

別紙 2

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名：原本悦和

原本君はツメガエルの TGF- β スーパーファミリーに属する分泌タンパク質の一つであるノーダル関連遺伝子(nodal-related gene)の解析を行った。ノーダル関連遺伝子は、中胚葉誘導、左右軸形成、前後軸形成に関与するなど初期発生において重要な役割を担っていることが知られている。両生類モデル生物である *Xenopus laevis*(*X. laevis*)では *Xnr1* から *Xnr6* まで 6 種類のノーダル関連遺伝子が報告されている。その中で原本君は *Xnr3* に興味を持ち、その解析を行った。その理由としては、①TGF- β スーパーファミリー間で保存されている 7 つのシステイン残基のうち C 末端側の残基を欠損しており、構造的に興味深いこと、②シユペーマンオーガナイザーに発現し神経誘導能を示すことが知られているが、そのメカニズムには不明な点が多いこと、③他のノーダル関連遺伝子が活性化する Smad2/3 を活性化せず、その作用機序が不明であること、が挙げられる。また原本君はツメガエル属の一つ、*Xenopus tropicalis*(*X. tropicalis*)から *Xnr3* の相同遺伝子(*Xtnr3*)をクローニングし、その解析を行った。何故ならば *X. tropicalis* はツメガエル属で唯一、二倍体ゲノムを持つ生物であり、かつ世代交代時間が比較的短い等の特徴から、偽四倍体である *X. laevis* では不可能であった遺伝学的解析も可能であると考えたからである。

本研究で原本君は 3 つの大きな発見をした。一番目は *Xtnr3* が遺伝子重複していること、二番目は *Xnr3* の神経誘導能が pro-region による BMP 阻害活性に依存していること、三番目は *Xnr3* の mature-region が他の TGF- β スーパーファミリーと異なりモノマーとして働き、その活性は特異的な構造により保持されていること、である。

まず *Xtnr3* のクローニングを試みた。*X.tropicalis* cDNA ライブラリーを *X.laevis* の *Xnr3* をプローブにしてスクリーニングを行った。その結果、異なる配列を持つ *Xtnr3* を 3 種類単離した。これらのクローンは *X.laevis* において報告されている *Xnr3* の構造的特徴をすべて保存しており、活性についても同様であった。ゲノミックサザンブロットおよび PCR を用いた解析の結果、*Xtnr3* は *X.tropicalis* のゲノム中で遺伝子重複していることが明らかになった。現在 *X.tropicalis* のゲノムは大規模解析が行われているが BAC クローンをショットガンシーケンスにより解析しているため、重複している領域は縮重されて登録され

てしまう。原本君のこの結果は大規模解析では明らかにできない重要な発見である。また、このスクリーニングを行った際に **mature-region** を欠損した *Xtnr3* も単離した。原本君はこの偶然得られたクローンの機能解析から神経誘導活性や BMP の阻害活性ドメインが **pro-region** に存在することを明らかにした。このことは TGF- β スーパーファミリーの **pro-region** が積極的に他のシグナルに影響を与える事を示した大きな発見である。

Xnr3 はどのようなメカニズムによって BMP シグナルを抑制しているのかという問題は本研究を始める段階ではまったく分かっていなかった。本研究を通じて原本君はこの阻害が、**pro-region** が BMP の **mature-region** に直接結合し、その活性を抑制するというメカニズムによることを明らかにした。マウスの Nodal の研究から Nodal の **mature-region** が BMP の **mature-region** とヘテロダイマーを形成しその活性をお互いに阻害しあうことが報告されている。しかし本研究は *Xtnr3* が異なる阻害様式で BMP を阻害していることを証明した。さらに **pro-region** 内に 2 種類の BMP 結合ドメインが存在していること、それらのドメインはどちらもこれまで報告されていない新規の構造であることを明らかにした。この結果はいままで補助的な役割しか想定されてこなかった、他の TGF- β スーパーファミリーの **pro-region** についての再検討を促すであろう。

Xnr3 の全長を含むタンパク質をアフリカツメガエルの胚において過剰発現させると突起形成を引き起こす。この活性は BMP の阻害ではなく、FGF シグナルの亢進によることが示唆されている。原本君は本研究において、この活性が *Xtnr3* の **mature-region** によるものであり、また *Xtnr3* の **mature-region** は通常の TGF- β スーパーファミリーとは異なり、ダイマー形成を必要とせずモノマーとして機能していることに発見し、これを証明した。これは本研究の重要な発見の一つであり、今後 TGF- β スーパーファミリーの研究に大きく貢献すると考えられる。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。