

氏名・(本籍)	よこ 横	うち 内	ゆう 裕	じ 二
学位の種類	博 士 (理 学)			
学位記番号	理博第1279号			
学位授与年月日	平成4年3月27日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻			
学位論文題目	ニワトリ胚肢芽パターン形成に関与するホメオボックス遺伝子群の解析			
論文審査委員	(主査)			
	教 授 竹 内 拓 司		教 授 四 釜 慶 治	
			助 教 授 井 出 宏 之	
			助 教 授 黒 岩 厚	
	(東北大・抗研)			

論 文 目 次

第一章 序論

第二章 肢芽発生時における Chox-1, Chox-4 クラスターのホメオボックス遺伝子群の発現パターンの解析

第三章 Chox-1/Chox-4 遺伝子群に対する位置情報源の作用

第四章 ホメオボックス遺伝子 Msx-1 の正常発生および ZPA/RA 処理後の発現パターンの解析

第五章 ホメオボックス遺伝子 Msx-2 の正常発生および AER/ZPA 移植時の発現パターンの解析

第六章 総合考察

論文内容要旨

第一章

肢芽軟骨パターン形成過程では、脊椎動物の発生において普遍的に観察される分節構造の形成と、位置特異性の決定という2つの特徴が顕著に観察される。この過程を司る機構を明らかにする事により、脊椎動物パターン形成における普遍的な機構の解明に至る道が開かれることが期待される。

第一の特徴である肢芽軟骨の分節構造は、前軟骨凝集塊の分枝、分節過程の組み合わせによって形成されることが明らかにされていたが、その分子機構については全く明らかにされていない。第二の特徴である位置特異性の決定は次のような機構によって行われると提案されてきた。前後軸上の位置特異性は極性活性化帯（ZPA）から分泌されるモルフォゲンの濃度勾配によって指定される。また、基部先端軸上の位置特異性は外胚葉性頂堤（AER）の影響下である中胚葉層の進行帯が、内在する位置価を単調変化させることで決定される。しかし、モデルのなかで仮定された概念の存在は証明されていない。これら二つの問題を遺伝子レベルで明らかにする必要があり、私はそのための最短の方法はすでに明らかにされている形態形成遺伝子、ホメオボックス遺伝子群と肢芽発生との関係を調べる事であると考え、解析を行った。

第二章

脊椎動物のホメオボックス遺伝子の中には、ゲノム中でクラスターを形成して存在するグループがある。この遺伝子群は体軸に沿って発現し、その位置特異性を決めていと考えられる。またこのグループに属する遺伝子群がマウス肢芽において、軸に関して規則性を持って発現していることが明らかにされた。そこで、ホメオボックス遺伝子と肢芽軟骨パターン形成との関係を明らかにするために、ニワトリホメオボックスクラスターChox-1, Chox-4の遺伝子群の肢芽発生における発現について *in situ hybridization* による解析を行った。前肢芽発生初期において、Chox-1 遺伝子群の発現領域境界は基部先端軸に沿っていることが明らかになった。また、その時間的／空間的発現には規則性があり、クラスターの最も3'側に位置するものほど早く／基部側から発現し、5'側のものほどより遅く／より先端部で発現していた。一方、Chox-4 遺伝子群の境界は前後軸に沿っており、その空間的発現にはChox-1と同様の規則性がある事が明らかになった。これらの結果は、Chox-1, Chox-4 遺伝子群がそれぞれの軸の位置特異性を決める位置価である可能性を示唆する。発生後期において、これらの遺伝子群の発現領域と軟骨パターンを比較したところ、軟骨の分枝分節形成過程と一致していることが明らかになった。このことはこれらの遺伝子群が肢芽軟骨パターン形成の分枝分節過程に関与している可能性を示唆する。

第三章

第二章の解析から Chox-4 遺伝子群は、前後軸の位置価である可能性が示唆された。その発現は前後軸の位置特異性を支配する ZPA によって制御されていることが予想される。そこで、ZPA と Chox-4 遺伝子群の関係を明らかにするために ZPA と同様の作用を持つレチノイン酸 (以下 RA) ビーズ移植時の発現について解析したところ、異所的な発現がビーズ近傍に誘導された。このことは、Chox-4 遺伝子群の発現は ZPA によって制御されている事を示唆する。

また第二章の解析から、Chox-1 遺伝子群と Chox-4.8 の領域特異的発現は基部先端軸に沿った位置価を反映あるいは位置価そのものである可能性が示唆された。基部先端軸の位置特異性は AER の支配のもとに自律的に経時変化していると考えられている。AER とこれらの遺伝子群の関係を明らかにするために、AER 移植時の発現について解析を行ったところ、異所的な発現が AER 直下に誘導された。このことは AER がこれらの遺伝子群の発現を制御している事を示唆する。ところで初期の発現誘導領域は、移植 AER 直下の中胚葉全体ではなく、予想に反して後方の限られた領域であった。このことは Chox-1 の AER による発現誘導は AER 単独による制御ではない事を示唆している。肢芽後方には ZPA があり、Chox-4 遺伝子群は ZPA によって制御されていることから、Chox-1 を制御するものは ZPA であることが予想された。ZPA と Chox-1 遺伝子群の関係を明らかにするために、ZPA 移植時の解析を行ったところ、Chox-1.10、-1.9 が AER 直下で新たに誘導された。この事は Chox-1 遺伝子群の発現誘導には AER と ZPA 両者が同時に働く必要がある事を示唆する。ここで改めて ZPA 移植時の Chox-4 遺伝子群の発現に注目するとやはり AER 直下で起こっていた。このことは両者が同時に働くことが Chox-4 の発現にとっても必要である事を示唆する。

第四章

脊椎動物のホメオボックス遺伝子のうちクラスターを形成していない遺伝子もある。そのうちショウジョウバエの msh ホモログである Hox-7/7.1 遺伝子が、マウス肢芽の進行帯で発現していることから、その機能と肢芽発生との関連が予想された。ニワトリでクローニングされた二個の msh ホモログのうち Msx-1 の正常発生における発現パターンについて解析を行ったところ、AER における強い発現が観察された。加えて肢芽前側中胚葉においても発現していた。Msx-1 の中胚葉における発現は肢芽の予定細胞死領域の分布とほぼ一致する事から、肢芽細胞の細胞死と関係する事が示唆される。Msx-1 と ZPA との関係を明らかにするために肢芽前方の発現領域に ZPA および RA ビーズを移植したところ、Msx-1 の中胚葉における発現は消失した。このことは、Msx-1 の発現が ZPA によって抑制的に制御されている事を示唆する。

第五章

もう一つの msh ホモログである Msx-2 の発現について、正常発生における発現パターンについて解析を行った。その結果、Msx-2 は AER と、その下に接する中胚葉の一定範囲で発現

していることが明らかになった。その発現は AER によって制御されていることが予想されており、その点を明らかにするために AER 移植時の Msx-2 の発現について調べた。AER の移植により Msx-2 の発現が新たに誘導され、その発現は移植した AER 下の一定範囲で継続して発現した。このことは、Msx-2 の発現は AER によって誘導維持されていることを示唆する。Msx-1 は ZPA によって抑制的に制御されていることから Msx-2 も ZPA によって何らかの制御を受けていることが予想された。Msx-2 と ZPA の関係を明らかにするために Msx-2 発現領域に ZPA を移植したところ、発現に変化はみられなかった。このことは Msx-2 の発現は Msx-1 と異なり ZPA により抑制的な制御は受けていないことを示唆する。

第六章

序論で述べた通り、肢芽軟骨パターン形成には、分枝分節的形成機構、位置特異性の決定機構の二つの解明すべき課題がある。今回の解析結果からそれぞれの問題の解明点と今後の課題について考察する。

Chox-1/Chox-4 遺伝子群は前軟骨凝集塊の分枝分節過程と一致した発現パターンをすることが明らかになった。このことはこれらの遺伝子群が軟骨の分枝分節形成過程を支配している可能性を示唆する。これらの遺伝子群は細胞接着分子群を制御することによって、軟骨の二分岐パターン形成を支配している可能性が考えられる。

次に、Chox-4 遺伝子群は肢芽の前後軸に沿って発現し前後軸の位置特異性を支配する ZPA によって発現が制御されていることを示した。また Chox-1 遺伝子群と Chox-4.8 は肢芽の基部先端軸に沿って発現し、基部先端軸を支配する AER の移植によって発現誘導されることを示した。さらに、AER/ZPA の移植によって誘導される異所的な発現と最終的に形成される軟骨構造には強い相関関係が見られた。これらのことは Chox-1/Chox-4 遺伝子群がそれぞれの軸に沿った位置特異的な構造を指定する遺伝子的実体、位置価である可能性を示唆する。

Chox-1/Chox-4 遺伝子群の発現パターンにはクラスター上の3'側のものほど基部/前側から発現し、5'側ほど先端部/後側で発現するという規則性が見られた。時間軸上の発現にも3'側ほど早く発現するという規則性が見られた。位置を指定するという位置価の機能上、この秩序立った発現パターン形成が最も重要な過程の一つである。AER 移植時の Chox-1 遺伝子群の解析から、AER、ZPA 両者が同時に働くときにクラスター上の遺伝子の3'から5'へのスイッチングが起こることが明らかになった。このスイッチングが差時的な発現の基本システムであると考えられる。しかしこれだけでは空間内の秩序立った発現パターンは形成されない。その説明には基部先端軸の位置指定モデルが有効である。また前後軸のパターン形成も同様に説明することができる。このモデルでは濃度勾配を形成するモルフォゲンを考慮しなくとも位置指定過程が説明できる。

クラスターを形成していないホメオボックス遺伝子群も軟骨パターン形成に必要である。Msx-1 は AER で強く発現することから、AER の機能である AER 因子の転写制御に必要であ

ると考えられる。また中胚葉における発現は予定細胞死領域と良く一致することから、細胞死の制御に関与し、余分な組織を除去することでパターン形成に関与していると考えられる。一方、Chox-1, Chox-4 の新たな発現は Msx-2 発現領域内であることから、Msx-2 はスイッチングに必要な転写制御因子である可能性が考えられる。

これまで未解明であった肢芽軟骨パターン形成の持つ二つの問題、分枝分節構造の形成と位置特異性の決定はこれらのホメオボックス遺伝子群によって支配されている可能性を新たに提示した。今後はアンチセンス RNA 発現個体の作成によってそれぞれの機能を明らかにしていく予定である。

論文審査の結果の要旨

ニワトリ胚の肢芽はパターン形成機構の研究に広く使われている。肢芽のパターン形成の基本となる軟骨パターン形成は、未分化な進行帯細胞のうちどの領域の細胞が軟骨に分化するかによって決まるが、このパターンは基部-先端部軸、前後軸の2つの軸に従って主に決定されている。基部-先端部軸方向の軟骨パターンはAERの作用下に進行帯内で自律的に順次決定され、前後軸方向の軟骨パターンもZPAからの作用のもとにやはり進行帯内で決定されると考えられているが、その決定機構は全く不明であった。

本研究は、ショウジョウバエやマウス胚でパターン形成に重要な役割を持っていることが示されてきたホメオボックス遺伝子のうち、Hox-1, Hox-4に相当するニワトリのホメオボックス遺伝子Chox-1, Chox-4クラスターについて肢芽での発現をin situ hybridizationによって調べたものである。またクラスターを形成しないホメオボックス遺伝子であるMsx-I, Msx-IIの肢芽での発現も調べている。

その結果Chox-1遺伝子群はクラスターの最も3'側に位置するものほど早くかつ基部側から発現し、5'側に位置するものほど遅くかつ先端部側に発現していることが明らかになった。さらにこの遺伝子群の発現はAERの移植によって誘導された。Chox-4遺伝子群も同様の規則性をもって発現し、その発現は主に後半部に留まっていたが、ZPAの移植によって前半部での発現もみられた。これらのChox遺伝子の発現パターンは軟骨の分枝分節形成過程と一致しており、Chox遺伝子が分枝分節形成に重要な役割を果たしていることを示している。

またMsx-1, Msx-2遺伝子については、両者ともにAERで発現していたが、前者は前側中胚葉、後者はAER直下の進行帯で発現していた。また前者はZPA、後者はAERによって発現の制御をされていることが明らかになった。

これらの結果はこの分野にとって極めて重要な新しい知見であり、この論文は著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって、横内裕二提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。