

審査の結果の要旨

論文提出者氏名

鄭 恵英

生物の形作りの仕組みは、厳密な遺伝子発現の制御による細胞分化と、これら細胞の秩序正しい運動や巧妙な相互作用による位置情報獲得が基本である。原腸形成は発生過程における最初の形態形成であり、これにより球状の受精卵は外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉を有する桿状の胚へと変化する。原腸形成の制御機構の解明に関わる様々な研究が行われ、Wnt、FGF、BMP等の細胞増殖因子が非常に大事な役割を担っていることが明らかにされている。初期発生において、FGF（線維芽細胞増殖因子, Fibroblast growth factor）はRas-MAPK依存的に中胚葉誘導やパターン形成を制御することが以前から知られていた。近年、FGFがMAPK非依存的な原腸形成運動制御にも関わっていることを強く示唆する論文が報告されている。FGFの標的遺伝子であるXsprouty2の機能解析により、この遺伝子産物が胚を前後方向に伸長させるのに最も重要であると言われている収斂と伸長（convergent extension）を阻害することも報告されている。しかしながら、発生過程で様々な機能を担うFGFシグナルがどのように制御され、どのように他のシグナル経路と相互作用しているかは、未知の部分が多い。

そこで、本研究ではアフリカツメガエルの受精卵を材料として、FGFシグナルを不可逆的に阻害できる化学的阻害剤とcDNA microarray法を用い、FGFシグナルの阻害によって転写量が増減する遺伝子群をゲノムレベルでの網羅的解析によって同定し、その中の幾つかの新規遺伝子について初期発生過程の原腸形成における機能解析を行っている。さらに、原腸胚初期に背側中胚葉に強く発現が認められ、神経胚では後方側とaxial mesoderm, midlineに強く発現が見られるNeurotrophin receptor homolog (NRH)分子の機能解析を試み、NRH分子がFGFシグナルの下流で細胞運動と細胞骨格形成を制御する鍵分子であることを明らかにしている。

第1章では研究の背景、研究目的について述べている。

第2章では、FGFシグナルの阻害によって転写量が増減する遺伝子群の同定とFGFシグナルとの関連、機能解析を行っている。すなわち、アフリカツメガエルの原腸胚10.5から切出したKeller explantにFGF receptor (FGFR)細胞内ドメインのリン酸化阻害剤であるSU5402またはコントロールとしてDMSOを添加した後、原腸胚11.5になるまで培養した組織からmRNAを抽出している。cDNA microarrayを利用し、遺伝子の転写量の変化を検討した結果、コントロールとしてのDMSOを添加した場合に比べて2倍以上または2倍以下の遺伝子転写量の変動が見られた43個の遺伝子を同定している。そのうちの38個の遺伝子は2倍以上の転写量の上昇が、5個の遺伝子は2倍以下の転写量の減少が観察されている。BLAST検索を行った結果、同定された遺伝子群の中には既知のFGF標的遺伝子も多数含まれていたが、全体の約6割が未知の遺伝子であったと述べている。

次に、これらの未知遺伝子がどのような制御に関わっているのかを推定するために、*in situ* hybridization法を用い、これら遺伝子転写産物の時間的、空間的な発現パターンの解析を行っている。さらに、これらの遺伝子がFGFR1の標的遺伝子として同定されたことから、FGFR1の機能と密接な関係にあると考え、各々の発現パターンの比較を行い、特に原腸胚の原口周辺でFGFR1遺伝子と類似の発現パターンを示す6個の新規遺伝子を同定し、共発現因子群と命名している。

新規遺伝子群とFGFシグナルとの関連をさらに詳しく調べるため、FGFシグナルの既知の標的遺伝子であり、細胞分化・誘導に関わるXbra、ならびに細胞運動と細胞骨格形成制御に関わるXspry2、Xmcを予定外胚葉や背側中胚葉に顕微注入し、新規遺伝子群転写産物の発現量の変化をRT-PCR法

により測定している。その結果、新規遺伝子群のうち Xmig6 と名づけた因子のみ Xbra による転写産物の発現量の上昇が見られ、他の因子に関しては発現量の変化は認められなかったと述べている。次に、これら新規遺伝子群の発現が MAPK の活性に依存しているかどうかを明らかにするために、MAPKK の阻害剤である U0126 を用いて発現量の変化を調べ、Xmig6 のみが U0126 添加により発現が著しく減少することから、FGF の新規標的遺伝子 Xmig6 は MAPK 依存的に FGF シグナルによって制御されると結論づけている。さらに、Xmig6 が Xbra の下流因子であり筋分化に関わっていることも示している。一方、G protein coupled receptor 4 (GPCR4) タンパク質をコードする新規遺伝子 XGPCR4 は MAPK 非依存的な経路で転写調節され、原腸形成における細胞運動を制御していることを明らかにしている。

このように、FGFR 細胞内ドメインの阻害剤と cDNA microarray を用いた解析により、FGF シグナルによって転写制御される遺伝子群をゲノムレベルで網羅的に解析することが可能であり、今回用いた実験手法が発生過程、特に、原腸形成における FGF シグナルの多様な機能を知る上で有効なツールとなると結論づけている。

第3章では、FGFR1 の共発現因子であり、原腸胚初期に原口の周りに発現する Neurotrophin receptor homolog (NRH) 遺伝子に注目し、その発現パターンの解析、NRH 遺伝子の mRNA および アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた遺伝子機能増強・阻害実験、NRH 遺伝子の部分的欠失体を用いた機能性ドメイン解析実験などから、原腸形成における NRH の機能を検討している。すなわち、*in situ* hybridization により原口周辺での NRH 遺伝子転写産物の発現パターンを詳しく調べた結果、背側中胚葉に強く発現が認められ、神経胚では後方側と axial mesoderm, midline に強く発現が見られることを示している。また、NRH 遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチドによる機能阻害実験の結果、原腸胚の前後軸が短くなる表現形や彎曲した表現形が見られると共に、convergent extension の際に、背側中胚葉細胞群が内外側方向に微小突起を形成し相互に滑りこむ細胞運動であるインターカレーションが阻害されることを見出している。この時、背側中胚葉細胞は微小突起を消失するが、全長の NRH あるいは NRH 細胞内ドメインの遺伝子の mRNA を細胞内へ導入すると微小突起の形成が回復するため、この表現型は NRH の細胞内ドメインの機能に起因すると結論づけている。また、このような微小突起形成には Wnt/Planar cell polarity (PCP) 経路が重要な役割を果たしていることが知られているため、NRH と Wnt/PCP 経路の関係を調べた結果、両者は微小突起形成において協調的な作用があり、低分子量 GTPase の Rho と Rac がその下流で細胞骨格形成を制御していることを明らかにしている。以上の結果に基づき、NRH は FGF シグナル依存的な微小突起形成を正に制御する分子であると結論づけている。

第4章では、本論文の総括と展望を述べている。

以上、本論文は初期発生過程において FGF シグナルによって(1)時間的、空間的に転写制御を受ける遺伝子群の網羅的解析、(2)細胞分化や誘導に関わる遺伝子群と細胞運動と細胞骨格形成制御に関わる遺伝子群の同定を行い、(3)NRH が FGF シグナルの下流で、FGF シグナルによる細胞運動と細胞骨格形成を制御する鍵分子であることを明らかにしたものである。細胞増殖因子の機能はショウジョウバエから人間までよく保存されており、増殖シグナルに関わる因子の制御異常による先天的疾患やがん化などが数多く報告されているため、これらの成果は医学的应用にも繋がるものであり、化学生命工学分野の発展に寄与するところが多い。よって、本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格であると認められる。