

論文内容の要旨

申請者氏名 小林 琢磨

脊椎動物の眼は、器官発生モデルとしてこれまでに非常に多くの研究が行われている。発生を制御する転写因子やシグナル伝達に関わる遺伝子とその発現パターンが多数報告され、突然変異体の解析、遺伝子過剰発現、遺伝子ノックアウトなどの手法により、遺伝子の機能解析に関する研究報告も多い。さらにこれらの遺伝子の調節関係も次第に明らかにされている。このように多数の報告があるにもかかわらず、いまだその分子メカニズムが統一的に理解されているとは言い難い。その理由の一つは、遺伝子ごとに、異なる動物種で、異なる実験手法によって得られた結果が比較検討されていることにある。このような背景のもとで、申請者は、実験操作の容易なニワトリ胚に着目して、古典的な実験形態学と器官培養の手法を用い、関連する多くの遺伝子の発現動態を調査した。特に、眼の形態形成に必須である背腹の極性形成に関わるシグナル分子、BMP4 と Shh、および眼胞内のシグナル分子 FGF8 に注目して、これらのシグナル分子が、眼の発生に必要な転写因子群を制御する機構について研究をおこなった。

まず、眼の原基である眼胞の発生運命に、背と腹の領域で明瞭な違いがあることを明らかにし、特に、眼胞の前腹4分の1領域が眼の発生に必須であり、この領域を実験的に除去すると発生が停止することや、この前腹4分の1領域だけで完全な眼に発生しうることを明らかにした。この領域には FGF8 が発現しているため、FGF8 が眼胞発生に必須のシグナル分子である事を示した。次に、この知見に基づいて、前腹4分の1領域を背側に移植し、この領域を重複して持つ個体を作成し、それぞれが別の眼に発生するのかを検討した。その結果、眼胞4分の1領域にさらに眼胞周囲組織を含めた領域を重複して持つ場合、それぞれが別の眼に発生することを明らかにした。これによって眼胞の周囲組織、つまり脳の背側および腹側正中部の存在が眼の形態形成に支配的な役割を持つことを示した。また、移植した領域から発生する眼の極性が、宿主胚の背腹の極性に支配されることを示した。

続いて、器官培養により、眼胞を含む頭部背側部、腹側部の微小領域を用いて、背および腹側正中部の役割を調査した。背側部シグナルとして BMP4、腹側部シグナルとして Shh を想定して、その機能を調査した。手法として、シグナル遺伝子発現細胞やシグナル含有ビーズ移植、遺伝子の局所的強制発現を用いた。その結果、BMP4 と Shh は背-腹の極性に関わる遺伝子 Tbx5 と Pax2 の発現を双方向性に制御する事、それと同時に、色素上皮と網膜の分化に関わる遺伝子 Mitf, Otx2 と Rx1, Chx10 を誘導することを明らかにした。さらに、Shh が、眼胞の腹側に FGF8 の発現を誘導し、続いて FGF8 が Mitf の抑制機能をもつことにより、眼胞内に色素上皮と網膜の明瞭な境界が形成されることを示した。

以上の結果から、眼胞の周囲で発現する二つの背と腹のシグナル分子がさらに眼胞内の背と腹のシグナル分子を誘導し、これらがそれぞれの段階で形態形成と領域分化に必要な転写因子群を制御することが明らかにされ、このような一連の遺伝子発現調節系によって、眼胞の発生が制御されていることを明確にした。本研究で用いられた胚操作および微小領域の器官培養は、従来の眼の発生研究ではほとんど用いられておらず、シグナルによる遺伝子発現解析の新しいアプローチとして、今後、より一層の研究の展開が期待される。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 小林 琢磨

申請者は、これまで、脊椎動物の眼がいかにして形成されるのか、その発生のメカニズムを遺伝子レベルで解析することを目指して、研究を進めてきた。ニワトリ胚を用いて、古典的な実験形態学や微小領域の器官培養の手法と、遺伝子発現解析の手法を組み合わせて研究を進め、過去の知見とあわせながら、眼の原基自体に、いかにして背と腹の極性が形成されるのか、またこの極性が眼の形態形成にどのような意味を持つのかを明らかにしようとした。

すでに先行研究によって、背と腹の極性が正常に形成されないと眼胞の発生が停止することが実験形態学的手法を用いて明らかにされている。申請者は、これを発展させる形で、眼胞の背側部分と腹側部分の発生がどのように運命づけられているかを、眼胞部分除去によって明らかにしようとした。その結果、眼胞の前腹4分の1領域がないと眼の発生が止まること、またこの4分の1領域だけで眼を形成することを明らかにした。この研究は申請者が第2著者である論文として発表された (*Dev. Biol.* 2008, 317:620-631)。申請者は、この研究の中で、この前腹4分の1領域で発現するシグナル FGF8 が重要な機能をもつことを明らかにし、その事実を手がかりに、以下の研究を展開した。

まず、眼胞の前腹4分の1領域が単独で1個の眼を形成するためには何が必要かを調べるために、その周辺組織（頭部の背側正中部、および腹側正中部）の機能を胚移植操作によって調べようとした。この目的のために、前腹4分の1領域と周辺領域（頭部腹側正中部）を重複して持つ個体を実験的に作成したところ、第2の眼をもつ個体ができた。この結果は、申請者を筆頭著者とする論文として発表された (*Dev. Growth Differ.* 2009, 51:723-733)。このような報告は過去になく、眼胞内部で進行する形態形成プログラムが（背と腹の極性に関して）領域によって異なる事を明確に示した点は、これまでの長い眼の発生研究の中でも重要な発見であると言える。

さらに申請者は、眼胞内に背と腹の明確な極性が生まれるメカニズムをより精細に明らかにするために、新たに、眼胞を含む頭部の微小な領域を器官培養することを試みた。これは、眼胞周囲組織のシグナル分子が、眼胞の背と腹の極性形成にどのような役割をもつかを直接的に調査できる優れた系であることが一連の結果から明らかにされた。その端的な実験結果として、二つのシグナル Shh と BMP4 を本来の位置とは 180 度異なる位置に作用させることにより、眼の形態形成を 180 度逆にできる結果を得たことである。これらの結果は、申請者を筆頭著者とする論文として *Dev. Growth Differ.* に投稿され、審査中であるが、Editor から比較的軽微な修正が必要との連絡を得ているとのことである。この研究では、多数の眼の発生に関わる転写因子群が、眼の周囲シグナルによってどのように誘導されるかを実験的に調査しており、眼の初期形態形成メカニズムに関して一定のストーリーを提示したことは評価できる。

以上のように、本論文は、申請者が独自に考案した胚操作モデルと器官培養モデルを用いて、Shh、BMP、FGF8 シグナルが眼の形態形成プログラムをどのように駆動するのかを明らかにしたものであり、学術上、貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。