The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The zinc finger gene fez-like functions in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons
Author(s)	平田, 務
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45462
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

【4】

氏　　名	平田　務（ひらた つとむ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　18910　号
学位授与年月日	平成16年4月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	The zinc finger gene *fez-like* functions in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons （zinc finger 遺伝子 *fez-like* は subplate 神経と視床皮質経路軸索の形成に関与している）
論文審査委員	（主査） 教　授　平野　俊夫 （副査） 教　授　八木　健　　教　授　遠山　正彌

論文内容の要旨

〔目　的〕

*fez*ファミリーに属する遺伝子 *fez-like* はC末側に6個のC2H2タイプ zinc finger ドメインを、N末側に Engrailed 型のリプレッサーモチーフを持つ転写抑制因子と考えられる。Fez-like の zinc finger ドメイン及びリプレッサーモチーフは脊椎動物において非常によく保存されている。これまでにゼブラフィッシュの変異体の解析より、ゼブラフィッシュ *fez-like* は視床下部におけるモノアミン作動性神経の形成に必須であることが示されているものの、哺乳類動物における役割はまだ明らかとなっていない。そこでマウスを用いて *fez-like* 遺伝子の機能の解析を行った。

〔方法ならびに成績〕

まずマウス *fez-like* の発現を in situ ハイブリダイゼーションで調べた。*fez-like* は胎生8.5日より前脳領域で強い発現が認められた。胎生9.5日では終脳背側および間脳領域で強い発現が認められ、胎生12.5日では大脳新皮質、腹側視床、視床下部などで発現が認められた。*fez-like* は、ノザンハイブリダイゼーションにより、成体においても脳、胸腺、胃、皮膚などに、その発現が認められた。

次に *fez-like* ノックアウトマウスを作成した。*fez-like* の蛋白翻訳領域を欠損させるようにターゲッティングベクターを構築し、ES細胞において相同組換えをおこし、対立遺伝子の一方を欠失させた（ヘテロ）ES細胞を作成した。このES細胞をマウス胚盤胞にインジェクションをしてキメラマウスを作成し、C57/BL6マウスとの交配によりヘテロ接合体を作成した。その後ヘテロ接合体同士の交配によりホモ接合体 *fez-like* ノックアウトマウスを作成し、解析を行った。

fez-like ノックアウトマウスは一見正常に生まれてきた。しかしながら3週齢頃から成長が止まり、4週齢前後で死亡した。餌を、固形物から液体状の物に変え飼育を行うと、正常に成長するものの、過剰運動性といった行動異常が認められた。そこで、中枢神経前部の組織学的解析を行った。胎生17.5日でNissl染色を行ったところ、ノックアウトマウスでは内包の形成異常、海馬采・脳弓の異常、大脳新皮質の中間層などに異常が認められた。内包は視床と大脳皮質をつなぐ神経軸索の経路であるので抗体染色、DiIによるトレーシングで視床皮質路の軸索を調べたところ、

ノックアウトマウスでは一部の軸索が大脳皮質へ向かうものの他の領域へと向かう軸索も認められた。視床皮質路形成の詳しいメカニズムについてはまだ明らかとなっていないものの、大脳新皮質 subplate 神経が重要な役割を担っていることが明らかとなっている。subplate 神経から視床への投射神経がパイオニアニューロンとして機能し、視床皮質路軸索は suplate 神経軸索を足場として皮質に軸索を伸ばすと考えられている（hand-shake モデル）。そこで subplate 神経を CSPG 抗体で染色したところ、ノックアウトマウスにおいては著しい減少が認められた。subplate 神経は胎生 10.5－11.5 日に発生（誕生）してくることが知られているので、胎生 11.5 に BrdU を取り込ませその時期に分化した細胞を追跡したところその後の時期において野生型とノックアウトマウスにおいて差は認められなかった。このことより *fez-like* は subplate 神経の分化に重要な役割を担っていることが示唆された。

〔総　　括〕

fez-like ノックアウトマウスでは視床皮質路に異常が認められた。この軸索経路の形成にはさまざまな分子が関与していると考えられているが、詳しいメカニズムについては明らかとなっていない。*fez-like* ノックアウトマウスでは subplate 神経の形成に異常が認められ、これまでに提唱されている hand-shake モデルと合致する結果が得られた。

fez-like が subplate 神経の形成にどのように関与しているかはまだ明らかとなっていないが、BrdU 取り込みの実験においてノックアウトマウスにおいても胎生 11.5 日に生まれた神経細胞が subplate 神経の位置に存在していることより、subplate 神経の誕生や移動ではなく、分化・維持に関与していると考えられる。今後 subplate 神経形成に関与している遺伝子 *Tbr1* や *Emx1/2*、*COUP-Tf1* との関係について詳しく解析することにより、subplate 神経の形成について理解が進むと考えられる。

論文審査の結果の要旨

終脳や間脳は行動、記憶といった高次機能を担う非常に重要な組織である。その構造は非常に複雑であるため、まだ発生、分化メカニズムなど未解明な部分が多い。申請者はマウスにおいて前脳特異的に発現している遺伝子 *fez-like* を単離し、ノックアウトマウスを作成することにより、*fez-like* が視床皮質路軸索の形成と大脳新皮質 subplate 神経の形成に重要な役割を担っていることを示した。

Fez-like は種を超え非常によく保存された C2H2 型 zinc finger 領域と Engrailed 型リプレッサー領域を有する転写抑制因子と考えられる。*fez-like* は発生の早い時期から前脳領域に特異的に発現していることを示した。また *fez-like* ノックアウトマウスを作成し、ノックアウトマウスは正常に生まれてくるものの、過剰行動性、摂食行動異常といった行動異常を示した。さらに前脳領域を解剖学的に解析をすることにより海馬采や内包の形成に異常が認められることを示した。内包は視床と大脳新皮質を結ぶ神経軸索路であり、*fez-like* ノックアウトマウスでは、抗体染色や DiI を用いたトレーシングより視床皮質路軸索が正常に走行していないことを示した。視床皮質路軸索の形成メカニズムはまだ明らかになっていないものの、hand-shake モデルが提唱されており、大脳新皮質 subplate 神経が重要な役割を担っていることが知られている。CSPG や GAP43 など subplate 神経に発現している抗体を用いて subplate 神経の形成を調べ、ノックアウトマウスでは subplate 神経が減少していることを示した。続いて subplate 神経が E11.5 頃誕生してくることより BrdU の取り込み実験で subplate 神経を調べたところ、BrdU 陽性細胞の数や細胞が存在する場所に関しては野生型とノックアウトマウスでは差が無いことを示した。このことより *fez-like* が subplate 神経の誕生や移動ではなく、分化に関与しているということが示唆された。

これまでに大脳新皮質の形成に関与する遺伝子として *Tbr1* や *Coup-tf1*、*Emx1/2* などが報告されている。*fez-like* とそのような遺伝子との関係を詳しく調べることにより大脳新皮質形成メカニズムの理解が進むと考えられる。

このようにさまざまな実験技術を用い、新規遺伝子の単離からノックアウトマウスを作成することによりその遺伝子の機能解析まで行い、*fez-like* が前脳の形成に関与していることを示しており、学位に値すると考えられる。