

|           |                                                                                                                                                                                 |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | お 尾 ない たか ゆき<br>内 隆 行                                                                                                                                                           |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                       |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2970 号                                                                                                                                                                    |
| 学位授与の日付   | 平 成 18 年 3 月 23 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 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻                                                                                                                                                     |
| 学位論文題目    | Xenopus XsalF: Anterior Neuroectodermal Specification by<br>Attenuating Cellular Responsiveness to Wnt Signaling<br>(XsalF は Wnt シグナルに対する細胞応答性を調節し、前方神経外胚葉の領<br>域化を行う)<br>(主 査) |
| 論文調査委員    | 教 授 塩田浩平 教 授 金子武嗣 教 授 西川伸一 教 授 鍋島陽一                                                                                                                                             |

### 論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の脳の初期発生を制御する機構を理解するため、アフリカツメガエルの大脳・中脳前駆細胞の組織を用いた cDNA screening を行いショウジョウバエの sal family に属する Zn finger 型の転写因子を単離した。我々はこの遺伝子を XsalF と命名し、胚での正確な発現領域を確認するために、アフリカツメガエルの神経胚を用いて double in situ hybridization を行った。その結果 XsalF は神経胚期においてアフリカツメガエルの大脳・中脳予定領域に特異的な発現を示すことが明らかとなった。

次に XsalF の機能を調べるために mRNA 微量注入法を用いて XsalF の機能増強実験を行った。その結果、XsalF の強制発現により大脳・中脳マーカー遺伝子である Otx2 と大脳マーカーである Pax6 の発現領域が拡大することが観察された。同時に中脳後脳境界領域のマーカーである Pax2 と後脳領域のマーカーである Gbx2 の発現が抑制されていた。これらのことから XsalF は大脳・中脳予定領域の発生を促進し、中脳後脳予定領域と後脳予定領域の発生を抑制することが示唆された。

次に XsalF が大脳・中脳予定領域の形成に必須であるか調べるために、XsalF の機能阻害実験を試みた。まず、XsalF の C 末端側を欠如した deletion construct (ドミナントネガティブ体) を作成し、その mRNA をアフリカツメガエル胚に微量注入した。その結果、大脳・中脳予定領域のマーカーの発現を抑制し、中脳後脳予定領域と後脳予定領域のマーカーの発現領域を拡大することが観察された。また XsalF mRNA に相補的な morpholino アンチセンスオリゴヌクレオチドを作成し、8細胞期の動物極側に微量注入したところ、神経胚期において大脳・中脳予定領域のマーカーの発現を抑制し、中脳後脳予定領域と後脳予定領域のマーカーの発現領域を拡大することが明らかとなった。これらの XsalF 機能阻害実験から、XsalF は大脳・中脳予定領域の形成に必須の制御因子であることが示唆された。

次に XsalF がどのような機構で大脳・中脳の領域形成を制御するかについて解析した。Wnt 蛋白は胚の神経板を後方化し、前脳など前方の神経発生を抑制する因子として考えられている。そこで Wnt1 DNA をアフリカツメガエルの8細胞期の動物極側に強制発現したところ、神経胚期において大脳マーカーである Pax6 の発現を抑制し、中脳後脳境界領域マーカーである Pax2 の発現の拡大が認められた。さらに XsalF mRNA を Wnt1 DNA と共に微量注入したところ、Wnt1 DNA によって抑制された Pax6 の発現が回復した。このように XsalF は Wnt シグナルに拮抗することが示唆された。一方 Wnt シグナルを細胞内で抑制する因子である GSK3- $\beta$  と Tcf3 の mRNA 発現を解析したところ GSK3- $\beta$  および Tcf3 は神経胚期において胚の前方で発現が強く、後方で弱いことが観察された。これらの前方特異的な発現は XsalF の機能阻害によって抑制されることが判明した。また、逆に XsalF の機能阻害表現型を GSK3 $\beta$  や Tcf3 の強制発現は抑制する事が明らかとなった。このように XsalF は GSK3- $\beta$  と Tcf3 の発現を制御することによって大脳・中脳の領域形成を行っていることが示唆された。

これらの結果から XsalF は初期胚の脳の領域化における必須な制御因子であり、Wnt シグナルへの反応性を負に制御す

ることで前脳中脳発生を促進することが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

脳発生における領域特異性獲得の分子機構には、不明な点が多い。本学位申請者は、アフリカツメガエル初期胚の脳・中脳予定領域に発現する新規 *spalt family* 転写因子, *XsalF* を用いその機構を解析した。RNA 微量注入法による機能増強実験では, *XsalF* の強制発現により脳・中脳領域マーカーが異所的に誘導された。逆に中脳後脳境界部及び後脳前方領域マーカーの発現は抑制された。一方, C 末端を欠如した *XsalF* ドミナントネガティブ体及び *XsalF* mRNA に相補的な morpholino アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた *XsalF* の機能阻害実験を行ったところ, 中脳後脳境界部及び後脳前方領域マーカーの発現が異所的に誘導され, 脳・中脳領域マーカーの発現は抑制された。これらのことから *XsalF* は脳・中脳予定領域の形成に必須の正の制御因子であることが示唆された。次に *XsalF* の作用機序を解析したところ, *XsalF* は神経後方化シグナルである Wnt 活性を阻害することが示めされた。さらに Wnt シグナルの負の制御因子である GSK3 $\beta$  と Tcf3 の発現を *XsalF* が調節することが明らかとなり, これらが *XsalF* 活性を媒介することが示唆された。

以上の研究は脳領域特異性の制御因子の解明に貢献し, 脳の初期発生機構の理解に寄与するところが多い。したがって, 本論文は博士(医学)の学位論文として価値があるものと認める。

なお, 本学位申請者は, 平成18年2月9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。