

審査の結果の要旨

氏名 中田千紗子

本研究は生物の発生、組織の分化、細胞の運命づけに深く関わっているフォークヘッド型転写因子の機能を明らかにするため、ゼブラフィッシュを実験モデルとし、中枢神経系発生に重要な役割を演じる新規フォークヘッド型転写因子 *foxl1* のクローニングと機能解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. ゼブラフィッシュ発生段階の経時的 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* は中枢神経系に強く発現する事が示された。
2. 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の結果、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、さらに *pax6a* の発現が前脳および網膜において減少しており、*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。
3. *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所、*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。
4. *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。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、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になった。

以上、本論文はゼブラフィッシュ初期発生において、Shh の転写を抑制する事により、中枢神経系の発生に重要な役割を果たす、新規フォークヘッド型転写因子 *fox11* の機能を明らかにした。本研究は、フォークヘッド型転写因子による胚発生調節機構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。