

氏名（本籍）	小野 廣記 （ 福島県 ）		
学位の種類	博 士（ 理学 ）		
学位記番号	博 甲 第 6902 号		
学位授与年月日	平成26年 3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	A Novel N-terminal Motif is Responsible for the Evolution of Neural Crest-Specific Gene-Regulatory Activity in Vertebrate FoxD3 (脊椎動物における FoxD3 タンパク質の N 末モチーフの進化と神経堤細胞誘導能力の獲得)		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	和田 洋
副査	筑波大学教授	理学博士	齊藤 康典
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	本多 正尚
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	笹倉 靖徳

論 文 の 要 旨

神経堤細胞は脊椎動物を特徴付ける形質のひとつであり、胚発生時に神経板と非神経外胚葉の境界(神経板境界)に位置する上皮組織が神経管形成時に脱上皮化して遊走したものである。遊走した神経堤細胞は頭部骨格組織をはじめとする様々な組織や器官へ分化するため、脊椎動物の体制、特に発達した頭部の進化において神経堤細胞の獲得は重要なステップであったと考えられる。神経堤細胞は、神経板境界で発現する **Neural plate border specifiers** と呼ばれる転写因子群と、脱上皮化した神経堤細胞や遊走中の神経堤細胞で発現する **Neural crest specifiers** と呼ばれる転写因子群によって誘導される。

神経堤細胞の誘導に関わる転写因子は脊椎動物において新たに獲得された転写因子ではなく、相同な転写因子はほとんどの動物に存在している。脊椎動物と原索動物の胚発生の比較から、脊椎動物の神経堤細胞誘導において **Neural plate border specifiers** として機能する転写因子と相同な転写因子が原索動物のホヤやナメクジウオの神経板境界において発現しているが、**Neural crest specifiers** に含まれる転写因子と相同な転写因子のほとんどはホヤやナメクジウオの神経板境界では発現していないことが明らかになっている。そのため、脊椎動物が神経堤細胞を獲得した分子的背景として、**Neural crest specifiers** に含まれる転写因子が新たに神経板境界で発現するようになったことが重要であることが示唆されている。しかし、遺伝子発現場所の変化と同様に遺伝子発現調節に変化を与える、転写因子のタンパク質自体の変化については知見が得られていない。

本研究で注目している **FoxD3** も **Neural crest specifiers** に含まれている神経堤細胞の誘導において重要な転写因子のひとつであり、ニワトリの神経管で強制発現させると過剰な神経堤細胞を誘導することが出来る。これまで脊椎動物における他の **FoxD** グループの転写因子である **FoxD1**、**FoxD2**、**FoxD4**、**FoxD5** や、さらにナメクジウオにおいて脊椎動物の **FoxD** グループと相同な **FoxD** の発現の比較から、**FoxD3** のみが神経板境界で発現していることが明らかとなっている。そのため、本研究では神経堤細胞の進化の研究において知見が無かった転写因子のタンパク質の変化と新規の誘導能獲得について、**FoxD3** に注目して転写因子のタンパク質自体の変化が、神経堤細胞を誘導するという機能の獲得に関わっているかどうかを調べた。

はじめに **FoxD** グループの転写因子やナメクジウオの **FoxD** をニワトリの神経管において強制発現し、神経堤細胞の誘導能力を比較した。その結果、脊椎動物の **FoxD1**、**FoxD2**、**FoxD4**、**FoxD5**、さらにナメクジウオの **FoxD** は過剰な神経堤細胞を誘導することができず、脊椎動物の **FoxD3** のみが過剰な神経堤細胞を

誘導する能力があることが明らかとなった。この結果は、FoxD3 の神経堤細胞誘導能力は、単に遺伝子発現場所の変化によって獲得されたものではなく、転写因子の Neo-functionalization を経て神経堤細胞を誘導するようになった事が示唆された。

さらに、FoxD3 タンパク質の神経堤細胞誘に重要なタンパク質の領域を特定するために、ゼブラフィッシュの FoxD3 とナメクジウオの FoxD のドメインスワッピングにより、キメラ DNA を作成し、神経堤細胞の誘導能力を調べた。その結果、ナメクジウオ FoxD の N 末領域の 40 アミノ酸をゼブラフィッシュ FoxD3 の 39 アミノ酸と入れ替えたキメラタンパク質(DA-A-A とする。D=Danio/ゼブラフィッシュ、A=Amphioxus/ナメクジウオ)が神経堤細胞を誘導する能力をもつことがわかった。脊椎動物の種間で比較的保存性が高い FoxD3 の N 末の約 40 アミノ酸の領域が神経堤細胞の誘導するために重要なドメインであることが示唆された。

これまで、形態進化をもたらす重要な分子的背景として、転写因子をコードする遺伝子のシス-調節領域の変化に注目が集まっており、形態進化に寄与するいくつもの例が示されている。一方転写因子のタンパク質自体の変化は、遺伝子発現の時間的・空間的な発現を変化させるシス-調節領域の変化と比べて、胚発生に与える悪影響が大きいと考えられ、それほど注目されていなかった。しかし、転写因子のタンパク質の変化は、協調的にはたらく他の転写因子との相互作用や自身の転写活性の変化を通して、遺伝子発現調節に変化を与え、形態進化に貢献することが明らかになってきている。

本研究で明らかとなった FoxD3 の新規の機能獲得は、脊椎動物における神経堤細胞進化の研究において、タンパク質の変化が重要であったことを示す最初の報告である。さらに、FoxD3 の神経堤細胞を誘導する能力が転写因子の主な機能ドメインである DNA 結合ドメイン以外の領域によってもたらされていることも興味深い。DNA 結合ドメイン以外の転写因子の領域は他の協調的にはたらく因子との相互作用の変化や自身の転写活性を変化させるドメインであると考えられているため FoxD3 による神経堤細胞の誘導には他の転写因子やコファクターが関与している可能性がある。

脊椎動物で Neural crest specifiers として機能する転写因子群は相互の発現調節をするなど、神経堤細胞は複雑な遺伝子調節ネットワークによって誘導され、さらに原索動物のホヤやナメクジウオの関連遺伝子のほとんどが神経板境界とは異なる組織で発現していることから、神経堤細胞を誘導する遺伝子調節ネットワークは、複数の遺伝子が神経板境界で新たに発現して新規に構築されたネットワークであると考えられている。そのため、FoxD3 のタンパク質の変化は神経板境界で新たに発現するようになった他の転写因子との相互作用や転写活性を変化させ、脊椎動物を特徴づける重要な形質である神経堤細胞を誘導する遺伝子制御ネットワークの進化に重要であったと考えられる。

審 査 の 要 旨

神経堤細胞は、脊椎動物で新たに獲得された細胞であり、脊椎動物の頭部の進化に深く結びついている。この神経堤細胞の進化的な起源は、脊椎動物の進化において重要な課題の 1 つである。本研究は、その形態的な特徴の進化を、DNA レベルの遺伝子進化に結びつけた成果として、高く評価された。また、この成果は、転写因子の進化と形態進化を結びつける中で、常にシス調節配列の進化に比重が置かれてきた現状に一石を投じ、タンパク質としての転写因子の進化にも目を向ける必要性を提示するもので、進化発生学において一般性の高いメッセージも含んでいると評価された。

平成26年1月30日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。