



# 論 文 内 容 要 旨

POU 転写因子は POU-specific domain 及び POU homeo domain からなる DNA 結合部位 (POU domain) を持ち, 特徴的な octamer 塩基配列に結合する能力を有する一群の転写調節因子の総称であり, POU domain の構造の相同性により現在 6 つのクラスに分けられている。クラス III POU 転写因子の一つである Brn-2 は, 発生の過程を通じて神経特異的に発現が見られることや, *in vitro* における神経細胞の分化過程の解析結果から神経系の発生に重要な役割を果たしていると考えられている。我々は, 哺乳類神経系の発生に於けるこの Brn-2 遺伝子の役割の解明を目的として, ジーンターゲティング法を用いて Brn-2 欠損マウスを樹立し, その解析を行った。

## 1. 方 法

ジーンターゲティングは以下のように行った。Brn-2 遺伝子の coding region の 60% (POU domain を含む) を neo<sup>r</sup> 遺伝子により置き換えた置換型のターゲティングベクターを作成し, これをエレクトロポレーション法にて ES 細胞に導入した。相同組換えにより変異が導入されれば Brn-2 の POU domain を含む領域が neo<sup>r</sup> 遺伝子により置き換えられ, Brn-2 の正常な機能が欠失すると予想された。約 300 個の G418 耐性クローンをサザンブロッティング法でスクリーニングした結果, 5 クローンの相同組換え体を得て, さらに blastocyst injection 法により 2 クローンから Brn-2 欠損マウスを樹立することに成功した。

## 2. 結 果

Brn-2 欠損マウスの解析から, ヘテロ接合体は何ら異常を示さないが, そのホモ接合体は全て生後 10 日以内に死亡することが判明した。その中枢神経系の組織学的解析から, このホモ接合体マウスでは, 視床下部の室傍核と視索上核が欠損しており, これらの神経核を形成する大細胞性ニューロンであるバゾプレッシンニューロンとオキシトシンニューロンが欠失していることを確認した。下垂体後葉は大細胞性ニューロンの神経軸索により形成されるが, ホモ接合体では大細胞性ニューロンの完全な欠失の結果として下垂体後葉が欠損していることも判明した。さらに, カルシウム結合蛋白である Spot 35 をマーカーとして用いて大細胞性ニューロンの発生過程を解析したところ, ホモ接合体ではこれらのニューロンは脳室壁において正常に発生するものの, 胎生 12.5 日前後 (室傍核及び視索上核に向かって遊走している段階) で死滅することが判明し, Brn-2 が胎生期のこの時期のニューロンの生存に必須であることが示された。また, 室傍核には

コルチコトロピン放出因子 (CRF) とサイロトロピン放出ホルモン (TRH), 室周囲領域にはソマトスタチン (SS) などの下垂体前葉機能を制御する視床下部ホルモンを産生分泌する小細胞性ニューロンが存在するが, ホモ接合体ではこれらの小細胞性ニューロンもまた欠失していることが判明した。さらに我々はヘテロ接合体マウスで, 大細胞性ニューロンにおけるバゾプレッシン及びオキシトシンの発現が野生型の半分に減少していることを発見した。これらの結果から Brn-2 はこれらの視床下部ニューロンの発生と機能を多角的に制御している因子であることが強く示唆された。

本研究により *in vivo* における Brn-2 の機能が明らかとなり, 視床下部の大細胞性ニューロン及びいくつかの小細胞性ニューロンの発生・発達のみならず, その機能の発現において Brn-2 が必須であることが判明した。

## 審査結果の要旨

生体の発生や分化を制御していると考えられる各種の転写因子のうち、POU 転写因子は POU-specific domain 及び POU homeo domain からなる DNA 結合部位 (POU domain) を持ち、特徴的な octamer 塩基配列に結合する能力を有する一群の転写因子の総称であり、POU domain の構造の相同性により現在、6 クラスに分類されている。

クラス III POU 転写因子に属する Brn-2 は、発生の過程を通じて神経特異的に発現がみられることや、*in vitro* においてある種の胎児性癌細胞が神経細胞へと分化する際にその発現が誘導されることから、神経系の発生に重要な役割を果たしていると考えられているが、本遺伝子の詳細な機能は不明である。

ジーンターゲット法は、マウス胚由来未分化細胞 (ES 細胞) を用いて相同組換えによる特定の遺伝子の不活性化を行い、さらにその細胞由来のノックアウトマウスを作製する方法であり、ある特定の遺伝子の機能を解析する上で非常に優れている。本研究では、哺乳類神経系の発生における Brn-2 遺伝子の役割を解明するために、ジーンターゲット法を用いて Brn-2 欠損マウスを樹立し、その解析を行った。

Brn-2 欠損マウスのホモ接合体は、すべて生後 10 日以内に死亡し、視床下部の室傍核と視索上核の欠損、これらの神経核を形成する大細胞性ニューロンである vasopressin neuron と oxytocin neuron の欠失、ならびに下垂体後葉の形成不全が組織学的解析により明らかとなった。さらに、spot35 を用いた解析により、これらのニューロンは、脳室壁から室傍核及び視索上核に向かって遊走している胎生 12.5 日前後に死滅することが判明し、Brn-2 が発生初期のニューロンの生存に必須であることが示された。また、室傍核に存在する corticotropin releasing hormone, thyrotropin releasing hormone ならびに第 3 脳室周囲領域の somatostatin などを分泌する小細胞性ニューロンもホモ接合体では消失していた。

一方、組織学的には全く異常を示さないヘテロ接合体マウスでは、大細胞性ニューロンにおける vasopressin 及び oxytocin の発現量が野生型の半分に減少していた。

以上の結果より、Brn-2 は、視床下部に存在する大細胞性ニューロン及び一部の小細胞性ニューロンの発生・分化だけではなく、これらのニューロンの機能発現に対して多角的に制御している因子であることが判明した。

本研究は、世界で初めて Brn-2 遺伝子欠損マウスを樹立し、その詳細な解析により、*in vitro* での研究では解明できなかった Brn-2 遺伝子の機能を究明したもので、極めて独創的かつ優れた研究であり、十分学位論文に値するものである。