

|             |                             |
|-------------|-----------------------------|
| 氏 名         | ささ い のり あき<br>笹 井 紀 明       |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (理 学)                   |
| 学 位 記 番 号   | 理 博 第 2394 号                |
| 学位授与の日付     | 平 成 13 年 7 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      | 理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻       |
| 学 位 論 文 題 目 | カエル胚神経堤領域に発現する Fox 型転写因子の役割 |

論文調査委員 (主 査) 教授 永 田 和 宏 教授 竹 市 雅 俊 教授 宮 田 隆

### 論 文 内 容 の 要 旨

神経堤細胞は、初期胚において、表皮と神経板の間から発生する脊椎動物特有の外胚葉系の細胞集団である。これらは、末梢神経、頭部の間葉系組織、副腎髄質、色素細胞、心臓の流出部など、きわめて多様な組織に分化する。この多分化能に関する研究は現在までさかんに行われてきたが、その初期発生に関する研究はこれまでほとんど手つかずのままであった。

本研究は、カエル胚において、初期の神経堤細胞に特異的に発現する分子の解析を通して、神経堤初期分化の分子メカニズムの解明に寄与しようというものである。申請者は神経誘導因子 Chordin と FGF の協同によって特異的に誘導される分子をディファレンシャルスクリーニングの手法を用いて探索し、初期から神経堤に発現する遺伝子 FoxD3 を単離した。FoxD3 は未分化外胚葉が神経堤に運命づけられる時期からこの領域に発現するフォークヘッド型 (Fox 型) 転写因子の 1 つである。スクリーニングの際に期待されたように、FoxD3 は Chordin と FGF (または Wnt) の両者のシグナルが与えられたときにはじめてその転写が誘導され、それぞれの単独によっては誘導されなかった。FoxD3 メッセンジャー RNA を胚内に微量注入して大量発現させると、異所的な神経堤が誘導された。また、FoxD3 のドミナントネガティブ変異体を用いてその機能を喪失させると神経堤の発生が阻害された。これらの結果から、FoxD3 が神経堤細胞の発生に必要かつ十分な遺伝子であることが示された。

FoxD3 の今 1 つの活性は、表皮の分化に関与する BMP4 の転写を抑制することによって中枢神経も誘導するというものである。これと同様の活性を、FoxD3 と最も相同性が高いとされる XBF2(FoxD1) も持っている。しかし、神経堤を誘導する活性は FoxD3 のみが持つものであり、Chordin やドミナントネガティブ BMP レセプターによって BMP4 の発現を抑制しても神経堤は発生しない。このことは、神経堤の発生に Chordin 以外に別のシグナルが必要とされることの傍証でもある。

本研究では、FoxD3 と、既知の因子との関係についても解析を進めた。Zic 関連因子や Slug はともに Zinc フィンガー型の転写因子であり、特に Slug は神経堤の発生ならびに走化現象に必須であることが知られている。これらの因子との関係を検討した。まず、Zic 関連因子によって誘導される Slug の転写をドミナントネガティブ FoxD3 が抑制した。また、ドミナントネガティブ FoxD3 によって抑制された神経堤は Slug の大量発現によって回復された。このことは、FoxD3 が Slug と同等、またはその上流で働くことを示唆する。一方、FoxD3 によって誘導される神経堤分子マーカーの中に、ドミナントネガティブ Slug によって抑制されるものの他に、抑制されないマーカーが存在した。このことは、神経堤の分化を促進するシグナル経路の中に、Slug に依存するものの他に Slug に依存しないものが存在することを示す。これらの結果から、FoxD3 は神経堤細胞の分化制御において最も上流に位置する遺伝子の 1 つであるばかりでなく、神経堤の分化の維持にも必要とされる遺伝子であることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

神経堤（神経冠）細胞は初期発生過程で神経板（中枢神経原基）と皮膚前駆領域の間に発生するユニークな外胚葉細胞である。神経堤細胞は分化決定後、末梢へ広く移動し、様々な組織形成（末梢神経系、頭頸部軟骨、血管、内分泌組織）に関与する。こうした多様な分化の制御については最近多くの分子レベルでの解析が行われてきた。一方、神経堤細胞の未分化外胚葉からの決定という最初のステップに関しては遺伝子レベルではほとんど解明されていなかった。

申請者は、初期発生学においてきわめて有用な実験系であるアフリカツメガエルを用いてこの問題を解明することに努めてきた。まず、Chordin（神経誘導因子）と FGF（繊維芽細胞成長因子）の協同で発現誘導される遺伝子をディファレンシャルスクリーニングの手法を用いて系統的に探索した。次に 2 次スクリーニングとして候補遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、それらの発現パターンを注意深く観察することによって、神経堤に最も初期から発現していると思われる遺伝子 FoxD3 の単離に成功した。またこの活性を、メッセンジャー RNA 微量注入法と RT-PCR を用いて解析し、FoxD3 が神経堤を誘導するに十分な因子であることを証明した。さらにドミナントネガティブ FoxD3 を用いることによって、FoxD3 が神経堤の発生に必須の遺伝子であることも示した。

ここで、メッセンジャー RNA 微量注入法の問題の 1 つは、注入する遺伝子の特異性である。特に、FoxD3 と最も相同性が高いとされる XBF2（FoxD1）とは、中枢神経を誘導するという共通の活性を持つ。この問題に対し、申請者は、XBF2 では神経堤が誘導できないことを示し、さらにドミナントネガティブ FoxD3 とドミナントネガティブ XBF2 を用いてこれら両者が互いに他方の活性を抑制できないことを示すことによって反論している。このような緻密な論理展開は本論文の特徴の 1 つである。

本論文は FoxD3 の活性についての議論にとどまっていない。Zic 関連因子と Slug はいずれも Zinc フィンガー型の転写因子であり、神経堤を誘導する遺伝子としてよく知られたものである。これら両者との関係について解析を深めた。まず Zic 関連因子によって誘導される Slug の発現に FoxD3 が必須であることを示し、さらにドミナントネガティブ FoxD3 で抑制した神経堤が Slug の大量発現によって回復できることを示した。このことは FoxD3 が神経堤発生の分化経路において最も上流に存在することを強く示唆する。さらに、FoxD3 とドミナントネガティブ Slug を用いることによって、FoxD3 によって誘導される神経堤の中に、一部 Slug に依存しない経路が存在することを見いだした。このことは神経堤分化における新規の経路の存在を示唆するものである。

このように、神経堤に初期から発現する遺伝子を単離してその活性について解析したばかりでなく、既知の他の遺伝子との関係にまで言及した点はきわめて緻密かつ斬新であり、神経堤初期分化についての分子レベルでの理解に対して寄与するところが大きい。よって本申請論文を、博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、申請者は、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認められたものである。