



The medaka FoxP2, a homologue of human language gene FOXP2, has a diverged structure and function

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 板倉, 達郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/375

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 507号	学位授与年月日	平成20年 3月17日
氏 名	板 倉 達 郎		
論文題目	<p>The medaka FoxP2, a homologue of human language gene FOXP2, has a diverged structure and function (ヒト言語遺伝子 FOXP2 のホモログであるメダカ FoxP2 は、ヒトと異なる構造と機能を有する)</p>		

博士(医学) 板 倉 達 郎

論文題目

The medaka FoxP2, a homologue of human language gene FOXP2, has a diverged structure and function
(ヒト言語遺伝子FOXP2のホモログであるメダカFoxP2は、ヒトと異なる構造と機能を有する)

論 文 の 内 容 の 要 旨

[はじめに]

FOX遺伝子はフォークヘッドドメインを有する転写因子で発生においていろいろな役割を持つ。そのメンバーの一つであるFOXP2は最近の研究において、人の言語発達に非常に重要であることがわかっているが、言語発達においての分子的功能はほとんどわかっていない。その機能を知るひとつのアプローチとして、魚類であるメダカのFoxP2遺伝子を単離し、ヒトやマウスと比較した。

[材料ならびに方法]

メダカFoxP2cDNAを単離し、塩基配列をヒト、マウスと比較した。次に、抗メダカFoxP2抗体を作成しFoxP2の発現を調べた。また、マウスにおいてFoxp2により発現が抑制されるとされる、肺クララ細胞蛋白CC10遺伝子のプロモーターを使いルシフェラーゼアッセイによりマウスとメダカのFoxP2の機能の差を測定した。さらに、マウスとメダカのキメラ蛋白を作成しCC10プロモーターの活性を見ることで機能の差が生じる部位を決定した。

[結果]

cDNA単離の結果、メダカFoxP2は775アミノ酸からなると推測され、ジンクフィンガー、ロイシンジッパー、フォークヘッドドメインは保存されているものの、マウス、ヒトと比べて73%の相同性であった。配列の最も顕著な違いとして、ヒトやマウスに見られる40のグルタミンリピートがメダカでは欠失しており、N末側に16個、C末側に58個のアミノ酸が挿入されていた。

発現においては、発生初期(Somatic Stage)で、神経管全体にFoxP2発現が見られるが、発生が進むにつれて中脳などに局在する。また、発生後期においては耳石や網膜などにおいても発現の局在がみられた。成魚の脳においては、複雑な発現パターンが見られる。前脳では、中央腹側において発現がみられ、中脳では視蓋、視床、視床下部での発現が見られた。そして、小脳ではプルキンエ細胞での発現が見られた。また、松果体において強い発現が確認できた。脳以外では、網膜、消化管、脊髄での発現がみられた。

マウスにおいてFoxp2は肺クララ細胞蛋白CC10遺伝子のプロモーターに対し抑制的に働くことがわかっている。しかし、メダカFoxP2の標的遺伝子は特定されていないので、マウスCC10プロモーターを仮の標的遺伝子としてメダカFoxP2のCC10プロモーターへの転写活性を測定した結果、メダカFoxP2はCC10プロモーターに対して弱い抑制しか示さないことがわかった。次に、メダカFoxP2とマウスFoxp2をN末側、中央部、C末側に3分割し、メダカ/マウス・キメラ蛋白を作製した。この6種のキメラ蛋白のCC10プロモーターへの転写活性を検討した結果、中央部がメダカ由来のものは弱い転写抑制を示し、中央部がマウス由来のものは強い転写抑制を示すことが判明した。そこで、中央部のアミノ酸配列を比較したところ、フォークヘッドドメインにある3つのアミノ酸の違いを見出した。メダカFoxP2のこの3アミノ酸をマウス型に変えたところ、CC10プロモーターに対する転写活性は強い抑制を示した。

[考察]

メダカFoxP2は、ヒトやマウスに比べグルタミンリピートの欠損および2箇所の余分なアミノ酸配列の挿入以外、ほとんどのドメインが保存されていた。しかし、タンパク全体の相同性は73%とヒトやマウスなど陸上動物(99%相同性)に比べると低いことから、進化的圧力が地上進出時にかかったことが推測される。また、両生類であるアフリカツメカエルと哺乳類の相同性は95%と中間値を示している。

メダカFoxP2の発現においては、視蓋、視床、視床下部、網膜、プルキエン細胞などヒト、マウス、ゼブラフィッシュと類似した発現がみられたが、今回、魚類においてフォトレセプターの役割があると言われている松果体での発現がメダカで確認できたことは、ヒトやマウスの松果体との機能的違いが推測される。

またFoxP2の機能において、メダカとマウスでは唯一既知のターゲットである*CC10*プロモーターに対する抑制が異なった。しかし、それはN末側やC末側の比較的アミノ酸配列の異なっている部位ではなく、フォークヘッドドメインの3つのアミノ酸配列の違いが原因であったことで、フォークヘッドドメインの重要性が明らかになった。

[結論]

言語遺伝子といわれるFOXP2のホモログであるメダカFoxP2遺伝子を単離し解析することで他の生物との違いを明らかにした。メダカFoxP2では、ヒトFOXP2の特徴のひとつであるグルタミンリピートが欠損しているとともに、2箇所に余分なアミノ酸配列の挿入が認められた。しかし、その他のドメインでは高い保存性が見られた。また、発現は脳においては他の生物と類似していたが、メダカでは松果体での強発現が観察された。メダカFoxP2はマウスFoxp2のターゲットである*CC10*プロモーターに対し、マウスFoxp2のような強い抑制が見られなかったが、メダカのフォークヘッドドメインをマウス型にすることで強い抑制が回復した。今後、脳や言語の発達におけるFOXP2の分子的解析が言語習得メカニズムの理解や言語障害を有する疾患に重要であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

FOXタンパクはフォークヘッドボックスを持つ転写因子で多数のメンバーからなるFOXファミリーを形成し、酵母からヒトまで広範な生物に存在が知られている。FOXファミリーのタンパクは主に発生過程において様々な役割を果たしていて、その遺伝子変異による疾患も数多く知られている。メンバーの一つであるFOXP2は発達性言語協調障害の複数の家系の患者で変異が発見され、ヒトの言語発達に非常に重要であることがわかっているが、FOXP2の機能や発症の分子機構に関しては殆どわかっていない。申請者は、FOXP2の機能を探るための一つのアプローチとして、メダカの相同遺伝子FoxP2のcDNAを単離し、アミノ酸配列を推定してヒトやマウスとの構造比較を行った。さらに、抗メダカFoxP2抗体を作成して、メダカの発生過程での発現組織の分布を調べるとともに、標的遺伝子の活性制御能に関してマウスFoxp2との比較解析を行った。

申請者は、まずメダカのFoxP2のcDNAの部分塩基配列をデータベースから検索し、cDNAライブラリーのスクリーニングとRT-PCR法を組み合わせ用い、アミノ酸コード領域全長を含むcDNAをクローニングした。推定アミノ酸配列のドメイン解析から、ジンクフィンガー、ロイシンジッパー、フォークヘッドドメインは保存されていることが判明したが、ヒト、マウスとの相同性は73%と若干低かった。相同性

を下げた主な差異は、ヒト、マウスに存在するN端側のGlnリピートを欠き、逆にGlnリピートとZnフィンガーの間に16アミノ酸、C端側フォークヘッドの下流に54アミノ酸の挿入配列を持つことであった。

次に、申請者はラット抗メダカFoxP2モノクローナル抗体を作成した。それを用いて、メダカ胚でのFoxP2タンパクの発現組織分布を解析した。その結果、発生初期の体節期(Somite Stage)では、神経管全体に発現が見られた。発生段階が進むと中脳に、発生後期では耳石や網膜などにも発現が局在化していくのが見られた。成魚の脳においては、様々な部分での発現を示し、前脳では、中央腹側に、中脳では視蓋、視床、視床下部に、小脳ではプルキンエ細胞での発現が見られた。また、松果体にも強い発現が確認できた。脳以外では、網膜、消化管、脊髄での発現が認められた。

FoxP2は転写遺伝子であるため、申請者はさらに標的遺伝子に対する活性制御能の解析を試みた。マウスにおいて相同遺伝子FoxP2は肺クララ細胞で発現される。

タンパクCC10の遺伝子プロモーターに対して抑制的に作用することが報告されている。しかし、メダカFoxP2の標的遺伝子は特定されていないので、マウスCC10プロモーターを仮の標的遺伝子として、メダカFoxP2のCC10プロモーターへの転写活性を測定した。その結果、メダカFoxP2はCC10プロモーターに対しての抑制的な作用は弱いことがわかった。マウスとメダカの差異が生じる理由を追究するために、メダカFoxP2とマウスFoxp2のcDNAをそれぞれN端側、中央部、C端側に3分割し、メダカ/マウス・キメラタンパクを産生するcDNAを全6種類作製した。これらのキメラcDNAを用いたところ、CC10転写抑制能を示すためにはフォークヘッドドメインを含む中央部がマウス型であることのみが必要十分条件であった。中央部のアミノ酸配列を比較したところ、フォークヘッドドメインにある3つのアミノ酸の違いを見出した。すなわち、メダカではDSADM、マウスではESSDRであった。メダカFoxP2のこの3アミノ酸をマウス型に変えたところ、CC10プロモーターに対する転写活性は強い抑制を示した。

本研究で申請者は、メダカFoxP2タンパクの松果体での発現を初めて確認し、松果体機能が哺乳類と魚類で異なること、そのことにFoxP2が関与している可能性があることを示唆した。さらに転写因子としてのFoxP2の機能がCC10遺伝子のプロモーターに対する発現抑制効果で見える限りマウスとは異なり、その違いはフォークヘッドドメインの3つのアミノ酸配列の違いが原因であったことを示し、それによりフォークヘッドドメインの重要性を明らかにした。審査委員会では、これらの点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) メダカの脳でのFoxP2の発現は神経細胞とグリアの両方で見られたのか
- 2) FoxP2の眼と松果体での発現の意味について
- 3) FoxP2が眼の神経細胞の一部でのみ発現が見られることにはどういう意味が考えられるか
- 4) FoxP2の標的遺伝子をスクリーニングする方法について
- 5) FoxP2と相互作用するタンパク質に関して
- 6) CC10プロモーター上のマウスFoxp2結合塩基配列について
- 7) FoxP2のノックアウトマウスの症状について
- 8) ゼブラフィッシュの松果体でのFoxP2の発現について
- 9) 言語能力とFOX2はどのように関連するか
- 10) 動物種によるFOX2遺伝子のオルターナティブスプライシングの違いについて

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文

にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	蓑	島	伸	生				
	副査	筒	井	祥	博	副査	梶	村	春彦