

論文審査の結果の要旨

氏名 福田 雅和

本論文はツメガエル初期発生において中胚葉で発現する T-box 転写因子である接合体性 *VegT* (*zVegT*) の機能及び転写制御機構について述べられている。中胚葉は将来、筋肉、心臓、腎臓、血球などに分化し、また原腸陥入運動に伴い予定外胚葉細胞を裏打ちし神経に誘導する。このように中胚葉は脊椎動物のボディープランの決定に極めて重要な役割を担う細胞群であり、その誘導、形成及び領域化機構の解明は発生生物学における最重要課題のひとつである。T-box 転写因子は脊椎動物において中胚葉誘導、形成及び領域化に重要であることが示唆されている。福田氏はツメガエル内胚葉決定因子であり中胚葉誘導に必須であることが知られる母性 *VegT* のバリエーションで、初期原腸胚期に汎中胚葉、後期原腸胚期に沿軸中胚葉で限局し発現する *zVegT* に着目した。

論文の前半部分において、福田氏は *zVegT* のオルソログ及びその機能を明らかにした。中胚葉形成に関与する脊椎動物の T-box 遺伝子の分子系統樹を作成し、ツメガエル *VegT* がゼブラフィッシュ *Spadetail* と同一の遺伝子サブファミリー (*VegT/Spadetail* サブファミリー) に分類されることを示し、またこの遺伝子サブファミリーに属す複数の遺伝子のゲノム構造及びシンテニーを比較し、それらが高度に保存されていることを示した。また *zVegT* の時間的・空間的発現パターンを調査し、その発現がゼブラフィッシュ *Spadetail* と発現時期及び領域が同一であることを見出した。さらに *zVegT* を特異的に阻害するモルフオリノーアンチセンスオリゴ (MO) を用いた機能阻害実験の結果、*zVegT* MO 顕微注入胚は体幹部中胚葉構造が乱れ、筋肉の減少及び体節の分節化に異常が生ずることが明らかとなった。この *zVegT* MO 顕微注入胚の表現型は、ゼブラフィッシュ *Spadetail* 変異体の表現型と著しく類似していた。以上の結果から、ツメガエル *zVegT* はゼブラフィッシュ *Spadetail* のオルソログであり、沿軸中胚葉形成に重要な働きを果たすことが明らかとなった。

論文の後半部分においては、*zVegT* の中胚葉特異的シス制御領域及びトランス制御因子を明らかにしている。まず *VegT* 遺伝子のゲノム構造を *Xenopus tropicalis* のゲノム情報を用い明らかにした。*mVegT* 及び *zVegT* は各 9 つのエキソンから構成され、第 2 エキソンから第 9 エキソンは両者で共有し、*zVegT* の第 1 エキソンは *mVegT* の第 1 イントロンに位置していることを見出した。まず

mVegT 及び *zVegT* の各第 1 エキソンの間をクローニングし、トランスジェニック胚を作製した結果、トランスジェニック胚において内在性の *zVegT* の中胚葉特異的な発現を模倣したレポーター遺伝子の発現が観察され、この領域約 6 kb 内に *zVegT* の中胚葉特異的なシス制御領域が存在することを明らかにした。次にこのシス制御領域の欠失解析を行い、シス制御領域が 2 箇所 (-2420~-2035 bp 及び -545~-122 bp) に離れて存在することを明らかにした。これら領域中には、Nodal シグナルのメディエーターである FoxH1 及び Smad、FGF シグナルのメディエーターである Ets 及び T-box 転写因子の結合配列が複数存在していた。そこで *zVegT* の中胚葉特異的な発現と Nodal シグナル及び FGF シグナルの関与を調査するため、各シグナルを特異的に抑制することが報告されている Cerberus-short (*CerS*) 及びドミナントネガティブ型 FGF レセプター (*XFD*) の各 mRNA をツメガエル初期胚に顕微注入し、過剰発現実験を行った。その結果、*XFD* mRNA 過剰発現胚においては *zVegT* の発現に影響は見られなかった一方、*CerS* mRNA 過剰発現胚においては *zVegT* の発現に顕著な消失が観察され、*zVegT* の発現に対する Nodal シグナルの関与が示された。さらに、FoxH1 転写因子及び T-box 転写因子の各結合配列に対する点変異導入により、トランスジェニック胚作製において *zVegT* の中胚葉特異的な発現を模倣したレポーター遺伝子の発現の消失が観察された。さらにゲルシフトアッセイにより、*in vitro* において FoxH1 タンパク質及び T-box タンパク質 Eomesodermin (*Eomes*)、Tbx6 が同定した *zVegT* のシス制御領域の各結合配列に結合することを示した。次に T-box 遺伝子の時間的・空間的発現パターンを詳細に比較し、*Eomes* が *zVegT* よりも早く発現し、トランス制御因子の候補であると予想した。さらに *Eomes* MO を用いた機能阻害実験により、*in vivo* において内在性 *zVegT* の発現の消失が認められ、*zVegT* の発現に *Eomes* が寄与していることを実証した。

本研究により、*zVegT* が中胚葉特異的な転写が Nodal シグナル及び T-box 転写因子 *Eomes* により 2 箇所に離れて存在するシス制御領域を介して活性化され、誘導された *zVegT* が沿軸中胚葉形成に重要な役割を果たすことが示された。これらの知見は、複雑に制御される中胚葉形成及びその領域化における重要な知見であり、今後の脊椎動物における中胚葉形成及び領域化研究に大きく貢献すると考えられる。

なお、本論文は高橋秀治、小沼泰子、原本悦和、Chang-Yeol Yeo、Yeon-Jin Kim、石浦章一、浅島誠との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。

