

## 論文内容の要旨

申請者氏名 高橋 源 尚

### 第1部、肢芽の前後軸形成におけるAlx4の役割

本論文では軸前性多指症マウス Strong's luxoid (IstJ) がAlx4遺伝子のhomeobox部分に16bpの欠失を持つ事、この欠失は、遺伝子にフレームシフトを起こし、Homeodomainのhelix3/4以降を欠失した短くなったAlx4蛋白を生じることを示した。これが原因となって、軸前性多指形成を生じる。詳細な分子生物学的解析を与えるため、ニワトリからAlx4のホモログを単離し、肢芽伸長における発現様式を観察した結果、ニワトリAlx4は肢芽前側に特異的に発現し、肢芽における極性化活性の本体であるSonic hedgehog (Shh) と相補的な発現様式を示したことがわかった。また、その発現は、Shhの発現以前に既に予定肢芽の前側に限局している事、更にAlx4を欠損したIstDマウスにおいて、前側に異所的にShhを発現している事から、Alx4はShhを抑制している事が示された。Fibroblast Growth Factor (FGF) を局所的に加え、付属肢を形成させると、Alx4の発現が抑制された所にShhが発現してくる事から、Alx4がShhを抑制している事が更に支持された。また、Shhを前側に局所的に加えると、Alx4が抑制される事から、肢芽の伸長の間に、Alx4とShhとの間にnegative feedback loopが存在する事が示唆された。同様な変異マウスであるExtra toes (Xt) における発現パターンを調べたが、IstJにおけるGli3の発現も、XtにおけるAlx4の発現も全く変化は見られなかった。したがって、肢芽にはGli3とは異なる別の前後軸形成メカニズムが存在し、Alx4がその一翼を担っている事が示された。また、Alx4はShhによってGli3よりもかなり早い時間で抑制される事は、Alx4がGli3に依存していない事を支持していた。本論文は、脊椎動物の肢芽の前後軸決定にはShhとAlx4の間のnegative feedback loopが存在し、Alx4はGli3とは異なる系で前後軸形成に働いている事を明らかにした。

### 第2部、水晶体のファイバー分化におけるPitx3の役割

本論文でニワトリより単離されたPitx3は、Pitxファミリーの一つであり、水晶体特異的な発現様式を示した。FISH法により人染色体上に位置を調べた所、10q24の位置にマッピングされる事が分かった。この位置には、anterior segment mesenchymal dysgenesis (ASMD) という前眼部の形成異常や先天性白内障を引き起こす原因遺伝子が存在する事が報告されている。眼の発生におけるPitx3の機能を明らかにする為に、Pitx3の全長にEngrailedのsuppressor domainを結合したdominant negative体 (RCAS-dnPitx3) を作製し、ニワトリ胚頭部の水晶体予定領域に強制発現させる事を試みた。その結果、RCAS-dnPitx3を強制発現させた個体では、水晶体ファイバーの配列に異常を生じ、E10まで発生を進めると、前眼部の間葉細胞が粗になるという異常が認められた。更に、各種クリスタリンの発現を調べた所、 $\delta$ -クリスタリンの発現量の低下が認められた。これらの結果は、RCAS-dnPitx3を感染させた眼がASMDの病態を再現していると考えられた。更にその機能を調べる為、水晶体の分化に関わる各種遺伝子マーカーの発現様式を比較した。この結果、L-mafとFilensinに僅かな減少が見られた。また、水晶体のファイバー分化に関わっている事が知られているProx1が大きく減少している事が観察された。Pitx3とProx1の発現様式を比較した所、明らかにPitx3が早く発現している事が観察された。眼の発生過程において、Pitx3が水晶体上皮と赤道面に強い発現が見られる事と考え合わせると、Pitx3は水晶体上皮細胞が増殖状態から水晶体ファイバーへ分化する過程、あるいは、水晶体上皮/ファイバー移行部細胞の不均等分裂に関与している事を示唆しており、dnPitx3において、ファイバー分化に関わるProx1が減少している事は、その機能を強く支持している。また、Pitx3とProx1の発現時期から、Pitx3がProx1を発現制御している事が考えられる。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 高橋 源 尚

論文は、新規のホメオボックス型転写因子 Alx4、Pitx3 の胎児発生における機能を解析している。

ニワトリから単離された Alx4 遺伝子は、その特徴的な肢芽前部に限局した発現様式から、肢芽前後軸の決定に深く関与することが示唆された。ニワトリを使った詳細な発生生物学的な解析から、この遺伝子が肢芽後方の極性化蛋白である Sonic Hedgehog (Shh) と互いに抑制的な関係を持つこと、発現の開始時期の解析から、Alx4 が Shh よりも早期に肢芽前後軸を決定していること、Gli3 とは独立したシグナル経路にあることが明らかにされた。このような知見は、同時に、脊椎動物の Alx4 遺伝子の変異が軸前性多指症を引き起こす可能性を強く示唆する物であった。事実、Alx4 の染色体場の位置が報告されるに及んで、Alx4 が Strong's luxoid (Ist) の原因であることの可能性が強まった。この可能性を確かめるため、Istマウスの Alx4 遺伝子を解析した結果、16 bp の欠失が確認された。

これらの事実は、Alx4 が肢芽の戦後軸の決定に、かなり早期から深く関わっていることを想起させる物であると同時に、Alx4 遺伝子の変異がヒトを含む脊椎動物の軸前性多指症の原因となる可能性を指摘したことになる。この意味に於いて、本論文は、発生生物学の主要な問題に関わる重要な糸口となると思われる。加えて、ヒトの多指症の原因解明にも積極的な学術的な貢献が認められる。

本論文の2部では、もうひとつの転写因子 Pitx3 の機能を詳細に検討している。この遺伝子は非常に特徴的な発現様式を示しており、発生過程の水晶体に特異的に発現することが見出された。この遺伝子の機能を解析するため、dominant negative 型に人工的に変異させ、発生初期の水晶体に強制発現させたところ、レンズファイバーの著しい乱れと種々の水晶体マーカーの発現の変化が認められた。このような知見は、この遺伝子が水晶体の分化発生に重要かつ不可欠の機能を発揮していることを示唆している。また、ヒトの白内障の発症モデルと遺伝子治療のモデルとなる可能性も指摘できる。

以上のように、本論文はふたつの新規の転写因子の生物学的機能を詳細に明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。本論文は、発生生物学にとどまらず、医学的な応用も可能であり、学術的な意義は大きい。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。