

論文内容の要旨

申請者氏名 竹 内 純

脊椎動物の前後肢の形態は著しく異なる。これまでに研究された遺伝子のはほとんどが、前肢と後肢で同じ発現を見せるのに、全く異なる形態が作り上げられるのなぜか。この重要な問題に対する答えは見つかっていなかった。

ニワトリ胚は表面上の形態（前肢は羽毛で覆われた翼が形成され、後肢はウロコや爪が形成される）だけでなく、内部構造（前肢は指が3本、後肢は4本）にも異なる点が多々挙げられることから、前後肢の違いを解析するのは適したモデルである。さらに、T-box遺伝子ファミリーの一つショウジョウバエomb(optomotor-blind)が羽と肢の違いに関わることが報告されていることから、T-box(Tbx)遺伝子に着目した。

ニワトリTbx5/Tbx4は、それぞれ前肢芽と後肢芽特異的に発現していた。発現パターンは、かつてStephensが前後肢のidentityが決定されると報告している時期と一致し、かつ、発生後期においてもそれぞれ前後肢芽特異的に発現が維持されることから、前後肢の違いに関わる可能性が示唆されていた。そこで、Tbx5を予定後肢芽領域に強制発現(misexpression)させて形態変化を追ったところ、本来ウロコが生えるはずの表皮がほぼすべて羽毛に置き換わり、内部の骨格パターンも指が3本になるなど前肢化する結果が得られた。一方、Tbx4を予定前肢芽域にmisexpressionさせたところ、前肢の表皮から羽毛が消失し骨パターンにも変化が見られ後肢様形態変化を伴った。

misexpressionによる前後肢の形態変化から、2つのTbx遺伝子は肢芽で発現する様々な遺伝子を制御している可能性が考えられた。その中でHox9パラログ(Hoxb9, Hoxc9, Hoxd9)に注目して、misexpression後のHoxの発現変化を追った。Hoxb9, c9は本来後肢芽のみで、Hoxd9は前肢芽のみで発現する遺伝子であるが、Tbx5を後肢にmisexpressionさせると、Hoxb9, c9の発現は抑えられ、Hoxd9が異所的に発現されてきた。また逆に、Tbx4を前肢にmisexpressionさせると、弱いながらもHoxb9, c9が誘導されてきて、Hoxd9は抑制された。Hoxのこのような発現変化はCohnらの仮説と一致しているだけでなく、さらに、Tbx5/Tbx4は形態変化からだけでなく、前後肢芽において異なって発現するHox遺伝子を調節していることも明らかになり、Tbx5/Tbx4は前後肢の違いを決定する中心的な遺伝子であるといえる。

物を正確に見るには、背腹・鼻耳軸に沿った網膜の形態形成と視覚中枢への神経投射が正しく行われる必要がある。しかし、どのような遺伝子が分子的基盤となって眼が形づくられ、神経投射が行われているか背腹軸に関する解析はほとんどなされていない。

Tbx5は網膜の背側に極性を持って発現している。Tbx5は肢芽での結果より眼の背腹軸形成においてもTbx5が極性の決定に関与しているのではないかと考え、ニワトリ胚を用いてTbx5を腹側網膜に異所的に発現させる実験を行った。すると、腹側網膜が形態的に背側化し、本来背側に発現しているEphrinB1, B2が腹側にも誘導され、腹側に発現しているPax2, Vaxの発現は抑制された。Tbx5の異所的発現は神経投射にも変化を及ぼし、腹側網膜の視神経節細胞から伸びている軸索は視蓋の背側に到達するが、Tbx5を異所的に発現している網膜由来の軸索は本来の到達点に留まらずに、背側網膜由来の神経線維の到達点（視蓋の腹側）に達していた。これらの結果から、Tbx5は網膜の軸形成に関与しているのみならず、眼の発生後期の網膜視蓋投射にも関わっていることが明らかになった。

以上の結果は、Tbx 遺伝子が四肢と眼の形態、とくに器官の identity と組織の極性の決定に重要な働きを持つことを意味している。本研究は、Tbx 遺伝子の機能を分子生物学的に詳細に検討し、組織の発生の基盤となる普遍的なメカニズムの解明に大きく寄与している。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 竹 内 純

本論文は、転写因子 Tbx5、Tbx4 の機能を分子生物学的な手法を駆使して、肢芽と眼の発生において詳細に解析している。肢芽では、Tbx5 遺伝子が前肢（ニワトリでは wing）に、Tbx4 遺伝子が後肢（leg）に特異的に発現が認められる。これは、ショウジョウバエの遺伝学的な解析結果を考えあわせると、肢芽の wing / leg identity の直接の決定因子であることを十分に予想させるものである。本論文では、これを証明するために肢芽の間葉組織に電気穿孔法（electroporation）を用いて、異所的発現を試みている。この方法は、従来肢芽の間葉組織への応用は困難と考えられてきたが、本論文では、画期的な改良を加え、これを可能にしている。異所的発現の結果は、非常に劇的で、Tbx5 を leg に強制発現させた場合は leg が wing 様の形態に、Tbx4 を wing に強制発現させた場合は wing が leg 様に形態転換した。

本論文では、形態上の詳細な解析に加え、3つの Hox9 遺伝子の発現パターンの逆転も確認している。興味深いのは内在性の Tbx 遺伝子の発現変化である。本論文では、Tbx5 の leg での強制発現が Tbx4 の抑制を引き起こすのに対し、Tbx4 の強制発現は Tbx5 の遺伝子の発現になんら影響しないことを見出している。これは、進化の過程で、leg が default 状態で、優勢な Tbx5 が Tbx4 からの独立性を獲得し、上肢（wing）の形態を変化させてきたことを推測させる。この知見は非常に重要で、発生生物学、進化論、分子生物学的に極めて大きな示唆を与えることと考えられる。

また、本論文では、Tbx5 遺伝子が発達過程の眼の背側に限局して発現することに注目し、電気穿孔法と従来のレトロウイルス法を用いて、この発現の意味を解析している。Tbx5 を眼の腹側に強制発現した場合、眼の形態が著しく変化し、double dorsal 様となっている。このことは、種々の分子マーカーでも確認されている。このような事実は、Tbx5 遺伝子が眼の形態の背腹軸の決定において中心的な役割を担っていることの証明である。また、Tbx5 遺伝子の腹側での強制発現は、腹側網膜に位置する網膜神経節細胞の軸索の pathfinding にも著しい異常を引き起こしている。これは、Tbx5 遺伝子の機能が形態のみならず、網膜視蓋投射というこれまでに解明されていない重要な問題の解答そのものであることを意味している。

以上のように、本論文は Tbx5 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。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。