

論文内容の要旨

申請者氏名 小野 達也

アフリカツメガエルの受精卵は 12 回の卵割後、中期胞胚遷移(**midblastula transition**、**MBT**)を迎え、これを境に卵割は非同調的となり、それまでは不活性であった接合体ゲノムからの転写が活性化される。さらに胚を形成する個々の細胞の細胞周期が **S**、**M** 期の初期発生型から、**G1**、**S**、**G2**、**M** 期からなる体細胞型へと変化する。本論文では、**MBT** 前後における転写因子 **E2F** の機能解析を行った。**E2F** は体細胞型細胞周期において **G1/S** 期移行を制御する転写因子であり、その過剰発現は休止期細胞を **S** 期へと進行させる。その重要性から、体細胞型細胞周期における **E2F** の機能に関しては多くの知見があるが、初期発生および初期発生型細胞周期における機能に関しての報告は少ない。またアフリカツメガエル初期発生における **MBT** は細胞周期に間期が出現する時期であると同時に、接合体ゲノムからの転写が活性化される時期でもあり、**E2F** の機能が **MBT** における細胞周期変化に関与する可能性を考えた。

初期発生における内在性 **E2F** の DNA 結合活性をゲルシフトアッセイにより解析したところ、未受精卵から原腸胚期まで同レベルで存在したが、内在性 **E2F** の転写活性をレポーターアッセイにより解析すると、胞胚期以前には **E2F** の転写活性は存在せず、胞胚期において初めて生じ、その後上昇した。優性不能型 **E2F-1** 組み換え蛋白質を初期胚に導入すると、内在性 **E2F** の転写活性が阻害された。この初期胚では、胞胚期に至るまでは何の表現型も観察されないが、胞胚期後、表面の細胞が浮き出す異常が生じ、その後発生を停止した。その際、**MBT** における細胞周期変化の目印とされる母性サイクリン **E** 蛋白質の分解時期、および **Cdc2** のキナーゼ活性を抑制する 15 番目のチロシン残基のリン酸化時期は、未処理の初期胚と比べて変化がなかった。しかし、発生段階の進行とともに 15 番目のチロシンがリン酸化された **Cdc2** 量が増加した。を初期胚中の **Cdc2** 活性を調べたところ、この結果と一致してキナーゼ活性が抑制されていた。さらに定量的ゲノム PCR の結果から、表現型が生じる時期まではゲノム量は増加するものの、その後増加しなくなり、細胞増殖が停止するところがわかった。このことは二細胞期の片半球に優性不能型 **E2F-1** を導入した初期胚の切片の核染色では正常な半球と比較して核の数が少ないことから確認できた。また、発生異常を生じた初期胚を詳細に解析したところ、核の形が変形していること、および初期胚から精製したゲノムは断片化していることがわかった。

以上の結果から、**MBT** 以前の初期胚に **E2F** は存在するがその転写活性化能は **MBT** 後に起こること、**MBT** における細胞周期変化に **E2F** は直接関与していないこと、胞胚期以後に上昇する **E2F** 活性は、胞胚期以降の初期胚の細胞増殖および胚発生に必須の役割を担っていることが示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 小野達也

本論文は、アフリカツメガエルの初期発生にて転写因子 **E2F** の機能解析を行った最初の例である。アフリカツメガエルの初期発生過程における中期胞胚遷移 (**midblastula transition**, **MBT**) では、接合体ゲノムからの転写が活性化されるのみならず、同調的卵割が非同調となり、胚を形成する細胞の細胞周期が **S**、**M** 期の初期発生型から、**G1**、**S**、**G2**、**M** 期からなる体細胞型へと変化する。本論文では、この遷移期において転写活性化と細胞周期の間期出現が同時期に起こることを考慮し、体細胞周期において **G1/S** 期移行を制御する転写因子である **E2F** に着目し、**E2F** の機能が **MBT** における細胞周期変化に関与する可能性を検討しており、これは **MBT** の分子機能を考えるうえで重要な知見であり、発生学上かつ細胞周期研究において評価できる。

本論文において、レポーターアッセイにより **E2F** の転写活性化能が胞胚期以後上昇することを明らかにしている一方で、ゲルシフトアッセイを用いることにより、内在性 **E2F** の DNA 結合能が未受精卵から原腸胚期まで同レベルで存在することを見出している。また、この際に **Rb** など通常の体細胞周期における **E2F** 活性制御にかかわる因子の関与は見られなかった。これは、予想外の発見であり、今後初期発生過程における細胞周期制御、転写活性化の研究において大きな意義を持つものである。

さらに、本論文では、優性不能型 **E2F-1** 組み換え蛋白質を初期胚に導入することにより、内在性 **E2F** の転写活性を阻害する実験を行っており、このような初期胚では、**MBT** における細胞周期変化の目印とされる母性サイクリン **E** 蛋白質の分解時期、および **Cdc2** のキナーゼ活性を抑制するチロシン残基のリン酸化時期は、未処理の初期胚と比べて変化がなかったものの、発生段階の進行とともにチロシンがリン酸化された **Cdc2** 量が増加し、キナーゼ活性が抑制されていた。定量的ゲノム PCR の結果から、表現型が生じる時期まではゲノム量は増加するものの、その後増加しなくなり、細胞増殖が停止することがわかった。このことは、優性不能型 **E2F-1** を導入した初期胚の切片を核染色することによっても確認している。さらに、発生異常を生じた初期胚を詳細に解析したところ、核の形が変形していること、および初期胚から精製したゲノムは断片化していることからアポトーシスが亢進していることがわかった。これらの実験結果より、**E2F** の機能は、胞胚期に至るまでは必要とされないが、胞胚期以降の初期胚の細胞増殖および胚発生に必須の役割を担っていることが示唆された。

以上のように、本論文は動物の初期発生過程における細胞周期制御因子の機能を示唆するものでものもので、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。