

論文審査の結果の要旨

氏名 佐藤 夢子

本論文は二部構成で、要旨、序論、第一章、第二章、考察、結論、方法、図表、文献からなり、前方神経板のパターン形成から眼の初期形成機構について、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) とネツタイツメガエル (*Xenopus/Silurana tropicalis*) を用いた詳細な解析を行った結果を述べている。

脊椎動物の眼の初期発生は、神経板の前方に前脳中脳領域が決まった後に、前脳領域の中央部に eye field (眼の発生野) が領域化されることから始まる。この発生過程の分子メカニズムとして、以下の遺伝子間の相互作用やカスケードが報告されていた。まず神経板の前方に *otx2* 遺伝子が発現する。*otx2* は、後方に発現する *gbx2* や *meis3* と相互に抑制し合うことで前脳中脳領域を定めると共に、その下流で eye field 特異的遺伝子 *rax* や *pax6* を直接あるいは間接的に活性化し、最終的に眼の形成に関わる一群の遺伝子の発現をもたらすとされている。このように *otx2* は、これらの遺伝子間相互作用やカスケードの最初の段階で中心的役割を担っている。*otx2* 遺伝子は bicoid 型の転写因子 Otx2 をコードしており、転写抑制作用と活性化作用の両方をもち、*gbx2* 遺伝子を直接抑制し、*rax* 遺伝子を直接活性化することが知られている。しかし上記の遺伝子カスケードだけでは eye field が定まるメカニズムなどは十分に説明できず、新たな遺伝子の同定が必要であった。さらに遺伝子間相互作用やカスケードの分子実体を具体的に説明する転写因子レベルでの分子メカニズムの知見は乏しく、特に Otx2 とタンパク質間相互作用するパートナー転写因子の存在や、Otx2 自身もつ転写活性化と抑制作用の切り替え機構などに関しては未解析であった。本論文は、第一章において、神経板と eye field に発現する新たな遺伝子として C2H2 型 Zn フィンガー転写因子をコードする *zbtb11* と *znf668* の解析を行うことで、それらが上記の遺伝子間相互作用とカスケードに関わることを示すと共に Otx2 とタンパク質間相互作用する転写因子をコードすることを明らかにした。さらに第二章において、Otx2 の翻訳後修飾に関する解析を行うことで、Otx2 自身による転写活性化と抑制作用を切り替える分子メカニズムを初めて明らかにした。これらの研究成果は、本学位審査会で高く評価された。詳細は以下の通りである。

第一章の「眼の初期発生における *zbtb11* と *znf668* の解析」では、先行研究で同定された eye field に発現する遺伝子 *zbtb11* と *znf668* の発生に伴う発現パターンの解析をまず行った。その結果、外胚葉全体の発現が次第に神経外胚葉から eye field に限局していくことが明らかとなった。次に機能亢進実験と機能阻害実験を行い、*zbtb11* は、*otx2* と遺伝子間相互作用する *gbx2* の発現に関与し、一方 *znf668* は *otx2* 下流の *rax* の発現に関わることを示した。そこで両遺伝子がコードする Zn フィンガー転写因子が、Otx2 とのタンパク質間相互作用や機能的相互作用すること予測し、まずタンパク質間相互作用について共免疫沈降法 (Co-IP) で検討し

た結果、Zbtb11Znf668 共に Otx2 と相互作用することが示された。次に Otx2 の標的遺伝子の制御における機能的相互作用を検討するため、Otx2 の活性化あるいは抑制性シス制御モジュール (CRM) を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、Zbtb11 が Otx2 の転写抑制作用を増強する一方、Znf668 は Otx2 の転写活性化を阻害することが示された。以上より、Zbtb11 は Otx2 のパートナーとして *gbx2* の転写を抑制すること、Znf668 は Otx2 の *rax* 遺伝子の転写活性化を抑制する調節因子であることが示唆された。これらの結果から、眼の初期発生に関わる新たな遺伝子が同定され、かつ眼の初期発生で中心的な役割を果たす Otx2 の新たな制御タンパク質であることも示された。これらの成果は、眼の初期形成の分子メカニズムに重要な知見を与えるものと高く評価できる。

第二章の「Otx2 のリン酸化修飾による細胞増殖と細胞分化の制御機構の解析」では、まず Otx2 の翻訳後修飾が Cdk 依存的なリン酸化修飾であり、その部位が 3 箇所あること突き止め、さらに Akt キナーゼによってもリン酸化を受けることを見出した。次に Otx2 のリン酸化修飾の発生過程への役割を解析するために、上記 4 箇所のリン酸化部位の疑似リン酸化変異体 (4E) と非リン酸化変異体 (4A) を作成し、両者の活性を比較した。比較すべき対象としては Otx2 の関与が知られている、神経板のパターン形成、眼の初期パターン形成と形態、細胞増殖、および Otx2 の転写抑制作用と活性化作用について検討した。その結果、4E 変異体と 4A 変異体は相反する活性を示し、神経板のパターン形成では 4E 変異体により後方化を促進するが 4A にはそのような活性はなく、眼の初期パターン形成では 4E は網膜形成を阻害するが 4A は促進し、細胞増殖については 4E は促進するのに対し 4A は阻害し、それに対応して細胞増殖阻害因子の遺伝子 *p27^{xic1}* を 4E は阻害するのに対し 4A は阻害しないことが明らかとなった。さらに Otx2 の転写活性化と抑制活性については、4E は主として抑制活性を示したのに対し、逆に 4A は転写活性化作用を示した。このように Otx2 はリン酸化修飾状態により、反対の活性をもつことが示唆された。特に、Otx2 が Cdk 活性依存的なリン酸化を受けると、細胞増殖阻害因子の遺伝子を抑制し、それにより Cdk がさらに活性化するという、正のフィードバック機構を示唆している点は非常に興味深い。さらに、第一章で明らかになった Zbtb11 と Otx2 のタンパク質間相互作用と機能的相互作用が 4A ではなく 4E で認められたことから、Zbtb11 はリン酸化型 Otx2 のパートナーであることが強く示唆された。このように、これまで不明であった Otx2 の転写抑制と活性化作用の切替機構に、リン酸化修飾に関わることが初めて明らかになった。*otx2* 遺伝子は発見されてから 20 年以上経ち、その間多くの研究者により精力的に研究されてきたにも関わらず、翻訳後修飾修飾についての解析はこれまで全く行われておらず、本論文により初めて明らかにされたもので、ことは極めて重要な発見であると審査会で高く評価された。本章で述べられている研究成果の大部分は、発生生物学の一流国際誌である *Development* に受諾され、まもなく出版される予定である。

なお、本論文に記載されている解析は全て論文提出者が主体となって分析および検証を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める