

氏 名 高 橋 弘 雄

学位 (専攻分野) 博士 (理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第725号

学位授与の日付 平成15年9月30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 CBF-1 Controls the Retinotectal Topographic Map along
the Anteroposterior Axis through Multiple Mechanisms

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	長濱 嘉孝
	教授	野田 昌晴
	教授	諸橋 憲一郎
	教授	山森 哲雄

Topographic maps with a defined spatial ordering of neuronal connections are a key feature of the brain's organization. The most widely used model for studies of the formation of topographic maps is the retinotectal projection. Chick brain factor-1 (CBF-1), a nasal retina-specific winged-helix transcription factor, is known to prescribe the nasal specificity which leads to the formation of the precise retinotectal map especially along the antero-posterior (A-P) axis. However, the molecular mechanisms by which CBF-1 controls the expression of topographic molecules have not been elucidated. In the present study, to gain insight into the downstream target genes of *CBF-1*, he employed electroporation of a retroviral vector carrying the *CBF-1* gene into the optic vesicle, and examined effects of the misexpression of *CBF-1* on the expression of topographic molecules and other asymmetrically distributed molecules. The in ovo electroporation of retrovirus allows the immediate and sustained expression of a transgene. Since endogenous *CBF-1* begins to be topographically expressed prior to Hamburger-Hamilton (HH) stage 11 in native embryos, at which stage the polarity along the nasotemporal (N-T) axis appears to be determined, this in ovo electroporation system is suitable for the functional study of *CBF-1*. Here, he shows that ectopic expression of *CBF-1* in the temporal retina represses expression of *EphA3* and *CBF-2*, and induces that of *SOHo-1*, *GH6*, *ephrin-A2*, and *ephrin-A5*. A chimeric protein that consists of an even-skipped repression domain and CBF-1 DNA binding domain exerted the same effects as the wild-type CBF-1 on the expression of *SOHo-1*, *GH6*, *EphA3*, *CBF-2*, and *ephrin-A5*, but not on that of *ephrin-A2*. On the other hand, a CBF-1 mutant deficient in DNA-binding activity exerted the same effects as the wild-type CBF-1 on the expression of *SOHo-1*, *GH6*, *EphA3*, *CBF-2*, and *ephrin-A2*, but not *ephrin-A5*. These results suggest that *CBF-1* controls *ephrin-A5* by a DNA binding-dependent mechanism, *ephrin-A2* by a DNA binding-independent mechanism, and *CBF-2*, *SOHo-1*, *GH6*, and *EphA3* by dual mechanisms.

Our lab recently identified a novel secreted molecule, Ventroptin, which is an antagonist of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) in the retina, and demonstrated that Ventroptin is implicated in the retinotectal topographic projection along both the dorsoventral (D-V) and A-P axes. Asymmetrical expression of *Ventroptin* along the N-T axis regulates the graded expression of *ephrin-A2* along this axis but not of *ephrin-A5* or *EphA3* in the retina, which is associated with the retinotectal mapping along the A-P axis. *Ventroptin* expression is ventral-specific, complementary to the dorsal-specific *BMP-4* expression at the early developmental stage of the retina. However, along with a decline of *BMP-4* expression from the dorsal retina, the expression of *Ventroptin* forms a double-gradient pattern along the two axes from E6. This suggests that a member of the TGF- β family other than *BMP-4* should appear in a temporal high-nasal low gradient along the N-T axis with a complementary pattern to the *Ventroptin* expression. In this study, he found that a TGF- β family member, *BMP-2*, is expressed in a pattern complementary to that of *Ventroptin*, with a double-gradient along the two axes from E6 onward. *Ventroptin* antagonizes *BMP-2* as well as *BMP-4*. Misexpression of *BMP-2* in the developing retina repressed expression of *Ventroptin* and *ephrin-A2*. Moreover, he demonstrates that *CBF-1* perturbs *BMP-2* signaling through a DNA binding-independent mechanism, which resultantly causes the induction of *ephrin-A2* expression. These results thus suggest that *CBF-1* is located at the top of the gene cascade for the regional specification along the N-T axis in the retina and distinct BMP signals play pivotal roles in the topographic projection along both axes.

論文の審査結果の要旨

個体発生過程における網膜内領域特異化は、後に起こる領域特異的視神経結合形成の基盤である。Chick brain factor-1 (CBF-1)は、ニワトリ網膜において鼻側領域特異的発現を示す winged-helix 型の転写因子で、網膜内の領域特異化に重要な役割を担っていると考えられている。しかし乍ら、CBF-1 による網膜領域特異化の制御機構についてはほとんど不明であった。申請者は、組換えレトロウイルスベクターを、エレクトロポレーション法を用いてニワトリ網膜に導入することによって、導入遺伝子の発生初期からの持続的な発現を可能とした。この方法を用いて CBF-1 による網膜領域特異化の制御機構について検討を行った。

申請者は、網膜耳側への CBF-1 の強制発現により、網膜鼻側に特異的発現を示す SOHo-1、GH6 および ephrin-A2、ephrin-A5 の発現領域の耳側への拡大が生じ、逆に耳側特異的発現を示す CBF-2、EphA3 についてはその発現が抑制される事を明らかにした。また、CBF-1 によるこれら遺伝子の制御機構についても検討を加え、ephrin-A5 は DNA 結合依存的な機構によって、ephrin-A2 は DNA 結合非依存的な機構によって、SOHo-1、GH6、CBF-2、EphA3 については2つの制御機構を併用して、制御している事を明らかにした。さらに申請者は、網膜において E6 から、BMP-2 が BMP の中和分子である Ventroptin と相補的に、前後、背腹の両軸方向に対して勾配を持って発現を始める事を明らかにした。Ventroptin は、BMP-2 に対しても BMP-4 に対すると同様の中和活性があることを示した。さらに、BMP-2 と Ventroptin の相互作用が、ephrin-A2 の前後軸方向の領域特異的な発現を制御する事を示し、CBF-1 が BMP-2 の細胞内情報伝達を直接的に阻害することが DNA 結合非依存的制御の実体であることを明らかにした。

以上のように、本研究は、CBF-1 が網膜領域特異化の遺伝子カスケードのトップに位置し、網膜の前後軸方向の領域特異性を支配するマスタージーンであることを示した。CBF-1 の複数の制御機構を明らかにしたことは、CBF-1 の下流遺伝子の多様な発現パターンを説明する重要な知見である。また、異なる BMP シグナルが前後、背腹の2つの軸における領域特異化において中心的な役割を担っている事を明らかにしたことは大きな発見である。前後軸方向の網膜領域特異化の分子機構については、これまで断片的な知見しか得られておらず、本研究において初めて CBF-1 を中心とする前後軸方向の領域特異化の分子機構が明らかとなった。この意味で学術的な重要性は高く、学位に値すると判断した。

口頭発表もよくまとまっており、審査会での質疑に対しても的確に応答したことから、申請者の本研究に対する十分な考察と関連分野に関する理解が確認された。また、本論文は適正な英文で記述されており、本研究内容の掲載論文が国際誌に受理されていることから、申請者の英語能力についても博士に相応しいと判断した。以上審査の結果、本学位論文申請者は、学位授与にふさわしい水準に達していると判定した。