

Title	Cloning and Regulation of the Vertebrate Homologue of lin-41 That Functions as a Heterochronic Gene in <i>Caenorhabditis elegans</i>
Author(s)	金本, 隆司
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47564">https://hdl.handle.net/11094/47564</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	かな 金 もと 本 たか 隆 し 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20976 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Cloning and Regulation of the Vertebrate Homologue of <i>lin-41</i> That Functions as a Heterochronic Gene in <i>Caenorhabditis elegans</i> . (肢芽に発現を示す線虫 <i>lin-41</i> ホモログの単離と発現・機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 秀樹  (副査) 教授 岡部 勝 教授 仲野 徹

#### 論 文 内 容 の 要 旨

##### [ 目的 ]

脊椎動物の四肢は肢芽と呼ばれる薄い外胚葉とその内部を満たす未分化な間充織からなる小さなふくらみが、決まったレベルの体節に隣接する体幹から突出して形成されることから始まり、最終的に骨組織・筋組織・神経組織などの分化した組織によって形成された、機能を有する成熟した四肢が完成する。その各過程での分子メカニズムの解析から、多くの遺伝子産物の機能と相互関係が明らかになっている。我々は四肢の形成に関与する分子を新たに同定しその機能メカニズムを明らかにすることを目的として、degenerate RT-PCR を用いた新規遺伝子の探索を行った。

##### [ 方法ならびに成績 ]

ニワトリ胚の軟骨から抽出した RNA を材料として C2H2 タイプの zinc finger 蛋白質を標的とした degenerate RT-PCR によるスクリーニングを進める過程で、マイクロ RNA *let-7* のターゲットとして線虫 *lin-41* のニワトリ・マウスでの相同遺伝子が肢芽にかなり特異的に発現を持つことを見いだした。

線虫 *lin-41* は発生の段階でのイベントのタイミングを規定する異時性遺伝子の一つであり、内在性の *lin-41* の発現が第 4 幼生後期に *let-7* によって抑制されることが成体への成熟に必要な機構であることが解明された。これは、マイクロ RNA の生理的機能を示した初めての例として大きなインパクトを与えた。*lin-41* によってコードされると考えられる蛋白は TRIM/RBCC ファミリーに分類され、転写因子としての機能をもつものやユビキチンシステムに関与するものなど様々な蛋白がこのファミリーに含まれる。*lin-41* の機能については線虫の突然変異体以外に報告はなく、データベース上、クローニングによる塩基配列の登録も線虫以外には無かった。このため、*lin-41* の脊椎動物における機能の解析を目的としてニワトリ・マウスの *lin-41* の cDNA をライブラリースクリーニングにてクローニングした。いずれの遺伝子も RBCC 蛋白をコードすると考えられ、そのアミノ酸レベルでの相同性は 80% 以上と非常に高度な保存が見られた。ノザンハイブリダイゼーションでは胚発生の初期 (ニワトリでは 2 日目) に高い発現がみられ、発生段階がすすむにしたがいその発現は低下した。この結果と *in situ* ハイブリダイゼーションの結果から、四肢形成に関与する機能を有すると考え、ニワトリの肢芽に RCAS ウイルスまたはエレクトロポレーションを用いた遺伝子導

入を試みた。しかし、遺伝子導入による形態変化は観察することはできず、ニワトリ胚の系では生理的機能の解析にはいたらなかった。今後、遺伝子改変マウスの作製などの手法が考えられる。

線虫では *let-7* による *lin-41* の 3' 側非翻訳配列に対する制御効果は広く認められた知見である。この制御機構が脊椎動物にも存在するかについては興味もたれる点であり、我々はルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、両分子間の線虫での関係がニワトリ・マウスでも保存されているかを検討した。pGL-3-Control ベクターの Xba I 部位にニワトリ・マウス *lin-41* の 3' 側非翻訳配列を挿入したコンストラクトを作製し、これを HeLa 細胞（内在性の *let-7* の存在がマイクロアレイなどで証明されている）に導入し、48 時間後に回収、ルシフェラーゼ活性を比較した。ニワトリ・マウスのいずれでもコントロールに用いた空のベクターを導入した細胞に比べて有意な活性低下を観察した。この結果が *let-7* による 3' 側非翻訳配列に対するものであるかを検討するため、*let-7* の認識配列と考えられる部分に変異を入れたコンストラクトを作製し、同様の解析を行ったところ、活性低下は軽減されるという *let-7* の関与を支持する結果を得た。

[ 総括 ]

線虫の発生のイベントのタイミングを制御する異時性遺伝子 *lin-41* のニワトリ・マウスにおける相同遺伝子を単離した。*lin-41* のアミノ酸配列の保存は両種間で高度であり、ニワトリ・マウスでともに発生期の肢芽に発現を示した。また、マイクロ RNA *let-7* による *lin-41* の 3' 側非翻訳配列に対する制御機構が脊椎動物でも保存されていることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

生物の正常な発生には、遺伝子発現の空間的・時間的な厳密な制御が重要である。線虫の *lin-41* は発生のイベントのタイミングを調節する heterochronic 遺伝子のひとつとして知られている。また、線虫および魚類では *lin-41* が 3'UTR を介した microRNA *let-7* による制御を受けることがわかっている。申請者らは、縮重 RT-PCR 法を用いたニワトリならびにマウスの四肢の形態形成に関わる因子のスクリーニングから、線虫 *lin-41* と同じく RBCC/TRIM 蛋白をコードするニワトリおよびマウス *lin-41* ホモログが、ニワトリ胚および胎生期のマウスでは肢芽にはほぼ特異的な発現を示し、アミノ酸配列の種間での高い保存性を示すことを明らかにした。ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた *lin-41* 3'UTR の解析からは、microRNA による 3'UTR の制御機構の存在を支持する結果を得た。以上の結果から、高等脊椎動物においても *lin-41* が発生のタイミングを調整している可能性があると考えられる。以上の内容から博士（医学）の学位授与に値するものと認める。