

審査の結果の要旨

氏名 阿部 裕一

本研究は、先天性脳奇形である全前脳胞症 (HPE) 亜型症例のリンパ球ゲノムに対して高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析をおこない、解析結果より判明した 6 番染色体長腕の 10.4 Mbp の欠損領域に含まれていた転写調節因子 *EYA4* を HPE 原因候補遺伝子と疑い、既知の原因遺伝子 *SIX3* との相互作用を中心に解析し、HPE 原因候補遺伝子としての可能性についての検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. G-バンド法では正常核型を示す HPE 症例のリンパ球ゲノムをサンプルとし、主な既知の HPE 原因遺伝子である *SHH*、*ZIC2*、*SIX3*、*PTCH1* および *TGIF1* の翻訳領域について塩基配列の解析をおこなった。各遺伝子の全コーティングエクソン及びイントロン-エクソン接合部分の塩基配列に異常は認めなかったため、HPE 発症の原因解析目的に高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析をおこない、6 番染色体長腕に 10.4 Mbp の欠損を発見した。HPE の原因として染色体異常が原因のことも多いが、6 番染色体長腕 22.31 から 23.2 にかけて 10.4 Mbp の欠損部分と HPE との関連を示唆する症例は本報告が初めてであり、G-バンド法で検出困難な染色体欠損を検出できたことから、HPE 症例における原因検索の手段として、マイクロアレイ解析は有用であることが示された。
2. 欠損領域には 80 の遺伝子が存在し、この中に HPE 原因候補遺伝子があるものと考えた。80 の遺伝子の中には既知の HPE 原因遺伝子は存在していなかったが、*EYA4* を含む 12 の遺伝子は脳での発現が確認されているものであった。本研究の結果からは、*EYA4* 以外にもこれらの染色体欠損領域に含まれていた中枢に発現する遺伝子や機能不明の遺伝子の中に、HPE 発症に関与する遺伝子が存在する可能性は否定できなかった。
3. 本研究では HPE 原因遺伝子の一つである *SIX3* との相互作用の可能性のある転写調節因子、*EYA4* が欠損領域に含まれていることに注目した。染色体欠損部分には *EYA4* 遺伝子のプロモーター領域と exon 1、2 までが含まれていた。*EYA4* 遺伝子の翻訳開始 ATG は exon 2 上に存在しているため、欠損アレルからは正常な転写、翻訳が不可能であると考えたが、第 1 開始コドンからの正常な翻訳は不可能でも、exon 4 に存在する 2 個の ATG を用いて N 末端側の 29 個ないし 31 個のアミノ酸を欠損した欠失変異体が翻訳される可能性は否定できなかった。
4. *EYA4* を HPE 原因候補遺伝子と仮定した場合、発現の時期と局在を明らかにすることが HPE の発症に *EYA4* の欠損が関与するという仮説において必要であると考え、マ

ウスの発生過程において、HPE 発症の時期と考えられている脳の左右分割の時期である E9.5 から 11.5 付近における *Eya4* の発現の検証をおこなった結果、*Eya4* はマウスの発生過程において前脳の左右分割前の時期に相当する E10.5 をピークに脳での一過性の発現を認めることが示された。

5. SIX タンパクと EYA タンパクとの相互作用の報告があるが、EYA4 については SIX3 との相互作用は証明されていなかった。本研究では、免疫沈降法を用いて SIX3 が EYA4 とタンパク複合体を形成することを示した。
6. EYA4 と SIX3 の結合についての詳細を調べるために EYA4 の欠損タンパクを作製し相互作用を確認する実験をおこなった。その結果、N 末側にある variable region (VR) 欠損変異体は SIX3 との複合体形成が認められたが、C 末側にある eya domain (ED) 欠損変異体は SIX3 との複合体形成が確認できなかった。このことから EYA4 と SIX3 の複合体形成には EYA4 の ED が関与していることが示された。
7. 更にタンパク相互作用・機能解析の目的でルシフェラーゼアッセイをおこなった。レポーターには SIX4 結合が確認されている ATP1A1 response element、Six3 自身によって発現調節がおこなわれている *Six3* プロモーター領域、HPE 発症で重要な SHH 経路の細胞内伝達分子である Gli の結合配列をレポーター遺伝子上流に組み込んで実験をおこなった。これらのレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイで、SIX3 によって上昇する比活性が EYA4 によって更に増強されるという結果が得られたことから、SIX3 と EYA4 の間に機能的相互作用が示された。
8. 欠損タンパクを用いたルシフェラーゼアッセイの実験において、免疫沈降の結果で SIX3 とのタンパク複合体の形成が不可能な EYA4 の C 末側の ED 欠損変異体だけでなく、N 末側を大きく欠損した VR 変異体が SIX3 と機能的相互作用を示さなかったことから、N 末側の VR は SIX3 との機能的な相互作用において転写活性化能を有することが示された。
9. 培養細胞に SIX3 と EYA4 を同時に遺伝子導入することによって、単独では細胞質と核に存在する EYA4 が、SIX3 存在下において核に局在する傾向を認めており、細胞内においても相互作用認めることが示された。

以上、本論文は G-バンド法では正常核型を示す HPE 症例に対しておこなったマイクロアレイ解析によって 6 番染色体長腕の微少欠損を発見し、その欠損領域に含まれていた転写調節因子 *EYA4* を HPE 原因候補遺伝子と考えて既知の原因遺伝子 *SIX3* との相互作用を中心に解析した結果、これまで報告のなかった SIX3 と EYA4 の間の強い相互作用を明らかにしたものである。本研究は HPE の発症メカニズムについて大きな発見であっただけでなく、今後転写制御に関するメカニズムや脳神経系の発生メカニズムの解明に大きく寄与することが期待されるものであり、学位の授与に値するものである。