



|              |  |
|--------------|--|
| Title        | 水晶体発生の初期過程におけるFoxe3, Sox2遺伝子の発現制御機構と転写制御因子SOX2の機能解析  |
| Author(s)    | 西郷, 有香   |
| Citation     | 大阪大学, 2008, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/49310">https://hdl.handle.net/11094/49310</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=" <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>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         | 西郷有香  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(理学)  |
| 学位記番号      | 第22184号   |
| 学位授与年月日    | 平成20年3月25日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>生命機能研究科生命機能専攻   |
| 学位論文名      | 水晶体発生の初期過程における <i>Foxe3</i> 、 <i>Sox2</i> 遺伝子の発現制御機構と転写制御因子 <i>Sox2</i> の機能解析 |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 近藤 寿人<br>(副査)<br>教授 八木 健 教授 山本 亘彦                                  |

### 論文内容の要旨

本論文では、水晶体発生の初期において *Foxe3* ならびに *Sox2* 遺伝子の発現を制御するエンハンサーを介した発現制御機構の解析を行った。さらに、*Sox2* 遺伝子 N-4 エンハンサーノックアウトマウスを作製し、転写制御因子 SOX2 の機能解析を行った。

第1章では、水晶体発生の初期における *Foxe3* 遺伝子の *Foxe3* 上流領域（エンハンサー）を介した発現制御機構の解析を行った。トランスジェニックマウスの作製実験の結果、*Foxe3* 上流領域中の水晶体と脳で組織特異的な発現を担うエレメントを示した。さらに、水晶体特異的 Sip1 ノックアウトマウスの表現型が *Foxe3* 突然変異マウスの表現型と酷似しており、水晶体特異的 Sip1 ノックアウトマウスの水晶体での *Foxe3* 遺伝子の発現が低下していたため、転写制御因子 Sip1 による *Foxe3* 遺伝子の発現制御機構の解析を行った。ニワトリ初代培養細胞を用いたトランسفエクション実験を行った結果、組織特異的な発現を担うエレメントと異なるエレメントで、SIP1 が *Foxe3* 上流領域を介して転写を活性化することを示した。加えて、Smad 結合タンパク質である SIP1 と BMP シグナル系の介在因子 Smad8 と共に導入した場合、SIP1 単独導入に比べ転写活性がより大きく上昇することを示した。以上より、SIP1 による *Foxe3* 遺伝子の発現制御機構は、組織によらず普遍的な活性化であることが示唆された。これは、転写抑制因子として報告されている SIP1 が転写活性化に関わる可能性を示した初めての実験結果である。さらに、Smad 単独では活性化が起きないことから、SIP1 と Smad8 の相互作用により *Foxe3* 遺伝子の転写が活性化されることが示唆された。これは、SIP1 と Smad8 が共同して *Foxe3* 上流領域を介し転写活性化に働く可能性を示した初めての実験結果である。

第2章では、水晶体形成時に *Sox2* 遺伝子の発現を制御するニワトリ N-4 エンハンサーの活性化機構の解析を行った。ニワトリ胚へのエレクトロポレーション実験の結果、頭部外胚葉や中枢神経系で組織特異的な活性化に関わるエレメントを示した。また、組織によらず普遍的な活性化に関わるエレメントも示した。次に、示したエレメント内には核内レセプター結合配列が存在するため、核内レセプターのリガンドの一つであるレチノイン酸への応答を検討した。ニワトリ胚への滴下実験の結果、レチノイン酸が、菱脳でのニワトリ N-4 エンハンサーの活性化に関わる可能性を示した。今後、エレメントに相互作用する因子が同定できれば、ニワトリ N-4 エンハンサーを介した *Sox2* 遺伝子の発現制御機構の一端が明らかになると思われる。

第3章では、水晶体形成時に発現する *Sox2* 遺伝子の機能解析のため、マウス N-4 エンハンサーノックアウトマウスの作製を試み、その解析を行った。その結果、眼が小さいという表現型のホモ欠失 ( $\Delta N4/\Delta N4$ ) マウスが得られた。次に、HE 染色法により眼の形態を観察した結果、ホモ欠失マウスの水晶体の大きさが、野生型に比べ小さいことが示された。さらに、抗体染色実験により、水晶体の主要構成蛋白質であり、水晶体纖維が合成するクリスタリンの分布を観察した結果、ホモ欠失マウスの水晶体のクリスタリンも、野生型と同様に分布していることが示された。クリスタリンの分布が正常にも関わらず、水晶体の大きさが小さい原因には、2つの理由が考えられる。1つは、神経網膜の異常の影響が考えられる。以前の報告で、SOX2 が神経網膜の前駆体のコンピテンスを量依存的に制御しており、神経網膜で SOX2 を欠失させたマウスで眼が小さいという表現型が得られたことが報告されている。マウス N-4 エンハンサー欠失により神経網膜で *Sox2* 遺伝子が適切に低下するならば、神経網膜に異常があらわれ水晶体が小さくなる可能性は高い。もう一つの理由としては、水晶体分化の異常が考えられる。

第4章では、マウス N-4 エンハンサーの活性とその応用を試み、マウス N-4 エンハンサーの発現制御機構の解析を行った。トランスジェニックマウスの作製実験の結果、マウス N-4 エンハンサーの活性化した組織は、ニワトリ N-4 エンハンサーで活性化される領域と類似することが示された。次に、第2章のニワトリ N-4 エンハンサーの解析を参考にしながら、マウス N-4 エンハンサーの一部を欠失、あるいは変異を導入し、トランスジェニックマウスの作製を行った。その結果、活性のなかった耳胞や前脳での組織特異的な活性化が追加された場合や、逆に活性のあった脊髄での組織特異的活性のみが抑制された場合が示された。このように、欠失あるいは変異マウス N-4 エンハンサーを用いることで、既存にはない組織特異的な遺伝子欠失マウスを作製することができると思われる。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、眼を中心とした感覚器発生を明らかにするための、水晶体形成の初期過程における転写制御システムに関する研究の成果である。申請者はまず、水晶体纖維分化にかかわる *Foxe3* 遺伝子の Sip1 による制御を明らかにした後、より初期の、頭部外胚葉から水晶体原基が生じる過程の研究をすすめた。

水晶体をはじめとする感覚器の原基の成立には、それに先立つ頭部外胚葉での *Sox2* 遺伝子の発現が重要であると考えられていた。その頭部外胚葉での *Sox2* 遺伝子の発現には、多数のエンハンサーの一つである N-4 エンハンサーが関与する。申請者は次の2つの研究を行った。(1)N-4 エンハンサー自身が受けける制御機構を解析すること。(2)N-4 エンハンサーのノックアウトマウスを作出して、頭部外胚葉における転写制御因子 SOX2 の活性が水晶体原基成立過程にどのように関与するかを評価すること。

第1の研究では、ニワトリ胚へのエレクトロポレーションを活用して、N-4 塩基配列に含まれる制御エレメントを網羅的に解析し、頭部外胚葉でのエンハンサー活性に必須なエレメントを抽出することに成功し、そのなかに核内受容体の結合配列様のものが繰り返して出現することを示した。

第2の研究では、N-4 エンハンサーのノックアウトにより頭部外胚葉での SOX2 の活性を低下させると、正常よりも小さな水晶体が発生し、その結果成体では小眼になることを示した。

これらの研究成果は、水晶体発生の初期過程についてこれまで未知であった制御機構を示す優れたものであり、学位論文に相応しいものと認める。