

# 論文内容の要旨

申請者氏名 木田 泰之

脊椎動物の四肢は、その原基となる肢芽領域から発生する。肢芽領域から発生した四肢は体幹部から手先へと向かう遠近軸、体軸に沿った前後軸、背腹軸の3方向に正確に発達する。そのうち遠近軸に沿った肢芽発生は、その最も先端に存在する上皮、AER (Apical ectodermal ridge) からのオーガナイジングシグナルにより制御されていると考えられている。AER 自身は、直下の間充織からの AEMF (apical ectodermal maintenance factor) により形成、維持されている。節足動物であるハエの脚は、遠近軸に沿って的確な節で分けられている。申請者は、遠近軸中間領域のみの欠損というユニークな表現型を示す Dachshund (Dac) に着目し、そのニワトリ相同分子 Dach1 を単離した。Dach1 は、肢芽発生の初期段階から強く間充織に発現していた。核蛋白である Dach1 の発現様式は Bmp-4 の発現様式の近傍、またハエにおいて Dac は Bmp-4 の相同分子である Dpp の発現領域の近傍に見られる。このことから BMP シグナルに対する Dach1 の関与が推測され、免疫沈降法、BMP シグナル標的遺伝子である Xvent2 の転写制御領域を用いたレポーターアッセイにより、Dach1 が BMP シグナルを抑制することを見出した。その分子機構は、Dach1 が BMP シグナル下流転写因子である Smad1 と結合し、mSin3A, HDAC1 などのコリプレッサー複合体をリクルートし、Smad を介する BMP シグナル標的遺伝子の転写活性を抑制することであった。

Dach1 機能欠失型を肢芽領域に強制発現させた場合、間充織において Fgf-10、Wnt-5a などの発現低下がみられ、その結果 AER 形成不全が認められ、完全な四肢遠位領域の欠損が起こった。このことは、Dach1 が、古くから予想されてきた AEMF の一つであることを示唆している。

近位部領域に、BMP ビーズ移植を行うと、近位部決定因子 Meis-2 の発現低下が見られた。その分子メカニズムの解明のため、VP16 転写活性化ドメインを融合させた Dach1 (VP16=Dach1) を間充織に強制発現したところ、Meis-2 の発現上昇が見られた。また、Dach1 機能欠失型を間充織に強制発現させ、その部位に BMP ビーズを移植すると、BMP による Meis-2 の発現低下が、Dach1 機能欠失型によりキャンセルされた。さらに、MEIS ゲノム転写制御領域を用いたレポーターアッセイを行うと、その活性は BMP により抑制され、VP16=Dach1 で強く活性化され、Dach1 機能欠失型により BMP の Meis-2 抑制はキャンセルされた。

以上より、四肢遠近軸形成は遠位部からの BMP シグナルを Dach1 が抑制することで、AER の形成を維持し、また、Dach1 が近位部での Meis-2 の発現を、Dach1/Smad1/mSin3A/HDAC1 複合体を介して抑制することにより、反一遠位部領域を決定していることが明らかとなった。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 木田 泰之

脊椎動物の四肢は、肢芽領域から発生し、体幹部から手先へと向かう遠近軸、体軸に沿った前後軸、背腹軸の3方向に正確に発達する。遠近軸に沿った肢芽発生は、先端に存在する AER (Apical ectodermal ridge) からのオーガナイジングシグナル Bmp-4 により制御されていると考えられている。また AER 自身は、直下の間充織からの AEMF (apicalectodermal maintenance factor) により形成、維持されていると考えられているが、その実態と機能はまだ明らかになっていない。

申請者は、遠近軸中間領域のみの欠損というハエのユニークな表現型を示す Dachshund (Dac) に着目し、そのニワトリ相同分子 Dach1 の肢芽形成過程における機能解析を発生生物学・分子生物学・細胞生物学的手法を用いて解明している。免疫沈降法、BMP シグナル標的遺伝子である Xvent2 の転写制御領域を用いたレポーターアッセイにより、Dach1 が BMP シグナルを抑制することを見出している。Dach1 は、BMP シグナル下流転写因子である Smad1 と結合し、mSin3A, HDAC1 などのコリプレッサー複合体をリクルートし、Smad を介する BMP シグナル標的遺伝子の転写活性を抑制する。Dach1 機能欠失型を肢芽領域に強制発現させた場合、間充織において Fgf-10、Wnt-5a などの発現低下がみられ、その結果 AER 形成不全が認められ、完全な四肢遠位領域の欠損が起きたことから、Dach1 が、古くから予想されてきた AEMF の一つであることを明らかにした。Dach1 は AER 自身にも発現することを考え合わせると、今回の結果は同時に、AER 自身において AER を維持するという新しい概念を生み出した。

近位部領域に、BMP ビーズ移植を行い、近位部決定因子 Meis-2 の発現低下をみている。その分子メカニズムはどのようなものであろうか。その解明のため、VP16 転写活性化ドメインを融合させた Dach1 (VP16=Dach1) を間充織に強制発現したところ、Meis-2 の発現上昇が見られた。また、Dach1 機能欠失型を間充織に強制発現させ、その部位に BMP ビーズを移植すると、BMP による Meis-2 の発現低下が、Dach1 機能欠失型によりキャンセルされた。さらに、MEIS ゲノム転写制御領域を用いたレポーターアッセイを行うと、その活性は BMP により抑制され、VP16=Dach1 で強く活性化され、Dach1 機能欠失型により BMP の Meis-2 抑制はキャンセルされた。

四肢遠近軸形成は、Dach1 が遠位部からの BMP シグナルを抑制して AER の形成を維持し、また近位部では Meis-2 の発現を Dach1/Smad1/mSin3A/HDAC1 複合体を介して抑制し、反一遠位部領域を決定していることを明らかにした。

以上のように、本論文は四肢形成の分子機構を Dach1 の機能解析を中心に明らかにしたもので、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。