

審査の結果の要旨

氏名 松田尚人

本研究は、脊椎動物中枢神経系の発生に必須の機能分子を探索するため、高効率な突然変異誘発と簡便な遺伝子クローニングを両立する分子遺伝学方法論をゼブラフィッシュ *Danio rerio* で開発し、視覚系（網膜視蓋）神経細胞の分化に必須な因子の単離を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 4,5',8-trimethylpsoralen (TMP)変異誘発法で作製され、受精後 30 時間で網膜視蓋に神経変性をおこす *no tectal neuron (ntn)* 突然変異体胚ゲノムと野生型胚ゲノム間で、全ゲノムサブトラクション法 representational difference analysis (RDA) を行い、*ntn* 遺伝子座の近傍に位置する 19 個の RFLP マーカーを得た。これらを用いて *ntn* 遺伝子座の物理地図を作成し、4つの候補 cDNA を単離した。シャペロニンの一つである CCT γ 遺伝子に 143 bp の欠失変異があり、変異 CCT γ 蛋白は ATPase 活性モチーフを含む C 末端側 equatorial domain のほとんどを欠損していた。
2. CCT γ 遺伝子のアンチセンス morpholino の野生型胚への微量注入により、網膜神経節細胞が減少し、視蓋神経細胞に細胞死が認められた。また、CCT γ 遺伝子 mRNA を微量注入した変異体胚では、視蓋神経細胞死が抑制され、網膜神経節細胞数が野生型レベルまで回復した。以上の phenocopy および rescue 実験により、CCT γ 遺伝子が *ntn* 突然変異の原因遺伝子であることを証明した。
3. ゼブラフィッシュ CCT γ mRNA は原腸形成終了期（受精後 12 時間）以後全身で発現した。しかし、種々のマーカーを用いた検討により受精後 30 時間で *ntn* 突然変異体は網膜視蓋以外での形態形成には異常を認めず、網膜視蓋に局限した表現型を示した。
4. *ntn* 突然変異体の網膜では、神経前駆細胞数は野生型と遜色なく、*ath5* や *brn3b* は正常に発現していることから網膜神経節細胞への commitment までは正常であった。しかし、nAChR β 3 遺伝子プロモーター制御下で緑色蛍光蛋白質は発現せず、Neuroilin 抗体染色、アセチル化チューブリン抗体染色も減弱していることから、分化した網

膜神経節細胞が減少していることが明らかとなった。

5. *ntn* 突然変異体の中脳視蓋では、*brn3b* mRNA の発現は正常で、抗アセチル化チューブリン抗体染色では中脳視蓋神経細胞の神経網が欠損し、分化障害を認めた。

以上、原腸形成以後偏在性に発現するゼブラフィッシュ CCT γ 蛋白の変異が、網膜視蓋神経細胞特異的な分化障害を起こすことを証明し、CCT γ 蛋白の網膜視蓋分化因子としての新たな機能を発見した。また、TMP 突然変異誘発法が実際に欠失変異を誘発することを示した。RDA 法で近傍連鎖マーカーを単離し原因遺伝子クローニングに成功し、TMP-RDA 法としてゼブラフィッシュ分子遺伝学の新規方法論を完成させた。今後、脊椎動物の中樞神経系の発生に必須な遺伝子を系統的に単離し、分子機構を解明していく上で重要な貢献を果たすと期待され、本論文は学位の授与に値するものと認められる。