

氏名	み せ たけ し 三 瀬 武 史
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2950 号
学位授与の日付	平 成 17 年 11 月 24 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	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	<i>Pax1/9</i> から重複で生じた <i>Pax1</i> と <i>Pax9</i> の発現領域・機能・シスエレメントの硬骨魚類における進化
論文調査委員	(主 査) 教 授 白 山 義 久    教 授 佐 藤 矩 行    教 授 山 極 壽 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

脊索動物の祖先が持っていた *Pax1/9* から遺伝子重複によって生じた *Pax1* と *Pax9* は、脊椎動物において咽頭嚢と硬節で発現し咽頭派生体と軸骨格の形態形成に関わっている。本研究では、メダカ *Pax1* と *Pax9* について発現解析 (*in situ* ハイブリダイゼーション)・機能解析 (モルフォリノを用いたノックダウン解析)・シスエレメントの解析 (トランスジェニックメダカ作成) を行った。そして、硬骨魚類特異的な咽頭派生体・軸骨格の進化に *Pax1* と *Pax9* の分子進化が果たした役割について明らかにすることを目的とした。

まず、胴体部の硬節においては *Pax1* と *Pax9* の発現に違いは見られなかったが、*Pax9* には *Pax1* にはない尾部特異的発現がみられた。さらに、*Pax1* と *Pax9* はどちらも軸骨格の形態形成に必要であることが示され、*Pax9* のみ尾部骨格の形態形成への関与が示唆された。そして、硬節と咽頭における発現は離れて位置するシスエレメントによって制御されていた。初期の脊椎動物において、先に進化した咽頭のエンハンサーの上流配列が変異を蓄積し、硬節におけるエンハンサー機能獲得に至ったことが示唆された。

咽頭においては、*Pax1* は第二～第七咽頭嚢で一様に発現するのに対し、*Pax9* は第二咽頭嚢と第二咽頭弓において強く発現していた。さらに、*Pax1* は第三～第六咽頭弓の角鰓骨、*Pax9* は第二咽頭弓の角舌骨の形態形成に関与していた。さらに、*Pax1* を第三～第七咽頭嚢の一部、*Pax9* を第二咽頭嚢と第二咽頭弓由来の鰓蓋において特異的な発現を促すシスエレメントの存在が明らかになった。*Pax1* と *Pax9* はシスエレメントの変化により発現部位が変化し、それに伴い形態形成における役割も変化したのだろう。魚類特有の第三～第六咽頭弓の鰓や、硬骨魚類特有の第二咽頭弓の鰓蓋など、特殊な構造の獲得・進化への *Pax1* と *Pax9* の分子進化の関与が示唆された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、脊椎動物の祖先において遺伝子重複により進化した *Pax1* と *Pax9* が、遺伝子重複後にどのように発現、機能を進化させ、さらに重複による機能の分化がどのような解剖学的特徴の進化に結びついたかについて明らかにしようとしたものである。*Pax1*、*Pax9* の脊椎動物における機能に関しては、これまで主にマウスやニワトリを用いて、とくに硬節に関する機能のみに注目して研究が行われてきたが、咽頭における機能はほとんど報告がない。また、遺伝子重複後の機能分化に焦点をあて、*Pax1*、*Pax9* の比較を詳細に行うというユニークな視点から研究を展開していった。

申請者は、まず *Pax1* と *Pax9* の発現様式を、硬骨魚類のメダカにおいて時空間的に詳細に記載することから研究を始めた。そのなかから、咽頭領域での発現が *Pax1* と *Pax9* で明確に異なっていることを見出した。このような違いはマウスやニワトリでは報告されておらず、硬骨魚類に特有の違いである。さらに詳細な発現比較により、尾部領域における *Pax9* に特有の発現を見出すことができた。これらの結果は、特に遺伝子重複後に *Pax1* と *Pax9* がどのように機能を分化させていったかを研究するための基盤となる研究であり、この段階で堅実に記載を行ったことが、研究のさらなる展開を生み出した

と評価することができる。

次に申請者は、上記のような発現の違いが、*Pax1*と*Pax9*の間で機能的な違いに結びついている可能性について、モルフオリノオリゴヌクレオチドによる機能阻害実験から解析し、検討した。硬節における機能に関しては、マウスでは見られなかった神経棘における必須の役割を見いだした。この結果は、マウスと硬骨魚類で遺伝子重複後に独立に機能分化をしたことを示しており、脊椎動物における遺伝子重複後の機能の分化の複雑さを示唆する貴重な知見であると評価された。さらに咽頭領域における*Pax1*と*Pax9*のユニークな機能も見いだした。咽頭領域が複雑な形態形成を行うようになったことは、脊椎動物に特徴的なことだが、これまでは神経堤細胞の移動によって複雑な形態形成が可能になったものと主に考えられていた。しかし最近になって、神経堤細胞同様に、内胚葉性の細胞も咽頭のパターン形成に深く関わっていることが明らかになりつつある。けれども、その分子機構はほとんど明らかにされていない。本研究の成果は、咽頭内胚葉における*Pax1*と*Pax9*の発現の進化が、咽頭形成における新しい位置情報を付加したことを示しており、内胚葉の位置情報を担う転写因子を同定した画期的な成果といえる。さらに、咽頭における機能分化に関しては、硬骨魚類の鰓蓋の進化に結びついた可能性にまで踏み込んで議論している。*Pax1*, *Pax9*で鰓蓋の進化が完全に説明されるわけではないが、その進化に関わった分子進化の一端を明らかにしたことは十分評価される。

最後に、申請者はフグゲノムを用いた転写制御機構の解析から、*Pax1*, *Pax9*の転写制御機構を比較し、発現・機能の分化をシスエレメントの進化に結びつけようと試みた。当初予定していた、F0世代でのシスエレメントの解析が困難であったために、シスエレメントの同定からトランスの因子の推定までは至らなかったが、*Pax9*と硬節の咽頭での発現が、別々のシス領域によって活性化されること、*Pax9*が新たに獲得したと思われる第2咽頭弓での発現に関わるシス領域を同定したことで、*Pax1*, *Pax9*の発現様式の進化が、シスエレメントの進化によってもたらされたものであることを実証した。以上のように、申請者は、一連の研究によって、シスエレメントの進化から形態の進化までを結びつけ分子進化と形態進化を橋渡しする研究に大きく貢献をした。

よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。