

氏名	ニシ タ ジュン コ 西 田 純 子
学位の種類	博士 (医学)
学位授与の番号	乙第 2691 号
学位授与の日付	平成 23 年 9 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当 (博士の学位論文提出者)
学位論文題目	Detection of isoform-specific fibroblast growth factor receptors by whole-mount in situ hybridization in early chick embryos (ニワトリ胚における線維芽細胞増殖因子受容体アイソフォーム群に対する特異的リボプローブの開発とそれらを用いた網羅的遺伝子発現解析)
主論文公表誌	Developmental Dynamics 第 240 巻 第 6 号 1537-1547 頁 2011 年
論文審査委員	(主査) 教授 大澤真木子 (副査) 教授 江崎 太一, 泉二登志子

論文内容の要旨

〔目的〕

線維芽細胞増殖因子 (FGF) は、現在までに 23 種類が確認されており、巨大な FGF ファミリーを形成している。一方 FGF レセプター (FGFR) は FGFR1~4 まであり、FGFR1~3 には b タイプ、c タイプの 2 種類ずつのアイソフォームが存在し、これまでに合計 7 種類の FGFR が報告されている。これらリガンドとレセプターの組合せにより FGF シグナルは厳密に制御され、胚発生における細胞の増殖や分化を担っている。従って、胚形成過程での各 FGFR アイソフォームの遺伝子発現分布を解析することは、胚形成における FGF シグナルの役割を理解する上で重要な手がかりになると考えられた。本研究は、各 FGFR アイソフォーム群に対する特異的リボプローブを開発し、全胚 in situ ハイブリダイゼーション法 (WISH 法) により同群の網羅的遺伝子発現パターンの解析を行うことを目的とした。

〔方法〕

①FGFR アイソフォーム群のクローニング：各 FGFR アイソフォームはそれぞれ選択的スプライシングにより生じる。そこで、選択的スプライシング領域のみを増幅させる PCR プライマーを作成した。この PCR プライマーを用いて、選択的スプライシング領域のみをニワトリ胚の cDNA ライブラリーよりクローニングした。②各 FGFR アイソフォームに対するリボプローブの特異性の検討：方法①において得られた DNA 断片を鋳型とし、DIG 標識した FGFR アイソフォームのリボプローブを作製した。次に、作製された各リボプローブ特異性をドットプロットハイブリダイゼーション法 (DBH 法) によって検討した。③WISH 法による FGFR アイソフォーム群の網羅的遺伝子発現パターン解析：方法②に記述した各 FGFR アイソフォームに特異的リボプローブの 6 種類と、FGFR1~3 の b および c タイプ両方を認識する generic リボプローブの 3 種類、合計 9 種類を用いて、発生ステージ 7~13 のニワトリ胚に対し、WISH 法により標的遺伝子発現の検出を行った。

〔結果〕

①FGFR1~3 のアイソフォーム b およびアイソフォーム c、6 種類すべての FGFR アイソフォームの選択的スプライシング領域を単離した。②これら単離された FGFR アイソフォームの塩基配列は互いに高い相同性を示した (例：FGFR1b と FGFR2b は相同性 76%，FGFR1c と FGFR2c は相同性 82%)。このような高い相同性にもかかわらず、DBH 法の結果では、本研究で使用された各 FGFR アイソフォームのリボプローブは、ターゲットの塩基配列に対して非常に優れた特異的結合能を示し、有意な非特異的結合は認められなかった。③WISH 法により、発生ステージ 7~13 のニワトリ胚における各 FGFR アイソフォーム群の発現パターンが明らかにされた。

〔考察〕

WISH 法の結果は、本研究で開発されたりボプローブが特異的にターゲットを認識することを示している。

FGFR2 を一例として挙げると、発生ステージ9の胚において、FGFR2b リボプローブは中脳-後脳予定領域にのみ限局した発現を認め、FGFR2c リボプローブでは中脳-後脳予定領域のみならず、神経管全体、頭部中胚葉そして前腸領域にシグナルを検出した。さらに FGFR1c と FGFR2c との塩基配列の相同性は 82% と非常に高いにもかかわらず、間脳や眼胞におけるこれら遺伝子の発現パターンは明確に異なっている。これらの結果から、本研究で開発されたりボプローブがそれぞれの FGFR アイソフォームの発現を特異的に認識でき得るものと考察される。

〔結論〕

本研究では、6種類すべての FGFR アイソフォーム群の選択的スプライシング領域の DNA 断片を単離した。この領域の塩基配列を基に開発されたりボプローブは WISH 法での FGFR アイソフォームの発現部位の検出に有効である。

論文審査の要旨

本研究では、初期ニワトリ胚を用いて6種類にも及ぶ FGFR アイソフォームの網羅的遺伝子発現パターンが報告されている。この研究を進める上で、著者は6種の FGFR アイソフォームそれぞれに対して、特異的に認識するリボプローブを独自の系を用いて開発しており、実際に本論文中で、これらのリボプローブが WISH 法にて、極めて効果的に機能することを示している。本研究は世界で最も注目される細胞内シグナル伝達因子の一つである FGF シグナルに対する詳細な基礎研究であると位置づけられる。また得られた研究成果は、国内外の類似の研究と比較しても、技術的レベル・知見の重要度は高く、今後の一層の研究の展開が期待される。さらに、本研究で得られた基礎的知見と FGFR ノックアウトマウスの機能的解析から得られる研究成果をまとめることで、胚発生における FGF シグナルの役割の全体像が明らかになると期待される。

これらの点で本論文は価値がある。

15

氏名	廣井敦子
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第2692号
学位授与の日付	平成23年9月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	Roles of fukutin, the gene responsible for Fukuyama-type congenital muscular dystrophy, in neurons: possible involvement in synaptic function and neuronal migration (福山型先天性筋ジストロフィー原因遺伝子 fukutin の神経細胞における役割: シナプス機能と遊走への関与)
主論文公表誌	Acta Histochem Cytochem 第44巻 第2号 91-101頁 2011年
論文審査委員	(主査) 教授 柴田 亮行 (副査) 教授 江崎 太一, 石郷岡 純

論文内容の要旨

〔目的〕

福山型先天性筋ジストロフィー (Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: FCMD) は、中枢神経や眼の形成異常を伴う遺伝性疾患で、原因遺伝子はフクチンである。FCMDの病態には、細胞外蛋白質である α -ジストログリカン (dystroglycan: DG) の糖鎖修飾低下による基底膜の脆弱性が深く関与し、フクチンは α -DGの糖