

学位論文の要旨

Functional analysis of the retinoic acid-related genes on neural patterning.

(レチノイン酸関連遺伝子の神経パターンニングにおける機能解析)

谷邊美早紀

I. 研究の背景と目的

形態形成の機序の解明は発生生物学における主要な課題の1つである。多細胞生物の形態形成においては、細胞の配置を三次元的に制御しなければならない。そのため発生初期における適切な体軸(頭尾軸・左右軸・背腹軸)の形成が不可欠となる。脊椎動物の脳は機能や形態の異なる様々な領域で構成されており、このような脳の複雑な構造を作り出すために、神経前後軸形成に伴う神経管の分節化が重要な働きをしている。

過去の研究より、神経前後軸の形成にはシグナル分子の濃度勾配が必要であることが示唆されている。神経前後軸形成に関わる因子としては Wnt、FGF、レチノイン酸の3つのシグナル分子が知られており、これらの濃度の違いが神経パターンニングに影響を及ぼすことが示されている。しかし、これらのシグナルが実際どのように脳の分節化を制御しているかはあまり明らかになっていない。そこで私はシグナル分子の制御下で分節化に関与する遺伝子を同定し、それらの機能

解析によって脳形成の仕組みを解明しようと考えた。そのため本研究に先立ち、DNA マイクロアレイ解析を用いて Wnt によって発現制御を受け頭部で強く発現する遺伝子を探索した (Tanibe et al., 2008)。発生初期での操作が容易なアフリカツメガエル胚を使用した。そしてこの解析で見出された候補遺伝子のうち、私は xCyp26c1 と xCOUP-TF-B に注目して機能解析を行った。

xCyp26c1 はレチノイン酸を不活性化する酵素であり、また xCOUP-TF-B はレチノイン酸による標的遺伝子の発現制御を阻害する機能をもつ核内レセプターである。このように、Wnt による発現制御を受ける遺伝子としてレチノイン酸関係遺伝子が候補に上がったことから、私は神経前後軸形成において Wnt シグナルがレチノイン酸の濃度を調節するのではないかと考えた。

II. 結果と考察

II-i. xCyp26c1 の機能解析

過去に私が行った研究において、xCyp26c1 は後脳領域にてレチノイン酸濃度を調節していることが示唆されていた (Tanibe et al., 2008)。そのため本研究では、xCyp26c1 が神経パターンングに及ぼす影響を明らかにするために、過剰発現・機能失欠実験を行った。xCyp26c1 mRNA の頭微注入による過剰発現実験では後脳のパターンングのみに影響が表れたが、モルフォリノンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) による機能失欠実験においては頭部の広い範囲で後脳パターンングの消失が認められた。これらの結果から、胚後方で合成されるレチノイン酸が後脳よりも前方の領域に拡散しないよう、xCyp26c1 が後脳で防波堤のような働きを担っているのではないかと考えられた。従って、xCyp26c1 が後脳で正常な領域に発現することは、後脳だけでなく頭部全体の神経パターンングに重要であると推測された。

xCyp26c1 の機能において発現領域が重要な役割を果たすと考えられたことから、次に xCyp26c1 の発現を制御する因子について解析を行った。以前に行った遺伝子上流配列における転写因子結合配列の検索では、脳形成に関与する転写因子の結合配列を見出すことが出来なかった。そのため、初期発生における神経系の誘導に倣い、頭部誘導因子による xCyp26c1

の発現量の変化を確かめた。BMP シグナルの阻害因子である tBR を顕微注入したとき、外胚葉片での xCyp26c1 の発現量は 30 倍に増加したが、tBR の注入量を増やしてもその効果は変わらなかった。このことから BMP の抑制は xCyp26c1 の発現において必要条件ではあるが、発現領域決定には直接関与しないことが推測される。一方、Wnt のアンタゴニストである Dkk-1 の顕微注入では、濃度に依存した発現量の変化が観察された。すなわち、xCyp26c1 の発現制御には、BMP の抑制による未分化な外胚葉の神経外胚葉化と、Wnt の適切な抑制の 2 つの仕組みが関与することが示唆された。

II-ii. xCOUP-TF-B の機能解析

過去の研究結果により、xCOUP-TF-B はレチノイン酸レセプターに結合し、レチノイン酸シグナルを阻害する機能を持つことが推測されている。本研究では、xCOUP-TF-B の過剰発現解析によって、xCOUP-TF-B が神経パターンニングにおいて重要な役割を持つことを確かめた。xCOUP-TF-B は前方神経マーカーの拡大や後脳マーカーの消失を引き起こしたが、これはレチノイン酸による後方化(前方神経領域の縮小・消失)とは反対の結果となった。さらに xCOUP-TF-B がレチノイン酸に引き起こされる後方化の影響を、神経マーカー遺伝子の発現レベルで軽減することも示された。これらの結果より、xCOUP-TF-B はレチノイン酸シグナルの調節を介して神経パターンニングに影響を与えていると考えられる。

また xCOUP-TF-B が Wnt 制御下の候補遺伝子として同定された経緯から、カノニカル Wnt シグナルの構成分子である β カテニンの過剰発現・機能欠失実験を行い、xCOUP-TF-B の発現量に及ぼす影響を調査した。その結果、xCOUP-TF-B の発現が Wnt シグナルによって抑制的に制御されていることが明らかになった。これらの結果は、Wnt シグナルが抑制されている領域において xCOUP-TF-B がレチノイン酸シグナルの伝達を阻害していること、すなわち Wnt シグナルの濃度勾配が xCOUP-TF-B の発現制御を介してレチノイン酸の濃度勾配を調節していることを示唆している。

II-iii. *xCyp26c1* と *xCOUP-TF-B* の発現制御を介した Wnt とレチノイン酸の相互作用

xCyp26c1 と *xCOUP-TF-B* は共に後脳で発現しているレチノイン酸関連遺伝子であるが、レチノイン酸シグナルに対する阻害経路はそれぞれ独立である。しかし、*xCyp26c1* と *xCOUP-TF-B* mRNA の共注入実験では、それぞれ単独での注入実験よりも効果が増大することが観察された。また *xCOUP-TF-B* mRNA の過剰発現が *xCyp26c1* の発現量を増加させる効果を持つことが明らかになった。よって、神経パターンニングにおいて 2 つの分子が協調的に働いていることが示唆された。後脳におけるレチノイン酸シグナルの調節は、これらの遺伝子の働きによって相乗的に抑制されていると考えられる。またどちらの遺伝子も Wnt シグナルの抑制強度に依存した制御を受けると示唆されたことから、Wnt シグナルが *xCyp26c1* と *xCOUP-TF-B* の発現制御を介してレチノイン酸の濃度勾配を調節していることが示唆された。従って、Wnt シグナルの抑制によって決定される神経パターンニングを、Wnt シグナル制御下のレチノイン酸濃度勾配がより強固に決定していることが推測された。

本研究では、レチノイン酸関連遺伝子を介して Wnt シグナルがレチノイン酸濃度を制御するという、新たなシグナル分子間の関係性を明らかにした。これまで神経前後軸形成におけるシグナル分子の役割はそれぞれ独立に解析されることが多かったが、本研究では *xCyp26c1* と *xCOUP-TF-B* を介した Wnt シグナルとレチノイン酸の協力関係から神経パターンニング決定の仕組みの一端を明らかにした。これまでの結果により、後脳において Wnt の濃度勾配がレチノイン酸の濃度勾配を調節していること、すなわち神経パターンニングの決定においてはレチノイン酸が Wnt の制御下にあることが推察される。シグナル分子による神経前後軸形成の仕組みの全体像を解明するためにはさらなる研究が必要であるが、本研究で得られた知見は脳形成機構を解明する一助となることが期待される。