇させるが 2.8kb 領域内の別の配列(未同定)を介して *mesp-b* の発現の局在を制御すること、レチノイン酸シグナルが 2.8kb 領域内の予想され

た配列以外の領域を介して *mesp-b* の発現を上昇させていることが明らかとなった。

本研究で得られた結果から、*mesp-b* の発現は、レチノイン酸シグナル、Tbx24、Notch シグナルによって未分節中胚葉前方で誘導され、さらに Notch シグナルによってその発現の局在が制御される、ことが示された。*mesp-b* 相同遺伝子の発現制御機構の解析については、これまでマウスやアフリカツメガエルを用いた先行研究があるが、これら 3 つの制御因子による直接的な制御を、生体を用いて全て解析した例はなく、*mesp-b* の発現制御機構について新たな知見を与えるものとして評価できる。

さらに、本研究とマウスでの先行研究を比較すると、マウスで報告されている *Mesp2* のエンハンサーはそのすぐ上流 300bp にあり、メダカの *mesp-b* 上流 2.8kb のエンハンサーに比べ転写開始点に近く、さらに短い。マウスの 300bp 内にも、今回メダカで機能が明らかになった Tbx 結合配列や RBPK 結合配列が複数存在している。従って、メダカではこれらの配列が上流 2.8kb という比較的広い領域内に散在しているのに対して、マウスでは狭い領域に密集している。このことは、*mesp* 相同遺伝子の発現制御に必要な配列群の数や配置が種間で異なっていることを示唆している。しかしながら、*mesp* 相同遺伝子の発現パターンは種間で極めて良く保存されている。一般に、生物種間で発現パターンが良く保存された相同遺伝子の発現制御領域は、機能配列の数や配置、および周辺配列がある程度まとまった長さで保存されていると考えられている。本研究で得られた結果は、このような従来考えられてきたエンハンサーのあり方に対し、配置の異なる配列群から共通の発現パターンを産み出すという、新しい姿を提唱する一例であると言える。

なお、本論文の主要部分は、村上良平、安彦行人、新井理、小原雄治、相賀裕美子、武田洋幸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十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。