

論文審査の結果の要旨

氏名 山元 孝佳

本論文は、要旨と序論、方法、結果、考察、結論、文献から構成され、メダカ繊毛短小化変異体 *MZdhc2* を用いた解析から、動物の発生に重要なシグナル経路であるヘッジホッグ (Hh) 経路における魚類での繊毛依存性、さらには魚類特異的な Hh 経路の制御機構について調べたものである。

Hh 経路は神経や筋肉、四肢などのパターン形成に必須であり、無脊椎動物から脊椎動物まで広く保存されている重要なシグナル経路である。リガンドである Hh は濃度勾配により位置情報を与えるモルフォゲンとして作用し、Hh 経路を活性化する。近年の繊毛変異体における解析から、マウスにおいては Hh 経路に繊毛は必須であり、受容体 *Patched1* (*Ptch1*) などの Hh 関連因子が繊毛に局在することが明らかになっている。一方、ショウジョウバエなどの無脊椎動物ではこの経路に繊毛は必要ではない。魚類では、繊毛を欠失したゼブラフィッシュ変異体において Hh 経路の活性は完全には消失しないことが知られている。したがって、Hh 経路の繊毛依存性は脊椎動物内においても魚類と哺乳類で異なることが示唆されているが、魚類における繊毛と Hh 経路についての知見は乏しく、生物種による繊毛依存性の違いを生み出すメカニズムについても不明であった。

本論文では、まず魚類での Hh 経路における繊毛依存性を調べるため、メダカ繊毛短小化変異体 *dhc2* の解析について述べられている。*dhc2* 変異体は *cytoplasmic dynein heavy chain2* (*dhc2*) を欠損した劣性致死変異体である。*Dhc2* は繊毛内の物質輸送に関わっており、クラミドモナスやマウスの *dhc2* 変異体では繊毛が短小化する。魚類では体節形成初期まで母性因子が存在するため、この影響を除去するため、始原生殖細胞移植によるメダカ代理出産法を確立し、*maternal-zygotic* (MZ) *dhc2* 変異体を作製した。その結果、繊毛変異体の典型的な表現型である脳室の拡大や左右性異常、腎管の拡大が観察された。

次に、Hh 経路依存的な領域化が生じる神経管について走査型電子顕微鏡を用いて観察し、MZ 変異体で繊毛が著しく短小化していることを明らかにした。さらに Hh 下流遺伝子の発現解析し、マウス変異体と同様に *olig2* 発現の背側拡大し、マウス変異体では発現しない *foxa2* や *nkx2.2* が発現していることを示した。さらに、Hh 経路の阻害剤である *cyclopamine* で処理実験の結果も併せて、メダカにおいても Hh 経路は繊毛を利用しているが、マウスに比べ繊毛への依存度が低いと結論した。また *olig2* 発現領域の背側拡がりについては、野生型細胞の MZ 胚への移植実験などから、繊毛短小化によってリガンドが遠方まで拡散するようになったためであると考察している。

さらに魚類での哺乳類とは異なる Hh 経路活性化機構の解明を行っている。*fused* (*fu*) は、ショウジョウバエから魚類まで Hh 経路の細胞内伝達因子として機能する一方、マウスでは Hh 経路に関与しないことが知られているため、繊毛依存性の違いをもたらしメカニズムの

1つとして、魚類での *fu* の機能を解析している。*fu* のノックダウンや過剰発現の実験から、*fu* がメダカにおいても Hh 経路に必須であることを見出し、これまで詳細に明らかにされていなかった *fu* の神経管での発現パターンを解析し、神経管の腹側特異的に発現し、MZ*dhc2* ではその発現が背側に拡大していることを明らかにした。これらの事実から、*fu* が Hh 依存的に発現する可能性を見出し、野生型胚を Hh 経路の阻害剤である cyclopamine で処理すると、*fu* の発現が顕著に減少することを示している。また Hh 依存的な *fu* の発現制御については、ゼブラフィッシュでも同様の実験を行い、この制御機構の魚類での保存性を確かめている。また、低濃度の cyclopamine で処理して Hh 活性を弱めた胚で、*fu* を過剰発現すると、Hh 経路の標的遺伝子である *nkx2.2* の発現が回復することを示した。これらの結果から、魚類では Fused のポジティブフィードバックによる Hh 経路のシグナルの増強があると結論づけた。また、魚類においてこの機構が Hh シグナル経路の繊毛依存性が低い原因となり得ると付け加えている。

本研究は Hh 経路と繊毛の関連がどのように進化したのかを紐解く上で、繊毛短小化変異体を詳細に解析し、哺乳類との違いを見出した点で意義深い。また *fu* を介した魚類特異的なポジティブフィードバックによる Hh 活性化機構を初めて明らかにしたものであり、Hh 経路の進化を解明する上で大きな成果を上げたと言える。また、メダカでの代理出産法の確立は、今後の変異体研究においても有用性が高い。

なお、本論文のうち、メダカ *a490/dhc2* 変異体の原因遺伝子の同定は平成 17 年度卒業研究の石黒伸茂氏との共同研究であり、走査型電子顕微鏡を用いた解析は帝京大学萩原治夫博士との共同研究である。しかし、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

上記より、博士（理学）の学位を授与できると認める。