

論文審査の結果の要旨

氏名 團野 宏樹

本研究は大きく分けて2つの研究から成り立っている。研究1では眼の発生と遺伝病に関する転写プログラムの同定を行い、研究2では包括的解析を行うことにより、研究1から明らかになった転写プログラムを拡張している。

研究1ではヒトの眼の発生と遺伝病に関わる転写プログラムを同定することを目指し、重篤な眼の形成不全である無眼球症の原因遺伝子間の関係を探った。まず、無眼球症の原因遺伝子の一つである *Rax* 遺伝子の発現制御機構を明らかにするために比較ゲノム解析を用いている。脊椎動物間で *Rax* 遺伝子周辺についての配列類似性を調査したところ、*Rax* 遺伝子上流に遺伝子をコードしないが保存された配列 CNS1 (Conserved Noncoding Sequence 1) が見出された。このような配列はシス制御活性を有していることが期待されたため、ツメガエル胚を用いたルシフェラーゼアッセイとトランスジェニックアッセイを行ったところ、CNS1 が *Rax* 遺伝子の発現を調節するシス制御配列であることが明らかにされた。

CNS1 にはなんらかの転写因子が結合することが考えられた。そこで CNS1 についての phylogenetic footprinting を行ったところ、CNS1 中には保存された OTX 型転写因子結合配列と SOX 型転写因子結合配列が存在していた。ヒトの無眼球症の原因遺伝子として *Rax*, *Otx2* と *Sox2* が同定されていたこと、また、これらが脊椎動物の予定眼領域で共発現していたことなどに基つき、論文提出者は *Otx2* と *Sox2* タンパク質が CNS1 に結合することによって *Rax* の転写を調節するという仮説をたて、検証を行った。

EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) により、*in vitro* で *Otx2* と *Sox2* タンパク質が CNS1 配列に結合することが確かめられた。さらに、胚の予定眼領域において内在性の *Otx2* と *Sox2* タンパク質が CNS1 に結合していることがクロマチン免疫沈降法により明らかになった。次に、ツメガエルの細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより、*Otx2* と *Sox2* の両方が *Rax* の転写活性化に必要であることがわかった。また、ヒトの培養細胞を用いた再構成実験の結果、*Rax* レポーターの活性化には、*Otx2* と *Sox2* の共過剰発現で十分であることが明らかになった。この両者の間に転写活性化についての相互依存関係が見出されたことから、*Otx2* と *Sox2* タンパク質間で生化学的相互作用があることが予想され、プルダウン法と共免疫沈降法によりそれが確かめられた。

研究2では、研究1から明らかとなった転写プログラムを拡張することを試みている。*Otx2* と *Sox2* は予定眼領域だけでなく、予定脳領域でも発現が重なっていたこと、また、*Otx2* や *Sox2* のヒトにおける変異は、無眼球症という眼の形成不全だけでなく、脳機能障害なども引き起こ

すことが知られていたことから、Otx2 と Sox2 とによる転写制御支配は予定眼領域だけでなく、予定脳領域にも存在していると考えられた。そこで、Sox2 が発現している予定神経細胞においてOtx2を過剰発現することにより変動した遺伝子発現を包括的に解析することにした。理想的には *in vivo* における遺伝子発現を解析することが考えられる。しかし、胚中のごく少量の予定神経細胞において遺伝子の過剰発現を行い、その結果生じた発現変動を精度よく調査するのは困難であることから、論文提出者はマウス胚性幹 (ES) 細胞を用いた *in vitro* 神経発生系を構築し、この困難を克服した。同定した神経前駆細胞誘導条件にて、テトラサイクリン除去による Otx2 の過剰発現を行い、その結果生じた遺伝子発現変化をマイクロアレイにより解析したところ、複数の遺伝子の発現が有意に変動していることが明らかとなった。これら遺伝子に有意に脳や眼の発生についての機能アノテーションがつけられていたことは、本ストラテジーの有効性を示している。また、これら遺伝子と Otx2 との新規の関係が明らかになったことに加え、変動遺伝子中の未知の遺伝子と眼や脳の発生と遺伝病との関係を期待させる。

研究 1 においては、ヒト遺伝学からの知見、ツメガエル胚を用いた操作性の高い実験と、比較ゲノム解析とを組み合わせることにより、Otx2 と Sox2 とによる *Rax* の正制御という保存された転写プログラムが明らかになった。この転写プログラムの構成要素である Otx2 タンパク質、Sox2 タンパク質、*Rax* 遺伝子、そしてシス制御配列 CNS1 は全て保存されたものであることから、この転写プログラムはヒトを含む脊椎動物で保存されたものであると言える。

研究 2 においては、*in vitro* 分化系、制御可能な過剰発現系と、マイクロアレイによる包括的発現解析とを組み合わせることにより、研究 1 で明らかになった転写プログラムの拡張として、Otx2 によって支配される眼と脳の転写プログラムの全体像が明らかにされた。

本研究は、眼と脳の発生と遺伝病に関わる転写プログラムを明らかにしたことから、生物学的知見の蓄積という点で評価される。さらに、本研究で構築されたストラテジーは、眼や脳といった特定の器官だけにその適用範囲が限られるものではない。従って、本研究の成功はストラテジーの応用可能性を示したという点でも評価できる。

これらは道上達男、常陸圭介、雪田聡、石浦章一、浅島誠との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究計画、実験及びその解析を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。従って、本審査委員会は博士 (学術) の学位を授与するにふさわしいものと認定する。