

氏 名	水 関 健 司
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2225 号
学位授与の日付	平 成 12 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	神経誘導因子により発現が誘導される神経初期因子群の単離とその機能解析

論文調査委員	(主 査) 教 授 影 山 龍 一 郎	教 授 鍋 島 陽 一	教 授 中 西 重 忠
--------	------------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

70年前 Spemann らは、脊椎動物原腸胚背側部（オーガナイザー）の持つ神経誘導活性により未分化外胚葉から神経組織が誘導されることを証明した。近年単離された神経誘導因子 Chordin や Noggin はオーガナイザー特異的分泌因子であり、BMP 4 等の表皮化因子に細胞外で直接結合し BMP シグナルを遮断することで、未分化外胚葉から神経組織を誘導する。しかし、未分化外胚葉が神経誘導因子のシグナルを受け取った後、どのような神経初期因子が機能して神経組織に分化するのかは不明であった。本研究では神経初期因子群の神経発生に於ける役割を明らかにする目的で、神経特異的プローブ、表皮特異的プローブの二者を用いてアフリカツメガエル初期神経板 cDNA ライブラリーをディファレンシャルスクリーニングし、極めて早い時期から神経特異的に発現する 3 つの転写因子 Zic-r1, Sox2, SoxD を単離した。これらの因子の発現はすべて BMP 4 で抑制、Chordin で誘導されたことから Chordin の下流因子候補と考えられ、その機能を mRNA 微量注入法で検討した。

Zic-r1 はショウジョウバエ pair-rule 遺伝子 *odd-paired* と相同性を有す zinc finger 型転写因子であることが一次構造解析から明らかになった。in situ hybridization 解析では、初期胚で予定神経領域に一樣に発現した後、後期胚以降腹側の発現は消失し、神経管の背側部に限局して発現した。未分化外胚葉の in vitro 培養系では Zic-r1 の強制発現により神経組織が誘導された。胚での強制発現では神経・神経堤マーカーの発現領域を拡大し、表皮マーカーの発現を抑制した。以上より、Zic-r1 は未分化外胚葉ならびに in vivo において神経分化を誘導するのに十分であることが示された。

性決定因子 Sry と相同性を有す転写因子である Sox 2 は、初期胚より胚発生を通じて全神経領域に発現していた。in vitro 培養系で未分化外胚葉に Sox 2 を強制発現させたが、明らかな神経化活性を認めなかった。Sox 2 の作用には協調して働く共同因子が必要である可能性を考慮し、Sox 2 と同時に他の分化制御因子（増殖因子）を作用させた。その結果、Sox 2 と bFGF は協調的に神経分化を促進させることが判明した。即ち、in vitro 培養系で未分化外胚葉に対して Sox 2 単独、bFGF 単独では神経化の活性は見られなかったが、Sox 2 + bFGF で神経組織が誘導された。

新規の Sox 関連遺伝子である SoxD は、初期原腸胚では一旦外胚葉全域に発現し、それ以降の胚発生では神経外胚葉に限局して発現した。未分化外胚葉 in vitro 培養系での強制発現で SoxD は前脳タイプの神経組織を分化させた。発生中の胚の外胚葉において SoxD を異所性に発現させると、神経組織が異所性に形成された。そこで神経発生における SoxD の役割を検討するため、dominant-negative 型 SoxD として DNA 結合領域を除いた SoxD BD (−) を作製し、in vivo で野生型 SoxD の機能を阻害したところ、前脳の発生が強く阻害された。このことから SoxD が前方神経の発生に必須であることが示された。

以上のように、本研究では神経発生の初発段階を制御する分子実体が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

神経系の発生は未分化外胚葉に神経誘導因子が作用することにより開始する。本研究では神経発生の初期段階を制御する分子実体を明らかにする目的で神経初期発生制御因子群の単離とその機能解析を行い、以下の結果を得た。

アフリカツメガエル胚より differential screening の手法を用いて、神経誘導因子により発現が誘導され神経発生の極めて初期から神経特異的に発現する 3 つの転写因子 Zic-r1, Sox2, SoxD を単離した。それぞれの因子の役割を、未分化外胚葉の in vitro 培養系並びに胚に於いて、mRNA 微量注入法を用いて検討した。

Zic-r1 はショウジョウバエ pair-rule 遺伝子 *odd-paired* と相同性を有す zinc finger 型転写因子であり、強制発現により神経分化を誘導するのに十分であることが示された。

性決定因子 Sry と相同性を有す転写因子である Sox 2 は、単独では神経化の活性は認められなかったが、未分化外胚葉に於いて basic fibroblast growth factor と協調的に神経分化を促進させることが示された。

新規の Sox 関連遺伝子である SoxD は強制発現により神経分化を誘導するのに十分であった。更に dominant-negative 型 SoxD を作製し in vivo で野生型 SoxD の機能阻害を試み、前方神経の発生に必須であることが示された。

以上の研究は、初期神経発生の機構を明らかにしたもので、神経発生の理解に寄与するところが多い。

したがって、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、本学位申請者は、平成 12 年 1 月 29 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。