

氏 名 湯 浅 純 一

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大乙第41号

学位授与の日付 平成9年3月24日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目 ニワトリ網膜－視蓋投射系における領域特異的な神経結合形成の
分子機構

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 鈴木 義昭
教 授 堀内 嵩
教 授 山森 哲雄
教 授 野田 昌晴

脳・神経系においては、ある領域内での神経細胞の2次元的位置が他の領域の2次元的位置に1対1に対応（保存）した形で神経結合が形成される「投射地図」はさまざまな場所で見い出すことができる。このような領域特異的な神経結合がどのようにして形成されるのかを解明することは神経発生学の根本問題の一つである。網膜から伸長する視神経の視覚中枢（視蓋）への投射系は、この神経結合形成のメカニズムを理解するためのモデルシステムとして歴史的によく研究されてきた。網膜－視蓋投射系では、眼の鼻側（前側）の視神経は反対側の視蓋の尾側（後側）領域に投射し、眼の側頭側（後側）の視神経は視蓋の吻側（前側）領域に投射している。また背側、腹側の視神経は視蓋のそれぞれ腹側、背側に投射している。したがって、眼のような外見上均質に見える器官においても鼻－側頭軸並びに背腹軸について何らかの「違い」があり、R. Sperryが「化学親和説」として提唱したように各軸に沿って非対称な発現パターンを示す分子がこのような神経結合の領域特異性を規定していることが予想されてきた。しかしながら、この網膜－視蓋投射系において、どのような分子メカニズムによって領域特異的な神経結合が形成されるのかはまだ解明されていない。

著者は、ニワトリ胚網膜の鼻側、側頭側領域からそれぞれmRNAを抽出し、cDNAサブトラクションと差別的スクリーニングを組み合わせて行うことにより、鼻側領域に特異的に発現する分子を1つ、側頭側領域に特異的に発現する分子を4つ見出した。興味深いことに、鼻側から単離された分子と、側頭側から単離された4分子のうちの1つは、ともにwinged-helixと呼ばれるDNA結合ドメインを有する転写因子ファミリーに属していた。網膜の鼻側から得たN-62-5分子、側頭側から得たT-14-6分子は、それぞれげっ歯類から単離されたBrain Factor-1(BF-1)、Brain Factor-2(BF-2)のニワトリホモログであると推定され、CBF-1、CBF-2(Chicken Brain Factor)と命名した。

ホールマウントin situハイブリダイゼーションを行ったところ、CBF-1、CBF-2は眼胞（眼の原基）ができて間もない時期（Embryonic day 2; Hamburger-Hamiltonの発生段階表によるとステージ10-11）には既に、眼胞の前後軸（後の網膜の鼻－側頭軸に対応する）方向で領域特異的な発現を示した。網膜の鼻－側頭軸についての領域特異性がステージ11には既に決定されていることを考慮に入れると、これら2つの転写因子が網膜の鼻－側頭軸を決定し、標的下流分子の発現を調節することにより視神経の視蓋への投射の領域特異性を規定していることが推定された。

そこでこのことを実証するため、CBF-1、CBF-2のcDNAを複製可能型のレトロウイルスベクターに組み込み、2日目ニワトリ胚に注入し、網膜内で異所的に（全体的に）強制発現させた。この場合、CBF-1を網膜の側頭側で異所的発現させることにより、本来は視蓋の吻側に投射する側頭側の視神経が、鼻側の性質を有するようになり視蓋の尾側に投射すること、またCBF-2の異所的発現によっては逆の現象が起こることが期待される。投射がほぼ完成していると考えられる19-20日胚において、一部の視神経軸索を蛍光色素Dilを用いて標識、観察したところ、期待どおりの結果が得られた。

Sperryは、網膜－視蓋投射系における領域特異的な神経結合の成立を説明するメカニズ

ムとして、網膜と視蓋の2次元的位置の標識は独立に決定され、化学的親和性によってその結合が成立するという「化学親和説」を提唱した。この仮説にはその後修正が加えられ、現在ではそのような位置標識は勾配をなして分布している分子によるものと考えられている。これまでに、網膜あるいは視蓋の前後軸についてのいくつかのトポグラフィック分子（領域特異的に、あるいは勾配をなして発現している分子）がさまざまな方法によって同定されてきた。そのいずれの網膜内トポグラフィック分子に比べてもCBF-1、CBF-2の発現開始時期が早いこと、また、異所的発現実験の結果から、この2つの転写因子が網膜の鼻-側頭軸に沿った位置標識の決定機構の中で、大本の遺伝子（マスター遺伝子）として働いている可能性が高い。したがって、これら2つの転写因子が、視蓋上に勾配状に存在する位置標識を認識する視神経軸索上のレセプター系の発現を調節することにより、最終的には、投射の領域特異性を規定していると推測される。

審査結果の要旨

湯浅君は、ニワトリ網膜－視蓋投射系の分子機構の研究の一端として、CBF-1およびCBF-2のcDNAを単離・同定することに成功し、これら遺伝子の発現状態の解析ならびに人為的操作によって発現パターンが変化することを明らかにした。*In situ*ハイブリダイゼーションによりCBF-1, -2は眼胞ができた間もない時期には既に、眼胞前後軸方向で領域特異的な発現を示すことを明らかにした。このことから、これらの転写因子が網膜の鼻・側頭側軸を決定し、視神経の視蓋への投射は領域特異性を規定しているものと推定した。これを実証するため、レトロウイルスベクターを用いた異所的強制発現の実験を行い、予想通りの結果を得た。

これらの結果は、既にNature382(1996)に発表されており、高い評価を得ていることでもあり、学位授与するに十分な業績であると判定した。

試験結果については、論文内容の発表につづき、実験結果、その背景となる知識、研究に用いられる技術の詳細などを口頭により審査を行った。その結果、いずれの設問に対しても適切な解答が得られた。また、英語に関する学力については、Nature382, 632-635(1996)を筆頭著者として発表している点から見て、十分な学力を有すると判定した。