

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	鄭 小娜
論文題目	Cannabinoid receptor-interacting protein 1 is a regulator of eye and neural development in <i>Xenopus laevis</i> (アフリカツメガエルにおいてカンナビノイド受容体結合タンパク質1は目と神経の発生の制御因子である)		
(論文内容の要旨)			
<p>CNRIP1 (Cannabinoid receptor-interacting protein 1; カンナビノイド受容体結合タンパク質1) は、大麻成分や内在性カンナビノイドの受容体の一つであるCNR1 (Cannabinoid receptor 1) のC末端に結合するタンパク質であり、2007年に酵母ツーハイブリッド法によって同定された。CNRIP1のアミノ酸配列は脊椎動物間で高度に保存されているが、どの動物種においてもCNRIP1の機能はほとんど知られていなかった。本研究で申請者は、アフリカツメガエル胚を使って、CNRIP1の発生過程における機能を解析した。</p> <p>アフリカツメガエルの <i>cnrip1</i> は、受精直後はほとんど発現してしないが、胞胚期後期に発現が開始し、原腸胚期には動物極側の予定外胚葉に特異的に発現していた。神経胚期では前方の神経板に強い発現が観察された。尾芽胚期では、脳、脊髄、目、脊索、セメント腺、嗅プラコードなどの組織に特異的に発現していた。モルフォリノオリゴをインジェクションして <i>cnrip1</i> をノックダウンした胚では、神経胚期においては神経管閉鎖の阻害が観察され、尾芽胚期においては目や脳が小さくなる、胚の体長が短くなる、などの重篤な形態異常が観察された。このような発生異常は、ネガティブコントロールであるミスマッチモルフォリノのインジェクションでは観察されなかったことから、<i>cnrip1</i> のノックダウンによる特異的な効果であると考えられた。次に、リアルタイムqPCRとホールマウント <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションによってマーカー遺伝子の発現変化を調べた。神経誘導が起こる原腸胚期前期では、<i>cnrip1</i> のノックダウンによって神経マーカーである <i>sox2</i> や前方マーカーである <i>otx2</i> の発現が抑えられていた。目の誘導が起こる原腸胚期後期においては、<i>cnrip1</i> のノックダウンによって <i>sox2</i> と <i>otx2</i> の発現が減少しただけでなく、目のマーカーである <i>pax6</i> や <i>rax</i> の発現も減少した。一方、<i>cnrip1</i> の過剰発現は、<i>sox2</i>、<i>otx2</i>、<i>pax6</i>、および <i>rax</i> の発現領域を拡大しうることがわかった。さらに、細胞系列特異的なノックダウンにより、動物極背側側方割球D1.2細胞ではなく、動物極背側割球D1.1細胞において <i>cnrip1</i> が機能することが、目と神経の発生に重要であることが示唆された。</p> <p>さらに <i>cnrip1</i> のアフリカツメガエルホモログの機能解析を行なった。<i>cnrip1</i> の発現量は、原腸胚期や神経胚期では比較的少ないが、尾芽胚期以降に著しく増加した。<i>cnrip1</i> の発現領域を調べたところ、神経胚期や尾芽胚期において脳や神経に発現することがわかった。モルフォリノオリゴにより <i>cnrip1</i> をノックダウンした胚では、目が小さくなり <i>sox2</i>、<i>otx2</i>、<i>pax6</i>、および <i>rax</i> の発現が低下した。これらの表現型は、<i>cnrip1</i> のモルフォリノオリゴによる表現型と共通しているが、<i>cnrip1</i> のモルフォリノオリゴの方が <i>cnrip1</i> のモルフォリノオリゴよりも効果が弱かった。以上、本研究により <i>cnrip1</i> が目と神経の発生を制御すること、および <i>cnrip1</i> と <i>cnr1</i> の発生における機能が部分的に類似することが明らかとなった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、アフリカツメガエル胚を用いた本研究により、*cnrip1*が目と神経の形成に必須であることを明らかにした。*cnrip1*は生理的機能がほとんど知られていない遺伝子であるが、先行研究においてマウス胚の脳にCNRIP1タンパク質が存在することは報告されていた。したがって、申請者は*cnrip1*が胚の発生に役割を果たす可能性があると考え、アフリカツメガエル初期胚をモデル系として用い解析した。

まず申請者は、アフリカツメガエル*cnrip1*の初期胚における発現パターンを調べた。リアルタイムqPCRにより、*cnrip1* mRNAの存在量が胞胚期には低いのが原腸胚期に著しく増えること、そして神経胚期中期には減少するが神経胚期後期には再び増え、尾芽胚期まで高いままであることが示された。ホールマウント in situ ハイブリダイゼーションにより、原腸胚期には動物極側、神経胚期には神経板、尾芽胚期には主に神経組織に*cnrip1*が発現することが明らかとなった。次に、申請者は*cnrip1*の機能を解析するため、モルフォリノオリゴによる*cnrip1*のノックダウン実験を行った。*cnrip1*のノックダウンは、目、脳や前後軸の縮小を引き起こした。さらに、*cnrip1*のノックダウンによって、神経や目の発生に重要な転写因子をコードする遺伝子群 (*sox2*, *otx2*, *pax6*, *rax*) の発現が抑えられた。逆に*cnrip1*の過剰発現によって、*sox2*, *otx2*, *pax6*, *rax*の発現が促進される傾向が見られた。そして、レスキュー実験を行った結果、*cnrip1*のノックダウンによる表現型は*cnrip1* mRNAの共注入により部分的にレスキューされることがわかった。これらの結果により、*cnrip1*が目と神経の発生を制御することが明らかとなった。

さらに申請者は、CNRIP1と結合するタンパク質CNR1に注目した。ホールマウント in situ ハイブリダイゼーションにより、アフリカツメガエル*cnr1*が神経胚期には神経板に発現すること、尾芽胚期には目と脳に発現することが示された。*cnr1*をノックダウンすると、*cnrip1*のノックダウンに比べると効果は弱いですが、目の異常が観察されて、*sox2*, *otx2*, *pax6*, *rax*の発現が減少した。この結果は、*cnrip1*と*cnr1*の初期胚発生における機能が類似する可能性を示唆している。

これら一連の申請者の研究は、進化的に保存されている*cnrip1*遺伝子の生理機能を脊椎動物ではじめて同定しただけでなく、初期胚における神経や目の誘導の新しい制御因子を発見したものであり、神経発生の分子機構の解明に貢献するものである。生命科学に関する高度で幅広い学識、専門分野における優れた研究遂行能力、及び生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見が示されていると判断できる。また、本論文は、論理的かつ一貫性をもって記述されていた。以上より、本論文は、博士(生命科学)の学位論文として価値のあるものと認めた。また、平成27年1月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日