

論文内容の要旨

申請者氏名 櫻井 祐介

Otx 遺伝子は、ショウジョウバエ頭部ギャップ遺伝子 *otd* の脊椎動物における相同遺伝子で、ペアードタイプホメオボックスをもつ転写因子である。マウスには *Otx1*, *Otx2* の2つのパラログが存在し、このうち *Otx2* の発現は、頭部オーガナイザー機能をもつ臓側内胚葉に始まり、吻側内中胚葉、吻側神経外胚葉、前脳・中脳、頭部神経堤細胞など、頭部形成の各段階、各部位で認められる。その遺伝子欠損マウスは、最初の *Otx2* 発現、臓側内胚葉での異常により頭部を形成せず、その後の吻側神経外胚葉、前脳・中脳での *Otx2* 機能は明らかでない。また、*Otx2* 遺伝子のエンハンサー解析がゲノム 300k に渡って行われ、原条形成により誘導された吻側神経外胚葉全体での *Otx2* 発現は 90kb 5' 上流にある AN エンハンサーの他、未知の別のエンハンサーによって制御されていることが明らかにされている。AN エンハンサーの活性は6体節期迄に失われ、その後の前脳、中脳域での発現は 75kb 5' 上流にある FM1 エンハンサー、115kb 3' 下流にある FM2 エンハンサー の2つの異なるエンハンサーにより制御されていることも明らかにされている。FM1, FM2 エンハンサーは最吻側の予定終脳、視床下部では発現活性をもたず、その後方発現境界は中脳・後脳境界と一致する。一方 *Otx1* 遺伝子は1体節期より *Otx2* と同様の領域で発現するが、その単独欠損マウスは脳形成に異常を示さない。

本研究ではエンハンサー欠損マウスを作成して、吻側神経外胚葉の形成、前脳・中脳の形成における *Otx2* 機能の解析を試みた。まず、*Otx1* と FM1, FM2 エンハンサーをともに欠損マウスするマウス胚を作製し、吻側脳が終脳、間脳、中脳、後脳に領域化する E8.5-E9.5 の時期 *Otx2* と *Otx1* が協働して間脳・中脳の後脳への後方化を抑制することを明らかにした。他方この時期、終脳は既に後方化シグナルに非感受性となり、*Otx* 非依存的になっていることが示された。また、FM1 エンハンサーと FM2 エンハンサーを欠損するマウス胚は、両エンハンサーが活性をもつ E9.5 で脳形成に異常を示すが、予想に反し、その後脳形成は正常となった。この胚での *Otx2* 発現の解析から、E10.5 以降、間脳・中脳で活性をもつ第3のエンハンサーが存在することが強く示唆された。

また、無体節期吻側神経外胚葉での *Otx2* 発現を制御するエンハンサーとしてあらたに AN2 エンハンサーを 5' 上流 87 Kb に同定し、AN, AN2 エンハンサーをともに欠損するマウス胚を作製した。同変異体は、E7.0-E8.5 吻側神経外胚葉全体の後脳化抑制に *Otx2* が必要で、この時期の吻側神経外胚葉での *Otx2* 発現がある閾値以下になると全吻側神経外胚葉（予定終脳、間脳、中脳域）が後脳へ後方化することを示した。しかしこの時期の *Otx2* 発現もまた、AN, AN2 エンハンサーの他に更に第3の AN3 エンハンサーによって制御されていることが示された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 櫻井 祐介

申請者は、吻側脳（終脳・間脳・中脳・後脳）形成時の *Otx* 遺伝子の機能に興味を持ち、その発現を制御するエンハンサーを欠損したマウス胚を作成して研究を進めた。

マウスで *Otx* 遺伝子は *Otx1* 遺伝子と *Otx2* 遺伝子よりなるが、*Otx2* 遺伝子は頭部形成の各段階、各部位で発現し、その遺伝子欠損マウスは *Otx2* 発現の最初の部位（臓側内胚葉）での異常により頭部を形成せず、吻側脳が、終脳・間脳・中脳・後脳に領域化する時期での *Otx2* 機能は不明であった。他方 *Otx1* 遺伝子の発現は1体節期より吻側神経外胚葉で *Otx2* と類似した発現を示すが、その遺伝子欠損マウスは頭部形成に異常を示さず、その脳形成における働きも不明であった。一方これまでの研究から、この時期の *Otx2* 発現は 75kb 5' 上流にある FM1 エンハンサー、115kb 3' 下流にある FM2 エンハンサー の2つのエンハンサーにより制御されていることが明らかになっていった。そこで申請者は、*Otx1* と *Otx2* の FM1, FM2 エンハンサーをともに欠損するマウス胚を作製し、吻側脳領域化の時期における *Otx2*, *Otx1* 遺伝子の機能解析を試みた。その結果、この時期 FM1, FM2 エンハンサーの下で発現する *Otx2* と *Otx1* は協働して、間脳・中脳の後脳化抑制に働いていることが明らかにされた。また、この時期終脳は既に後方化シグナルに非感受性となり、*Otx* 非依存的になっていることが示された。さらに、FM1, FM2 エンハンサーを欠損マウスするマウス胚の脳形成の異常と *Otx2* 発現の解析から、FM1, FM2 エンハンサーより遅れて活性をもつ第3のエンハンサーがさらに存在することも明らかとなった。以上の結果は、申請者が筆頭著者である論文 (Sakurai et al., *Developmental Biology*, 347, 392-403 (2010)) に報告されている。

さらに申請者は、同様の手法で、囊胚形成後誘導される無体節期の吻側神経外胚葉での *Otx2* の機能解明を試みている。この時期の吻側神経外胚葉全体での *Otx2* 発現は 90kb 5' 上流にある AN エンハンサーの他、未知の別のエンハンサーによって制御されていることが明らかとなっていた。申請者は、エンハンサー活性をもつ領域を再検索し、5' 上流 87 Kb に AN2 エンハンサーを同定、AN, AN2 エンハンサーをともに欠損したマウス胚を作製している。これまでの解析から、この時期 AN, AN2 エンハンサーの下の *Otx2* 発現は吻側神経外胚葉全体の後脳化抑制に必要であることが示唆されており、より詳細な解析を進めることによって、吻側神経外胚葉形成機序の解明が進むと期待される。

以上のように本論文は、多大の労力を要するマウスでの遺伝学的解析により、吻側脳形成に際し *Otx* 遺伝子が後脳化抑制に働いていることをはじめて示したものであり、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。