

氏名	くらくしげひろ 工 樂 樹 洋
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2851 号
学位授与の日付	平 成 17 年 1 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	分子的アプローチによるカメの甲の起源についての進化発生学的解析

論文調査委員 (主 査)  
教授 七 田 芳 則 教授 平 野 丈 夫 教授 岡 穆 宏

### 論 文 内 容 の 要 旨

本学位論文「分子的アプローチによるカメの甲の起源についての進化発生学的解析」において、申請者は、カメの甲（甲羅）という進化的新規形質の獲得の基盤となったゲノムおよび遺伝子の変化を同定することを目的として研究を進めた。

カメ類は、甲を有するという点で、他の羊膜類とは明らかに異なっている。本来、肩甲骨よりも腹側に位置するはずの肋骨が、カメ類では肩甲骨よりも背側に位置しており、これがカメ類の進化過程において甲の獲得を可能にした根源的な要因であると推定される。

今回、申請者は、ニホンスッポン *Pelodiscus sinensis* において、体幹部の骨格や筋肉のパターニングの制御をつかさどる41個のマーカー遺伝子のcDNAをRT-PCR法により単離し、そのうちの27個について、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法による染色体マッピングを行った。また、既知の中胚葉分化マーカー遺伝子である *Shh*, *Pax3*, *MyoD* について、*in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析を行い、ニワトリやマウスでの発現との比較解析を行った。次に、申請者は、遺伝子レパートリ、染色体上の遺伝子配置、ゲノム中のGC含量の不均一性、同義置換数推定などについて、他の羊膜類との比較解析も行った。その結果、カメ類のみに見られる特徴は検出されず、カメ類の系統では、ゲノムの大幅な改変を伴わずに、甲の形成というボディプランの変更が引き起こされた可能性が示唆された。

カメ類に特徴的な肋骨の水平方向への伸張は、咽頭胚後期に形成されるカメ特有の構造物である甲稜 (CR, carapacial ridge) によって引き起こされると考えられてきた。そこで申請者は、甲稜で特異的に発現する遺伝子を探索するため、Megasort法とリアルタイムRT-PCR法を効率的に組み合わせて、ニホンスッポンの大量cDNAスクリーニングを行った。その結果、甲稜で特異的に発現する *Sp5*, *CRABP-1*, *APCDD1*, *LEF-1* の4遺伝子を同定し、これら遺伝子のニホンスッポンでの発現パターンが、ニワトリやマウスでは見られない独特なものであることを明らかにした。このことから、羊膜類の共通祖先に既に存在したこれら4遺伝子が、カメ類の系統において二次的に甲形成を制御する遺伝子プログラムに組み込まれたことが強く示唆された。

甲稜で特異的に発現する *LEF-1* タンパク質は、Wntシグナルに応答し、核内で $\beta$ -カテニンと複合体を形成する。申請者は、*LEF-1* が甲稜に発現する時期に、その上皮細胞において $\beta$ -カテニンタンパク質が核に局在することを、免疫染色によって示した。さらに、ドミナントネガティブ型の *LEF-1* を、*in ovo* エレクトロポレーションによって甲稜上皮に強制発現させることによって、甲稜の成長が阻害されることも示した。これらの結果から、甲稜の上皮にWntシグナル経路が活性化され、それが甲稜の成長と形態的維持に不可欠であることが明らかになった。肢芽のパターニングにおいても、Wntシグナル経路が重要な役割を果たすことが知られているが、肢芽形成において中心的な役割を果たす *Shh*, *Fgf8* などの遺伝子は甲稜には発現していないことも申請者は確認している。これらの結果から、甲稜ではたらく遺伝子プログラムは、肢芽のパターニングをつかさどる既存の遺伝子プログラムの一部を転用 (co-option) して構成されている可能性が強く示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

生物進化の研究において、進化的新規形質の獲得に伴うゲノムおよび遺伝子の変化を同定することは、形態レベルの進化と遺伝子レベルの進化の関連性を探る上で極めて重要と考えられている。しかしながら、このような研究を行うためには、遺伝子の塩基配列および発現に関する多くのデータが必要であり、世界的に考えても、ほとんど手掛けられていないのが現状である。

今回、申請者は、カメ類に特徴的な進化的新規形質である甲（甲羅）に注目し、カメ類の進化過程において甲の獲得を可能にしたゲノムおよび遺伝子の変化を探る試みを行った。申請者は、ニホンスッポン *Pelodiscus sinensis* を用いて、(1)骨格や筋肉のパターニングの制御をつかさどるマーカー遺伝子 cDNA の RT-PCR 法による単離および蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法による染色体マッピング、(2)中胚葉分化マーカー遺伝子である *Shh*, *Pax3*, *MyoD* の *in situ* ハイブリダイゼーション法によるニワトリおよびマウスとの比較発現解析、(3)遺伝子レパートリ、染色体上の遺伝子配置、ゲノム中の GC 含量の不均一性、同義置換数推定などに関する比較解析を行い、これらの結果から、カメ類の系統では、ゲノムの大幅な改変を伴わずに、甲の形成というボディプランの変更が引き起こされた可能性を示した。将来的にはカメ類および他の羊膜類のゲノム全体での比較解析も重要になると思われるが、現時点において、数多くの遺伝子について上記のような信頼性の高い解析を行っていることは、今後の研究の発展を考えると、高く評価できる。

次に、申請者は、咽頭胚後期に形成されるカメ特有の構造物であり、甲形成に関与すると考えられている甲稜 (CR, carapacial ridge) にも注目し、甲稜で特異的に発現する遺伝子を探索するために、遺伝子発現の網羅的比較解析に用いられる Megasort 法とリアルタイム RT-PCR 法を効率的に組み合わせて、ニホンスッポンの大量 cDNA スクリーニングを行った。その結果として、甲稜で特異的に発現する *Sp5*, *CRABP-1*, *APCDD1*, *LEF-1* の 4 遺伝子を同定したことは高く評価できる。そして、(1)これら 4 遺伝子がカメ以外の脊椎動物のゲノム中にも存在していることを配列解析から確認し、(2)ニホンスッポンでの 4 遺伝子の発現パターンが、ニワトリやマウスでは見られない独特なものであり、(3)肢芽でも発現していること、(4)ドミナントネガティブ型の *LEF-1* を *in ovo* エレクトロポレーションによって甲稜上皮に強制発現させると、甲稜の成長が阻害されることを、申請者は明らかにした。以上の結果は、羊膜類の共通祖先に既に存在したこれら 4 遺伝子および各シグナル経路の一部（特に、*LEF-1* タンパク質の上流にあたる Wnt シグナル経路）が、カメ類の系統において二次的に甲形成を制御する遺伝子プログラムに組み込まれた（転用 (co-option) された）可能性を強く示唆しており、形態レベルの進化と遺伝子レベルの進化の関連性を探る上での重要な知見が得られたと考えられる。

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事項に関する試問を行った結果、合格と認めた。