

## 論文内容の要旨

申請者氏名 川口 茜

エピジェネティックな遺伝子制御の中でも、ヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) のメチル化及び脱メチル化は、それぞれ転写の抑制と活性化に作用し、そのメチル化因子として Ezh2 が、脱メチル化因子として Jmjd3 及び Utx が報告されている。申請者は、脊椎動物の発生や再生におけるこれらの役割を解明するため、ツメガエルを用いて発現と機能の解析をおこなった。まず、2 倍体ゲノムを有するネッタイツメガエルの *ezh2* と *jmd3*、*utx* の各 cDNA を単離した。それらの発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により調べたところ、いずれも発生初期の胞胚では外胚葉で強く、原腸陥入に伴って神経板とその辺縁部のプラコード外胚葉や神経堤、及び神経板を裏打ちする中軸中胚葉で発現し、その後は眼や脳、脊髄等において発現し続けた。また、これら 3 つの遺伝子は、オタマジャクシの尾部を切断した後に形成される未分化細胞塊 (再生芽) と、そこから伸長する再生脊髄でも良く似た発現パターンを示した。転写の抑制と活性化という、拮抗する機能を持つにもかかわらず、良く似た発現を示すことから、これらは異なる標的遺伝子を同時に制御することにより遺伝子発現の切り替えに働いていると考えられる。一方、4 倍体ゲノムを有するアフリカツメガエルから *jmd3* のパラログペア (*jmd3.a* と *jmd3.b*) を単離して発現を調べたところ、神経胚期において *jmd3.a* は神経板辺縁部に強く、*jmd3.b* は神経板と中軸中胚葉に強く発現していた。両者の発現を合わせるとネッタイツメガエルの *jmd3* の発現をほぼ再現することから、アフリカツメガエルではゲノム倍化によって生じた 2 つの *jmd3* 遺伝子の間に機能分担が起きたと考えられる。

次に、アンチセンスモルフォリノオリゴ法により、ネッタイツメガエルの *jmd3* の発現を阻害すると、原腸陥入が阻害された。同様な表現型は、アフリカツメガエル胚で *jmd3.b* の発現を阻害したときにも見られた。これに対して、同じアフリカツメガエルで *jmd3.a* の発現を阻害した場合は、原腸陥入に異常はなく、代わりにレンズの形成不全を伴う小眼の表現型が見られた。この表現型に注目して眼形成遺伝子の発現を調べたところ、神経板期の予定網膜領域における *rx* や *pax6*、プラコード外胚葉全体での *dlx5* の発現に顕著な変化はなかったが、プラコード外胚葉内部の予定レンズ領域における *pax6* および *six3* の発現が消失していた。さらに予定レンズ割球を狙ったモルフォリノオリゴ注入実験においても、*pax6* の発現が消失したことから、Jmjd3 の活性が *pax6* や *six3* の発現に直接必要なことが示唆された。そこで、エピトープタグ付きの Jmjd3 を神経胚に発現させてクロマチン免疫沈降実験をおこなったところ、Jmjd3 が *pax6* プロモーターに結合することがわかった。以上の結果から、*jmd3* は *pax6* を直接制御して、プラコード外胚葉内での予定レンズ領域の形成に働く遺伝子であり、レンズ形成を支配する遺伝子カスケードの最上位に位置すると考えられる。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 川口 茜

H3K27 メチル化制御因子群については、これまで主に培養細胞を用いた研究により、クロマチン構造の制御を介して組織特異的な遺伝子発現を調節することが明らかにされている。しかしながら、個体レベルの研究に関しては、発現様式についてすら未だ知見が乏しく、またいずれの遺伝子破壊マウスも発生の極めて初期に致死になってしまいうことから、特に器官形成や組織再生における役割に関してあまりわかっていなかった。

この問題に対して、申請者はツメガエルをモデル動物に用いてアプローチし、まずメチル化因子の遺伝子 $ezh2$ と、脱メチル化因子の遺伝子 $jmjd3$ と $utx$ について、発生及び幼生尾部の再生過程における発現様式を解析した。その結果、これら3つの遺伝子が胚期に体軸形成の要となるシュペーマンオーガナイザーで発現し、その後は脳脊髄や眼等の感覚器で発現し続けること、再生尾部においては再生芽と再生脊髄で発現することを発見した。これらの知見は、遺伝子破壊マウスが発生初期に致死になる原因を示唆すると共に、発生後期の器官形成や再生における重要な役割を示唆するものである。また、拮抗するはずのメチル化因子と脱メチル化因子が同じ組織で発現するのは、遺伝子発現の切り替えに関する新たな機構を示唆するものとして興味深い。

次に申請者は、特に  $jmjd3$  の発現について、2倍体ゲノムをもつネッタイツメガエルだけでなく、4倍体ゲノムをもつアフリカツメガエルにおいても調べ、アフリカツメガエルの  $jmjd3$  パラログの間で機能分担が起きていることを見出した。この機能分担を利用して、感覚器原基（プラコード外胚葉）特異的に  $jmjd3$  の発現を阻害し、 $jmjd3$  がレンズ形成に必要なことを明らかにした。アフリカツメガエルのパラログ間で発現様式が異なることはこれまでも報告があるが、その違いに注目してエピジェネティック因子の組織特異的な役割の解明に成功したのは、本研究が初めてである。

さらに申請者は、レンズ形成における  $jmjd3$  の作用機序を解析し、Jmjd3 蛋白質が  $pax6$  遺伝子のプロモーターに結合すること、その発現に必要なことを発見した。 $pax6$  はレンズ形成を制御する遺伝子カスケードの最上位とされてきた遺伝子であり、本研究はそのようなマスター制御因子の発現を H3K27 メチル化制御因子が担うことを初めて示すものである。

以上のように本論文は、脊椎動物の発生再生における H3K27 メチル化制御因子群の詳細な発現を調べ、眼形成における最上位遺伝子としての重要な役割を解明したもので、学術上、応用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。