

論文内容の要旨

申請者氏名 阪上起世

感覚器官である眼の神経性網膜は、前脳の一部として発生が始まる中枢神経組織で、光情報を神経シグナルへ変換して、脳へ伝達させる機能をもっている。脊椎動物において、神経性網膜は、内層から視神経細胞層、内顆粒層、光受容細胞層の3層構造をもち、6種類の神経細胞と1種類のグリア細胞が、それぞれ特有の位置を占めている。この7種の細胞分化は、時間的には重なりながら、しかし秩序だった系譜をとって進むことが明らかにされている。しかしながら、この神経性網膜が、どのように前脳領域から特異化されるのか、また7種類の細胞がどのように分化するのか、などに関する分子機構についての知見は蓄積されつつあるが、未解明な部分が多い。

申請者は、神経性網膜特異的に発現する *paired-like* 型転写因子 *Rx/rax* に着目し、その機能解析を行った。*Rx/rax* は網膜特異的に発現し、眼の形態形成に必須の因子であるが、網膜領域の決定過程の詳細な分子機構、及び神経性網膜の神経細胞分化における機能は明らかにされていない。申請者は、外来遺伝子の導入が容易なニワトリ胚からニワトリ *Rx/rax* 相同遺伝子(*RaxL*)を単離し、その機能解析を行った。

まず抗 *RaxL* 抗血清を作製し、*RaxL* の発現を組織化学染色法によって観察している。*RaxL* は、ほぼ全ての神経性網膜前駆細胞に発現し、発生が進行するにつれ、分化の終わった細胞層で消失、E15 では、光受容細胞層に発現は限局することが明らかにした。申請者は、*RaxL* の発現が、分化の終了した細胞で消失することに着目した。神経性網膜で最初に分化する視神経細胞の分化マーカー(RA4 抗原、cBrn-3、Islet-1、neuronal type III β -tubulin)と *RaxL* の発現に相関が見られるかを調べた結果、E3.5 から E7 において、*RaxL* の発現は移動後の視神経細胞で消失することを明らかにした。つまり、*RaxL* の発現の消失が、視神経細胞への最終分化に必要であることを見いだした。

申請者は、このことを確認するため、*RaxL* 及びドミナントネガティブ型 *RaxL(RaxLEnR)* を構築し、RCAS レトロウイルスベクターによって、生体内で強制発現を行った。ニワトリ胚への強制発現は、神経性網膜の細胞分化前ステージ 10 の眼胞内部に、エレクトロポレーション法によって行い、視神経細胞の分化が終わった E15 で影響を解析した。*RaxL* の強制発現胚には、cBrn-3 及び neuronal type III β -tubulin 陽性の視神経細胞は全く観察されなかった。このとき、視神経細胞層に存在する Sox2 陽性異所性アマクリン細胞はほぼ正常で、明らかな影響はみられなかった。一方、*RaxLEnR* の強制発現によって、視神経細胞の細胞数は 60% 減少したが、視神経細胞層には、視神経細胞と異所性アマクリン細胞は減少するものの、その割合はコントロールと同率で存在していることを見いだした。このことから、視神経細胞の形成には、*RaxL* の発現が消失しなければならないことが明らかにした。

申請者は、次に、視神経細胞の分化がいつ阻害されるのかを知るため、視神経細胞の生み出しがピークである E5 で、*RaxL* 及び *RaxLEnR* の強制発現の影響を解析した。*RaxL* の強制発現によって、E5 で Islet-1 陽性視神経細胞がコントロールと比較して、約 40%減少するのに対し、*RaxLEnR* の強制発現によって、Islet-1 陽性視神経細胞は約 30%増加していた。つまり、視神経細胞の初期分化に、*RaxL* が決定的ではないにしろ、抑制的に機能することを明らかにした。また、*RaxL* 強制発現による E15 での視神経細胞の欠失は、E12 から E15 における視神経細胞特異的な細胞死によるものであった。また、*RaxLEnR* 強制発現による E15 での視神経細胞層の細胞数減少は、E9 から E12 における視神経細胞非特異的な細胞死によるものであった。以上のことから、申請者は、*RaxL* は、その発現レベルと発現消失の時期を鍵として視神経細胞特異的に最終分化と生存を制御すると結論した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 阪上 起世

感覚器官である眼の神経性網膜は、前脳の一部として発生が始まる中枢神経組織で、6種類の神経細胞と1種類のグリア細胞が存在する。この神経性網膜がどのように前脳領域から特異化されるのか、また7種類の細胞分化の分子機構について未解明な部分が多い。

申請者は、ニワトリ胚の神経性網膜特異的に発現する因子 *paired-like* 型ホメオボックス転写因子 *RaxL* をクローニングし、遺伝子構造を明らかにし、さらに、大腸菌で発現させた *RaxL* を抗原としてウサギとラットで *RaxL* 特異的な抗体を作成した。

はじめに、*RaxL* の転写因子としての機能解析を *Selex* 法により、ターゲット配列を選別した後、ゲルシフト法により、コンセンサス配列 GCTAATTG を決定した。さらに、レポーターアッセイにより *RaxL* は、コンセンサス配列を介して転写促進活性を持っていること、またショウジョウバエ *Engrailed* の転写抑制ドメイン *EnR* との融合タンパク質 *RaxL-EnR* は、ドミナントネガティブ *RaxL* として機能することを明らかにした。

次に、神経性網膜で最初に分化する視神経細胞の分化マーカー (RA4 抗原、*cBrn-3*、*Islet-1*、neuronal type III β -tubulin) と *RaxL* の発現パターンを詳細に解析し、E3.5 から E7 において *RaxL* の発現は分化の進行しつつある移動後の視神経細胞で消失することを明らかにした。特に、*RaxL* を発現する視神経細胞は移動とともに、順次 RA4 抗原、*cBrn-3*、*Islet-1*、neuronal type III β -tubulin を発現し、neuronal type III β -tubulin の発現後、*RaxL* の発現が消失することを初めて明らかにした。

最後に、視神経細胞分化における *RaxL* の機能解析を、*RaxL* と *RaxL-EnR* をウイルスに組み込み、エレクトロポレーション法を用いてニワトリ胚へ導入し、E5 で *RaxL* 及び *RaxL-EnR* の強制発現の影響を解析した。その結果、*RaxL* の強制発現によって、*Islet-1* 陽性視神経細胞が約 40%減少するが、*RaxL-EnR* の強制発現では *Islet-1* 陽性視神経細胞は約 30%増加した。また、E15 では、*RaxL* の強制発現胚では視神経細胞は完全に消失するが、異所性アマクリン細胞は全く影響を受けなかった。しかし、*RaxL-EnR* の強制発現胚では視神経細胞と異所性アマクリン細胞が、ともに約 30%減少した。E15 の *RaxL* の強制発現胚での視神経細胞の消失は、E12 をピークとする視神経細胞特異的なアポトーシスによることを明らかにした。

本論文に示されている発見のほとんどが全く新規のものであり、学術上の貢献度は高い。また、中枢神経組織における細胞分化のモデルとしても重要な基本原理を提供する。加えて本研究のほとんどは、研究指導者や周囲の研究者との密接なディスカッションを基本として、データのすべてを阪上 起世自身が行ったものであり、本人の研究能力は極めて高く評価される。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値のあるものと認めた。