

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	(し も ぞ の な お き) 下 園 直 樹
学 位 (専 攻 分 野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学 位 授 与 の 日 付	平 成 年 月 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) ホヤ胚の脳において領域特異的に発現する遺伝子の解析	
論 文 調 査 委 員	(主 査) 久 保 田 洋 准 教 授 佐 藤 ゆ た か 准 教 授 曾 田 貞 滋 教 授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士（理学）	氏名	下園 直樹
論文題目	ホヤ胚の脳において領域特異的に発現する遺伝子の解析		
(論文内容の要旨) ホヤ幼生の中樞神経系は 330 個ほどの細胞から構成され、前後軸に沿った <i>Otx</i>、<i>Pax</i>、<i>Hox</i> などの遺伝子の発現領域の特異性のみならず、光受容、重力の感知などの機能に応じた領域特異性を持つとされている。申請論文では、カタユウレイボヤ (<i>Ciona intestinalis</i>) を用いて中樞神経系、特に脳における領域特異性の分子メカニズムをさらに理解するための研究を行った。 最近の研究からカタユウレイボヤ幼生の中樞神経系で発現する遺伝子として上述の 3 つを含めて 100 以上の遺伝子が同定されているが、領域特異性を研究するためにはそこで発現するできるだけ多くの遺伝子情報を得ることが大切である。そこでまず申請者は、幼生の神経系で蛍光タンパク質カエデを特異的に発現するトランスジェニック系統とマイクロアレイを駆使し、脳で特異的または優勢に発現する 565 個の遺伝子を特定した。これらの遺伝子の中には既に脳で発現することが知られていた <i>Ci-opsin1</i> や <i>Ci-TYRP1</i> などが含まれていた。それに加えて脳で発現することが新たに分かった神経ペプチド、ホルモンなどの遺伝子を特定した。 次に、whole-mount <i>in situ</i> hybridization により、尾芽胚から幼生形成にいたる胚および幼生の脳において、上で同定した遺伝子約 100 個の空間的発現をより詳細に調べた。その結果、脳全体での発現、脳背側領域での発現、脳腹側領域での発現、脳前方領域での発現、脳後方領域での発現、脳腹側前方領域での発現、脳中央領域での特異的発現の、少なくとも 7 つの発現パターンを見出した。この結果は、ホヤの中樞神経系には前後軸に沿った領域に加え、背腹軸にそったより細かい領域が存在することを示すものである。 さらに申請者は、7 つの発現パターンの内の 4 つ、すなわち脳全体での発現、背側領域での発現、腹側領域での発現、前方領域での発現を代表する合計 6 つの遺伝子について、それぞれその領域特異的発現を制御する 5' 上流の解析を進めた。すなわち、6 つの遺伝子の約 2~3 kb の上流配列を <i>LacZ</i> の上流につないだレポーターコンストラクトを作製し、これらを導入した胚での <i>LacZ</i> の発現を調べた。その結果、6 つの遺伝子全てにおいて内在性の遺伝子と同じ領域での <i>LacZ</i> の発現が認められた。そして、これらの遺伝子の上流配列のデリーションコンストラクトを作製して、領域特異的発現調節領域のさらなる絞り込みを行った。その結果、脳全体で発現する遺伝子に関しては <i>Otx</i> がその発現制御に関与していることを示唆する結果が得られた。 これらの結果は、ホヤ幼生の脳はこれまで考えられていた以上に領域化が進み複雑化しており、また多くの遺伝子は領域特異的に発現するように制御されていることを示すものである。			

(論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨)

尾索動物のホヤは脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物である。ホヤの幼生の中
枢神経系では *Otx*、*Pax*、*Hox* などの遺伝子が脊椎動物の中枢神経系と同様に前
後軸に沿った発現を示すなど、その発生と機能には共通の分子的メカニズムが
存在すると予測されている。また一方で、ホヤ幼生の中枢神経系は約 100 個の
神経細胞を含むわずか 330 個ほどの細胞で構成されており、このシンプルさを
生かした脳形成メカニズムの研究が進みだしている。これまでにその発生と機
能に関連して多くの遺伝子の発現と機能が調べられているが、申請者は「脳の
領域化」という点に的を絞って本研究を進めている。

カタユレイボヤ (*Ciona intestinalis*) ではトランスジェニック系統の作製
法が確立されている。そこで申請者はまず、共同研究者とともに、幼生の脳で
蛍光タンパク質カエデを特異的に発現するトランスジェニック系統を利用して、
蛍光を発する細胞での遺伝子発現と発しない細胞での遺伝子発現との比較
を、マイクロアレイを駆使して行い、脳で特異的または優勢に発現する 565 個
の遺伝子の特定に成功した。これらの中には脳で特異的に発現する既知の遺伝
子が多数含まれており、研究手法の妥当性を支持するものであった。加えて申
請者は新たに脳で発現する遺伝子、特に神経ペプチド、ホルモンなどの遺伝子
を特定しており、これは申請者の研究技術の高さを示すものとなっている。

申請者は次に、上で同定した遺伝子のうちの約 100 の遺伝子について、
whole-mount *in situ* hybridization により、尾芽胚および幼生の脳における空
間的発現をより詳細に調べた。その結果、脳全体での発現、脳背側領域での発
現、脳腹側領域での発現、脳前方領域での発現、脳後方領域での発現、脳腹側
前方領域での発現、脳中央領域での発現の、少なくとも 7 つの空間的発現パ
ターンを見出した。この結果は、これまでに分かっていたホヤの中枢神経系の前
後軸に沿った領域化に加え、より細かい領域が存在することを示すものとして
価値ある研究成果である。

申請者はさらに、こうした領域特異的発現がどのように制御されているかを
確かめるために、7 つの発現パターンの中の 4 つ、すなわち脳全体での発現す
る遺伝子 1 個、背側領域で発現する遺伝子 1 個、腹側領域で発現する遺伝子 3
個、前方領域で発現する遺伝子 1 個を選び、それぞれその領域特異的発現を制
御する 5' 上流の解析を進めた。6 つの遺伝子の上流約 2~3 kb の配列にレポー
ター遺伝子 *LacZ* をつないだコンストラクトを作製し、これらを導入した胚での
LacZ の発現を調べた結果、6 つの遺伝子全てにおいて内在性の遺伝子と同じ脳
領域での *LacZ* の発現が認められた。このことはこれらの遺伝子の領域特異的
発現がこれらの 5' 上流域によって制御されていることを示す重要な結果である。
申請者はさらに上流配列のデリーションコンストラクトを作製して、領域特異
的発現調節領域のさらなる絞り込みを行い、脳全体で発現する遺伝子に関して
は *Otx* がその発現制御に関与していることを示唆する結果を得ている。これら
の結果は、ホヤ幼生の脳はこれまで考えられていた以上に領域化が進み複雑化
しており、また多くの遺伝子は領域特異的に発現するように制御されているこ
とを示すものとして重要な成果である。

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、平成 23 年 1 月 13 日に論文内容とそれに関連した事項について口頭試問を
行った結果、合格と認めた。