

氏名	太田 聡
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 707 号
学位授与年月日	平成 21 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	脊椎動物の胚発生における繊維芽細胞成長因子シグナルの役割の研究
論文審査委員	委員長 教授 弥益 恭 委員 教授 坂井 貴文 委員 教授 末光 隆志 委員 准教授 小林 哲也

論文の内容の要旨

繊維芽細胞成長因子 (Fibroblast Growth Factor, FGF) は、多数のメンバーを含む成長因子群であり、一般に動物細胞の増殖、分化、移動などを制御する。脊椎動物胚発生においても多様かつ重要な役割が知られており、発生初期においては中胚葉及び内胚葉の誘導と胚体の背腹軸の確立、その後は各領域、器官の誘導や領域化、そして成体においては各組織、器官の維持にも貢献する (Böttcher and Niehrs, 2005; Ornitz and Itoh, 2001; Thisse and Thisse, 2005)。

本研究では、小型魚ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) をモデルとし、脊椎動物の胚発生における FGF シグナルの役割について、FGF 受容体 (FGF receptor, FGFR) の機能に注目しつつ研究を行った。まず、4 種知られる *fgfr* 遺伝子 (*fgfr1*, *fgfr2*, *fgfr3*, *fgfr4*) 各々について、構成的活性型 *fgfr* (*constitutively active fgfr*) 遺伝子を作製し (*ca-R1*, *ca-R2⁺*, *ca-R2*, *ca-R3*, *ca-R4*)、ゼブラフィッシュ胚で強制発現させたところ、いずれの遺伝子も bud 期においては、胚の動植物軸に沿った伸長、脊索の重複、脳領域マーカー遺伝子の発現の腹側への拡大と前方へのシフトを誘導し、24 時間胚 (24 hpf) では、前脳の欠損、後脳の重複を引き起こした。以上より、FGFR の下流で働くシグナル伝達系は、少なくとも初期胚では FGFR の種類によらず、基本的に類似すると考えられる。

次に、内在 FGFR の機能を阻害するために、各 *fgfr* について膜結合型 dominant negative *fgfr* (*membrane-bound dominant negative fgfr*) 遺伝子を作製した (*mdn-R1*, *mdn-R2b*, *mdn-R2c*, *mdn-R3*, *mdn-R4*)。mRNA の導入による強制発現の結果、*mdn-R4* を除くすべての各 *mdn-FGFR* は胴部と尾部の形成を阻害した。各 *mdn-FGFR* が実際にはどの FGF の作用を阻害するのかを確認するために、各 *mdn-FGFR* 遺伝子と、異なるサブグループに属する *fgf* 遺伝子 (*fgf3*, *fgf4*, *fgf8*, *fgf16*) の共発現を行ったところ、*mdn-FGFR1c* は Fgf4, Fgf8, Fgf16、*mdn-FGFR2b* は Fgf3 と Fgf16、*mdn-FGFR2c* は Fgf16、*mdn-FGFR3c* は調べたすべての Fgf の作用に対して強い阻害効果を示した。*mdn-FGFR4* については、いずれの Fgf の作用に対しても顕著な阻害効果を示さなかった。以上から、*mdn-FGFR* にはある程度リガンド選択性があり、特に *mdn-FGFR3c* は FGF シグナル全般を阻害しようと結論した。

そこで、*mdn-R3* を全 FGF シグナル阻害剤として利用し、FGF シグナルの胚発生における役割の検討を試みた。原腸形成期に *mdn-R3* 強制発現胚で、胚領域マーカー遺伝子の発現を調べたところ、中軸中胚葉 (脊

索)の短縮、沿軸中胚葉の形成不全、内胚葉細胞の減少が観察された。神経外胚葉については、予定前脳領域は生じるのに対し、予定中脳後脳境界 (Midbrain Hindbrain Boundary, MHB) および後方神経外胚葉の形成は阻害されており、FGF シグナルは後方神経系の形成に必要であると推定された。

一方、FGF リガンドを阻害するため、分泌型 dominant negative *fgfr* (*soluble dominant negative fgfr*) 遺伝子を作製し (*sdn-R1*, *sdn-R2b*, *sdn-R2c*, *sdn-R3*, *sdn-R4*)、同様に強制発現させたところ、*sdn-R3* 強制発現胚のみで MHB の消失、耳胞の縮小、胴尾部の欠損といった特異的な形態異常が観察された。各種 FGF リガンドとの共発現を行ったところ、*sdn-FGFR3c* は Fgf8 をはじめとする Fgf8 subfamily 成長因子の機能を特異的に阻害した。そこで、*sdn-R3* を Fgf8 subfamily の阻害剤として利用することで、Fgf8 subfamily の胚発生における機能についてさらに検討した結果、Fgf8 subfamily は、頭部では MHB 領域における峽部形成、耳胞形成、そして後方構造の形成に不可欠であることが明らかとなった。後方形成に関しては、Fgf8 subfamily は尾芽領域の形成とその後の維持に必須であると推定された。

なお、Fgf8 subfamily でも中核として働く Fgf8 については、各種脊椎動物において、複数の splicing isoform 知られるが、その生物学的意味についての詳細は不明であった。私はまず、PCR 法により、ゼブラフィッシュでも他の脊椎動物と同様に Fgf8a と Fgf8b という 2 種の isoform が存在することを明らかにした。Real Time RT-PCR の結果、発生時期、胚領域を問わず、Fgf8b が Fgf8a より高レベルに発現していることを明らかにした。両者の胚発生における機能を比較するため、各 isoform について、mRNA 導入により胚での強制発現を行ったところ、Fgf8a は主として後方化活性、Fgf8b は主として背側化活性を持つことが示された。各種 *sdn-FGFR* mRNA との共導入実験から、Fgf8a は FGFR2b と FGFR2c に比較的親和性が高く、Fgf8b は FGFR3c と高い親和性を持つと推定された。したがって、2 種の Fgf8 isoform は、異なる受容体を介してシグナルを伝達することで、発生において独自の役割を果たすと推定された。ただし、各 isoform 特異的な morpholino oligo のゼブラフィッシュ胚への導入により機能阻害を行ったところ、どちらの isoform を knockdown した場合にも同様に原腸形成の停止が見られ、これらの効果がいずれの isoform の mRNA の注入によってもレスキューされることから、Fgf8a と Fgf8b はいずれも原腸形成には共通して関与すると推定された。

本研究において得られた以上の結果は、脊椎動物の胚発生における FGF シグナルの多様な機能の少なくとも一部が、受容体およびリガンドの多様性により説明できることを示唆している。

論文の審査結果の要旨

繊維芽細胞成長因子 (Fibroblast Growth Factor, FGF) は、動物細胞の増殖、分化、移動を制御する成長因子グループであり、脊椎動物胚発生においても多様かつ重要な役割が知られている。すなわち、初期においては中胚葉及び内胚葉の誘導と胚体の背腹軸の確立、その後は各領域、器官の誘導や領域化にも貢献する。従って、FGF の胚発生における役割を理解することは、個体のパターン形成から各種器官形成、そして再生医療等にも係る極めて重要な研究課題といえる。学位申請者、太田 聡氏提出の「脊椎動物の胚発生における繊維芽細胞成長因子シグナルの役割の研究」と題する学位論文は、小型魚ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) をモデル動物として、FGF シグナルの初期パターンニングにおける役割に取り組むことで、脊椎動物発生制御機構の解明をめざした研究の成果をまとめたものである。

本研究では、ゼブラフィッシュの胚発生における FGF シグナルの役割について、FGF 受容体 (FGF receptor, FGFR) の機能に注目して研究を行った。まず、4 種知られる FGFR (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4) 各々について、構成的活性型 FGFR (ca-FGFR) 遺伝子を作製し、ゼブラフィッシュ胚で強制発現させたところ、いずれの遺伝子も、原腸形成期には、胚体の背側化を誘導し、24 時間胚 (24 hpf) では、前脳の欠損、後脳の重複を引き起こした。以上より、FGFR の下流で働くシグナル伝達系は、少なくとも初期胚では FGFR の種類によらず、基本的に同じであると推定した。

次に、内在 FGFR の機能を阻害するために、4 種ある FGFR 各々について膜結合型ドミナントネガティブ FGFR (mdn-FGFR) 遺伝子を作製し、強制発現実験を行った。まず、各 *mdn-FGFR* 遺伝子と各種 FGF 遺伝子との共発現を行い、FGF リガンドへの阻害効果を比較検討した結果、異なる *mdn-FGFR* の効果にはある程度リガンド特異性があり、特に *mdn-FGFR3c* は FGF シグナル全般を阻害しうると結論した。

そこで、*mdn-FGFR3c* を全 FGF シグナル阻害剤として利用し、FGF シグナルの胚発生における役割の検討を試みた。まず、異なる量の *mdn-FGFR3c* mRNA の強制発現効果を検討した結果、胚形成における FGF シグナル依存性には前後に沿った勾配が有り、胚の後方ほど FGF シグナル依存性が高いことを明らかとした。原腸形成期の *mdn-FGFR3c* 強制発現胚で、胚領域マーカー遺伝子の発現を調べたところ、中軸中胚葉 (脊索) の短縮、沿軸中胚葉の形成不全、内胚葉細胞の減少が観察された。外胚葉では、予定前脳領域が拡大する一方、予定中脳後脳境界 (MHB) および後方神経外胚葉の形成は阻害されており、FGF シグナルは後方神経系の形成に必要であると推定した。

一方、FGF リガンドの機能を直接阻害することを目的として分泌型 FGFR 遺伝子 (*sdn-FGFR*) を作製し、FGF リガンドとの共発現を行った結果、*sdn-FGFR3c* が Fgf8 をはじめとする Fgf8 サブファミリー成長因子を特異的に阻害することを見出した。Fgf8 サブファミリーには発現と機能の類似した多数のパラログ遺伝子があるため、通常の遺伝子機能阻害による機能解析には限界があったが、Fgf8 サブファミリーを一括して阻害しうる *sdn-FGFR3c* の強制発現により、同サブファミリー成長因子の胚発生における機能を全体として検討可能となったことになる。実際、*sdn-FGFR3c* 強制発現胚を詳細に検討したところ、中脳後脳境界 (MHB) と耳胞に加え、後方構造の大規模な欠損が観察された。強制発現胚での様々な領域マーカー遺伝子の発現の検討から、Fgf8 サブファミリーは、脳構造の形成に加え、胚後方構造の幹細胞ともいえる尾芽の形成と維持に必須であると推定された。

なお、Fgf8 サブファミリーでも中核として働く Fgf8 については、各種脊椎動物において、複数の splicing isoform があるが、その生物学的意味についての詳細は不明であった。太田氏はまず、ゼブラフィッシュでも、他の脊椎動物と同様に Fgf8a と Fgf8b という 2 種の isoform が存在することを示した。発現解析の結果、発生時期、胚領域を問わず、Fgf8b の方が Fgf8a より高レベルに発現していた。各々について、

mRNA 導入により胚での強制発現を行ったところ、Fgf8a は主として後方化活性、Fgf8b は背側化活性を示した。一方、各々について、morpholino oligo のゼブラフィッシュ胚への導入により機能阻害を行ったところ、いずれでも原腸形成異常が観察されたが、これらの効果がいずれの isoform でもレスキューされることから、Fgf8a と Fgf8b はいずれも原腸形成に関与すると推定した。さらに、sdn-FGFR mRNA との共導入実験から、Fgf8a は FGFR2b と FGFR2c に比較的親和性が高く、Fgf8b は FGFR3c と高い親和性を持つと推定された。したがって、2 種の Fgf8 isoform は、異なる受容体を介してシグナルを伝達し、異なる活性を持つことで、発生において独自の役割を果たすと推定された。

以上のように、本研究において、太田氏は脊椎動物の胚発生における FGF シグナルの多様な機能の少なくとも一部が、受容体およびリガンドの多様性により説明できることを明らかとした。また、本研究は、改変型 FGFR 遺伝子をツールとした研究手法を利用する上で前提となる様々な条件を初めて網羅的に明らかにするとともに、特に特定 FGF ファミリーリガンドを一括して阻害するという新たな可能性を見出した。最後に、FGF シグナルの中でも発生制御での重要性が知られる Fgf8 について、その isoform の存在の重要性を明らかにすることに成功した。なお、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。以上のことから、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。