

氏名（本籍）	よし 吉	だ 田	わたる 渉
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	医博第 1286 号		
学位授与年月日	平成 8 年 3 月 26 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）病理学系専攻		
学位論文題目	脊椎動物ニワトリ <i>Hoxa-4</i> 標的遺伝子の分離・同定		

（主査）

論文審査委員	教授 帯刀 益夫	教授 佐竹 正延
	教授 田村 眞理	

論文内容要旨

研究目的

脊椎動物の頭尾軸に沿った形態形成機構に HOX 遺伝子が重要な役割を担っていることが、HOX 遺伝子の発現パターン解析や遺伝子破壊実験などから明らかとなっている。しかし、HOX 遺伝子がコードする転写因子が結合し、転写制御している標的遺伝子の知見は乏しい。そこで、私は HOX 遺伝子が標的遺伝子の転写調節を介して行われる形態形成への寄与を明らかにすべく、ニワトリ HOXA-4 標的遺伝子の分離、同定を行った。

研究結果

標的遺伝子の分離のため、*in vivo* で HOXA-4 ホメオドメインタンパク質と結合していると考えられる可溶性クロマチンを HOXA-4 ホメオドメイン特異抗体で免疫沈降し、沈降分画から DNA 断片を精製することにより標的遺伝子断片を得るという生化学的手法を用いた。その結果、標的遺伝子の候補である DNA 断片の分離に成功し、それらの DNA 断片は *in vitro* でリコンビナント HOXA-4 タンパク質と強い結合性を示した。また、*in vitro* で強い結合性を示した免疫沈降 DNA 断片にはホメオドメインタンパク質が認識し、結合できると考えられる共通配列が存在していた。次に免疫沈降 DNA 断片をプローブとして標的遺伝子候補 DNA 断片をカバーするゲノム DNA クローンを分離した。このゲノム DNA クローン中に存在し、HOXA-4 タンパク質結合部位に隣接する転写単位は HOX ホメオドメインタンパク質の標的遺伝子であると考えられ、この転写単位に由来する mRNA の cDNA クローンを分離を行った。この標的遺伝子の塩基配列を決定し、アミノ酸に翻訳したところ、この遺伝子はプロテインキナーゼをコードしていることが明らかとなった。このプロテインキナーゼは特にキナーゼメインにおいて酵母の *YAK1* にコードされるプロテインキナーゼと高い相同性を示した。この新奇キナーゼは酵母の *yak1* を相補したことから機能的にも *YAK1* と相同であると考えられ、この標的遺伝子は脊椎動物の *YAK1* ホモログ *VYAK* と命名した。*YAK1* は酵母の増殖に抑制的に作用しているプロテインキナーゼであることから、*VYAK* は脊椎動物の細胞増殖や分化の調節に働くと推測された。*VYAK* 遺伝子の部分的なゲノム構造の解析により、クロマチン免疫沈降法で回収された HOXA-4 タンパク質結合部位は最も 3'側のイントロンにあることが判った。また、培養細胞 P19 を用いたトランジェントトランスフェクション実験ではこの HOXA-4 結合部位を含むイントロン領域は HOXA-4 タンパク質依存性のエンハンサー活性を示した。このことから生体内でも実際に *VYAK* が HOXA-4 タンパク質の標的遺伝子となっている可能性が示唆された。*in situ*

hybridizationによりHOXA-4とVYAKの発現パターンを比較した結果、体節、神経管、中腎、消化管、肢芽等の器官で二者の発現がオーバーラップしている領域が観察された。さらにHOX遺伝子の中軸骨格形成における役割を解明するために、発生段階の異なるステージにおける体節各組織でのVYAKとHOXA-4の発現パターン解析を行った。その結果、5日胚の体節皮板ではHOXA-4とVYAKが同じレベルで発現していたが、椎板領域ではHOXA-4の発現が強いのにに対してVYAKの発現はHOXA-4の発現に比べて弱かった。また、4日胚でのHOXA-4とVYAKの体節各組織での発現パターンや発現量は5日胚のそれとは異なっていた。肋骨や脊椎骨といった中軸骨格は、体節椎板細胞から派生する軟骨凝集塊から形成される。この過程には体節細胞の増殖速度が関係すると考えられることから、HOX遺伝子は体節の増殖や分化を決定する遺伝子や細胞分化のタイミングの領域特異的な制御を行っている可能性が考えられた。このことから体節の各組織でHOXA-4が標的遺伝子VYAKの発現量を微妙にコントロールすることにより、その細胞の増殖や分化決定が行われた結果、領域特異的な中軸骨格が形成されるというモデルが導きだされる。

研究の意義・独創的な点

HOX遺伝子の下流にある標的遺伝子として細胞の増殖に関与する因子としてVYAKが同定された。そして、HOX遺伝子がコードするホメオドメインタンパク質が生体内でVYAKの転写調節を行うことが明らかとなり、HOX遺伝子と細胞の増殖という現象が結びついた。また、今回、クロマチン免疫沈降法という生化学的手法を用いたHOX遺伝子の標的配列分離の際に*in vitro*での結合性やHOXホメオドメインタンパク質の共通標的配列の有無といったクライテリアをもうけ効率良く標的遺伝子候補断片を選別した結果、標的遺伝子の分離に成功したと考えられる。

審査結果の要旨

脊椎動物の *Hox* 遺伝子は、その胚における発現パターンや遺伝子破壊したマウスの変異体の解析など個体レベルの研究から、形態形成に重要であることが分かっているが、*Hox* 遺伝子がコードする転写因子としてのホメオドメイン蛋白がどのような遺伝子を標的として制御しているかは全く明らかではない。吉田渉は、ニワトリ *Hox* 遺伝子のひとつである *Hoxa-4* の標的遺伝子の分離・同定を試みた。そのため、生体内で HOXA-4 蛋白が結合していると考えられるクロマチンを断片化し、抗 HOXA-4 特異抗体で免疫沈降し、沈降分画から DNA 断片を精製し、クローニングした。そして、この遺伝子断片をプローブとして、標的遺伝子の候補となるゲノム DNA をクローニングした。このゲノム DNA クローンに HOXA-4 蛋白が認識する特異的 DNA 配列が存在することを確認し、これに隣接する DNA 断片をプローブとして、cDNA ライブラリーから、その転写単位となる mRNA コード領域をクローニングすることに成功した。この cDNA クローンの塩基配列から、この遺伝子が新しい蛋白キナーゼをコードしていることが明らかとなった。この蛋白キナーゼは酵母の YAK1 のコードされる遺伝子と高い相同性を示し、酵母の *yak1* 変異を相補したので、機能的にも YAK1 と同等であると考え、脊椎動物 YAK1 (VYAK) と命名した。ゲノム構造の解析から HOXA-4 の結合サイトはこの遺伝子の 3'側のイントロン内にあり、トランスフェクション実験から、この結合領域が確かに HOXA-4 蛋白により制御されるエンハンサー活性を持っていることを証明した。さらに、*in situ* hybridization により、HOXA-4 蛋白の発現と VYAK 遺伝子の発現がいくつかの組織でオーバーラップしていることが分かった。また、HOXA-4 蛋白の標的遺伝子である VYAK 遺伝子が、蛋白キナーゼであることから、細胞増殖制御に関与していることが予測され、*Hox* 遺伝子の新しい制御メカニズムが明らかとなった。

このように、吉田渉の研究成果は、*Hox* 遺伝子の新しい標的遺伝子を単離し、形態形成の遺伝子制御機構に重要な知見を加えたと考えられ、発生生物学、分子生物学研究に大きく貢献し、学位論文に値するものと判定する。