

論文内容の要旨

申請者氏名 大崎 加奈枝

本研究は、神経系の形成に関わる現象を分子レベルで明らかにすることを目的とし、ホメオボックス遺伝子に注目した。ホメオボックスは、ショウジョウバエのホメオメオティック遺伝子、分節化遺伝子に見い出された180bpのDNAモチーフで、ホメオボックスをもつ遺伝子はホメオボックス遺伝子と呼ばれる。ホメオドメインはホメオボックスにコードされ、塩基配列特異的DNA結合能を有する。ホメオボックス遺伝子は転写因子であると考えられ、時空特異的に発現し、形態形成に関与する。中枢神経系の形成においては、これまでに*PAX*, *POU*, *LIM*などのホメオボックス遺伝子が重要な役割を果たすことが知られている。

マウス発生過程の神経系に発現するホメオボックス遺伝子群 (*Dbx*, *Dbx2*, *munc-4*, *C2*, *Alx*, *Vax1*, *Vax2*) を単離し、その解析を行った。論文は以下の2部で構成される。第I部では、*Dbx*, *Dbx2*, *munc-4*, *C2*, *Alx*について、初期胚での発現パターンを中心に解説する。第II部では網膜に注目し、発生過程の眼で発現している2つのホメオボックス遺伝子*Vax1*, *Vax2*について報告する。

第I部、神経系に発現するマウスホメオボックス遺伝子群

*Dbx*は、ホメオドメインのヘリックスIIIに対する合成オリゴプローブより得られた遺伝子で、*Dbx*をプローブとして得られた*Dbx2*とファミリーを形成している。*Dbx*, *Dbx2*は後脳から神経管にかけて発現し、*Dbx*は中脳蓋、視床、乳頭領域でも発現していた。

*munc-4*は、*prd-type*ホメオボックス遺伝子に対応するプライマーをもとにRT-PCR法により単離され、線虫*unc-4*のホモログと考えられる。神経系では嗅上皮、終脳領域、中脳、後脳、神経管に発現が見られ、8.5日胚から体節で発現していた。

*C2*は、*munc-4*をプローブに得られた新規のホメオボックス遺伝子である。神経系では視床、中脳、後脳、神経管、顔面神経節、後根神経節、交感神経節で、非神経系ではseptum transversum、肢芽、嗅原基、鰓弓、歯芽、瞼で発現していた。抗*C2*抗体を作成し、マウス12.5日胚のウエスタンブロットティングを行ったところ、遺伝子構造から予想された33.5kDaにバンドが得られた。

*Alx*は、*C2*と同じく*munc-4*をプローブに得られたホメオボックス遺伝子で、ショウジョウバエ*aristaless*のホモログと考えられる。*Alx*ゲノムDNAを単離し遺伝子構造を解析したところ5つのエキソンにコードされていた。前脳、神経管の底板で発現が見られた。

RT-PCR法、ハイブリダイゼーションスクリーニング法により単離されたこれらホメオボックス遺伝子は、発現パターンから神経系の形成に何らかの役割を果たしていると考えられた。一方、これらの遺伝子は非神経系でも発現しそれらの領域で何らかの役割を担っていると考えられた。

第Ⅱ部、発生過程の網膜に発現するVaxホメオボックス遺伝子ファミリー

*Vax1*は、*Antp*クラスの本メオドメインに対するプライマーを本とにマウス新生児の脳からRT-PCR法により得られた。*Vax2*は*Vax1*をプローブにしたスクリーニングにより得られた。*Vax1*, *Vax2*は、本メオドメインのアミノ酸配列が一致し、両遺伝子はファミリーを形成していた。*Vax1*, *Vax2*は3つのエキソンにコードされ、スプライシングサイトは両遺伝子間で保存されていた。9.5~16.5, 8.5日胚~成体までの*Vax1*, *Vax2*の発現パターンをそれぞれ解析したところ、*Vax1*, *Vax2*は眼を本心に異なる発現パターンを示した。9.5日胚では、*Vax1*は脳から眼柄にかけて発現し、*Vax2*は眼杯に発現が見られた。10.5日胚では、*Vax1*は脳、眼柄、眼杯外層、嗅原基に、*Vax2*は眼杯内層の腹側領域に発現が見られた。11.5~16.5日胚では、*Vax1*が脳、眼柄に発現しているのに対し、*Vax2*は眼杯内層の腹側領域に発現していた。*Vax2*の発現は、網膜色素顆粒層を除くすべての網膜の層で見られ、この発現は成体まで認められた。

網膜形成は大きく3つの発生段階に分けられる。眼杯が形成される時期。眼杯内層から神経細胞グリア細胞が生じ、眼杯外層が網膜色素顆粒層に分化する時期。網膜神経節細胞が視蓋に投射し接続地図(網膜視蓋投射)が形成される時期である。*Vax1*は初期の眼杯に、*Vax2*は発生を通じて網膜に発現することから網膜の形成、分化に関与していると考えられた。*Vax2*の発現は網膜の腹側領域に局在していることから網膜の背腹軸に対する特異性の獲得に関与している可能性が示唆された。

バッククロスパネルを用いた解析により、*Vax2*はマウス染色体6番にマップされた。*Emx1*と*Vax2*がリンクしている可能性がヒト*EMX1*の染色体上の位置との対応により示唆された。*Vax1*はマウス染色体19番にマップされ、*Emx2*とリンクしており、*Vax*, *Emx*ファミリーは祖先型*Vax-Emx*の重複により生じたものと考えられた。

Vax1, *Vax2*をプローブにトリcDNAライブラリーをスクリーニングしたところホモログと考えられる遺伝子が1種類得られた(*chickVax*)。chick*Vax*はアミノ酸配列の上では*Vax1*に近かった。chick*Vax*の発現は脳、眼柄、眼杯に見られ、*Vax1*, *Vax2*を合わせたパターンと考えられた。chick*Vax*にファミリーが在しないかどうか今後確める必要がある。*Vax1*, *Vax2*, chick*Vax*の解析は、遺伝子の進化を考える上で一つのモデルになると考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 大崎 加奈枝

本論文はマウス神経系で発現している複数の新規ホメオボックス遺伝子の単離、遺伝子構造の決定、発生過程における発現パターンの解析、染色体マッピング等をおこなったものである。ホメオボックス遺伝子群は多くの生物で発見されている転写調節因子をコードしている遺伝子群であり、特に動物の形態形成過程を制御している遺伝子群であることが報告されている。最近では形態形成だけでなく神経系の形成に関わるホメオボックス遺伝子も数多く報告されているが、ほ乳類神経系の複雑さから考えてまだ多くの未知ホメオボックス遺伝子の存在が想定されていた。本研究では合成オリゴヌクレオチドを使ったハイブリダイゼーションによるスクリーニングやRT-PCR法を用いた検出法などを用いて未知ホメオボックス遺伝子を単離し、これらの遺伝子の発生過程における発現パターンの解析する事によって、ホメオボックス遺伝子群のマウス神経系の形成過程への寄与を示唆する結果を得ている。特に本論文で重点的に述べられている *Vax* (*Vax1*, *Vax2*) 遺伝子群はその発生過程における発現パターンから、網膜の形成において重要な働きをしていることが考えられる。網膜は致死でない数多くのミュータントが存在すること、発生過程への操作が容易であること、構造が比較的単純であることなどから、神経系の形成機構の研究がもっとも進んでいる領域であるが、本研究でおこなわれた *Vax* 遺伝子の解析は今後の網膜の形成機構研究に重要な貢献をすると考えられる。

一方、本研究ではマウスだけでなくトリの *Vax* 遺伝子を単離しその遺伝子構造および胚での発現パターンの解析もおこなっている。高等動物の発生過程は多くの転写調節因子によってコントロールされていると考えられているが、複雑な形態の形成や、神経系形成の機構がどのように進化してきたかについてはまだあまり明らかにされていない。本研究でおこなわれたマウスとトリの *Vax* 遺伝子群の構造と発現パターンの比較は、脊椎動物の発生過程における遺伝子発現制御機構の進化の過程を示唆する重要な結果を含んでいる。

以上のように、本論文はほ乳類神経系の形成機構および、発生過程における遺伝子発現制御機構の解明に重要な示唆をあたえるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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あるものと認めた。