

氏 名 鈴木 亮子

学位 (専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第540号

学位授与の日付 平成13年3月23日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 Identification of RALDH-3 , a novel retinaldehyde
dehydrogenase, expressed in the ventral region
of the retina

論文審査委員 主 査 教授 上野 直人
教授 諸橋 憲一郎
教授 山森 哲雄
教授 野田 昌晴
教授 藤澤 肇 (名古屋大学)

論文内容の要旨

To understand the molecular basis for the establishment of regional specificity during retinal development, it is important to make up a catalogue of the molecules with asymmetrical expressions in the developing retina. To address this issue, a large-scale screening using Restriction Landmark cDNA Scanning (RLCS) was performed along the antero-posterior or dorso-ventral axis in the chick retina. A number of molecules, which showed asymmetrical expression along the respective axes in the developing retina, were isolated. Among them, she identified two aldehyde dehydrogenases; one was a ventral retina-specific novel clone *V/BgIII#1*, and the other was already known dorsal retina-specific retinaldehyde dehydrogenase 1 (RALDH-1). This dissertation mainly describes the identification and characterization of the *V/BgIII #1*.

In the developing retina, a retinoic acid (RA) gradient (ventral high-dorsal low) along the dorso-ventral axis is considered to be important for the regional specification, especially for the ventral retinal formation. For example, deficiency of vitamin A in rat embryos results in abnormalities in eye formation: the eyes are small or missing, and mainly a reduction in size of the ventral half is observed. Symptoms similar to vitamin A deficiency have been observed in double knock-out mice for RA receptors, which the ventral half of the retina is reduced in size. The RA gradient has been thought to result from the asymmetrical distribution of retinaldehyde dehydrogenases: one is RALDH-1, and the other is a ventral retina-specific enzyme, which has not been cloned. First, she addressed whether *V/BgIII#1* is the ventral RA-generating enzyme. Using a retinoid-responsive reporter cell line, she confirmed that *V/BgIII#1* has the activity to produce RA from retinaldehyde. She thus concluded this molecule as the ventral-specific RALDH, and named it retinaldehyde dehydrogenase 3 (RALDH-3). A search for similar sequences in DNA databases showed that RALDH-3 has the highest similarity (86% identical) with human aldehyde dehydrogenase 6 (hALDH6). The mouse homologue of *V/BgIII#1* was then isolated from a neonatal mouse eye cDNA library. Chick and mouse RALDH-3, and hALDH6 all consist of 512 amino acid residues and showed high similarity with each other: the mouse RALDH-3 is 85%, 94% identical to the chick and hALDH6, respectively. The mouse *Raldh-3* expression was detected by RT-PCR in some adult mouse tissues including kidney, stomach and salivary gland, which are known to express *hAldh6* at high levels. This suggests that RALDH-3 is the orthologue of hALDH6.

Next, she performed *in situ* hybridizations to gain insight into the spatio-temporal expression of *Raldh-3* and *Raldh-1* during chick and mouse embryonic eye development. *Raldh-3* was expressed first in the surface ectoderm overlying the ventral portion of the prospective eye region, and then in the ventral retina. In mouse, *Raldh-3* expression was also observed in the invaginating lens pit. On the other hand, the *Raldh-1* expression began in the dorsal retina nearly at the same time with *Raldh-3* expression in the ventral retina. The *Raldh-1* expression in chick was restricted to the dorsal retina throughout the development,

while in mouse it was also observed in the ventral retina and lens vesicle at the later developmental stage. The *Raldh-3* expression in the lens pit seemed to be replaced by the *Raldh-1* in the lens vesicle. The occurrence of two RALDH genes that are controlled differently may thus underlie the specific development of the dorsal and ventral retina.

The paired-like homeobox-containing transcription factor Pax6 is known to be a master gene of the eye development. Recently, it was reported for *Pax6* mutant mice that the local production of RA in the eye region and nasal region is disrupted. This suggests that *Pax6* regulates retinoid formation in the eye region as well as in the nasal region. She therefore examined the expressions of *Raldh-1* and *Raldh-3* in *Pax6* mutant rat (*rSey*²) embryos. She found that E11.5 *Pax6* mutants are devoid of *Raldh-3* expression. At E13.5, no *Raldh-1* expression was detected in the mutant, though strong *Raldh-1* expression was observed in the dorsal retina in the wild type.

In summary, she identified a novel RALDH, RALDH-3, which is responsible for RA production in the ventral eye region. The results obtained in this study indicated that: 1) *Raldh-3* expression in the surface ectoderm is responsible for the RA-gradient formation along the dorso-ventral axis during the early eye development, 2) *Raldh-1* and *Raldh-3* are individually involved in the dorsal and ventral retinal development, respectively, 3) mouse *Raldh-1* and *Raldh-3* might have some additional roles in the eye development as compared with chick orthologues, and 4) *Raldh-3* is a downstream target of *Pax6*, and *Pax6* exerts its functions at least in part through RA produced by RALDH-3.

論文の審査結果の要旨

視覚の認知は視神経が網膜から厳密に制御された神経連絡によって正確に脳へ投射されることによってなされる。この神経回路の形成には網膜の領域特異性、すなわち、前後軸並びに背腹軸に沿った機能的差異が決定的な役割を担っていると考えられている。したがって網膜の発生において両軸方向の非対称性獲得の機構を明らかにすることは視神経回路形成のメカニズム解明につながる神経生物学の重要な課題の一つである。この非対称性獲得の基盤は非対称な遺伝子発現に求めることができる。申請者の所属する研究室では網膜の前後・背腹で異なる発現を示す遺伝子の網羅的解析を行っている。

申請者は背腹軸に沿って差別的に発現する遺伝子を探索するために RLCS (Restriction LandmarkcDNA Scanning)法を駆使して網膜の腹側で特異的に発現するレチナルアルデヒド脱水素酵素 3 遺伝子 (RALDH-3) を見いだした。さらに、培養細胞系を用いて RALDH-3 遺伝子産物のレチノイン酸合成活性を証明したほか、眼発生過程における RALDH-3 の遺伝子発現に関して詳細な研究を行った。その結果、RALDH-3 はニワトリ、マウス胚において眼胞形成に先だって表皮外胚葉の眼予定領域に発現し、その後網膜腹側に限局することや、水晶体、鼻腔などにも発現することを明らかにした。また、その発現は関連遺伝子で網膜背側に発現する RALDH-1 より早いことを示した。

次に申請者は背側に限局した遺伝子発現調節の手がかりを得るために、眼形成に必須の役割を担っている Pax6 遺伝子との相関について検討し Pax6 機能欠損突然変異体マウスの眼胞ではその発現が消失することから、RALDH-3 は遺伝子の下流で機能する遺伝子であり、その遺伝子発現が Pax6 によって直接あるいは間接的に制御されている可能性を示した。

レチノイン酸は網膜の腹側から背側に濃度勾配を形成し、網膜の背腹パターンの形成に寄与していると考えられる。本研究は RALDH-3 がレチノイン酸濃度勾配の確立に寄与する網膜背腹非対称獲得の鍵分子であることを強く示唆し、視神経投射メカニズム解明に大きく貢献するものであり、学位論文に値するものである。

学位論文として提出された研究結果について口頭発表の後、5名の審査委員が本博士論文における計画の立案、実験方法、結果の考察および関連分野の知識に関する質疑応答を行った。申請者のそれら質疑への応答は適切であり、当該分野の基礎的知識も十分に有していると判断された。学位論文が英語で書かれていることや、その内容を含む原著論文が国際誌にすでに発表されていることから英語に関する能力についても十分であると判断した。論文の内容やこれらの試験結果から、申請者は学位を受けるに十分な資格を有しているものと判断した。