

論文審査の結果の要旨

氏名 趙 薇

本論文の研究結果は三つの部分から構成されている。結果に先立ち、イントロダクションの章があり、そこでは体節形成に必須な因子として、体節時計の概念や、その分節境界の形成に必要な分節因子について紹介された。分節境界の確立には **Tbx6** タンパク質の前方境界形成が重要であり、その境界の確立には **Mesp2** と **Ripply2** による負の制御が必須であることが述べられている。しかしこの2つの分子のどちらが実際の **Tbx6** の制御に直接関与しているかは不明であり、その点を明らかにすることが目的であることが述べられている。

研究結果の第一項では、**Ripply2**を過剰に発現するトランスジェニックマウスを作成しその解析により、**Ripply2**の発現量が**Tbx6**のタンパク質の安定性に影響を及ぼすことを示した。この解析に際し、趙さんは**Ripply2**タンパク質を検索できる抗体を自ら作製し、世界で初めて**Tbx6**、**Mesp2**、**Ripply2** 三つのタンパク質を同一サンプル内で可視化しその2時間の体節形成サイクル(Phase I, II, IIIに分けられる)におけるダイナミクスを明らかにした。野生型のPhase Iでは**Tbx6**と**Ripply2**タンパク質が共局在するが、強制発現胚において、**Ripply2**発現領域では**Tbx6**が観察されなかった上に、**Tbx6**の下流因子である**Mesp2**の発現レベルも明らかに減少していた。この現象は**Tbx6**タンパク質が**Mesp2**ではなく、**Ripply2**により分解されるとする仮説を支持するものである。更に免疫染色の結果を定量的に解析し、**Ripply2**と**Tbx6**の負の関係性を明らかに示した。

さらに、**Mesp2**遺伝子座に**Ripply2**をノックインしたマウスを作成し、**Mesp2**不在化で**Ripply2**により**Tbx6**タンパク質の分解が起るか否かを解析した。このノックインマウス胚では**Mesp2**の発現がないにもかかわらず、**Tbx6**タンパク質は正常胚と同様に前方境界を形成し、それは**Ripply2**発現領域の後方境界と一致した。この結果は、**Ripply2**が**Tbx6**の前方境界を決定する因子であることを強く支持している。一方、このノックインマウス胚では分節境界が**Ripply2**により形成されるにもかかわらず、分節した体節が観察されず、**Mesp2**欠損マウスと相似した表現型を呈した。すなわち、この2つの蛋白質は同じ領域で発現するが、**Ripply2**が分節境界の決定、**Mesp2**が中胚葉細胞団の分割、及び体節内での前後極性の確立に機能していることが示唆された。

第二項では異所的な**Ripply2**の発現が、**Tbx6**の誘導する中胚葉発生を阻害することを示している。**Ripply2**を本来の発現領域ではない未分節中胚葉全体に過剰発現させると、未分節中胚葉における**Tbx6**タンパク質が観察されなくなり、また本来は体節を形成する沿軸中胚葉に、体節の代わりに神経管が形成された。この表現型は、以前に報告された**Tbx6**欠損マウスの表現型と相似している。**Ripply2**過剰発現マウス胎児では、**Tbx6**のRNAの発現が変わらなかったことから**Ripply2**は**Tbx6**の発現をRNAではなく、タンパク質レベルで制御することが証明できた。更に、同じような現象は、未分節中胚葉に発現しているT-box因子である**T** (**brachyury**)にも観察された。従って、**Ripply2**によって誘導されるタンパク質の分解は未

分節中胚葉で発現するT-box因子に共通にみられる現象であることが推測できた。

第三項では、Tbx6とRipply2のタンパク質の相互作用を解析した。Tbx6の分解にはRipply2との結合が必要不可欠だと考え、様々な部分欠損型Tbx6を用いて免疫沈降を行い、Ripply2と相互作用に必要なアミノ酸配列がT-boxに存在する二つのドメインを同定し、そのどちらかがあれば両者が結合することを示した。さらにこの2者が直接的に結合することを、GST沈降実験によって確認した。

本研究は、個体レベルの遺伝学的解析、及び組織化学的解析、さらに生化学的解析により体節の分節境界の決定に重要なTbx6の前方境界の決定機構に関して研究した。Tbx6の前方境界の決定にはRipply2が十分であり、Mesp2とは独立に機能しうることを明らかにした。また、この抑制がRNAではなく、Tbx6のタンパク質制御であることを示した。更にこのメカニズムはT-boxを持つタンパク質にとって一般的な制御である可能性を示唆した。発生過程において組織特異的に一過的な発現を示すTbxファミリータンパク質の機能制御の解明に意味を持つ研究成果となる。

なお、本論文のうち、研究結果の第一項の定量解析に関しては、国立遺伝学研究所、発生工學研究室の二宮洋一郎との共同研究である。しかし、論文提出者が主体となって解析及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。

上記より、博士(理学)の学位を授与できると認める。