

論文審査の結果の要旨

氏名 足立 健次郎

本論文は、マウス胚盤胞発生に必須の遺伝子である *Bysl* の同定及びその機能解析について述べられたものである。マウス初期発生過程においては、最初等価であった割球が胚盤胞期に胚体を構成する内部細胞塊あるいは胚体外組織を構成する栄養外胚葉へと分化する。これは胚発生過程における最初の細胞分化であり、哺乳類特有の発生現象である。しかしながら、生体における胚盤胞発生過程の解析には物理的あるいは方法論的制約を伴うため、その詳細な調節機構は未だ明らかではない。論文提出者は、本論文の前半部で *in silico* 発現解析と RNAi を組み合わせることにより、胚盤胞の形成に関与する因子の同定を試みている。

まず、EST 及びマイクロアレイデータを用いて、体細胞組織と比べて着床前胚で高い発現が認められる遺伝子を抽出した。RT-PCR 解析により発現パターンを確認し、32 遺伝子を同定した。それらの胚盤胞発生における関与を検討するために、各遺伝子に対する siRNA を受精卵に注入し胚盤胞への発生率を評価した。その結果、siRNA の導入により胚盤胞への発生を有意に抑制するものを 5 遺伝子同定した。後半部では、これらの遺伝子のうち *Bysl* の機能について解析を行っている。

論文提出者は、*Bysl* の発現抑制が胚盤胞期直前に胚発生を阻害することを見出した。*Bysl* は当初、ヒト栄養外胚葉細胞特異的な細胞接着に関与する細胞質因子として同定された。しかし、その後多くの生物種で高度に保存されていることがわかり、特に出芽酵母のホモログである *ENP1* は 40S リボソームサブユニットの生合成に関与することが報告された。そこで、まず胚盤胞発生過程における *Bysl* の役割について検討している。*Bysl*/siRNA の導入胚を詳細に解析したところ、胚盤胞形成直前の 16 細胞期桑実胚で増殖が停止していることがわかった。栄養外胚葉分化マーカーの発現を RT-PCR 及び免疫染色により検討したところ、サイトケラチン *EndoA* の発現が減少していた。次に、それぞれ内部細胞塊及び栄養外胚葉細胞系列への分化に関与する転写因子 Oct3/4 及び *Cdx2* の発現を免疫二重染色により調べたところ、Oct3/4 は通常の桑実胚とほぼ同レベルの発現を示したものの *Cdx2*

の発現が殆ど認められなかった。これらのことから、*Bysl*/siRNA 導入胚では細胞増殖とともに栄養外胚葉細胞分化が異常になっていることが示唆された。次に、*Bysl* の生物学的機能を検討している。内部細胞塊に由来する細胞株である ES 細胞に shRNA 発現ベクターを導入したところ、その増殖が著しく阻害されることがわかった。細胞内局在を調べるため、Venus との融合タンパク質を作製し発現させたところ、*Bysl* は核内に存在し、特に核小体に強い局在が認められた。さらに、*Bysl*/shRNA を導入した ES 細胞では 40S サブユニットの構成要素である 18S rRNA の合成が著しく阻害されていた。次に、蔗糖密度勾配遠心法により細胞質中のリボソームを解析したところ、40S サブユニットの生成が著しく減少し、60S サブユニットの蓄積及びポリソームの減少が認められた。また、透過型電子顕微鏡による解析の結果、*Bysl*/siRNA 導入胚においてもリボソーム生合成に異常を来していることが明らかになった。以上のように、*Bysl* は 40S リボソームの生合成に必須の因子であり、胚盤胞発生において不可欠な役割を担っていることが示された。

本論文では、着床前胚における分子生物学的手法を用いた機能解析の有効性を示すとともに、当初の報告とは異なり *Bysl* がリボソーム生合成に不可欠な役割を担う因子であることを証明した。本研究は、RNAi を初期胚でのスクリーニングに用いた点で特徴的であり、これまで困難であった着床前胚の解析に重要な貢献を成すと考えられる。また、酵母に比して解析が遅れている哺乳類リボソーム生合成の分子機構に関する新しい知見を与えるものである。

なお、本論文は実吉（添田）知恵氏、相良洋氏、岩倉洋一郎氏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、博士（理学）の学位を授与できると認める。