

氏名	井上 詞貴
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 675 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 24 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	脊椎動物の胚発生を制御する成長因子遺伝子 <i>fgf8</i> の転写制御機構
論文審査委員	委員長 教授 弥益 恭 委員 教授 井上 弘一 委員 教授 末光 隆志 委員 准教授 足立 明人

論文の内容の要旨

脊椎動物における脳の発生は、神経誘導の結果生じた神経板の前後軸に沿った領域化により開始され、その後、引き続いて進行する各領域に特異的な神経細胞の増殖、分化、そして細胞移動と神経軸索の伸張を経て完成される。脳原基の領域化において、予定中脳および後脳領域の境界、いわゆる中脳後脳境界（MHB）で形成される峽部は、その前方に中脳を、後方に小脳を誘導する局所的なシグナル分泌センターとして機能することから、峽部オーガナイザーと呼ばれる。繊維芽細胞増殖因子（Fibroblast growth factor, FGF）ファミリーの一つである *Fgf8* は MHB・峽部で発現し、峽部オーガナイザーから分泌されるシグナル本体として機能する。私は、脊椎動物の脳形成を制御する分子メカニズムを明らかにするため、本研究において、ゼブラフィッシュ *fgf8* 遺伝子の転写調節機構の解明に取り組んだ。

まず、ゼブラフィッシュ胚における GFP レポーター遺伝子のトランジェント発現を指標に、ゼブラフィッシュ *fgf8* 遺伝子周辺ゲノム DNA が持つ転写調節能について検討を行ったところ、遺伝子下流 +14.4 kb に位置する S4.2 領域（1309 bp）が、体節形成期に MHB において転写活性化能を持つことが示された。S4.2 領域が *egfp* 遺伝子に連結された GFP コンストラクト（S4.2-EGFP）を導入したトランスジェニック（Tg）胚において、レポーターの発現解析を行うことにより、S4.2 は中期体節期以降の MHB に加え、鼻原基、眼柄遠位部、そして耳胞におけるエンハンサーとして機能することが明らかとなった。S4.2 領域内部に様々な部分的欠失を導入し、同様に Tg 胚でのレポーター解析を行うことにより、S4.2 内の #234 領域（485 bp）がエンハンサー活性に必要十分であることを見出した。さらに、#234 領域内の #34 領域が転写活性化に、#2c 領域が中脳、後脳での異所的な転写の抑制に必要であり、S4.2 による *fgf8* の MHB 特異的な転写が、転写活性化と領域特異的な抑制機構によって制御されることを示した。

#234 領域内には、Pax ファミリーホメオドメイン転写因子の認識配列が 2 カ所見出されたが（PBSI、PBSII）、このファミリーの一つである Pax2a は、中期体節期以降の MHB の維持において、*fgf8* の発現に必要であることが知られるため、*fgf8* 転写制御における Pax2a の役割を検討した。まず、Pax2a が PBSI または PBSII に *in vitro* で特異的に結合することを EMSA 法により示した。また、mRNA および発現コンストラクトの導入により *pax2a* の強制発現を行うと、S4.2-EGFP の発現が脳領域で異所的に誘導されること、*pax2a* 変異体（*no isthmus*）の MHB では S4.2-EGFP の発現が消失することを見出した。さらに、S4.2

領域の MHB における転写活性化能は、PBSI/II を欠失させることでほぼ消失した。以上より、S4.2 の MHB エンハンサー活性には Pax2a の PBSI/II への結合が必要十分であると考えられる。

さて、Fgf8 の MHB オーガナイザー分子としての機能は、脊椎動物間で共通しているが、実際、各動物種 *fgf8* 遺伝子の周辺 DNA 配列の網羅的な比較を行ったところ、S4.2 領域内に、四足類 *Fgf8* および魚類の *fgf8* パラログである *fgf17a* でも高度に保存された配列 (DCR3) が見出された。さらに、ゼブラフィッシュ *fgf17a*、メダカ *fgf17a*、マウス *Fgf8* の DCR3 のいずれもが、GFP レポーター解析により、S4.2 と同様の MHB エンハンサー活性を持つことが示された。加えて、これらの動物種由来 DCR3 も Pax2a と結合能を持つことを確認した。これらの結果より、DCR3 の MHB エンハンサーとしての作用機序が脊椎動物において進化的に保存されていることが示唆された。

以上のように、本研究は、MHB オーガナイザー分子である Fgf8 の発現維持が、Pax2a の S4.2 への結合による転写活性化と、#2c が持つ領域特異的な抑制との協調作用によって厳密に制御されており、この制御メカニズムは脊椎動物において進化的に保存されていることを明らかとした。

論文の審査結果の要旨

脊椎動物の初期発生過程では、中枢神経系原基である神経板の領域化が進行する。この際、予定中脳および後脳領域の境界、いわゆる予定中脳後脳境界 (Midbrain-Hindbrain Boundary; MHB) で形成される峡部は、周辺において中脳、小脳を誘導する局所的なシグナル分泌センターとして機能することから、峡部オーガナイザーと呼ばれる。繊維芽細胞成長因子 (Fibroblast growth factor, FGF) ファミリーの一つである Fgf8 は、MHB・峡部で発現し、峡部オーガナイザーから分泌されるシグナル本体であり、MHB における Fgf8 の発現調節機構を明らかにすることは、脊椎動物脳形成の制御メカニズムを明らかにする上で重要な課題と言える。学位申請者、井上詞貴氏提出の「脊椎動物の胚発生を制御する成長因子遺伝子 *fgf8* の転写制御機構」と題する学位論文は、小型熱帯魚ゼブラフィッシュをモデル動物として、Fgf8 の MHB における発現調節機構に取り組むことで、脊椎動物における脳形成制御の遺伝子機構の解明に取り組んだ研究の成果をまとめたものである。

申請者は、まず、ゼブラフィッシュ胚における GFP レポーター遺伝子のトランジェント発現を指標に、ゼブラフィッシュ *fgf8* 遺伝子周辺のゲノム DNA の転写調節能について広範に検討を行い、遺伝子下流 +14.4 kb に位置する S4.2 領域 (1309 bp) が、体節形成期に MHB において転写活性化能を持つことを見いだした。S4.2 領域の転写調節能を詳細に内在 *fgf8* の発現と比較するため、同ゲノム領域が *egfp* 遺伝子に連結された GFP コンストラクト (S4.2-EGFP) をゼブラフィッシュの生殖系列に導入し、得られたトランスジェニック (Tg) 胚におけるレポーターの発現解析を行うことにより、S4.2 領域は、中期体節期以降、MHB での *fgf8* の発現に加え、鼻原基、眼柄遠位部、そして耳胞における *fgf8* の発現をも再現するエンハンサーであることを明らかとした。

引き続き、申請者は S4.2 領域の MHB におけるエンハンサーとしての作用機構を解明するため、S4.2 領域内部に様々な部分的欠失を導入した上、変異導入 S4.2 領域の転写制御活性をやはり Tg 胚を用いたレポーター解析で検討し、S4.2 内の #234 領域 (485 bp) が MHB でのエンハンサー活性に必要な十分であることを見出した。さらに、#234 領域内の #3 及び #4 領域が転写活性化に、#2c 領域が中脳、後脳での異所的な転写の抑制に必要なことを示した上、S4.2 領域による *fgf8* の MHB 特異的な転写が、転写活性化と領域特異的抑制によって制御されることを提唱した。

MHB エンハンサーのコアとも言える #234 領域の塩基配列には、Pax ファミリーホメオドメイン転写因子の認識配列が 2 カ所見出されたが (PBSI, PBSII)、この転写因子ファミリーの一つである Pax2a は、中期体節期以降の MHB における *fgf8* の発現に必要なことが知られる。そこで申請者は、S4.2 による転写制御に Pax2a が関与する可能性を検討するため、一連の実験を行なった。まず、Pax2a が PBSI または PBSII に *in vitro* で特異的に結合することを EMSA 法により示した。また、mRNA または発現コンストラクトの導入により *pax2a* の胚内強制発現を行うと、S4.2-EGFP の発現が脳領域で異所的に誘導されること、*pax2a* 変異体 (*no isthmus*) の MHB では S4.2-EGFP の発現が消失すること、S4.2 領域の MHB における転写活性化能が PBSI/II を欠失させることでほぼ消失することを明らかとした。以上より、申請者は、S4.2 の MHB エンハンサー活性には、Pax2a の PBSI/II への結合が必要十分であると結論した。

さて、Fgf8 の MHB オーガナイザー分子としての機能は、脊椎動物間で共通するが、本研究において、各動物種 *fgf8* 遺伝子の周辺 DNA 配列についての網羅的な比較を行ったところ、S4.2 領域の内部に、四足類 *Fgf8* および魚類の *fgf8* パラログである *fgf17a* でも高度に保存された配列 (DCR3) が見出された。さらに、ゼブラフィッシュ *fgf17a*、メダカ *fgf17a*、マウス *Fgf8* の DCR3 のいずれもが、GFP レポーター解析において S4.2 と同様の MHB エンハンサー活性を示した。加えて、これらの動物種由来 DCR3 も Pax2a と結合

能を持つことを確認した。これらの結果から、申請者は、DCR3のMHBエンハンサーとしての作用機序が脊椎動物において進化的に保存されていることを強く示唆した。

以上のように、本研究は、MHBオーガナイザー分子であるFgf8の領域特異的発現が転写活性化と転写抑制機構の協調作用によって厳密に制御されており、この制御メカニズムは脊椎動物において進化的に保存されていることを明らかとしたものである。これらのこと自体、生物学上重要な成果であるが、本研究はそれに留まらず、脊椎動物における脳形成制御機構の遺伝子レベルでの理解、そして脊椎動物の脳形成に関するゲノムレベルでの進化に関する今後の研究に大きく貢献すると考えられる。さらに、以上の内容は、すでに査読付き論文として国際誌に採択となっている。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。