

氏 名	なか やま あき え 中 山 晶 絵
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2659 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 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	ホヤの変態に関する分子発生生物学的研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 佐 藤 矩 行 教 授 米 井 脩 治 教 授 西 田 利 貞

論 文 内 容 の 要 旨

多細胞動物の変態過程は古くから生物学上の興味深い問題の1つとして、そのメカニズムや生態学的意義についての研究がなされてきた。本論文の対象生物であるホヤ類においても、変態によって遊泳性のオタマジャクシ型幼生は固着性の成体へ形態・生理・生態を劇的に変化させる。これまでホヤ類の変態過程については様々な組織学的観察や実験がなされてきたが、ホヤの変態過程の分子メカニズムについてはほとんど明らかになっていなかった。そこで、本論文では、変態の開始過程に関わると予想される遺伝子の網羅的な単離・同定をディファレンシャルスクリーニング法により行い、また、変態過程の幼若体 EST を行い変態過程に関与する遺伝子の解析を行った。

まずディファレンシャルスクリーニング法では、カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) 遊泳幼生期から尾部吸収直後にかけて発現量が増加する遺伝子の cDNA クローン を70個、発現量が減少する遺伝子のクローンを219個単離した。これらのクローンの全てについて3'側約500bpの塩基配列を決定しクローンの重複を調べたところ、発現が増加するクローンは15クラスターに、減少するクローンは53クラスターに分けられた。各々のクラスターについて塩基配列を決定し、既知の遺伝子やドメインに対する相同性の検索を行うと共に、*in situ* ハイブリダイゼーションによって各クローンの発現パターンを調べ、さらに *Ciona* cDNA プロジェクトのデータベースの情報も利用して、以下のように各々の遺伝子のもつ特徴を明らかにした。遊泳幼生期から変態開始後の尾部吸収直後にかけて発現量が増加する遺伝子の中で、特に発現量の増加が著しいと認められたもの6クラスターのクローンは、それぞれ *Ci-meta1* から *Ci-meta6* と名づけた。*Ci-meta1*, *Ci-meta2* と名づけたクローンは、得られた全70クローン中に26個および30個含まれており、全体の半分以上を占めていた。特に、*Ci-meta1* cDNA クローンは、他のホヤ類で変態開始に関与することが報告されている分子と同様に EGF-like リピートを持ち、かつ付着突起で発現していることから、変態開始過程に関与する可能性が高いと予想された。また、*Ci-meta4~6* はいずれも遊泳幼生期の間充織で発現し、後に幼若体の体腔内にある一部の遊離細胞として発現が続いていた。これらの細胞は、成体の血球細胞の一部となると考えられる。*Ci-meta4~6* の発現パターンは、体腔内遊離細胞の分化過程が、付着や尾部吸収過程とは異なる制御を受けている可能性を示している。

一方、遊泳幼生期から変態開始後の尾部吸収後にかけて発現が減少する遺伝子として得られたクローンには、退化する幼生の尾部で発現する遺伝子群が6クローン含まれていた。また、細胞外マトリックスの構築に関与することが報告されているドメインをもつクローンも6クラスター得られた。カエルの変態過程では細胞外基質の変化の関わりが報告されており、ホヤでも同様に細胞外基質の変化が変態開始過程と深い関わりをもつ可能性が示唆された。この他、79クローンとともにも数多くのクローンを含んでいたクラスターの塩基配列は、既知の遺伝子に相同性を持っていなかったものの、このクローンの発現は尾芽胚期から幼生期にかけて劇的に変化していた。

次に変態過程の幼若体 EST では、3,694クローンについて解析を行った。そのうち24クラスター(32クローン)は、現在までのカタユウレイボヤ EST データベースの29,138クラスター中には含まれておらず、幼若体期にのみ特異的に発現を

するということが明らかになった。

申請者は、本論文で得られた結果、すなわちホヤ類の変態過程とくに変態開始過程で働く遺伝子の単離と同定は、今後のホヤ類の変態過程の分子メカニズム解明において有用な情報となると述べている。

論文審査の結果の要旨

多くの海産無脊椎動物はまず幼生を発生させ、次いでその幼生の変態を経て成体の体制を形づくるという発生戦略をとっている。この体制を全く別のものに変える変態というダイナミックな過程は古くから生物学者の興味をひきつけてきた。本論文の対象生物であるホヤの変態では遊泳性のオタマジャクシ型幼生から固着性の成体へと形態学・生理学・生態学的に劇的に変化がおこる。本論文では申請者はホヤ類の変態現象の分子メカニズムの解明を目的として、変態の開始過程に関わると予想される遺伝子の網羅的な単離・同定をディファレンシャルスクリーニング法により行い、また変態過程の幼若体 EST を行い変態過程に関与する遺伝子の解析を行っている。

まずディファレンシャルスクリーニング法により、カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) 遊泳幼生期から尾部吸収直後にかけて発現量が増加する遺伝子の cDNA クローンを70個、発現量が減少する遺伝子のクローンを219個単離することに成功した。遊泳幼生期から変態開始後の尾部吸収直後にかけて発現量が増加する遺伝子の中で、特に発現量の増加が著しいと認められたもの6クラスターは、それぞれ *Ci-meta1* から *Ci-meta6* と名づけた。*Ci-meta1*, *Ci-meta2* と名づけたクローンは、得られた全70クローン中に26個および30個含まれており、全体の半分以上を占めていた。特に、*Ci-meta1* cDNA クローンは、他のホヤ類で変態開始に関与することが報告されている分子と同様に EGF-like リピートをもち付着突起で発現しており、変態開始過程に関与する可能性が高いと予想された。また、*Ci-meta4*~*6* はまず遊泳幼生期の間充織で発現し、後に幼若体の体腔内にある一部の遊離細胞として発現が続いていくことから、これらの細胞は成体の血球細胞の一部となると考えられる。*Ci-meta4*~*6* の発現パターンは、体腔内遊離細胞の分化過程が付着や尾部吸収過程とは異なる制御を受けている可能性を示している。

一方、遊泳幼生期から変態開始後の尾部吸収後にかけて発現が減少する遺伝子として、退化する幼生の尾部で発現する遺伝子群、細胞外マトリックスの構築に関与することが報告されているドメインをもつ遺伝子群を得た。カエルの変態過程では細胞外基質の変化が報告されており、ホヤでも同様に細胞外基質の変化が変態開始過程と深い関わりをもつ可能性が示唆された。この他、79クローンともっとも数多くのクローンを含んでいたクラスターの塩基配列は、既知の遺伝子に相同性を持っていなかったものの、このクローンの発現は尾芽胚期から幼生期にかけて劇的に変化していた。

さらに申請者は変態過程の幼若体 EST 解析を行い、調べた3,694クローンのうち24クラスター (32クローン) が、これまでのカタユウレイボヤ EST データベースに含まれていない、幼若体期にのみ特異的に発現をするものであることを明らかにした。

この数年、ホヤの変態過程の分子メカニズムの興味が世界的におこり、3つ程の研究グループが別々のホヤを使ってそのメカニズムの解明にのりだしている。申請者の研究は中でも、EGF 様リピートをもつ分子が変態開始に関わっていること、変態過程で細胞外基質がダイナミックに変化することを示した点で高く評価されている。申請者は既にこれらの研究に関連した2編の論文を国際誌に公表しており、申請者の研究能力は十分高いものと判断される。

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た。なお、論文に報告されている研究業績を中心に関連分野に関する試問を行った結果、適切な解答が得られたので合格と認めた。