

氏 名	王 喆
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	博理工甲第 1080 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	脊椎動物の前脳部域化を制御する遺伝子機構の解析
論文審査委員	委員長 教 授 弥益 恭 委 員 教 授 小林 哲也 委 員 准 教 授 足立 明人 委 員 准 教 授 川村 哲規

論文の内容の要旨

脊椎動物の初期発生において、*gbx2* homeobox 遺伝子は原腸形成期に神経板の後方で発現し、中脳と小脳を誘導するシグナル分泌センター（峡部オーガナイザー）の位置決定に貢献する。マウスの場合、*gbx2* はその後の脳形成において、大脳基底核と間脳視床の発生にも関与するが、この際の *gbx2* の役割について、詳細は不明である。本研究では、発生生物学での優れた研究モデルであるゼブラフィッシュを用い、前脳形成における *gbx2* の役割を発生遺伝学的に検討した。

まず、ゼブラフィッシュ胚中枢神経系原基における *gbx2* の発現を、Whole mount *in situ* hybridization (WISH) により検討し、この遺伝子が体節形成後期 (18-24 hours post-fertilization/hpf) において、終脳の側方部で一過的に発現すること、36 hpf 以降の咽頭胚においては視床領域で発現することを明らかにした。さらに、*gbx2* の領域特異的エンハンサーの制御下で EGFP を発現する Transgenic (Tg) 魚を用いることで、終脳および視床における *gbx2* の発現の動態を生体胚で追跡できることを示した。また、2 色 fluorescence *in situ* hybridization による前脳マーカー遺伝子の発現との比較により、体節形成後期における終脳での *gbx2* の発現が、前脳前方の形成に関わる遺伝子 *emx3*, *six3b*, *dlx2a*, *otx2*, *shha*, *pax6a* の発現と密接な関係にあること、特に *gbx2* が終脳内の脳室側領域において強く発現することを示した。これらの観察は、*gbx2* が終脳部域化遺伝子の発現を制御することで終脳の部域化に関わることを示唆した。*gbx2* の終脳形成における役割を直接検討するため、加温誘導性 *gbx2* を保有する Tg 系統魚 [*Tg(hsp70l:gbx2)*] の胚について、*gbx2* の終脳での発現開始に先立つ 16 hpf において加温処理し、前脳部域化に関与する転写調節遺伝子、そして分泌因子遺伝子の発現に対する *gbx2* 強制発現の効果を WISH 及び定量 PCR (qPCR) により調べた。その結果、前脳領域の発生に関わる転写因子遺伝子である *otx2*, *emx3*, *six3b*、そして *dlx2a* の発現が抑制された。この際、終脳腹側（外套下部）における *six3b* と *dlx2a* の発現低下が特に顕著であるのに対し、終脳における *emx3* の発現低下は背側（外套）では比較的軽微であった。分泌因子遺伝子については、一般には神経管背側領域の形成を行う *bmp2b* と *wnt1* の発現が抑制される一方、外套下部を誘導する *shha* が活性化された。一方、*gbx2* の機能欠損変異体の胚における前脳形成遺伝子の発現を検討したところ、外套での *emx3* の発現が腹側に拡大し、外套下部では *dlx2a* の発現が増強されていた。

さらに、Gbx2 と人工エストロゲン受容体の融合タンパク質 Gbx2-ERT2 の mRNA を胚に注入し、

Tamoxifen 処理することにより、内在 *gbx2* 遺伝子の終脳での発現開始に先立つ 16 hpf において Gbx2 の転写調節能を活性化し、前脳部域化に関与する転写調節遺伝子、そして分泌因子遺伝子の発現に対する効果を WISH により調べた結果、外套下部領域の発生に関わる転写因子遺伝子である *six3b* と *dlx2a* の発現が抑制された。分泌因子遺伝子については、外套下部の形成を誘導する *shha* が活性化された。以上の結果は、*gbx2* が、体節形成後期においては終脳で発現し、他の転写因子遺伝子と分泌因子遺伝子の発現制御を介して終脳の部域化、特に後に基底核となる外套下部の形成に関与することを示す。

次に、終脳における *gbx2* の発現を調節する細胞内シグナルを明らかにするため、終脳での発現開始に先立つ時期 (14-18 hpf) において、様々なシグナル伝達経路の活性を制御する薬剤でゼブラフィッシュ胚を処理し、*gbx2* の発現を検討した。その結果、Wnt シグナルの活性化、FGF シグナルの阻害、レチノイン酸 (RA) 処理のいずれによっても終脳における *gbx2* の発現が顕著に抑制された。この結果は、終脳における *gbx2* の発現が Wnt シグナルと RA シグナルで抑制される一方、FGF シグナルを必要とすることを示す。また、これらのシグナルが 14-18 hpf の時期内のどこで働くかを検討した結果、FGF シグナルは継続的に *gbx2* 発現に必要とされること、Wnt シグナルと RA はこの時期全体を通じて *gbx2* の発現抑制に働くことを見出した。

一方、*gbx2* の視床形成における役割を検討するため、前述の *Tg(hsp70l:gbx2)* 系統魚胚を、視床で *gbx2* の発現が見られる直前の 34 hpf において加温処理し、視床原基とその周辺脳領域で発現する転写因子遺伝子の発現に対する効果を WISH 及び qPCR により調べた。その結果、視床での *irx1b* の発現、視床と中脳での *dbx1a* の発現、そして視床と視床下部での *olig2* の発現について抑制が観察された。また、*gbx2* の機能欠損変異体では視床での *irx1b* の発現が低下した、これらの結果は、咽頭胚期の間脳においては、*gbx2* は視床形成遺伝子の発現制御を通して視床形成に関与することを示す。

以上のように、本研究は、*gbx2* が体節形成後期には終脳の部域化、咽頭胚期では視床形成に関与することを、発生遺伝学的に明らかとしたものである。

論文の審査結果の要旨

脊椎動物の初期発生において、*gbx2* homeobox 遺伝子は原腸形成期に神経板の後方で発現し、中脳と小脳を誘導するシグナル分泌センター（峡部オーガナイザー）の位置決定に貢献する。マウスの場合、*gbx2* はその後の脳形成において、大脳基底核と間脳視床の発生にも関与するが、この際の *gbx2* の役割の詳細はわかっていない。王氏は、発生生物学での優れた研究モデルであるゼブラフィッシュを用い、前脳形成における *gbx2* の役割を発生遺伝学的に検討した。

まず、ゼブラフィッシュ胚中枢神経系原基における *gbx2* の発現を、Whole mount *in situ* hybridization (WISH) により検討し、この遺伝子が体節形成後期 (18-24 hours post-fertilization/hpf) において、終脳の側方部で一過的に発現すること、36 hpf 以降の咽頭胚においては視床領域で発現することを明らかにした。さらに、*gbx2* の領域特異的エンハンサーの制御下で EGFP を発現する Transgenic (Tg) 魚を用いることで、終脳および視床における *gbx2* の発現の動態を生体胚で追跡できることを示した。また、2 色 fluorescence *in situ* hybridization による前脳マーカー遺伝子の発現との比較により、体節形成後期における終脳での *gbx2* の発現が、前脳前方の形成に関わる遺伝子 *emx3*、*six3b*、*dlx2a*、*otx2*、*shha*、*pax6a* の発現と密接な関係にあること、特に *gbx2* が終脳内の脳室側領域において強く発現することを示した。これらの観察は、*gbx2* が終脳部域化遺伝子の発現を制御することで終脳の部域化に関わることを示唆した。

gbx2 の終脳形成における役割を直接検討するため、王氏は加温誘導性 *gbx2* を保有する Tg 系統魚 [*Tg(hsp70l:gbx2)*] の胚について、*gbx2* の終脳での発現開始に先立つ 16 hpf において加温処理を行い、前脳部域化に関与する転写調節遺伝子、そして分泌因子遺伝子の発現に対する *gbx2* 強制発現の効果を、WISH 及び定量 PCR (qPCR) により調べた。その結果、前脳領域の発生に関わる転写因子遺伝子である *otx2*、*emx3*、*six3b*、そして *dlx2a* の発現が抑制された。この際、終脳腹側（外套下部）における *six3b* と *dlx2a* の発現低下が特に顕著であるのに対し、終脳における *emx3* の発現低下は背側（外套）では比較的軽微であった。分泌因子遺伝子については、神経管背側領域の形成を行う *bmp2b* と *wnt1* の発現が抑制される一方、外套下部を誘導する *shha* が活性化された。一方、*gbx2* の機能欠損変異体の胚においては、外套での *emx3* の発現が前方に拡大し、外套下部では *dlx2a* の発現が増強された。

王氏はさらに、野生型の Gbx2 と改変型 estrogen 受容体の融合タンパク質 Gbx2-ERT2 の mRNA を胚に注入し、Tamoxifen 処理することにより、内在 *gbx2* 遺伝子の終脳での発現開始に先立つ 16 hpf において Gbx2 を活性化することに成功した。Gbx2 活性化が前脳部域化に関与する転写調節遺伝子、そして分泌因子遺伝子の発現に及ぼす効果を WISH により調べた結果、外套下部領域の発生に関わる転写因子遺伝子である *six3b* と *dlx2a* の発現が抑制された。分泌因子遺伝子については、外套下部の形成を誘導する *shha* が活性化された。以上の結果は、*gbx2* が、体節形成後期においては終脳で発現し、他の転写因子遺伝子と成長因子遺伝子の発現制御を介して終脳の部域化、特に後に基底核となる外套下部の形成に関与することを示す。

次に、終脳における *gbx2* の発現を調節する細胞内シグナルを明らかにするため、王氏は、終脳での発現開始に先立つ時期 (14-18 hpf) において、様々なシグナル伝達経路の活性を制御する薬剤でゼブラフィッシュ胚を処理し、*gbx2* の発現を検討した。その結果、Wnt シグナルの活性化、FGF シグナルの阻害、レチノイン酸 (RA) 処理のいずれによっても終脳における *gbx2* の発現が顕著に抑制された。この結果は、終脳における *gbx2* の発現が Wnt シグナルと RA シグナルで抑制される一方、FGF シグナルを必要とすることを示す。また、これらのシグナルが 14-18 hpf の時期内のどこで働くかを検討し、FGF シグナルは継続的に *gbx2* 発現に必要とされること、Wnt シグナルと RA シグナルはこの時期全体を通じて *gbx2* の発現抑制に働くこ

とを見出した。

一方、*gbx2* の視床形成における役割を検討するため、前述の *Tg(hsp70l:gbx2)* 系統魚胚を、視床で *gbx2* の発現が見られる直前の 34 hpf において加温処理し、視床原基とその周辺脳領域で発現する転写因子遺伝子の発現に対する効果を WISH 及び qPCR により調べた。その結果、視床での *irx1b* の発現、視床と中脳での *dbx1a* の発現、そして視床と視床下部での *olig2* の発現について抑制が観察された。また、*gbx2* の機能欠損変異体では視床での *irx1b* の発現が低下した、これらの結果は、咽頭胚期の間脳においては、*gbx2* は視床形成遺伝子の発現制御を通して視床形成に関与することを示す。

以上のように、本研究において王氏は、*gbx2* が、体節形成後期には終脳の部域化、咽頭胚期では視床形成に関与することを発生遺伝学的に明らかにした。これらの成果は、脳形成初期での脳原基の領域化に関して未解決だった問題に回答を与えるとともに、初期の脳形成を制御する遺伝子ネットワークに関する今後の研究に大きく貢献するものである。特に、大脳基底核、そして視床の発生という、重要でありながら比較的研究が遅れている分野で新たな分子機構を明らかにしたのみならず、こうした脳領域に関わる先天性疾患の病因理解にも今後貢献しうると期待される。なお、本論文の内容は、発生生物学領域の国際誌である *Differentiation* において、査読付き論文として掲載されている。よって、本審査委員会は、この学位論文が博士（理学）の学位に十分ふさわしいと判断し、「合格」との判定を行った。