

すずき あゆむ

氏名（本籍地）	鈴木 歩
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第 219 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 27 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論文題目	核内 FGF8:FGF8 のあらたな作用機構の可能性
博士論文審査委員	（主査） 教授 仲村 春和 教授 田村 宏治 教授 小椋 利彦

論文内容の要旨

高等脊椎動物の脳は非常に複雑な構造を持ち高次脳機能を営むが、その発生を辿ると一本の神経管にたどり着く。神経管の前方部に前脳胞、中脳胞、菱脳胞という3つの脳胞（一次脳胞）が形成され、さらに前脳胞が終脳胞と間脳胞に、菱脳胞は後脳胞と髄脳胞に細分化され、5つの脳胞（2次脳胞）に領域化される。

脳の領域は、その領域で発現する転写因子の組み合わせで決定するが、二次的オーガナイザーが領域の境界に形成され、転写因子の発現を制御するシグナルセンターとして働く。これまでの移植実験から中脳と後脳の境界部（峽部）はオーガナイザーとして働き、中脳胞の背側を視蓋に、後脳胞の背側を小脳に分化させることが明らかとなっている。その分子の実体は FGF8 である。特に小脳分化には FGF8 による Ras-ERK 経路の活性化が必要であること、正常な中脳/後脳境界形成には Ras/ERK 経路の負の調節因子 *sprouty2* などによるこの経路の厳密な調節が必要である。

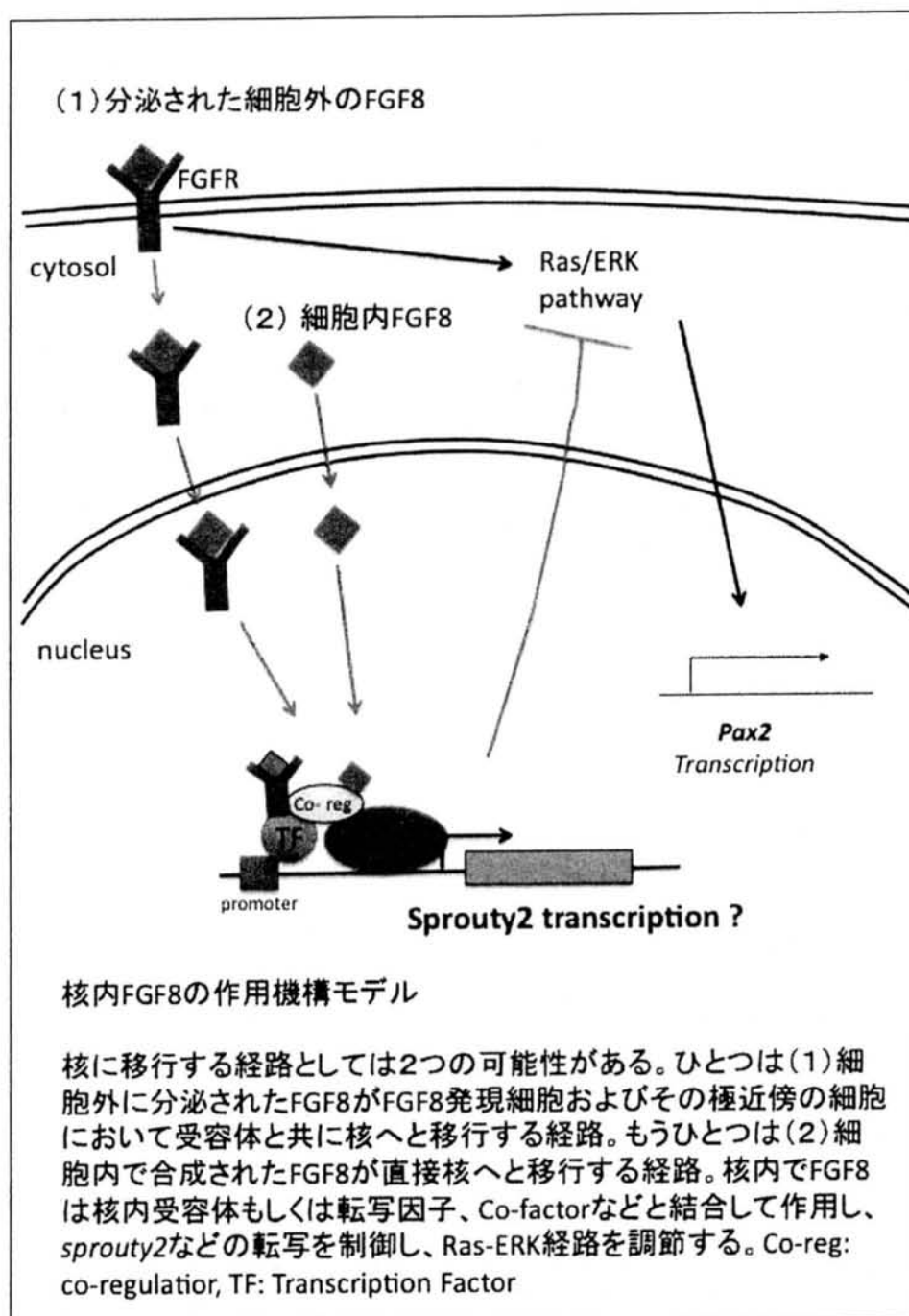
一般的に FGF8 は細胞膜上の受容体を介して Ras-ERK 経路をはじめとした細胞内シグナル伝達経路を活性化させて下流の遺伝子を制御すると考えられている。しかしながら FGF8 の下流で誘導される遺伝子の発現をみると、FGF8 発現細胞の周りで ERK の活性化域に誘導されるもの（*Pax2* など）と、FGF8 発現細胞と一致して誘導されるもの（*sprouty2* など）があり、その作用は一元的には説明できないと思ったのが、本研究を開始した動機である。

そこで文献を調べると、脊椎動物で 20 種類以上存在する FGF のメンバーでは FGF1, FGF2, FGF3, FGF10 など核の中に局在することがわかった。これらは受容体に結合して細胞内のシグナル伝達経路を活性化させる機能のほかに、核に移行し遺伝子発現の制御などに関わっているのではないかと考えられている。

そこで本研究では FGF8 に核内作用機構が存在するのかどうかまず明らかにすることにした。峽部で主に機能している FGF8b アイソフォームを NIH3T3 培養細胞にトランスフェクトすると、大部分の細胞では FGF8b は細胞質に局在したが、細胞質の他に核にも移行している細胞が存在した。また *in ovo* electroporation 法によりニワトリ胚神経管に FGF8b を導入した場合でも、FGF8b の核内局在が見られた。通常の免疫組織化学法では内在性の FGF8 の核内局在は検出できなかったが、検出感度を上げることで、マウス胚 E9.5 峽部で内在性 FGF8 の核局在を検出した。次に核へと至る経路を探るために、FGF8b タンパク質をしみ込ませたビーズを峽部近傍の間充織に移植したところ、ビーズ周囲の間充織細胞および峽部の神経上皮細胞で FGF8b の核移行が見られた。また中脳後脳領域への強制発現実験で、FGF8b 非導入領域において FGF8 の核移行が認められた。これらの結果は FGF8 が分泌されて、その後核へと移行したことを示唆している。また培養 NIH3T3 細胞に FGF8 を加えると FGF8 の核移行が認められたが、FGFR 阻害剤を用いたところこの核移行が阻害されたことから FGF8 の核移行には FGFR も関与していることが示唆された。一方でシグナルペプチドを欠失させた非分泌型フォームの FGF8b (dspFGF8b-HA) を NIH3T3 細胞及びニワトリ胚中脳胞にトランスフェクトすると、細胞質よりも核に優位に局在した。更にこのとき中脳胞では

sprouty2 が誘導されたが、ERK は活性化されていなかった。また *dspFGF8b* は Pax2 を誘導することはなかった。

本研究によって FGF8 は核に移行して機能しうることがわかった。FGF8 は受容体を介して細胞内のシグナルカスケードを活性化させるだけでなく、核に移行して *sprouty2* などの遺伝子発現の制御に関与する可能性を示唆している。



FGF8 (fibroblast growthfactor 8) はその名の示す通り、分泌因子として細胞膜上の受容体に結合し、細胞内シグナル伝達経路を活性化することにより細胞増殖、細胞分化、細胞移動など多彩な機能を司る。中枢神経系の発生過程で、FGF8 は中脳後脳境界部（峡部）に発現し、視蓋や小脳を誘導するオーガナイザー分子として働く。FGF8 による Ras-ERK 経路が活性化されるとことにより小脳が誘導されるが、正常発生においては Ras-ERK 経路の活性化は厳密な制御が要求され、FGF8 により Sprouty2, Sef, MKP3 などこの経路の負の制御因子の発現も誘導される。これまで Sprouty2 は Ras-ERK 経路の下流で誘導されると考えられてきた。一方、峡部では FGF8 が分泌タンパク質であることを反映して ERK は FGF8 の mRNA の発現よりも広い範囲で活性化されている。しかし、Sprouty2 の発現は ERK の活性化域とは一致せずに FGF8 の mRNA の発現と一致している。FGF ファミリーの中には核内に局在し転写を調節するものがあることから、FGF8 も核内因子として Sprouty2 の発現制御に関わっている可能性があるのではないかということから本研究は開始された。培養細胞、ニワトリ胚に FGF8 をトランスフェクトしたところ、FGF8 の核内局在がみられた。峡部での内在性の FGF8 の核内局在は通常の免疫組織化学法では検出できなかったが、反応産物を増幅することにより確認された。シグナルペプチド欠失型 FGF8 は大部分が核内に移行したが、この変異型 FGF8 は ERK を活性化することなく Sprouty2 の発現を誘導することができた。これまで分泌因子として働くと考えられてきた FGF8 が核内因子として、転写の調節に関与していることを示したもので生物学的に大きな意義をもつ研究である。学位申請者の論文は申請者が自立して研究活動を行うに必要な能力・学識を有していることを示しており、博士（生命科学）論文として合格と認める。