



Title	Analyses of Hematopoietic- and neurologic-expressed sequence 1 induced during newt retina regeneration
Author(s)	後藤, 達志
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47694">https://hdl.handle.net/11094/47694</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 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

氏名	後藤達志
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第20679号
学位授与年月日	平成18年9月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Analyses of Hematopoietic- and neurologic-expressed sequence 1 induced during newt retina regeneration (イモリの網膜再生過程で誘導される Hematopoietic- and neurologic-expressed sequence 1 の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 徳永 史生  (副査) 教授 小倉 明彦 教授 河村 悟 教授 西田 宏記 助教授 久富 修

### 論文内容の要旨

われわれヒトのような哺乳類では、脳や網膜などの中枢神経器官に損傷を受けた後、再生することは非常に困難である。それに対し、一部の有尾両生類は、成体であっても失った網膜を再生することが知られている。われわれが研究対象としているアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の場合、手術によって網膜を除去すると、眼球内に残された非神経細胞の網膜色素上皮細胞が色素を失い、網膜前駆細胞へと脱分化することが明らかになっている。この網膜前駆細胞からなる細胞層からやがて、網膜を構成する神経細胞やグリア細胞が分化し、手術後5~6週間で元と変わらない形態を持った網膜を完成する。我々は、網膜再生の初期過程、特に網膜色素上皮の脱分化に興味を持ち、分子メカニズムの解明を目指している。

初めに、ディファレンシャルディスプレイ法による解析を行い、網膜除去直後に比べて、2日、8日後の mRNA 量の増加が見られる約 750 塩基対の遺伝子断片を単離し、翻訳領域全長の塩基配列を決定した。分子系統解析により、この遺伝子はイモリの Hematopoietic- and neurologic-expressed sequence 1 (Hn1) であることが明らかとなった。Hn1 の類似遺伝子は、両生類だけでなく、他の脊椎動物や尾索動物 (ホヤ) や昆虫 (ショウジョウバエ、ミツバチ) といった無脊椎動物のゲノムにも存在していた。しかし、アミノ酸配列に既知のモチーフなどは見られず、過去の研究も少なかったため、機能はまったく不明であった。そこで、我々は Hn1 がコードするタンパク質 (HN1) を大腸菌で大量発現する系を構築し、HN1 を特異的に認識する抗体を作成し、この抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った。その結果、手術をしていない網膜 (正常網膜) においては、HN1 が外・内網状層や神経節細胞層に発現していた一方、網膜色素上皮細胞層にシグナルは見られなかった。この Hn1 の分布は、グリア繊維酸性タンパク質 (GFAP) の分布と一致しており、正常網膜において HN1 がグリア細胞に発現していることが示唆された。続いて、網膜再生過程における解析も行った。網膜除去後 10 日目には、脱分化過程にある網膜色素上皮細胞に HN1 の発現が見られ、その核への分布が観察された。網膜除去後 18 日目では、HN1 は再生網膜全体で発現しており、網膜前駆細胞でも HN1 の発現が維持されていることが示唆された。網膜除去後 27 日目には、正常網膜と同様に、HN1 の発現が網状層や神経節細胞層に局限していた。同様の解析を個体発生過程のイモリについても行った。その結果、発生過程の眼でも網膜前駆細胞で HN1 が発現していることが明らかとなり、また、発生が進むにつれて、再生過程と同様に網状層に局在することが分かった。

## 論文審査の結果の要旨

われわれヒトのような哺乳類では、脳や網膜などの中枢神経器官に損傷を受けた後、再生することは非常に困難である。それに対し、一部の有尾両生類は、成体であっても失った網膜を再生することが知られている。われわれが研究対象としているアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の場合、手術によって網膜を除去すると、眼球内に残された非神経細胞の網膜色素上皮細胞が色素を失い、網膜前駆細胞へと脱分化することが明らかになっている。この網膜前駆細胞からなる細胞層からやがて、網膜を構成する神経細胞やグリア細胞が分化し、手術後5~6週間で元と変わらない形態を持った網膜を完成する。後藤君は、網膜再生の初期過程、特に網膜色素上皮の脱分化に興味を持ち、分子メカニズムの解明を目指した。

初めに、ディファレンシャルディスプレイ法による解析を行い、網膜除去直後に比べて、2日、8日後の mRNA 量の増加が見られる約750塩基対の遺伝子断片を単離し、翻訳領域全長の塩基配列を決定した。分子系統解析により、この遺伝子はイモリの Hematopoietic and neurologic-expressed sequence 1 (Hn1) であることが明らかとなった。Hn1 の類似遺伝子は、両生類だけでなく、他の脊椎動物や尾索動物 (ホヤ) や昆虫 (ショウジョウバエ、ミツバチ) といった無脊椎動物のゲノムにも存在していた。しかし、アミノ酸配列に既知のモチーフなどは見られず、過去の研究も少なかったため、機能はまったく不明であった。そこで、我々は Hn1 がコードするタンパク質 (HN1) を大腸菌で大量発現する系を構築し、HN1 を特異的に認識する抗体を作成し、この抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った。その結果、手術をしていない網膜 (正常網膜) においては、HN1 が外・内網状層や神経節細胞層に発現していた一方、網膜色素上皮細胞層にシグナルは見られなかった。この Hn1 の分布は、グリア繊維酸性タンパク質 (GFAP) の分布と一致しており、正常網膜において HN1 がグリア細胞に発現していることが示唆された。続いて、網膜再生過程における解析も行った。網膜除去後10日目には、脱分化過程にある網膜色素上皮細胞に HN1 の発現が見られ、その核への分布が観察された。除去後18日目では、HN1 は再生網膜全体で発現しており、網膜前駆細胞でも HN1 の発現が維持されていることが示唆された。除去後27日目には、正常網膜と同様に、HN1 の発現が網状層や神経節細胞層に局限していた。同様の解析を個体発生過程のイモリについても行った。その結果、発生過程の眼でも網膜前駆細胞で HN1 が発現していることが明らかとなり、また、発生が進むにつれて、再生過程と同様に網状層に局在することが分かった。

これらの結果から、Hn1 が発生・再生過程での網膜形成に関与していることが推測された。マウスの末梢神経の再生直後にも Hn1 の発現が上昇するという報告があり、Hn1 の発現誘導は脊椎動物の神経が再生する時に共通して見られる現象かもしれない。また、これまでに、他の動物の発生で見られる網膜前駆細胞とグリア細胞との類似性が指摘されてきたが、それより前の段階の網膜色素上皮細胞の脱分化過程で、既にグリア細胞に近い性質の獲得が行われていることを今回の結果は示すと考えられる。さらに、網膜形成の初期に Hn1 は核に存在し、細胞分化に伴って、細胞質へと分布が変化していくことが網膜の発生・再生過程の両方で観察された。このような Hn1 の局在変化を生み出す機構や意義について、考察した。

この成果は発生・再生の研究において重要な成果であり、発生・再生の研究に大きく貢献するものである。よって後藤君提出の論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値有るものと認める。