

{別紙2}

審査の結果の要旨

氏名 矢部慎一郎

本研究は脊椎動物初期発生において重要な役割を演じ、特に中胚葉誘導に関与する *nodal* の共益因子と考えられている EGF-CFC 遺伝子の作用期序を明らかにするため、*FRL-1* の過剰発現系での誘導能、および *FRL-1* の機能欠損実験にて、中胚葉およびそれに引き続く神経誘導のシグナルカスケードの解析を試み、下記の結果を得ている。

- 1、 *FRL-1* mRNA を用いアニマルキャップアッセイを行ったところ、過去の知見に反し *FRL-1* による神経誘導が中胚葉誘導を経由しないこと、さらにそれが BMP シグナルの阻害によるものであることを RT-PCR 法により示した。
- 2、 モルフォリノ・オリゴ・ヌクレオチドを用いて *FRL-1* 欠損胚を作成した。*FRL-1* 欠損胚では薄切標本において脊索、前腎管などの中胚葉性組織には欠損は見られず、神経組織に欠損が認められた。また Whole-mount in situ immunohistology 法、RT-PCR 法を用いたフェノタイプ解析では、神経組織欠損は前方神経のみで後方神経の阻害は認めなかった。その一方で、*FRL-1* がアニマルキャップアッセイにて後方神経の誘導能を有することを示した。後方神経欠損を呈するゼブラフィッシュ EGF-CFC 欠損胚を *FRL-1* が代償できる知見を考慮すると、*FRL-1* の神経誘導能は中胚葉誘導を伴わない直接的なものであり、かつ前方神経分化および後方神経分化両方に関与すると考えられた。
- 3、 *FRL-1* の細胞内シグナルカスケードをアニマルキャップアッセイ、*FRL-1* 欠損胚を用いて解析した。まず、アニマルキャップにおける *FRL-1* の過剰発現による神経誘導が MAPK シグナルの阻害物質により阻害されることを RT-PCR 法により示した。同様に Western blotting 法にても *FRL-1* の過剰発現、及び *FRL-1MO* による機能阻害により MAPK の活性化の上昇及び消失が認められた。次に *FRL-1MO* による *FRL-1* 欠損胚の頭部神経欠損の表現型が MAPK の常活性化体の形質導入で回復することを示した。さらにアニマルキャップにおける *FRL-1* の過剰発現による BMP 下流遺伝子マーカーの発現阻害が、MAPK シグナルの阻害物質により回復することがわかった。したがって、*FRL-1* による MAPK シグナルの活性化が BMP シグナルの阻害を引き起こすことにより神経分化が誘導されることが示された。

- 4、 アニマルキャップアッセイにおいて、FRL-1 が BMP レセプター直下の細胞内蛋白 Smad1 のリン酸化を阻害することを Western blotting 法で示した。これにより、神経誘導因子として FRL-1 は、BMP シグナルカスケードのもっとも早期での阻害に関与すると考えられた。

以上、本論文は、FRL-1 の *in vitro* での誘導能、および FRL-1 欠損胚の解析により、FRL-1 による、nodal シグナルと独立した伝達経路での神経分化誘導能の存在を明らかにした。本研究は、これまで明らかにされていない中胚葉を經由しない神経誘導のシグナルカスケードの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。