

論文審査の結果の要旨

氏名 儘 田 博 志

本論文は一部構成で要旨、序論、方法、結果、考察、文献、図表からなっており、アフリカツメガエル胚の初期眼発生における新規核膜タンパク質 *Nem1* の機能解析結果について述べられている。

脊椎動物の眼は前脳由来の眼杯と表皮由来の水晶体により形成され、その発生機構は良く解析されているが、発生初期の神経板における予定眼領域の決定から眼胞形成に至る経路の解析は数少ない。これまで報告されているものとして、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) での初期眼形成に関わる転写因子の遺伝子カスケードがある。それは、まず *Otx2* の制御を受けて *Tbx3* が予定眼領域に発現し、次いで *Otx2* と *Sox2* により *Rax*, *Pax6*, *Six3* 等の転写因子が順に発現誘導されるというものである。しかし、これら転写因子の直接の標的遺伝子の同定やその発現制御機構については未だ明らかにされていない。一方、核膜タンパク質はこれまで細胞分裂時の核膜の消失と再構築、ならびに核の構造を維持する役割が主として解析されてきた。しかし発生過程における核膜タンパク質の役割についての解析は殆どなされていなかった。本研究ではアフリカツメガエルの予定脳領域である前方神経外胚葉に発現する遺伝子のスクリーニングから新規の核膜タンパク質 *Nem1* を同定しその機能解析を行った。その結果、*Nem1* が核膜内膜上において眼の発生に関与すること、またその活性には *Nem1* が核膜内膜に局在していることが必要であること、さらに核質側に存在する C 末端側領域と核タンパク質 BAF との相互作用が重要であることを示すなど、発生学における重要な知見が得られている。

Nem1 はアミノ酸配列の構造予想プログラムにより、N 末側にシグナルペプチド様の配列と、中央に 5 つの膜貫通領域が予測されたが、既知のドメインやモチーフは持っていなかった。また *Nem1* 遺伝子のオーソログはヒトから線虫まで存在していたが、いずれも機能未知であった。しかし進化的に保存された相同性の高い領域を 2 ケ所見だし、それぞれ領域 A、領域 B とした。領域 A は膜貫通領域内に、領域 B は C 末端側に存在した。次に *Nem1* の時間的空間的発現パターンを解析したところ、*nem1* mRNA は母性 mRNA として存在し、中期胞胚遷移後も発現しており、また神経胚期には前方神経外胚葉に発現し、尾芽胚期では眼を含む頭部に強い発現が見られた。

核膜でのタンパク質の局在に関する検討は、これまで免疫電子顕微鏡観察を用いて行わ

れてきたが、本研究においてそれらを解析するための簡便な方法を新たに考案した点が高く評価できる。本研究では、まず核膜の内腔側と核質側を識別するための指標として、それぞれに配向するようにタグを付けた核内膜タンパク質 MAN1-HAi(内腔側)と Emerin-HAc(内腔側)、HAn-Emerin(核質側)を作成した。次いでそれらを発現させた培養細胞を、細胞膜の抗体透過性を引き起こす digitonin を用いて処理したところ、核外膜の抗体透過性が核内膜に比べ経時的に増大することを見いだした。この「digitonin 透過処理-免疫染色法」を用いることで、Nem1 の C 末端領域は核質側に配向していることが示され、またこのことより Nem1 は核膜内膜タンパク質であることが示唆された。

Nem1 の機能解析を行うために mRNA による過剰発現実験、アンチセンス・モルフォリーノオリゴ (MO) による機能低下実験を行った。興味深いことに、いずれの場合においても神経胚期において予定眼領域に発現する眼特異的マーカー遺伝子である *rax*, *tbx3*, *pax6* の発現が低下し、また尾芽胚期においては眼の欠損した表現型が得られた。対照的に前脳中脳マーカー遺伝子である *otx2* や神経板マーカー遺伝子である *sox2* の発現には影響は見られなかった。これは Nem1 が眼の発生に特異的に働くことを示唆する。さらに Nem1 の各種欠失型コンストラクトを作製し、mRNA の顕微注入実験を行った結果、シグナルペプチドと膜貫通領域が Nem1 の活性と核膜局在に必要で、特に Nem1 の C 末端領域の核膜への局在が活性に必要であることが示された。以上の結果から、Nem1 は核内膜に局在し、核質側で化学量論的に制御された複合体を形成する可能性が考えられた。

そこで次に Nem1 の C 末端領域と相互作用する因子として核タンパク質の BAF に注目した。BAF は核内膜タンパク質や眼の発生に関わる転写因子と相互作用することが知られている。解析の結果、*baf* mRNA は *nem1* と眼胞領域で共発現すること、Nem1 の領域 B に存在する BAF 結合配列を介して結合することが示された。さらに、*nem1* MO による眼の形成阻害は *nem1* mRNA の共注入では回復するが、BAF 結合配列を欠いたコンストラクトでは回復効率が著しく低下した。これらの結果から Nem1 は核内膜において、少なくとも BAF を介して眼特異的マーカー遺伝子の発現制御に関与することが示唆された。

以上のように本研究は、核膜タンパク質が発生過程の組織特異的な遺伝子発現を制御する可能性を初めて示したものであり、核膜タンパク質の役割に新たな知見を与えるものとして、高く評価できる。

なお、印刷公表した論文中の Nem1 のクローニングは共著者の高橋範行によるものであるが、本論文に記載されている解析は全て論文提出者が主体となって分析およ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。

したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。