

学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏名	田端 裕正
学位の種類	博士（バイオサイエンス）
授与年月日	2018年（平成30年）3月17日
学位授与の要件	本学学位規程第18条第1項該当者（学位規則第4条第1項）
学位論文の題名	眼形成における Pax6 の機能解析
審査委員 主査	教授 山本 博章
副査	教授 齊藤 修
副査	教授 西 義介

論文内容要旨

転写因子 Paired Box 6 (Pax6)は、脊椎動物の正常発生過程では、眼のほとんどの領域に発現している。その発現様式は、眼胞から眼杯に形態形成が進むにつれ、眼の領域化が起こり、神経網膜(Neural Retina : NR)と網膜色素上皮(Retinal Pigment Epithelium : RPE)への分化が進行していく過程においても変わらず、これら領域で発現し続ける。さらに *Pax6* の突然変異によって、NR、RPE、レンズ、虹彩等を含む眼の組織に異常が生じることが知られている(Walther and Gruss, 1991; Kawakami *et al.* 1997)。加えて、*Pax6 null* のマウス個体では眼の形成不全のみならず、間脳の欠損や前脳の形成異常をも引き起こす。このように転写因子 Pax6 は眼の形成において非常に重要な役割を担っており、広く解析が行われているにもかかわらず、この転写因子がいかにして多様な組織の発生を制御しているか、その機構は明らかになっていない。

本研究では、眼の発生に必須の過程である神経網膜と網膜色素上皮の領域化について、ニワトリ胚を用いて Pax6 のアイソフォームごとの機能を、*in vivo* で明らかにしようとした。内在的な Pax6 よりもより強い誘導能を持たせるために機能亢進させた Pax6 各アイソフォームや、DNA 結合ドメインを改変した Pax6 を発現させるコンストラクトを、ニワトリ胚の眼の形態形成初期の眼胞に導入することで、以降のこの領域における、眼の発生に関わる遺伝子の発現への影響を *in ovo* で解析を行った。

その結果、それぞれのドメインに特徴のある機能があることが判明した。これらの結果は、眼の発生過程において、Pax6 の DNA 結合ドメインの使い分けが、

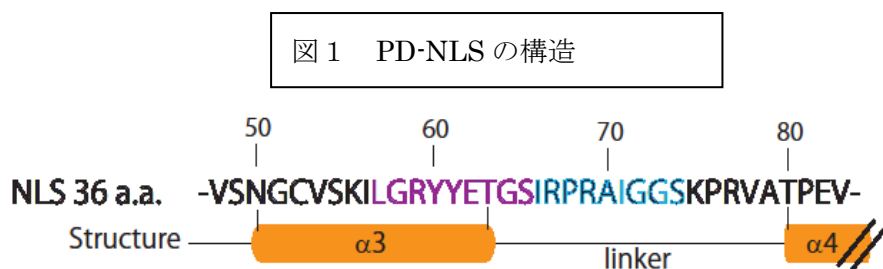
発生や分化にまったく異なる方向性を付与する可能性を強く示唆する。

これらの解析を行う中で、DNA 結合ドメインの一つである PD を人為的に欠損させた改変型 Pax6 で、核への局在性の著しい低下が見られることに気付いた。これは、Pax6 の PD 内に非常に強力な核移行シグナル (Nuclear localization signal : NLS) をもつことを示している。Quail Pax6 でも同様の知見があり、exon5 にコードされるアミノ酸配列(chicken やヒト、マウスでは exon6 にコードされる Pax6 の 48-119 a.a. のアミノ酸配列に相当)を欠いた際に著しく核への局在性が低下するとされていた (Carrière *et al.*,1995)。

多くの転写因子では、DNA 結合ドメインの内部、あるいは近傍に NLS が存在するとされている (Cokol *et al.*, 2000)。興味深いことに、Pax6 のもう一方の DNA 結合ドメインである HD に関してはその近傍に NLS が存在し、その NLS(HNLS⁵-LKRKLQR-(206 – 212 a.a.))を認識して核内輸送タンパク質である Importin13 (IPO13)が HD の 208 – 214 a.a.と 261 – 267 a.a.との両アミノ酸配列に結合することで核内への輸送が行われることが報告されている(Ploski *et al.*, 2004)。

しかし、強力な NLS を持つ PD では、NLS 領域の詳細な解析は行われていないため、同時に PD-NLS 領域の解析も行った。

結果として、PD-NLS は PAI サブドメインの最も C 末端側の α ヘリックスである α 3 全域を含み、linker 部分、そして RED サブドメインの N 末端側の α 4 の前半までの広範囲にわたることが明らかになった。中でも特に高い NLS 活性を持つ I57-S65 は α 3 の C 末端に位置し、次いで NLS 活性の高かった I66-S74 は linker 部分に相当していることが明らかになった(図 1)。



したがって、この領域は、NLS として機能した後、核内では個別のシスエレメントに結合することで下流因子調節にも関与していることになる。

強力な NLS 活性を示した領域のうち、T63, G64, I66, P68, G72, G73, S74 はヒト Pax6 でも保存されているサイトで、それぞれ missense 変異が確認されており、それらの変異は虹彩が形成されない無虹彩症や白内障、緑内障、眼振、黄斑の中心窩形成不全など様々な眼形成不全を引き起こすことから、PD-NLS は Pax6 の核内への移行に限らず、眼の発生メカニズムにも深く関与していることが考えられる。

論文審査結果要旨

〈博士論文審査・試験結果〉

視覚には神経網膜と網膜色素上皮の機能が必須である。両組織は、発生中の脳に形成される眼胞が眼杯へと形態形成される過程で、同じ領域から発生する。この領域化がどのような機構によって起こるのか、古くから発生学領域における一つの課題であった。著者は Pax6 転写因子の発現領域の組織化学的解析から、この因子が深く関わることに気付いた。Pax6 は異所的な眼形成を起こすことが出来る強力な転写因子であるが、その分子機構の全容解明には多くの研究を必要としている段階である。著者は神経網膜と網膜色素上皮の領域化において、この転写因子の機能的関与を明らかにしようとした。当該発生段階の顕微操作が可能なニワトリ胚を用いて、Pax6 が持つ 2 種の DNA 結合領域がこの形態形成過程にどのように関わるかを、改変した Pax6 遺伝子を脳胞にエレクトロポレーションすることによって解析した。その結果、当該転写因子の DNA 結合ドメインのサブドメインがそれぞれ特異な機能を持ちうること等、重要な発見をした。この転写因子の機能解析はほとんどが *in vitro* で行われてきており、DNA 結合ドメインの「使い分け」を *in vivo* で見出した本研究の価値は大変高いものである。またこの過程で得た核移行シグナルの解析は、当該配列と標的 DNA 構造との相関を示唆するなど、当該研究領域での貢献が大きいと認められるので、論文として合格である。試験においては、何点かの指摘を受けたが、これらを論文に反映させることで、合格と判断された。