

論文内容の要旨

申請者氏名 山田 竜一

Hox 遺伝子群は脊椎動物の発生過程において重要な役割を果たす転写調節因子をコードする遺伝子群であると考えられている。発生過程における *Hox* 遺伝子群の機能を解明するためには *Hox* 遺伝子転写産物が発現制御している標的遺伝子の同定、解析が重要である。*Mab2111* は抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により *HOXC4* の標的候補遺伝子として同定された遺伝子であり、線虫の *mab-21* 遺伝子のマウスホモログであった。*mab-21* は線虫の *Hox* 遺伝子である *egl-5* との遺伝学的な関係が報告されている。このことは、*Mab2111/mab-21* がマウス、線虫において共通の *Hox* 標的遺伝子である可能性を示唆している。線虫 *mab-21* の変異体は胚生致死、あるいは生殖感覚器の形成異常を起こすことが知られている。また、*mab-21* は線虫、マウスのみならず、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、カエル、ヒトでも高度に保存されており、発生過程において重要な役割を担っていると考えられる。しかし、*mab-21* ファミリーは既知の遺伝子と相同性が無いため、その機能に関しては全く未知である。そこで、本研究は *Mab2111* 遺伝子の発生過程における役割を明らかにすること、さらに *Mab2111* と *Hox* 遺伝子の関係を明らかにすることを目的とした。

Mab2111 の発現様式を明らかにするために、*in situ hybridization* を行った。その結果、発生過程において *Mab2111* は中枢神経系、目、生殖器等に発現することが判明した。*Mab2111* の生体内での役割を明らかにするために、*Mab2111* 遺伝子欠損マウスを作製した。*Mab2111* 欠損マウスは肋骨にホメオティック変異が認められ、*Hoxc4* 遺伝子欠損マウスの表現型との類似性が示された。そこで、*Mab2111/Hoxc4* 二重欠損マウスを作製したところ、ホメオティック変異を示す個体の割合に増加が認められ、*Mab2111* と *Hoxc4* の遺伝学的相互作用が示された。さらに、*Mab2111* 欠損マウスは水晶体、および包皮腺に形態形成異常が認められた。水晶体胞の形成不全に付随して、水晶体形成に関わることが知られる *Foxe3* の発現減少、および細胞増殖率の低下が示された。一方、水晶体形成関連遺伝子 *Pax6*, *Sox2*, *Six3*, *c-maf* 等の発現に変化は観られなかった。また、*Pax6* 突然変異マウスにおいて *Mab2111* の発現が減少していたことから、*Mab2111* と *Pax6* の遺伝学的相互作用が示された。さらに、水晶体形成における *Mab2111* の役割を明らかにするために、*Mab2111*-/-細胞と Wild-type 細胞から構成されるキ

メラマウスを作製した。キメラマウスにおける各細胞の組織分布を調べた結果、*Mab2111*^{-/-}細胞は網膜で認められたが、水晶体には全く認められなかった。このことから、水晶体形成において *Mab2111* は細胞自律的に機能することが示唆された。

マウスには *mab-21* ファミリーに属する *Mab2112* が存在する。*Mab2111/12* は発現パターン、アミノ酸配列の類似性、および *Mab2111* 欠損マウスの表現型から発生過程において類似した役割を担っていると考えられる。そこで、*Mab2112* 欠損マウスを作製した。*Mab2112* 欠損マウスは網膜、および腹部体壁に形態形成異常が認められ、胎生致死であった。*Mab2112* 欠損マウスの腹部体壁において *Mab2111* 欠損マウスの水晶体と同様に、細胞増殖率の低下が認められた。さらに *Mab2111/2* 二重欠損マウスを作製したところ、*Mab2111/2* 二重ヘテロマウス(+/-,+/-)は正常に生育するのに対し、*Mab2111* ホモ、*Mab2112* ヘテロマウス(-/-,+/-)は生後3週間で致死であった。以上の結果から、*Mab2111* と *Mab2112* は予想されたとおり、類似した機能を持つことが示唆された。

Mab2111 の分子機能を明らかにするために、MAB21L1 結合タンパク質の探索を行った。マウス胎仔抽出液より GST-MAB21L1 融合タンパク質に特異的に結合するバンドを検出し、ペプチドシーケンスを行った。その結果 MAB21L1 結合タンパク質として、KH ドメインを有する RNA 結合タンパク質、Sam68 (Src-associated in mitosis, 68 kDa) が同定された。免疫沈降法、細胞染色の結果から細胞内における MAB21L1 と Sam68 の結合、および共局在が示された。さらに、MAB21L1 の N 末端側の領域と Sam68 の KH ドメイン付近の領域が結合することが判明した。Sam68 は KH ドメインを介し poly(U)RNA に結合することが知られているが、Sam68 と poly(U)RNA の結合活性に対する MAB21L1 の影響は認められなかった。次に、Sam68 の活性に対する MAB21L1 の影響を検討するために、Rev-CAT assay を行った。その結果、MAB21L1 は Sam68 の活性を増強することが判明した。

本研究により、マウス発生過程において *mab-21*(*Mab2111/2*) 遺伝子は包皮腺、肋骨、網膜、腹部体壁の形成において重要な役割を果たすことが明らかとなった。特に水晶体形成において、*Mab2111* は細胞自律的に機能することが示唆された。生体内における *mab-21* の分子機能は依然として不明であるが、このような機能未知分子の解析を通じ、発生現象を理解する上で新たな知見が得られるものとする。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 山田 竜一

Hox 遺伝子群は脊椎動物の発生過程において重要な役割を果たす転写調節因子をコードする遺伝子群であると考えられている。発生過程における *Hox* 遺伝子群の機能を解明するためには *Hox* 遺伝子転写産物が発現制御している標的遺伝子の同定、解析が重要である。*Mab2111* は抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により HOXC4 の標的候補遺伝子として同定された遺伝子であり、線虫の *mab-21* 遺伝子のマウスホモログであった。*mab-21* は線虫の *Hox* 遺伝子である *egl-5* との遺伝学的な関係が報告されている。このことは、*Mab2111/mab-21* がマウス、線虫において共通の *Hox* 標的遺伝子である可能性を示唆している。本論文は *Mab2111*、*Mab2112* 遺伝子の発生過程における役割を明らかにすること、さらに *Mab2111* と *Hox* 遺伝子の関係を明らかにすることを目的としたものであり、*Mab2111* および *Mab2112* 遺伝子欠損マウスを作製し、そのフェノタイプと、*Hoxc4* 遺伝子との遺伝学的相互作用の解析を行なったものである。

Mab2111 欠損マウスは肋骨にホメオティック変異が認められ、*Hoxc4* 遺伝子欠損マウスの表現型との類似性が示された。そこで、*Mab2111/Hoxc4* 二重欠損マウスを作製したところ、ホメオティック変異を示す個体の割合に増加が認められ、*Mab2111* と *Hoxc4* の遺伝学的相互作用が示された。また、*Mab2111* 欠損マウスは水晶体、および包皮腺に形態形成異常が認められた。キメラマウスの解析から、水晶体形成において *Mab2111* は細胞自律的に機能することが示唆された。マウスには *mab-21* ファミリーに属する *Mab2112* が存在する。*Mab2111* と *Mab2112* はその発現パターン、アミノ酸配列の類似性から、発生過程において類似した役割を担っていると考えられる。そこで、*Mab2112* 欠損マウスを作製し、*Mab2111* 欠損マウスの表現型と比較した。*Mab2112* 欠損マウスは網膜、および腹部体壁に形態形成異常が認められ、胎生致死であった。このことから、*Mab2112* はマウス発生過程において、これらの領域の形成に重要な役割をもつことが明らかとなった。

以上のように、本論文は *Mab2111* 遺伝子が、*Hox* の直接の標的遺伝子であることを示したとともに、マウス発生過程において *mab-21(Mab2111/2)* 遺伝子が包皮腺、肋骨、網膜、腹部体壁の形成において重要な役割を果たすことが明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。