【206】

氏　　名	津田浩史（つだ ひろし）
学位(専攻分野)	博　士（医　学）
学位記番号	医博第2076号
学位授与の日付	平成11年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科生理系専攻
学位論文題目	Structure and Promoter Analysis of Math3 Gene, a Mouse Homolog of Drosophila Proneural Gene atonal （ショウジョウバエのプロニューラル遺伝子atonalと構造的に類似するマウスath3遺伝子の構造とプロモーター解析）
論文調査委員	(主査) 教授 成宮　周　教授 中辻憲夫　教授 中西重忠

論文内容の要旨

［緒言］

脊椎動物のヘリックスループヘリックス型遺伝子Athファミリーはショウジョウバエのプロニューラル遺伝子の一つであるatonalと高い相同性をもち，神経発生および分化への関与が示されている。

この内の一つであるath-3遺伝子については以下のことが明らかにされてきた。1）Xenopus ath-3遺伝子は前脳や網膜のような前方神経組織に強く発現し，アニマルキャップの強制発現実験で網膜ニューロンを含む前方の神経の分化を誘導する。2）Mouse ath-3（Math3）遺伝子は胎生期に広範囲の神経系に発現するが，生後は網膜内顆粒層に限局して発現する。本研究は神経または網膜特異的に働く遺伝子の発現調節機構を解明することを目的としてMath3の遺伝子構造と発現調節機構の解析を行った。

［方法と結果］

1．Math3の遺伝子構造

Math3のcDNAをprobeとして，マウスゲノムライブラリーをスクリーニングし，Math3遺伝子の遺伝子構造を決定した。Math3遺伝子は約8kbのイントロンをはさんだ2個のエクソンからなり，2番目のエクソンに全翻訳領域が含まれていた。

2．転写開始点の決定

Primer extension法，Reverse transcription-mediated polymerase chain reaction法を行い転写開始点を決定し，転写開始点は75bp離れた二ヵ所に存在することを示した。

3．培養細胞系を用いたMath3上流域のプロモーター解析

ルシフェレース遺伝子の上流にMath3上流域3kbをつないだレポータープラスミドを作製し，ニューロブラストーマ細胞，グリオーマ細胞，線維芽細胞を用いてルシフェレースアッセイを行った。その結果，Math3プロモーターはニューロブラストーマ細胞で特異的活性を示した。さらに，Math3プロモーターのdeletion mutantを作製し，ニューロブラストーマ細胞を用いてルシフェレースアッセイを行った。その結果，1番目の転写開始点より下流＋4から＋196の領域（2番目の転写開始点から72bp上流と121bp下流を含む領域）がMath3のプロモーター活性として最低必要な領域と結論した。

4．Math３プロモーター領域を含むレトロウイルスによる網膜器官培養への感染実験

網膜におけるMath３のプロモーター活性を調べるために，Math３プロモーター領域と，その下流にレポーター遺伝子としてbacterial lacZを組み込んだレトロウイルスを作製しマウス網膜培養組織へ感染させた。その後，X-gal染色で陽性細胞の検討を行った。網膜における部位特異的なMath３プロモーター活性として１番目の転写開始点下流＋196より上流0.9kbの領域で，本来Math３の発現する内顆粒細胞層にのみ陽性細胞を認め，ニューロブラストーマ細胞で活性のあった＋４から＋196の領域や，＋４より上流の0.7Kbの領域を用いただけのレトロウイルスでは陽性細胞を認めなかった。

［結論］

Math３遺伝子の調節領域は，Math３の神経系の発現と網膜の発現に応じて，それぞれ２種類存在する。すなわち，転写開始点付近の193bpの領域で神経特異的な発現調節を行い，さらに上流を含めた0.9kbの領域で網膜特異的な発現調節を行っている。この２種類の調節領域を使い分けることによって発生過程で異なった遺伝子発規をすることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

神経分化転写制御因子Math-３遺伝子は胎生期に広い範囲の神経系に発現するが，生後は網膜に限局して発現する。本研究はMath-３の発現調節機構を明らかにする目的でMath-３遺伝子上流の転写調節領域の解析を行ったものであり以下の結果を得た。

１．Math-３遺伝子は２個のエクソンからなり，Primer extension法，RT—PCR法によって転写開始点は相互に75bp離れた２ヵ所に存在することを示した。２．Math-３上流領域とルシフェレース遺伝子を融合し，本融合遺伝子をニューロブラストーマ細胞，グリオーマ細胞，線維芽細胞に導入する事によって神経細胞におけるMath-３転写調節部位を決定した。この結果，Math-３上流領域が神経細胞における特異的発現に必要なこと，さらに，１番目の転写開始点より下流＋４から＋196の領域がMath-３の神経細胞におけるプロモーター活性として必要な領域であることを示した。３．Math-３プロモーター領域と，その下流にlacZを組み込んだレトロウイルスを作製しマウス網膜培養組織へ感染させlacZの発現を検討した。ニューロブラストーマ細胞で活性のあった＋４から＋196の領域を用いたレトロウイルスは活性がなく，網膜特異的なMath-３プロモーター活性として１番目の転写開始点下流＋196より上流0.9kbの領域が必要であることを明らかにした。

以上の結果は，Math-３遺伝子が異なる２種類の転写調節領域を用いて神経特異的，また網膜特的な発現調節を行っていることを示すものである。

本研究は哺乳動物の神経発生分化機構の解明に貢献し，本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお，本学位授与申請者は，平成11年１月11日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け，合格と認められたものである。