

学位論文題名

マボヤ初期発生における NF- κ B/Rel

ファミリーの役割に関する研究

学位論文内容の要旨

NF- κ B/Relファミリーは、N末端側に約300アミノ酸残基からなる相同領域(Rel homology domain (RHD))を有し、哺乳類の免疫応答に関与する転写因子NF- κ B、ショウジョウバエの免疫応答に関与するDifや背腹軸決定に関与するDorsalなどが知られている。その活性化機構は互いに類似しているが、機能は、免疫応答の活性化、細胞増殖や分化の制御、発生における背腹軸決定、形態形成時のprogrammed cell deathなど多岐にわたっている。背腹軸決定に関しては、ショウジョウバエの場合、Dorsalが胚の腹側で核内に局在して腹側化に関与することが示唆されている。一方、本研究で対象とする原索動物マボヤは、系統発生的に脊椎動物と無脊椎動物の中間に位置し、進化上、最も初期に脊索を獲得した生物種と考えられ、脊椎動物の発生を単純化したモデル動物として用いられている。

本研究では、進化的に興味深い位置を占め、単純な発生パターンを示すマボヤを用いて、その発生における軸決定の分子機構を明らかにするため、その候補と考えられるNF- κ B/Relファミリーに着目した。初めに、マウスc-rel遺伝子由来のRHDをプローブに用いたマボヤゲノミックPCR産物のサザンブロット解析を行い、マボヤNF- κ B/RelファミリーPCR産物を得た。このPCR産物をプローブに用いて、マボヤ受精卵cDNAライブラリーから2つの完全長cDNAクローン(As-rel1とAs-rel2と命名)を単離した。2つのクローンの推定アミノ酸配列を比較した結果、両者のRHDは96%の相同性を示したが、As-rel2は、As-rel1と比較して、開始メチオニンの前に9 bpの挿入があり、RHDのC末端側に核移行配列を欠き、7アミノ酸が付加された構造をしている。つまり、As-rel1は典型的なNF- κ B/Relファミリーに属するが、As-rel2は核移行配列を欠いた新規遺伝子産物である。核移行配列を持たないNF- κ B/Relファミリーに関する報告は、本研究で発見されたマボヤAs-rel2の例が初めてである。また、XrelAとAs-rel1が46%、As-rel2が55%の相同性を示した。As-rel1とAs-rel2が1つの遺伝子からalternative splicingによって生成する可能性を検討するために、As-rel1とAs-rel2との共通配列であるRHDをプローブに

用いてゲノミックサザンプロット解析を行った。high stringencyの条件下では他のバンドが検出されず、As-rel1とAs-rel2はalternative splicingによって生成したと考えられる。一方、low stringencyの条件下では数本のバンドが検出されたことから、NF- κ B/Relファミリーに相同の他の遺伝子がマボヤに存在する可能性が考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 沢 英 良

副 査 教 授 長 沢 滋 治

副 査 助 教 授 高 橋 和 彦

副 査 助 教 授 沢 田 均

学 位 論 文 題 名

マボヤ初期発生における NF- κ B/Rel

ファミリーの役割に関する研究

NF- κ B/Rel ファミリーは、N末端側に約300アミノ酸残基からなる相同領域（RHDと呼ばれる）を有する転写因子であり、その役割は、免疫応答、細胞増殖・分化、あるいは、発生・形態形成の制御などと多岐にわたっている。初期発生における役割として、ショウジョウバエの Dorsal とアフリカツメガエルの Xrel A が背腹軸決定に関与することが示唆されている。系統発生学的に脊椎動物と無脊椎動物の中間に位置している原索動物マボヤは、進化上最も初期に脊索を獲得した動物であり、かつ、脊椎動物の発生を単純化したモデル動物であることから、初期発生におけるNF- κ B/Rel ファミリーの役割の解明に威力を発揮すると考えられる。

本論文提出者は、マボヤ卵からのNF- κ B/Rel ファミリー・cDNAの単離とマボヤ初期発生における役割に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) マボヤ受精卵cDNAライブラリーから2つの完全長cDNAクローン(As-rel 1 と As-rel 2)を単離した。両者はRHD内で96%の相同性を示した。As-rel 1は典型的なNF- κ B/Rel ファミリーに属し、一方、As-rel 2は核移行配列とC末端配列を欠いている。核移行配列を欠いたNF- κ B/Rel ファミリーは、本研究で初めて発見された。ゲノミックサザンブロット解析の結果から、As-rel 1 と As-rel 2 は alternative splicing によって生成したと考えられる。

(2) マボヤの組織における As-rel 1 と As-rel 2 の発現を調べるために、As-rel 由来のRHDをプローブに用いたノザンブロット解析を行い、両者のmRNAの発現が受精卵と血球にのみ検出されることを明らかに

した。さらに、マボヤ初期発生過程での両者のmRNAの発現を調べ、両者のmRNAが共に未受精卵に存在し、発生の進行に伴って減少し、遊泳幼生で再び増加することから、As-rel 1 と As-rel 2 がマボヤ初期発生に関与すると考えられる。

(3) マボヤ初期発生における As-rel 1 と As-rel 2 の役割を明らかにするために、マボヤ受精卵へのmRNAの顕微注入実験を行い、それぞれを過剰発現した時の初期発生に対する影響を調べた。As-rel 1 の場合、原腸形成および神経板隆起が遅れ、非常に短い尾を有する幼生が形成された。注入するmRNA濃度に依存して尾の長さが減少すること、尾を形成する脊索の細胞数も減少することから、As-rel 1 は尾部構造の形成に関与していると考えられる。一方、As-rel 2 の場合、初期発生に対してほとんど影響が認められなかった。As-rel 1 と As-rel 2 の相互作用を調べるために、両者のmRNAの同時注入実験を行い、As-rel 1 の過剰発現が及ぼす初期発生に対する影響が As-rel 2 の同時過剰発現によって抑制され、正常な長さの尾が形成されることを明らかにした。in situ ハイブリダイゼーション解析により神経分化のマーカー分子の発現を調べ、As-rel 1 が背側構造である脊索の形成と頭部および尾部の神経形成の制御に関与していることを明らかにした。本研究で初めて発見された As-rel 2 の役割として、ヘテロダイマーの形成を介して As-rel 1 の核内移行を抑制することで、As-rel 1 の作用を制御している可能性が考えられる。

以上の新知見およびそれらを得るために用いた新研究技法は、マボヤの初期発生におけるNF- κ B/Relファミリーの役割の理解にとどまらず、背腹軸決定の制御機構の視点から初期発生システムの進化の道筋を理解する上で重要な寄与をなすものである。

審査員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士（薬学）の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。