The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification of essential sequence motifs in the node/notochord enhancer of Foxa 2 (Hnf 3β) gene that are conserved across vertebrate species
Author(s)	西崎, 有利子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42597
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【38】

氏　　名	西　崎　有利子（にし ざき ゆり こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16045　号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学　位　論　文　名	Identification of essential sequence motifs in the node/notochord enhancer of *Foxa 2* (*Hnf 3 β*) gene that are conserved across vertebrate species （*Foxa 2* (*Hnf 3 β*) 遺伝子のノード／脊索エンハンサーの中で脊椎動物の種間で保存されている活性に必須な塩基配列の同定）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　近藤　寿人 （副査） 教　授　濱田　博司　　教　授　審良　靜男

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

脊椎動物の体軸構造の形成とそれに沿ったパターン形成には、オーガナイザーと脊索が主要な働きを担っている。しかしながら、それらの構造が形成される分子機構については不明な点が多い。この問題に対して、マウスのオーガナイザー（ノードと呼ばれる）と脊索の形成に必須である転写因子 Foxa 2 に特に注目し、その遺伝子発現制御機構の解析を通して取り組んでいる。そのための最初のステップとして、この研究では、マウス *Foxa2* のオーガナイザー及び脊索における遺伝子発現を支配しているエンハンサーの中から、その活性に重要な塩基配列を見いだすことを目的とする。

【方法ならびに成績】

マウスのノード／脊索エンハンサーの中から、その活性に重要な塩基配列を同定するために、異なる種間でエンハンサーの塩基配列の比較を行った。そのためにまず、ニワトリと、ゲノムサイズが小さいといわれている魚類のドワーフグーラミーとを、マウスと比較する対象として選び、それらの *Foxa2* 遺伝子をクローニングした。そしてそれぞれの転写単位の上流から下流にわたりゲノム DNA を断片化し、エンハンサー活性を検定した。検定はすべて、hsp 68プロモーターを持つ LacZ レポーターの上流に目的の DNA 断片を挿入したものをトランスジーンとして、トランスジェニックマウス胚を形成することによって行った。その結果、ニワトリでは、転写単位上流－5 kb周辺の2.5kb の断片、ドワーフグーラミーでは転写単位上流－7 kb 周辺の2.5kb の断片に、ノード／脊索エンハンサーを同定した。

マウス、ニワトリ、ドワーフグーラミーの 3 つの動物種間でノード／脊索エンハンサーの塩基配列を比較した。その結果、保存された配列を 3 箇所検出し、それぞれ、5'側より順に CS1 (18bp)、CS2 (17bp)、CS3 (14bp) と名づけた。これらの塩基配列は、これまでにオーガナイザーや脊索の形成に関与することが知られている転写因子の認識配列とは異なったものであった。

ノードと脊索でエンハンサー活性を持つ、マウス *Foxa2* の1.5kb のエンハンサーについて、その構成を調べるために、1.5kb の DNA 断片を 2 つに分けて活性を検定した。3'側の500bp の断片（CS3 を含む）は、活性は弱いが、ノードと脊索におけるエンハンサー活性を示した。しかし、CS1、CS2 を含むエンハンサーの 5'側の 1 kb の断片は、ノードや脊索で発現を起こすことはできなかった。さらに、1.5kb の塩基配列から CS3 のみを欠失したエンハンサー

では、ノードや脊索における発現が完全に失われた。一方、CS1またはCS2を欠失させても、元のエンハンサーに比べて、活性が低下するものの、ノードと脊索におけるエンハンサー活性を保持していた。

【総括】

マウスFoxa 2のノード／脊索エンハンサーを2つに分けたエンハンサーとCSを欠失したエンハンサーの実験の結果から、エンハンサーは、3'側の領域特異性の決定を支配する領域と、5'側の遺伝子発現レベルの増強をもたらす領域とよりなることが示唆された。CS配列の欠失実験から、CS 3は、ノード及び脊索における遺伝子発現に必須であり、CS 1及びCS 2は、強い遺伝子発現に必要であることが示唆された。

特にCS3が、これまでに報告されている転写因子の認識配列とは異なることから、CS3を活性化する転写因子による、ノード／脊索の遺伝子発現に関わる新しい機構が存在することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

脊椎動物の基本的な体制の形成には、オーガナイザーと脊索という誘導活性に富む組織が極めて重要な働きをしている。本論文は、マウス胚におけるオーガナイザー（ノードという）と脊索との形成機構を明らかにすることを目的として、それらの組織の形成に必須な転写因子Foxa 2に注目し、その遺伝子発現制御領域（エンハンサー）の解析を行ったものである。まず、マウスFoxa 2遺伝子のノード・脊索エンハンサーの中から機能的に重要な配列を同定するために、エンハンサーの種間での比較を行っている。ニワトリおよび魚類のドワーフグーラミーからFoxa 2をクローニングし、それぞれについてトランスジェニックマウス胚を作成することにより、ノード・脊索で遺伝子発現を起こすエンハンサーを同定した。これら3動物種のエンハンサーの塩基配列の比較により、CS1、CS2、CS3という3つの種間で保存された配列を見出したが、これらの配列は、既知のノード・脊索での遺伝子発現に関与する転写因子の結合配列とは異なる。さらにCS3はノード、脊索でのエンハンサー活性に必須であること、また、CS1、CS2は強い遺伝子発現に必要であることを明らかにした。この研究は、ノード・脊索の形成には、種間で保存された遺伝子調節機構が作用していることを示し、また、その調節機構には、これまでに知られていない転写因子が必須の働きをしていることを示唆する重要な知見を与えた。本論文は学位論文に値すると評価される。