



Title	Distinct transcriptional regulation and phylogenetic divergence of human LEFTY genes
Author(s)	八代, 健太
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41731">https://hdl.handle.net/11094/41731</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	八 代 健 太
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 8 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Distinct transcriptional regulation and phylogenetic divergence of human <i>LEFTY</i> genes (ヒト <i>LEFTY</i> 遺伝子の転写発現調節解析と系統発生学的考察)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡田伸太郎  (副査) 教 授 濱田 博司 教 授 近藤 寿人

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

脊椎動物の内臓配置は左右非対称である。その臓器配置の一様性から動物種間で高度に保存された共通の分子機構が想定されているが、未だその詳細は不明である。

マウス *lefty* 遺伝子は、TGF  $\beta$  superfamily に属する分泌蛋白で、*lefty 1* と *lefty 2* の2つの遺伝子からなる。初期体節期において *lefty 1* は主に予定神経底板領域の左側に、*lefty 2* は主に側板中胚葉の左側に左右非対称に発現する。*lefty 1* 変異マウスは臓器錯位症である胸腔内左側相同を示すことから、発現パターンから予測された通り *lefty* 遺伝子は左右軸形成過程において重要な役割を果たしている。

本研究では、ヒト *LEFTY* 遺伝子に関して、マウスと共通の機構が保存されているかどうかについて知見を得るため、転写発現調節を中心にマウスと比較解析し、その知見を基に系統発生学的考察を試みた。

#### 【方法と成績】

##### LEFTY 遺伝子の単離について

マウス *lefty 1* cDNA を probe にヒト genomic library を探索した。ヒトでは3つの *LEFTY* 遺伝子 (*LEFTY 1*・*LEFTY 2*・*LEFTY 3*) が単離された。遺伝子地図を作製したところ、これらの遺伝子は tandem に並んでおり、マウス *lefty* の存在する 1 H 5 に相当する Ch. 1 q42.2 に存在することが分かった。*LEFTY 3* は exon 内に Alu 配列を含み偽遺伝子であると思われた。ヒト *LEFTY* とマウス *Lefty* のアミノ酸配列を比べると、各々の counterpart よりもヒト同志、マウス同志の方が相同性が高く、ヒトとマウスでは全く独立に遺伝子重複を生じた可能性が考えられた。

##### LEFTY 2 の転写発現調節について

マウス *lefty 2* を側板中胚葉と予定神経底板の左側に左右非対称に発現させるエンハンサーと相同性の高い配列が *LEFTY 2* の 5' 上流に見いだされた。この領域を含む DNA 断片に *hsp68* プロモーターと *lacZ* をレポーター遺伝子としてつなげた DNA construct を作成し、1細胞期のマウス卵前核に顕微受精を行い、偽妊娠雌マウスの子宮内へ移植、8.25d.p.c.まで子宮内で発育させた後に胚を回収し、X-gal 染色にてレポーター遺伝子の発現を解析した。その結果、マウス *lefty 2* と同様の左側特異的な発現を認めた。このことから、ヒト *LEFTY 2* がヒト初期胚においてもマウスと同様な発現と機能を担っていると考えられた。

## LEFTY 1 の転写発現調節について

マウス *lefty* 1 を予定神経底板に発現させるエンハンサーと相同性の高い配列が *LEFTY* 1 の 5' 上流に存在し、この領域を含む DNA 断片を用いて、前述した方法と同様にトランスジェニックマウスの系で発現を解析した。マウスのエンハンサーでは予定神経底板のみでしか発現を認めないが、ヒトでは全く異なり *LEFTY* 2 (*lefty* 2) と同様の発現パターンを示した。

*lefty* 2 の特徴的発現パターンにとって転写因子 FAST 2 結合部位の存在が必要且つ十分であることが分かっている。塩基配列を解析したところ、ヒト *LEFTY* 1 の転写発現調節領域にはこの FAST 2 結合部位が存在するが、マウスではこの結合部位が変異によって失われていた。そこで、このヒトの FAST 2 結合部位に変異を導入した construct を作成したところ、*lefty* 2 様の発現は消失した。

このことから、ヒト *LEFTY* 1 は *lefty* 2 と同様の発現パターンを示し、これは FAST 2 結合部位の有無によることが示された。また、*LEFTY* 1 の転写発現調節がマウス *lefty* 1 と大きく異なっていることから、ヒトとマウスで独立して遺伝子重複を生じた事が強く示唆された。

### 【総括】

ヒト *LEFTY* を単離したところ、3 つの *LEFTY* 遺伝子が genome 上に tandem に並んで存在した。*LEFTY* 3 は偽遺伝子と思われた。*LEFTY* 2 の転写発現調節は、マウス *lefty* 2 とほぼ同様の機構が保存されていたが、*LEFTY* 1 の転写発現調節はマウスとは大きく異なるものであった。

マウスでは *lefty* 1 が予定神経底板、*lefty* 2 が側板中胚葉で主に機能するように役割分担が存在する。一方、ヒトでは機能を持つ 2 つの *LEFTY* とも *lefty* 2 様の発現を示し、予定神経底板と側板中胚葉の間での量的な差は認めなかったため、マウスのような発現部位での役割分担は存在しないと考えられた。しかし、ヒトの *LEFTY* 1 と *LEFTY* 2、マウス *lefty* 1 と *lefty* 2 の 2 つの部位での発現を相加すれば、ほぼ同様の発現のパターンと強さを示すため、2 つの動物種で機能としてはほぼ同等であることが示唆された。また、マウスとヒトのアミノ酸配列の比較及び転写発現調節機構の違いから、系統発生的に遺伝子重複は各々の動物種で独立して生じたことも示唆された。

本研究より、ヒトの左右軸形成過程においてもマウス同様 *LEFTY* 遺伝子が重要な役割を果たすことが強く示唆され、*lefty* 遺伝子の機能解析がヒト臓器錯位症例の病因の解明に発展しうるものと期待される。

## 論文審査の結果の要旨

脊椎動物の内臓の配置は左右非対称である。その臓器配置の一様性から、動物種間で高度に保存された共通の分子機構の存在が想定されている。しかしながら、左右軸決定機構に関する研究は、長い間遺伝子学的手法と実験発生学的手法による解析に限られてきたため、未だに左右軸形成に関する詳細は不明である。

本研究は、左右軸形成に重要な役割を果たすマウス *lefty* 遺伝子のヒト homologue を単離しその転写発現調節を中心にマウスと比較することで、ヒトの左右軸形成においても *LEFTY* 遺伝子が重要な役割を果たすことを示唆した最初の報告である。すなわち、ヒトとマウスでは全く異なった戦略で転写発現調節機構が進化してきたが、果たしている機能としてはほぼ同じであることが本研究で示唆されている。また、その解析の過程において、この遺伝子の重複は系統樹上マウス以前の動物種で生じたのではなく、マウスとヒトでは全く独立して重複を生じたと考えられる知見が得られ、興味深い。

ヒトの左右軸形成過程における発生異常は臓器錯位症として知られているが、その成因については不明な点が多い。本研究は、マウス *lefty* 遺伝子の機能解析を更に進めることでヒトにおける臓器錯位症の成因解明に発展しうると考えられる重要な知見を提示しており、よって学位に値するものと認める