

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Cloning and characterization of forkhead transcription factors
in zebrafish early development

和訳 ゼブラフィッシュ初期発生におけるフォークヘッド型転写因子の
クローニングと機能解析

指導教員 渡邊すみ子教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 中田千紗子

フォークヘッドドメインは、ショウジョウバエのホメオティック遺伝子とラット肝細胞調節因子遺伝子の間に、保存された 110 アミノ酸残基からなる DNA 結合領域として見い出された。現在 100 以上のフォークヘッドドメインを持つ転写因子が発見され、生物の発生、組織の分化、細胞の運命づけに深く関わっている事が明らかになりつつある。いくつかのフォークヘッド遺伝子はレンズ形成や角膜発生に関与する事が知られている。私は、ゼブラフィッシュを実験モデルとし、胚発生、眼の発生に関与する新規フォークヘッド遺伝子のクローニングとその機能解析を行った。ゼブラフィッシュの頭部より調製した mRNA から cDNA を作成し、既知フォークヘッド遺伝子の塩基配列を元に種々の degenerate primer を用いて PCR を行い、いくつかの既知および新規の cDNA フラグメントを得た。そのうち新規と思われるフラグメントについて 3'RACE、5'RACE を行い、哺乳類フォークヘッド型転写因子 FoxL1 のゼブラフィッシュホモログである事が明らかになり、それについて機能解析を行った。

転写抑制化因子 foxl1 は *shh* の発現を抑制する事によりゼブラフィッシュ胚における中枢神経発生を調節する

異なる発生段階のゼブラフィッシュから作成した RNA を用いた RT-PCR の結果、*foxl1* は発生段階の初期から発現が検出され、成魚の各臓器から作成した RNA を用いた RT-PCR では、脳でその発現が高い事が示された。Whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、*foxl1* は原

腸形成期の動物極側の一部に発現し、受精後 24 時間では間脳と中脳の領域および耳朶に、受精後 48 時間では心臓に発現する事が示された。切片 *in situ* ハイブリダイゼーションにより、受精後 24 時間胚の網膜に *foxl1* の発現が確認された。強力なアンチセンスオリゴの一種であるモルフォリーノ (MO) を用いた knock down 実験により、*foxl1* MO インジェクション胚の約 70% が脳の形成異常、網膜層構造形成異常を示した。

Whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションで種々の神経系遺伝子発現の動態を検討すると、受精後 24 時間後の *foxl1* MO インジェクション胚の中脳で *sonic hedgehog* (*shh*) が異所的に発現し、同時に *pax2a* の発現が眼枝において上昇し、さらに *pax6a* の発現が前脳および網膜において減少していた。このことから、*foxl1* が中脳領域で *shh* の発現に抑制的に働いている事が示唆された。

foxl1 の転写機能を解析するため、*foxl1* の DNA 結合領域にショウジョウバエ Engrailed の転写抑制化ドメイン (*foxl1*-EnR) もしくはヘルペス単純ウイルス VP16 の転写活性化ドメイン (*foxl1*-VP16) を融合したコンストラクトを作製し、ゼブラフィッシュで過剰発現させた。

foxl1-EnR の過剰発現は *foxl1* を過剰発現させた胚と同様な表現型を示した。

foxl1 が *shh* の発現を直接制御する可能性を検討するため、*shh* promoter を単離し、*shh*-promoter-EGFP を *foxl1* とゼブラフィッシュ受精卵で共発現させると、EGFP の発現が強く抑制された。さらに PC12 細胞で *shh*-promoter-luciferase への *foxl1* の影響を一過性発現の系で検討すると、フォークヘッド領域依存的に *foxl1* が *shh*-promoter の活性を抑制する事が明らかになった。同様の実験を NIH3T3 細胞あるいは HeLa 細胞を用いて行くと抑制活性がまったく観察されない事から、*foxl1* の活性は神経細胞にて特異的に機能する事が示唆された。Gal4-UAS システムで *foxl1* の転写抑制領域を検討した所、C 末端側の領域が必須である事がわかり、その中に corepressor である Groucho の結合配列として知られる Eh1 モチーフの存在が明らかとなった。これにより、*foxl1* は *shh* promoter の転写をフォークヘッド領域および C 末端側の領域依存的に抑制し、その活性には Groucho が関与する事が示唆された。

以上の事から *foxl1* は *shh* の転写抑制因子として、ゼブラフィッシュ中枢神経発生に必須の役割を果たしている事が明らかになった。