

氏名	ほし の ひで はる 星 野 秀 治
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 101 号
学位授与の日付	平 成 19 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	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	菱脳で特異的発現をする新規遺伝子, <i>cornichon-like</i> の機能解析

論文調査委員 (主査) 教授 上村 匡 教授 眞貝 洋一 教授 根岸 学

### 論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の後脳では、発生の過程においてロンボメアと言う分節構造が一過的に現れる。この分節構造は一種の繰り返し構造を作っており、それぞれの分節が異なるアイデンティティーを獲得する事で、分節毎に似通いながら異なった組織を作っていく。これまでに分節がいかにしてアイデンティティーを獲得するのかといった事は研究が進められてきたが、それ以降におきる諸現象についての分子レベルでの解析はまだ明らかにすべきものが多い。そこで、申請者が所属する研究室において後脳特異的発現を示す遺伝子のスクリーニングを行った結果、マウス胚とニワトリ胚において *cornichon-like* (*cnil*) 遺伝子がロンボメア 3 番と 5 番 (r3 と r5) のみで発現している事を見出した。

*cnil* は *Drosophila* の *cornichon* や出芽酵母の *Erv14p* 遺伝子によく似ているが、ハエや酵母の研究よりこのファミリーの分子は COPII 小胞と相互作用して、特定のタンパクの輸送を促進することが明らかにされている。そこで COPII と結合すると思われる領域を欠き、ドミナントネガティブとして働くと考えられる CNIL 分子、 $\Delta C$ -CNIL をエレクトロポレーションによりニワトリ胚後脳に発現させたところ、r3 側方に異所的な軸索が走行して三叉神経と顔面神経がつながるといふ表現型が現れた。また *SOX-10* 陽性の神経冠細胞が、通常では侵入しない r3 側方の領域に侵入している事も分かった。この表現型は、EGF レセプターファミリーである *ErbB4* のノックアウトマウスの表現型と非常に良く似ている。*ErbB4* は r3 や r5 の側方に神経冠細胞が侵入できないよう“バリアー”を形成するのに必要であると考えられている。マウス胚とニワトリ胚において *cnil* と発現領域が重なっている可能性がある遺伝子を探した結果、HB-EGF が後脳で発現している事が明らかになった。分泌型 HB-EGF を  $\Delta C$ -CNIL と共にニワトリ胚後脳に発現させると、 $\Delta C$ -CNIL により引き起こされる軸索走行の異常が抑制された。

CNIL が HB-EGF の分泌を促進しているかどうかを調べるために、培養細胞を用いた実験を行った。その結果、HEK293T 細胞に HB-EGF と野性型 CNIL を共発現させると、培養上清への HB-EGF の分泌が促進される事が分かった。また、 $\Delta C$ -CNIL は野生型 CNIL の機能を阻害し、実際にドミナントネガティブとして働く事も示された。更に、siRNA を用いて *CNIL* と HB-EGF をニワトリ胚後脳においてノックダウンすると、やはり r3 側方で三叉神経と顔面神経がつながるといふ表現型が現れた。

以上の結果より、*CNIL* はニワトリ胚後脳において HB-EGF の分泌を促進しており、分泌された HB-EGF は *ErbB4* を活性化する事で r3 側方に神経冠細胞に対して忌避的な性質を与えていると考えられる。

これまで HB-EGF は細胞表面で ADAM ファミリーのメタロプロテアーゼによって膜結合型から分泌型に変換されると考えられていた。しかし、HB-EGF の輸送と培養上清中への分泌を更に解析した結果、RhoGDI ファミリーのセリンプロテアーゼによって細胞内においても分泌型に変換され得る可能性を、哺乳類細胞を用いて初めて示した。この過程に CNIL が関わっているかどうかは、更なる解析が必要である。

## 論文審査の結果の要旨

脊椎動物の後脳では、発生の過程においてロンボメアと言う分節構造が一過的に現れる。この分節構造は各々異なるアイデンティティを獲得することで、似通いながら異なった組織を作っていく。その過程においてみられる様々な現象についての分子レベルでの解析は未だ十分には行われていなかった。

申請者は、マウス胚とニワトリ胚において *cornichon-like*(*cnil*) 遺伝子がロンボメア 3 番と 5 番 (r3 と r5) のみで発現している事を発見した。申請者は、野生型 *CNIL* や  $\Delta C$ -*CNIL* という改変分子をニワトリ胚の後脳に強制発現させ、*CNIL* が鰓弓神経の軸索走行と神経堤細胞の移動経路の決定に関わっていることを示した。この表現型より、申請者は ErbB4 のリガンドの一つである HB-EGF と *CNIL* の関係に注目し、分泌型 HB-EGF が  $\Delta C$ -*CNIL* によって引き起こされる表現型を抑える事を示した。次に申請者は、培養細胞 HEK293T を用いて野生型 *CNIL* や  $\Delta C$ -*CNIL* が HB-EGF と物理的に相互作用する事を示し、野生型 *CNIL* は培養上清中への HB-EGF の分泌を促進することも明らかにした。更に申請者は、 $\Delta C$ -*CNIL* は HB-EGF の分泌に関して野生型 *CNIL* と拮抗的に働くドミナントネガティブ分子である事も明らかにした。また申請者は、siRNA を用いた HB-EGF と *CNIL* のニワトリ胚後脳におけるノックダウン実験は、 $\Delta C$ -*CNIL* の後脳での強制発現と同様な表現型を引き起こすことを示した。これらの実験結果より、申請者は *CNIL* はニワトリ胚後脳の r3 と r5 において HB-EGF の分泌を促進する機能を持っており、HB-EGF による ErbB4 の活性化により神経堤細胞の移動経路や鰓弓神経の軸索走行パターン決定が行われているというモデルを提唱した。

また、申請者は HB-EGF は細胞内において Rhomboid ファミリーのセリンプロテアーゼにより、膜結合型から分泌型に変換され得る可能性を、哺乳類細胞を用いて初めて示した。

本研究は、神経堤細胞の移動経路の決定に必要な新たな分子を同定し、後脳パターンニングのメカニズムの理解に大きく貢献するものであり、高く評価できる。また、*CNIL* はリガンドの輸送を介して EGF レセプターファミリーのシグナリングの活性調節を行うという知見は、後脳のみならず生体内の EGF レセプターファミリーのシグナリングが関与する様々な現象においても同様な活性調節が行われている可能性を示唆しており、今後の EGF レセプターファミリーのシグナリング研究に大きな影響を与えるであろう。

以上により、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成19年1月23日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。