

論文内容の要旨

申請者氏名 田原 直幸

RNA 結合タンパク質 Cugbp Elav-like family member 1(Celf1)は、スプライシングや mRNA の安定性などを調節して転写後の遺伝子発現を制御する。申請者が所属する研究室では、これまでに、ゼブラフィッシュ胚発生における Celf1 の機能解析を行い、Celf1 が体節の左右対称性の維持と心臓の左右非対称性の決定に関与することを報告した。この研究の過程で、心臓と同じく左右非対称に配置される肝臓や膵臓の形成位置を調べたところ、*celf1* ノックダウン胚では、左右差の異常に加えて肝臓や膵臓の形成不全が観察された。この結果は、Celf1 が左右非対称性の決定だけではなく、内胚葉由来の器官形成に関与することを示唆している。本論文では、RNA 結合タンパク質 Celf1 の内胚葉由来器官の形成に果たす役割を明らかにし、内臓器官形成における RNA 結合タンパク質を介した転写後調節機構を明らかにしようとした。

受精後 48 時間の *celf1* ノックダウン胚において、約 80%の胚で肝臓が欠損し、約 20%の胚で肝臓の縮小が見られた。また、約 55%の胚において、膵臓が 2 つ以上分裂していたことから、Celf1 は、肝臓と膵臓の形成に関与することが明らかになった。*celf1* は、原腸陥入期では、肝臓や膵臓の前駆細胞である内胚葉細胞を含むすべての細胞で発現するが、その後の胚では、内胚葉由来の組織や器官には *celf1* 発現は消失することから、Celf1 が原腸陥入期の内胚葉形成を制御することで、内臓器官の形成に影響を与えると考え、これを検証するため、内胚葉細胞を GFP で標識する *Tg[sox17:GFP]* を用いて内胚葉細胞の挙動を解析した。その結果、*celf1* KD 胚では、内胚葉細胞の数が減少し、正中線付近に細胞が集合できないという表現型が観察された。以上の結果から、*celf1* は、原腸陥入の時期に、内胚葉細胞の増殖と移動を制御することで、肝臓や膵臓の形成に関与することが示唆された。次に、Celf1 の標的候補遺伝子のスクリーニングを行い、内胚葉細胞の増殖に機能を持つ *gata5*、細胞移動に機能を持つ *cdc42* の mRNA の 2 つを同定した。qPCR 解析から、Celf1 は、これらの標的遺伝子の発現を低下させる役割を持つことを示した。*celf1* KD 胚では、*cdc42* の mRNA の量が増加しているため、アンチセンスモルフォリノを用いて、*cdc42* を KD すると、内胚葉細胞の移動の異常はキャンセルされ、膵臓形成不全の表現型が回復することが明らかになった。以上の結果から、RNA 結合タンパクによる *cdc42* の転写後調節は、内臓形成、特に膵臓の形成に必須であることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 田原 直幸

脊椎動物の内胚葉由来器官は、細胞分化、移動、増殖などの生命現象が時空間的に厳密に制御されることで形成される。これまでに、様々な遺伝子やシグナルが内胚葉由来器官の形成に関与することが報告されてきていたが、RNA 結合タンパク質 Celf1 の関与は知られていなかった。ゼブラフィッシュは、脊椎動物であるが、発生期、卵黄から栄養を吸収し、皮膚呼吸によってガス交換できるので、内臓、呼吸器などが欠失していたとしても、生後数日間生育できる特性を持つ。本学位論文では、ゼブラフィッシュ胚のモデル生物としての特性を生かし、Celf1 の内胚葉由来器官形成における役割を明らかにしている。

申請者はゼブラフィッシュ胚における *celf1* の時空間的発現パターンに着目し、Celf1 が原腸陥入期に内胚葉細胞で働くことを予測し、原腸陥入期に焦点をあて、アンチセンスオリゴを利用した遺伝子ノックダウン法を駆使して Celf1 の内臓器官形成における役割を解析した。内胚葉細胞のライブイメージング、*in situ* ハイブリダイゼーションなど駆使して、*celf1* ノックダウン胚では内胚葉細胞の正中線方向への集合、内胚葉細胞の増殖に異常が起こることを示し、Celf1 がこれらの現象に必須の働きをすることを明らかにした。

これまでに知られている Celf1 の mRNA 3'UTR における標的配列の情報を利用して、申請者は Celf1 の標的候補のスクリーニングを行って、転写因子 Gata5 と低分子量 G タンパク質 Cdc42 をコードする mRNA を同定した。RNA 免疫沈降、qPCR 解析により Celf1 が *gata5* や *cdc42* の mRNA に結合し、その量を低下させる働きがあることを明らかにした。さらに、*celf1* KD の条件では、多くの遺伝子の発現レベルが増減しているので、*cdc42* の転写後調節がどのように内臓器官の形成に関与しているかは分かっていない。そこで、*celf1* ノックダウン胚の表現型を、*cdc42* をノックダウンすることによってレスキューする手法で、Celf1 は Cdc42 タンパク質の量を制限することによって内胚葉細胞の正中線方向への集合を制御し、膀胱の器官形成に関与していることを明らかにした。

以上のように、本論文は内臓器官の形成に必須な転写後調節機構の一端を解明したもので、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。