

|             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| 氏 名         | の 野 村 涼 坪                             |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (薬 学)                             |
| 学 位 記 番 号   | 薬 博 第 613 号                           |
| 学位授与の日付     | 平 成 19 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 | 薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻               |
| 学 位 論 文 題 目 | ゼブラフィッシュ <i>Fgf16</i> の同定と胸ビレ形成における役割 |

論文調査委員 (主 査) 教 授 伊 藤 信 行 教 授 中 山 和 久 教 授 竹 島 浩

## 論 文 内 容 の 要 旨

FGF (線維芽細胞増殖因子) は細胞増殖・分化能を有する多機能性細胞間シグナル分子である。多種多様な細胞から構成されている生体が秩序立って各器官・組織を形成する過程で、細胞間における情報伝達的手段として細胞間シグナル分子は大きな役割を担っている。当研究室が発見した9種類の新規な FGF の内、FGF16 の詳細な機能は不明である。

小型魚類であるゼブラフィッシュは発生期間が短く、場所や研究コストの面で大きな利点がある。さらに、ゼブラフィッシュはヒトの相同遺伝子を多く持ち、臓器、組織の構成もヒトと類似している。また、近年に開発されたモルフォリノ修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) は特定の遺伝子の機能を個体レベルで容易に阻害できることが明らかになった。従って、MO を用いたゼブラフィッシュ遺伝子機能解析法は個体レベルでのヒト遺伝子機能解析の良いモデル系であるとともに、遺伝子機能解析を基盤とした創薬標的の発掘にも有用であると期待されている。そこで私は、ゼブラフィッシュと MO を用いることにより、新規遺伝子の機能解析に、迅速かつ有益な知見を与えようと考え、未だ解明されていないゼブラフィッシュ *Fgf16* の機能解析を試みた。

### ゼブラフィッシュ *Fgf16* の同定

はじめに、DNA データベース上に登録されているゼブラフィッシュの DNA 断片配列情報からゼブラフィッシュ *Fgf16* の全翻訳領域の塩基配列を同定した結果、203アミノ酸をコードしていた。*Fgf16* の発現分布を検討した結果、耳胞、終脳、尾ビレ、鰓弓、下垂体、胸ビレ、特に胸ビレの伸長方向決定に重要な役割を担っている外胚葉で *Fgf16* の発現を確認した。次に、*Fgf16* に対する MO を翻訳開始領域の25塩基で設計 (*Fgf16* MO) し、ゼブラフィッシュ受精卵に導入することで、*Fgf16* の機能を阻害した胚を観察したところ、哺乳動物の前肢に相当する胸ビレの形成不全が見られた。同様に *Fgf16* に対する control MO として *Fgf16* MO の25塩基の内、5塩基を他の塩基で置換した control MO 導入胚を観察したところ、胸ビレの形成は正常であった。さらに、*Fgf16* のエキソン2とイントロン2間の25塩基で MO を設計 (*Fgf16* E2I2 MO) し、*Fgf16* E2I2 MO 導入胚を観察したところ、*Fgf16* MO 導入胚と同様に胸ビレの形成不全が見られた。さらに、*Fgf16* E2I2 MO 導入胚の cDNA を回収し、その塩基配列を調べた結果、*Fgf16* E2I2 MO 導入胚は *Fgf16* のエキソン2内の17塩基対が欠損するフレームシフトを起こしていることから、*Fgf16* MO が *Fgf16* 特異的に翻訳阻害していることを確認した。

### 胸ビレ形成因子としてのゼブラフィッシュ *Fgf16*

次に、*Fgf16* 機能阻害胚における外胚葉マーカーである *Fgf8*, *Fgf4* の発現を control MO 導入胚と比較した。その結果、*Fgf8*, *Fgf4* の発現が消失していることを確認した。さらに、*Fgf16* 機能阻害胚における間充織マーカーである *Fgf10* の発現を control MO 導入胚と比較した。その結果、*Fgf10* の発現は維持されていることを確認した。最後に、ゼブラフィッシュ *Fgf16* の細胞増殖活性を免疫組織化学染色による Phosphohistone H3 (H3P) 陽性細胞の割合を指標に、control MO 導入胚と *Fgf16* 機能阻害胚と比較検討した。その結果、*Fgf16* 機能阻害胚では control MO 導入胚に比べて、外胚葉直下に存在する間充織での H3P 陽性細胞の割合が有意に減少しており、*Fgf16* は間充織での細胞増殖活性を有している

ことを明らかにした。

長年、胸ビレの外胚葉において *Fgf8*, *Fgf4* ではない別の *Fgf* の関与が示唆されてきたが、謎であった。しかし、今回新たに同定した外胚葉で発現する *Fgf16* はその機能を阻害すると胸ビレ形成不全が見られた。また、上記の結果から *Fgf16* は *Fgf10* の下流で機能し、*Fgf8*, *Fgf4* の上流で機能する外胚葉の因子として考えられる。脊椎動物の四肢形成は古くから形態形成の良いモデルとして、発生学の格好の材料となってきた。従って、本研究の成果により、一組織としての四肢形成の理解のみならず形態形成機構の解明、ひいては各種臓器の再生医療への貢献が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

FGF（線維芽細胞増殖因子）は細胞増殖・分化能を有する多機能性細胞間シグナル分子である。多種多様な細胞から構成されている生体が秩序立って各器官・組織を形成する過程で、細胞間における情報伝達の手段として細胞間シグナル分子は大きな役割を担っている。当研究室が発見した9種類の新規なFGFの内、FGF16の詳細な機能は不明である。

小型魚類であるゼブラフィッシュは発生期間が短く、場所や研究コストの面で大きな利点がある。さらに、ゼブラフィッシュはヒトの相同遺伝子を多く持ち、臓器、組織の構成もヒトと類似している。また、近年に開発されたモルフォリノ修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド（MO）は特定の遺伝子の機能を個体レベルで容易に阻害できることが明らかになった。従って、MOを用いたゼブラフィッシュ遺伝子機能解析法は個体レベルでのヒト遺伝子機能解析の良いモデル系であるとともに、遺伝子機能解析を基盤とした創薬標的の発掘にも有用であると期待されている。そこで私は、ゼブラフィッシュとMOを用いることにより、新規遺伝子の機能解析に、迅速かつ有益な知見を与えようと考え、未だ解明されていないゼブラフィッシュ *Fgf16* の機能解析を試みた。

### ゼブラフィッシュ *Fgf16* の同定

はじめに、DNA データベース上に登録されているゼブラフィッシュのDNA断片配列情報からゼブラフィッシュ *Fgf16* の全翻訳領域の塩基配列を同定した結果、203アミノ酸をコードしていた。*Fgf16* の発現分布を検討した結果、耳胞、終脳、尾ビレ、鰓弓、下垂体、胸ビレ、特に胸ビレの伸長方向決定に重要な役割を担っている外胚葉で *Fgf16* の発現を確認した。次に、*Fgf16* に対するMOを翻訳開始領域の25塩基で設計（*Fgf16* MO）し、ゼブラフィッシュ受精卵に導入することで、*Fgf16* の機能を阻害した胚を観察したところ、哺乳動物の前肢に相当する胸ビレの形成不全が見られた。同様に *Fgf16* に対する control MOとして *Fgf16* MOの25塩基の内、5塩基を他の塩基で置換した control MO導入胚を観察したところ、胸ビレの形成は正常であった。さらに、*Fgf16* のエキソン2とイントロン2間の25塩基でMOを設計（*Fgf16* E2I2 MO）し、*Fgf16* E2I2 MO導入胚を観察したところ、*Fgf16* MO導入胚と同様に胸ビレの形成不全が見られた。さらに、*Fgf16* E2I2 MO導入胚のcDNAを回収し、その塩基配列を調べた結果、*Fgf16* E2I2 MO導入胚は *Fgf16* のエキソン2内の17塩基対が欠損するフレームシフトを起こしていることから、*Fgf16* MOが *Fgf16* 特異的に翻訳阻害していることを確認した。

### 胸ビレ形成因子としてのゼブラフィッシュ *Fgf16*

次に、*Fgf16* 機能阻害胚における外胚葉マーカーである *Fgf8*, *Fgf4* の発現を control MO導入胚と比較した。その結果、*Fgf8*, *Fgf4* の発現が消失していることを確認した。さらに、*Fgf16* 機能阻害胚における間充織マーカーである *Fgf10* の発現を control MO導入胚と比較した。その結果、*Fgf10* の発現は維持されていることを確認した。最後に、ゼブラフィッシュ *Fgf16* の細胞増殖活性能を免疫組織化学染色による Phosphohistone H3（H3P）陽性細胞の割合を指標に、control MO導入胚と *Fgf16* 機能阻害胚で比較検討した。その結果、*Fgf16* 機能阻害胚では control MO導入胚に比べて、外胚葉直下に存在する間充織での H3P 陽性細胞の割合が有意に減少しており、*Fgf16* は間充織での細胞増殖活性能を有していることを明らかにした。

長年、胸ビレの外胚葉において *Fgf8*, *Fgf4* ではない別の *Fgf* の関与が示唆されてきたが、謎であった。しかし、今回新たに同定した外胚葉で発現する *Fgf16* はその機能を阻害すると胸ビレ形成不全が見られた。また、上記の結果から *Fgf16* は *Fgf10* の下流で機能し、*Fgf8*, *Fgf4* の上流で機能する外胚葉の因子として考えられる。脊椎動物の四肢形成は古くから形態形成の良いモデルとして、発生学の格好の材料となってきた。従って、本研究の成果により、一組織としての四肢形成の理解のみならず形態形成機構の解明、ひいては各種臓器の再生医療への貢献が期待される。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値のあるものと認める。さらに、平成19年2月21日に論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認定した。