

氏名	こま だ むね かず 駒 田 致 和
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第3231号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科生理系専攻
学位論文題目	Expression of <i>Fgf15</i> is regulated by both activator and repressor forms of Gli2 in vitro (<i>Fgf15</i> の発現は活性型と抑制型の Gli2 によって制御される)
論文調査委員	(主査) 教授 影山龍一郎 教授 篠原隆司 教授 武田俊一

論 文 内 容 の 要 旨

形態形成因子として発生において重要な役割を果たしている Sonic hedgehog (Shh) は、様々な標的遺伝子の発現制御を介して、細胞の増殖、生存、位置情報の伝達やパターン形成を調節している。この発現制御は転写因子 Gli を介して行われているが、その複雑な転写制御機構には不明な点が多い。脊椎動物では3種類の Gli (Gli1、2、3) が存在しており、9塩基からなる Gli 結合配列 (コンセンサス配列) が同定されている。*Fibroblast growth factor 15* (*Fgf15*) の間脳、中脳の内側領域における発現は腹側正中部における *Shh* 発現領域に隣接しており、また *Shh* ノックアウトマウスにおいてこの部位における *Fgf15* の発現が消失することから *Fgf15* の発現は *Shh* シグナルの制御下にあると考えられる。また、*Fgf15* 遺伝子の5'側の3.6kb エンハンサー/プロモーター領域には Gli 結合配列 (GliBS) が存在し、ルシフェラーゼアッセイおよびトランスジェニックマウスの解析により Gli2 が直接結合することによって *Fgf15* 遺伝子の発現が制御されていることが明らかになっている。

上記のルシフェラーゼアッセイの結果から、この GliBS に結合する Gli2 と共役して *Fgf15* の発現を制御している因子の存在が示唆された。そこでエンハンサー/プロモーター領域の配列を詳細に解析することにより、新たに2つの Gli 結合配列 (Gli Responsive Element : GliRE) を同定した。これらの配列は Gli 結合コンセンサス配列と5塩基が共通しており、ルシフェラーゼアッセイにより Gli2 によって制御されていることが明らかになった。さらにクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) によって、Gli2 がこの配列に直接結合することを示した。

今回同定された GliRE に Gli2 が結合できないように変異を挿入し、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、予想に反して転写活性が上昇した。Gli2 には活性型と抑制型が存在し、時期、組織特異的にそのどちらか、或いは両方が作用して標的遺伝子の発現を制御していると考えられている。Gli2 の DNA 結合領域と VP16 の転写活性化領域を融合したキメラタンパクと、変異を導入した GliRE を用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、変異を導入していない GliRE に比べてルシフェラーゼ活性が低下した。つまり GliBS には活性型の Gli2 が、GliRE には抑制型の Gli2 が結合することによって *Fgf15* の発現を調節していることが示唆された。また、GliRE に変異を導入した transgene を用いてトランスジェニックマウスを作成し、*Fgf15* の発現を β -ガラクトシダーゼ活性により検出したところ、正常 GliRE と比べて発現領域に変化は見られなかった。これらのことから、本研究によって新たに同定された GliRE は、*Fgf15* の発現量の調節に関与するが、空間的な発現パターンには影響しないことが明らかになった。

本研究は、Gli2 の活性型と抑制型が、近傍の配列などの要因によりそれぞれの Gli 結合配列と結合することによって Shh シグナルによる *Fgf15* の発現を調節していることを明らかにし、Gli2 による転写制御の新たなメカニズムを示したものである。

論文審査の結果の要旨

Sonic hedgehog (Shh) は、胚の脊索や神経管底板に発現し、背側へ向かって濃度勾配をつくることによって神経管内に背腹軸を形成する。また、*Fibroblast growth factor15* (*Fgf15*) が Shh の誘導によって中脳・間脳の内側に発現し、シグナルを中脳、間脳の背側へと伝達する。Shh シグナルによる標的遺伝子の発現は転写因子 Gli によって制御されているが、抑制型と活性型をもつ Gli2 の転写制御機構には不明な点が多い。本研究においては、*Fgf15* のエンハンサー・プロモーター領域に新たな Gli responsive elements (GliREs) を同定し、これらと Gli binding site (GliBS) による3つの連続した Gli 結合配列がこの領域に存在することを明らかにした。また、これらの GliRE に抑制型 Gli2 が結合し、これが GliBS に結合した活性型 Gli2 と共役して *Fgf15* の発現量を調節していることを示した。GliBS は中脳・間脳の腹側における *Fgf15* の発現に必須の配列であるが GliRE は *Fgf15* の発現パターンには関与しないことから、抑制型 Gli2 が活性型 Gli2 と共役して *Fgf15* の発現量を調節しているという、転写制御の新たなメカニズムが明らかになった。

以上の研究は、Shh シグナルによる *Fgf15* の転写制御機構の解明に貢献し、発生学・分子生物学研究の進展に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 2 月 25 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。