

論文審査の結果の要旨

津田 佐知子

本論文は2章からなる。第1章では、新規のメダカ突然変異体 *tacobo* の原因遺伝子同定と表現型解析の解析を行った。*tab* 変異体は、ENU 誘発突然変異体 screening により得られた、体軸伸長と神経発生に異常を示す劣性致死変異体である。*tab* 変異体原因遺伝子の positional cloning により、これが基底膜の主要構成成分であり組織の形態形成において重要な役割を持つことが知られている、laminin γ 1 変異体であることを明らかにした。これはメダカでの初の laminin 突然変異体の報告である。

次に第2章では、*tab*変異体が最も初期に示す神経管の形態形成異常に注目し、神経発生における細胞外シグナルの機能を調べた。神経発生初期の構造である神経管を構成する神経上皮細胞は、大きく2つの特徴的な性質をもつ。1つは、Interkinetic Nuclear Migration (INM) とよばれる細胞周期依存的な核移動であり、これにより核分裂は神経管の脳室面側 (apical 側) に偏って生じる。2つ目は、神経前駆細胞は増殖期において、主に水平分裂 (planar cell division) により互いに等価な娘細胞を生む。近年、このINMと水平分裂は、神経細胞を産生する神経前駆細胞の数を維持するのに重要であることが示唆されている。しかし一方、これら核の挙動を制御するメカニズムについては、細胞接着関連分子や細胞極性形成因子、細胞骨格などの関与が明らかにされているが、いずれも細胞内に局在する分子であり、細胞外分子による神経管組織レベルでの制御については不明であった。

まず、分裂M期の核を抗リン酸化ヒストン抗体で標識したところ、*tab* 神経管において分裂頻度や細胞周期は正常であるが、M期細胞核は basal 側に異所的に分布することが判明した。このとき、*tab* 神経管の basal 側において、laminin1 (α 1, β 1, γ 1) の染色性はほとんど失われ、さらに透過型電子顕微鏡観察により基底膜が薄くまた複数箇所途切れていた。次に、laminin の主たる receptor である integrin を介するシグナルに注目し、laminin/integrin シグナルの下流の中心的標的分子である、focal adhesion kinase (FAK) の活性を調べたところ、野生型 (*wt*) 胚に比べ *tab* 胚の神経管では、その活性化は著しく低下していた。さらに、Morpholino antisense oligonucleotide (MO) 注入による FAK 機能阻害実験により、*fak*-MO 注入胚は、神経管において *tab* と同様に異所分裂が観察された。これ

により FAK を介した細胞外シグナルが分裂期細胞核の位置決定に関与することが示された。

tab 胚での異所的細胞分裂の原因を調べるため、まず INM について、共焦点レーザー顕微鏡による time-lapse 観察を行った。*tab* 胚において多数の核が異常な移動パターンを示し、basal 側で異所的な分裂が生じていた。また、*tab* 胚での分裂直前の核の移動速度は、核分裂の位置によらず、*wt* 胚に比べ有意に低下していた。これらの結果により、laminin γ 1 が神経上皮細胞の INM を制御することが示された。また、apical 側での細胞の分裂軸を調べたところ、*tab* 変異体では分裂の方向はランダム化していることが分かった。この細胞の分裂軸異常は、FAK 機能阻害胚においても同様に生じていた。さらに、神経細胞数を比較したところ、*tab* 神経管において神経細胞数は同じ時期の *wt* 胚神経管と比べて有意に増加していた。一方、分裂頻度は *tab* 神経管において有意に減少していた。これは、*tab* 神経管において、神経前駆細胞が正常に維持されず、分化が早まっている可能性を示唆する。最後に、FAK シグナルが、いかにして INM と水平分裂を制御しているのかについて、分子モーターである dynein/dynactin との関連をしめした。Dynactin は複合体として、dynein の motor 活性に重要な役割を持つ。dynactin 複合体の 1 つ dynamitin p50 の過剰発現により dynactin の機能阻害実験を行ったところ、過剰発現胚において、神経管での異所分裂、分裂角度異常が観察された。さらに、laminin/FAK と dynein-dynactin システムの genetic interaction も確認された。さらに、Dynactin の局在を抗体を用いて調べたところ、FAK 機能阻害胚の神経管では、dynactin の局在が低下していることがわかった。以上より、INM と水平分裂が laminin/FAK と dynein 複合体の相互作用により制御されることが示された。

本研究により、神経上皮細胞での INM と水平分裂、さらに神経分化制御における FAK を介する細胞外シグナルの役割が初めて明らかになった。また FAK は、dynein の活性調節に寄与していることが強く示唆された。これは、細胞外分子と細胞内分子の相互作用により、INM と水平分裂が組織レベルで制御されるメカニズムの一端を明らかにした初めて例であり、評価に値する。

なお、本論文は、高島茂雄、北川忠生、浅川修一、清水信義、三谷啓志、嶋昭紘、堤真紀子、堀寛、成瀬清、石川裕二氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及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。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。