The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Isolation of a novel homeobox gene, pnx, by an expression cloning strategy in zebrafish
Author(s)	裵, 永己
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43731
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【18】

氏　　名	裵　　永　己（べ　よん　ぎ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16665　号
学位授与年月日	平成14年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学　位　論　文　名	Isolation of a novel homeobox gene, *pnx*, by an expression cloning strategy in zebrafish （ゼブラフィッシュ発現スクリーニング法による新規ホメオボックス遺伝子 *pnx* の単離）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　平野　俊夫 （副査） 教　授　遠山　正彌　　教　授　祖父江憲治

論　文　内　容　の　要　旨

【背景と目的】

脊椎動物の神経発生の過程において Nieuwkoop の 2 シグナルモデルが一般に受け入れられている。発生初期に形成されるオーガナイザー（両生類における Spemann オーガナイザー）からの誘導シグナルにより外胚葉において神経外胚葉が誘導される。誘導された神経組織は、後方中軸中胚葉あるいは非中軸中胚葉からのシグナル（後方化シグナルにより）により後方神経が誘導され、そのシグナルが抑制された部分が前部中枢神経へと運命決定されると考えられている。現在、神経誘導シグナルとして BMP の拮抗分子 Noggin や Choridin が重要な役割を果たしていることが明らかとなっており、後方化シグナルとして BMP、FGF、Wnt、レチノイン酸が候補として考えられている。しかし、後方化シグナルの下流で後方神経の形成に直接関与する遺伝子に関しては、殆ど明らかとなっていない。我らは後方神経の形成の過程において、神経の前後のパターン形成と神経発生に関与する遺伝子群に興味を持ち、ゼブラフィッシュの原腸胚の cDNA ライブラリーから発現スクリーニング法による新規ホメオボックス遺伝子 *pnx* の単離し、この遺伝子の後方神経の形成においての役割を検討、解析した。

【方法ならびに成績】

発現スクリーニング法によって新規の遺伝子を検索するために、ゼブラフィッシュの原腸胚から cDNA ライブラリーを作成し、SP6 プロモーターを含む pCS2 +SfiI プラスミドに組込んだ。250-300クローンを 1 プールとして、DNA を回収し、プールごとに SP6 RNA polymerase を用いて RNA を育成し、ゼブラフィッシュ受精卵に注入し、体節期・器官形成期まで発生させ体軸形成に異常を誘導し得るプールを検索した。異常を誘導したプールの内、神経パターニングに異常を誘導したプールを細分画し、単一遺伝子の同定を行った。スクリーニングの内、単一遺伝子の過剰発現で、目を含む前脳が縮小・欠失表現型を誘導する遺伝子を見出した。DNA シークエンスの結果、ホメオドメインを持ち、N 末端に転写抑制モチーフ（Engrailed homology 1）を有する新規遺伝子であった。遺伝子は、胞胚後期に予定外胚葉領域全体に発現した後、原腸初期からは予定後方神経領域に発現が限局したことから、posterior nervous system-specific homeobox gene（*pnx*）と名付けた。原腸胚後期から体節きにかけて、後脳の菱脳節 4 番より後方の原始神経細胞（primary neuron）に限局して発現した。後方誘導シグナルの候補である Squint, FGF の過剰発現、レチノイン酸処理、非中軸中胚葉により *pnx* の発現は異所的に誘導され、後方化シグナルに拮抗する因子として報告されている Dkk 1 および Antivin の過剰発現により *pnx* の発現は抑制された。Pnx の過剰発現

により、前方神経マーカーである *six3* の発現が減少・消失し、後方神経のマーカーである *gbx2* および *hoxal* の発現が前方領域にまで拡大することと分裂後初期神経（post-mitotic primary neuron）特異的遺伝子である、*deltaB* と *HuC* の発現が腹側方に拡張することから、神経の後方化を引き起こしたと考えられる。細胞株を用いた形質導入実験により、Pnx は転写抑制因子として機能しえることを見出した。また、Pnx の Eh1 ドメインと転写抑制共因子 Groucho と結合するのが確認できた。一方、Pnx の Eh1 ドメインを VP16タンパク質の転写活性化ドメインに置換した antimorphic Pnx 変異体と antisense morpholino-oligonucloteide の強制発現および住入によって、後方神経板から分裂後初期神経特異的遺伝子である、neurogenin と HuC の発現が抑制されることが認められた。これらの結果から Pnx は後側神経の形成に関与する新規の転写抑制因子であることが示唆された。

【総括】

発現スクリーニング法によって、ゼブラフィッシュの原腸形成中期に後方神経板と後方初期神経細胞で発現する新規ホメオボクス遺伝子 *pnx* を同定した。*pnx* 発現は非軸中内胚葉から誘導される。また、FGF、Nodal、Wnt、およびレチノイン酸シグナルにより調節されるのがわかった。Pnx は Groucho タンパク質と相互作用し転写抑制因子として働く Eh1 抑制ドメインを持っている。Pnx に VP16タンパク質の転写活性化ドメインを融合させた antimorphic Pnx と antisense morpholino-oligonucloteide の強制発現および住入によって後方神経板特異的遺伝子の発現を抑制した。この結果は Pnx が後方神経系の形成に関与する新規転写抑制因子であることを示唆した。

論文審査の結果の要旨

本研究は発現スクリーニング法により、ゼブラフィッシュ新規ホメオボックス遺伝子 *pnx* を単離し、その構造と機能を解析したものである。*pnx* は、原腸形成中期より予定後方神経外胚葉領域に発現し、後方原始神経に発現が限局する。*pnx* の発現は、非軸中内胚葉からの誘導シグナルによって制御されること、後方化シグナルに関与すると示唆されている FGF、Nodal、Wnt、レチノイン酸シグナルによって調節されることを明らかにした。Pnx は、Groucho タンパク質と相互作用し転写抑制因子として働くこと、Pnx の転写抑制活性化能は Pnx の後方神経形成に必要であることを明らかにした。また、内在性の Pnx の蛋白阻害実験により、Pnx がゼブラフィッシュ発生過程において後方神経形成に必要な遺伝子であることを明らかにした。それらを示すため本論文は緻密に計画され正確な分子生物学的および発生学的手法に裏付けられた実験に基づいておる。また総じて神経発生学分野にで最初期においての後方神経形成の分子機構の解明の研究に大きく貢献すると考えられる。さらに本研究はゼブラフィッシュのみならず、脊椎動物一般の中枢神経領域化のメカニズムといった発生学の基本命題を解き明かす上で、重要な貢献をするものと考えられる。以上から本論文は、博士の学位授与に値する。