

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

氏 名 山本 詩織

論 文 題 目

Hox及びその標的遺伝子による
位置固有な四肢骨分化機構の解明

論文審査担当者

主 査

名古屋大学大学院理学研究科 教授 理学博士
本 間 道 夫

委 員

名古屋大学大学院理学研究科 教授 博士(医学)
木 下 専

委 員

名古屋大学大学院理学研究科 教授 博士(医学)
日 比 正 彦

論文審査の結果の要旨

四足動物の自由肢は、遠近軸に沿って柱脚、軛脚、自脚(手首・掌・指)の形態的かつ機能的に特徴的な領域を持ち、その原基である肢芽の協調的な成長と骨形態形成を経て形成される。自脚は五本の指を持つという特徴を持ち、これは四足動物の多様化を可能にする重要な基盤の一つとなっている。*Hox* 遺伝子クラスターの構成遺伝子である *Hox13*(*Hoxa13* と *Hoxd13*)は、自脚形態形成を制御する最上位遺伝子として知られている。しかし転写調節因子として機能する HOX の直接の制御下にあり位置固有な形態形成を実現化する遺伝子群の実体や、HOX による転写調節機構については未解明であった。申請者はこの課題に対して、肢芽で HOX 転写因子が結合している DNA の領域を次世代シーケンサーにより網羅的に同定する Chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-Seq)解析と、*Hox* 変異を持つ肢芽で発現変動を示す遺伝子を網羅的に同定するマイクロアレイ解析を用いて取り組んだ。

申請者はまず、それぞれ軛脚と自脚で発現して発現領域での軟骨形成の位置特性を決定する HOXA11 と HOXA13 に対する特異抗体を用いて ChIP-Seq を行い、マウス E11.5 肢芽においてそれぞれが結合している染色体領域を同定した。その結果、HOXA11 が軛脚で結合している領域のほとんどは HOXA13 が自脚で結合している領域に含まれ、HOXA11 と HOXA13 が共通した標的配列 (CHBRL: Common Hox binding region in limb bud)に結合していることが明らかになった。CHBRL には多くの場合、進化的に良く保存された複数の HOX 転写因子結合配列が見いだされた。典型的な CHBRL を用いた *in vitro* での実験から、これらには直接 HOX 転写因子が結合しうることが明らかとなり、複数および複数種の HOX やホメオドメイン転写因子が肢芽で CHBRL に結合していることを予測させる結果が得られた。ホメオドメイン転写因子であり、四肢骨形成に関わることが知られている PITX1 および SHOX2 も、既報情報の申請者による解析により CHBRL に結合することが判明し、四肢骨形成における HOX およびホメオドメイン転写因子群の標的を共有した直接で協調的な制御機構の存在を明らかにした。

さらに申請者は、CHBRL 近傍に存在し *Hox13* 変異胚肢芽で発現変動を示す遺伝子を HOX の直接標的遺伝子として同定したところ、*Hox13* 変異肢芽で発現が上昇する遺伝子として軟骨分化に必要な転写因子をコードするものが多いことを見いだした。これらの転写因子は、E10.5 および E11.5 の軛脚では *Hoxa11* と共発現しているが、E11.5 自脚では発現していない。しかし自脚軟骨形成が視覚化できる E12.5 においてはこれらの転写因子群発現は軟骨において観察されるようになる。一方で、*Hox13* 変異自脚で発現が低下する転写因子として BCL11a を見だし、BCL11a には軟骨分化を抑制する機能があることを示した。このようなことから、正常発生においては HOX13 には正、負両面から軟骨形成を一時的に抑制しておく機能があることが示された。自脚原基は5本の指を形成するために必要な細胞数と形態を提供するために拡張して団扇型構造をとるが、これは予定自脚領域において細胞増殖を正に制御する *Fgf10* と *Shh* が *Hox13* により自脚固有の発現制御を受けることに起因することが知られている。申請者は *Hox13* がこの自脚原基の拡張期に、五本の指形成に必要な細胞量が確保されるまで軟骨分化を留保させるという、他の肢芽領域で発現する *Hox* と比較して特異的な機能を発揮しているというモデルを提示した。このようにして四足動物の *Hox13* は、魚類のヒレから自脚に五本の指を持つ四肢へと進化する過程において重要な役割を獲得したとの推測が得られるに至った。以上の理由により、申請者は博士(理学)の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。