

氏名	中山 由紀子
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 932 号
学位授与年月日	平成 25 年 9 月 20 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	脊椎動物胚での峡部オーガナイザー形成制御機構の研究
論文審査委員	委員長 教授 弥益 恭 委員 教授 小林 哲也 委員 教授 坂井 貴文 委員 教授 中井 淳一

論文の内容の要旨

脊椎動物の中樞神経系は、発生の進行に従って前後、背腹の軸に沿って部域化され、最終的に極めて複雑な構造とそれに対応する高次機能を獲得する。初期脳形成では二次オーガナイザーが脳の部域化において重要な働きをしており、中脳及び小脳の発生運命の決定とパターン形成に関しては中脳後脳境界 (Midbrain-Hindbrain Boundary, MHB) 及びそこに形成される峡部が重要な役割を担う。従って、MHB・峡部形成の制御機構の解明は、脊椎動物における脳形成を理解する上で重要な課題といえる。これに関し、後脳前方に発現する *gbx2* ホメオボックス遺伝子は、予定前・中脳で発現する *otx2* 遺伝子とともに MHB の確立とその後の発生を制御することが、魚類から哺乳類まで共通して知られる。MHB の位置決定の後、ここに多数の MHB 関連遺伝子の発現が誘導されるが、Gbx2 タンパク質の作用機構、及びその下流標的遺伝子についての知見は乏しい。また、*gbx2* は発生後期まで MHB 周辺で発現を持続させるが、各発生段階での機能の違いについても知られていない。本研究では、Gbx2 の機能解析を通して MHB における遺伝子ネットワークを解明することを目的とし、Gbx2 の脳形成における機能、Gbx2 タンパク質内部の機能領域構造、発生の進行に伴う活性の変化、及び下流標的遺伝子について、ゼブラフィッシュをモデルとして検討を試みた。

まず、*gbx2* の発現レベルが脳形成に及ぼす影響を検討するため、異なる量の mRNA を胚に導入し、その効果を形態及び分子マーカー発現により検討を行った結果、*gbx2* は高レベルでは以前に報告されたとおり前脳及び中脳の形成を広範に阻害するのに対し、低レベルでは峡部形成のみを阻害することを見出した。これは、*gbx2* が峡部の形態形成に特異的に関与することを示す初めての Gain-of-function 実験である。次に、Gbx2 の転写調節能を検討するため、野生型 *gbx2*、人工的に作製した転写活性化型 Gbx2 遺伝子 (*vp-gbx2*)、転写抑制型 Gbx2 (*en-gbx2*) について、mRNA を胚に導入し、強制発現胚の形態と各種脳領域マーカーの発現を異なる発生段階で検討したところ、*gbx2* と *en-gbx2* は共に前・中脳抑制活性を示したのに対し、*vp-gbx2* は中脳から峡部にかけての形態異常を起こした。Gbx2 の転写調節能をさらに検討するため、ゼブラフィッシュ *fgf8a* 遺伝子の MHB エンハンサー配列の制御下に置いたホタル luciferase 遺伝子をレポーター、*gbx2*、*vp-gbx2*、*en-gbx2* をエフェクターとして P19C6 細胞及び HEK293T 細胞へ共導入し、luciferase の発現を検討した結果、*gbx2* と *en-gbx2* は MHB エンハンサーを抑制し、*vp-gbx2* は活性化した。また、このエ

ンハンサー活性は *pax2a* により上昇するが、この活性も *gbx2* により抑制された。以上の結果から、Gbx2 は転写抑制因子であると結論した。

次に、ゼブラフィッシュ *gbx2* について作製した様々な欠失導入遺伝子の mRNA を胚に導入し、強制発現胚の形態と各種脳領域マーカー遺伝子の発現を検討した。その結果、Gbx2 の前・中脳抑制活性にはホメオドメインが不可欠であること、N 末領域及び C 末領域いずれもが前・中脳形成抑制活性を持つことが見出された。また、各種脊椎動物 Gbx2 と同様 N 末領域に存在する Eh1 様配列も Gbx2 の前・中脳抑制活性に関与すること、やはり他種でも保存されている高プロリン含有配列（高 Pro 配列）が背腹パターンニングに関与することが示唆された。興味深いことに、Eh1 様配列と Pro 配列に挟まれた介在配列（IVR 配列）を欠失させた Gbx2 を強制発現すると、峽部が欠損するとともに中脳領域が小脳の性質を帯びることが観察された。これらの結果は、Gbx2 の脳形成制御能が異なる機能を持つ複数の分子内配列に依存することを示唆する。

さらに、発生時期ごとに Gbx2 の機能を検討するため、熱誘導性プロモーター制御下に *gbx2* を組み込んだ人工遺伝子 (*hsp-gbx2*) を導入した胚、または染色体上にこの遺伝子が組み込まれたトランスジェニック胚 (Tg:*hsp-gbx2* 胚) において、異なる発生時期に加温処理で *gbx2* の発現を誘導し、処理胚の形態と各種脳領域マーカーの発現を検討した。その結果、Gbx2 は原腸形成終了期において MHB/ 峽部形成に対して顕著な抑制活性を持つが、それ以前の原腸形成期にはその活性が弱く、原腸形成終了期を過ぎると急速に活性は低下することが示唆された。このことは、Gbx2 は主として原腸形成終了前後に MHB/ 峽部形成に関わることを示す。

最後に、MHB/ 峽部形成における Gbx2 下流標的遺伝子を網羅的に探索するため、Tg:*hsp-gbx2* 胚を原腸形成終了期で加温処理して *gbx2* を強制発現させ、直後に RNA を回収して対照胚との発現が異なる遺伝子についてマイクロアレイ解析により網羅的に検討した。その結果、多数の脳形成関連遺伝子の発現変動が確認されたため、これらの遺伝子の Tg:*hsp-gbx2* 胚での発現をさらに *in situ* hybridization 法、定量的 PCR 法で詳細に検討することで、有力な下流標的遺伝子の絞り込みに成功した。

以上一連の研究により、脊椎動物の中脳・小脳領域の形成について、Gbx2 転写因子を中心とした新たな分子的制御機構の解明を行った。

論文の審査結果の要旨

脊椎動物の中樞神経系は、発生の進行に従って前後、背腹の軸に沿って部域化され、最終的には複雑な構造とそれに対応する高次機能を獲得する。初期脳形成では二次オーガナイザーが脳の部域化において重要な働きをしており、特に中脳及び小脳の発生運命の決定とパターン形成に関しては、中脳後脳境界 (Midbrain-Hindbrain Boundary, MHB) 及びそこに形成される峽部が重要な役割を担う。従って、MHB・峽部形成の制御機構の解明は、脊椎動物における脳形成を理解する上で重要な課題といえる。これに関し、後脳前方に発現する *gbx2* ホメオボックス遺伝子は、予定前・中脳で発現する *otx2* 遺伝子とともに MHB の確立とその後の発生を制御することが魚類から哺乳類まで共通して知られるが、Gbx2 タンパク質の作用機構、及びその下流標的遺伝子についての知見は乏しい。また、*gbx2* は発生後期まで MHB 周辺で発現を持続させるが、各発生段階での機能の違いについても知られていない。中山由紀子氏は、MHB における遺伝子ネットワークを解明することを目的とし、Gbx2 の脳形成における機能、分子内部の機能領域構造、及び下流標的遺伝子について、ゼブラフィッシュをモデルとして検討を試みた。

まず *gbx2* の発現レベルが脳形成に及ぼす影響を検討するために、中山氏は mRNA を胚に導入してその効果を検討した。その結果、*gbx2* は高レベルでは前脳及び中脳の形成を広範に阻害するのに対し、低レベルでは峽部形成のみを阻害することを見出した。これは、*gbx2* が峽部の形態形成に特異的に関与することを示す初めての Gain-of-function 実験である。次に、Gbx2 の転写調節能を検討するため、野生型 *gbx2*、人工的に作製した転写活性化型 Gbx2 遺伝子 (*vp-gbx2*)、転写抑制型 Gbx2 遺伝子 (*en-gbx2*) について mRNA を胚に導入し、強制発現胚の形態と各種脳領域マーカーの発現を異なる発生段階で検討したところ、*gbx2* と *en-gbx2* は共に前・中脳抑制活性を示したが、*vp-gbx2* は中脳から峽部にかけての形態異常を起こした。また、ゼブラフィッシュ *fgf8a* 遺伝子 MHB エンハンサー配列の制御下に置いたホタル luciferase 遺伝子をレポーター、*gbx2*、*vp-gbx2*、*en-gbx2* をエフェクターとして P19C6 細胞及び HEK293T 細胞へ共導入し、luciferase の発現を検討した結果、*gbx2* と *en-gbx2* は MHB エンハンサーを抑制し、*vp-gbx2* は活性化した。このエンハンサー活性は *pax2a* により上昇するが、この効果も *gbx2* により抑制された。以上より、Gbx2 は転写抑制因子であると結論した。

次に、中山氏はゼブラフィッシュ *gbx2* 内に様々な欠失を導入し、得られた遺伝子の mRNA を胚に導入して強制発現胚の形態と各種脳領域マーカー遺伝子の発現を検討した。その結果、Gbx2 の前・中脳抑制活性にはホメオドメインが不可欠であること、N 末領域及び C 末領域いずれもが前・中脳形成抑制活性を持つこと、N 末領域に存在する Eh1 様配列も Gbx2 の前・中脳抑制活性に関与することなどを示した。興味深いことに、Eh1 様配列に隣接する配列 (IVR 配列) を欠失させた Gbx2 を強制発現すると、峽部が欠損するとともに中脳領域が小脳の性質を帯びることが観察された。これらの結果は、Gbx2 の脳形成制御能が異なる機能を持つ複数の分子内配列に依存することを示唆する。

さらに、発生時期ごとに Gbx2 の機能を検討するため、中山氏は熱誘導性プロモーター制御下に *gbx2* を組み込み、この人工遺伝子 (*hsp-gbx2*) を導入したトランスジェニック魚を作製した (Tg:*hsp-gbx2*)。この Tg 魚の胚において、異なる発生時期に加温処理で *gbx2* の発現を誘導し、処理胚の形態と各種脳領域マーカーの発現を検討した結果、Gbx2 は原腸形成終了期において MHB/ 峽部形成に対して顕著な抑制活性を持つが、それ以前の原腸形成期にはその活性が弱く、原腸形成終了期を過ぎると急速に活性は低下することが示唆された。このことは、Gbx2 は主として原腸形成終了前後に MHB/ 峽部形成に関わることを示す。

最後に、MHB/ 峡部形成における Gbx2 下流標的遺伝子を網羅的に探索するため、中山氏は Tg:*hsp-gbx2* 胚において原腸形成終了期で *gbx2* を強制発現させ、対照胚との発現の異なる遺伝子をマイクロアレイ解析により網羅的に同定した。その結果、多数の脳形成関連遺伝子の発現変動が確認されたため、これらの遺伝子の Tg:*hsp-gbx2* 胚での発現をさらに *in situ* hybridization 法、定量的 PCR 法で詳細に検討することで、有力な下流標的遺伝子の絞り込みに成功した。

以上のように、中山氏の提出した学位論文は、脊椎動物の中脳・小脳領域の形成について、Gbx2 転写因子を中心とした新たな分子的制御機構の解明を行ったものである。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。なお、本論文の内容は、発生生物学領域の国際誌において、査読付き論文として採択となっている。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。