

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成17年度博士課程 入学

氏 名 中崎 歩

指導教員名 高橋直樹

論文題目 ホヤ *Mab21* 遺伝子発現パターンの解析

背景

mab21 遺伝子は線虫において細胞の運命決定に関連する因子として同定された遺伝子で、線虫 *mab21* 変異体では雄の生殖感覚器である ray に形成異常がおこり ray の4番が6番に変換融合する表現系を示すことから、変異体の表現系 male abnormal にちなんでその頭文字をとり *mab21* と命名された。

mab21 遺伝子は線虫意外にもショウジョウバエ、ニワトリ、カエル、ゼブラフィッシュ、マウス、ヒトにいたるまで様々な生物で単離されており、脊椎動物では *mab2111*、*mab2112* という二つのファミリーを形成していることが知られている。アミノ酸配列は種間で高度に保存され、進化の過程で保存された遺伝子であることから、生物の発生、生命維持において重要な役割をもっていることが予想される。実際に、マウスを用いた解析から *mab21* 遺伝子が重要な機能を担っていることが明らかとなっている。発現パターンの解析より、発生過程におけるマウス *mab2111*、*mab2112* の遺伝子は共通して、中脳、眼、鰓弓、肢芽、脊髄で発現し、それ以外にも *mab2111* は生殖結節で、*mab2112* は腹部体壁で発現する。ノックアウトマウスを用いた解析では *mab2111* 欠損マウスは水晶体の形成不全、また雄の生殖器の一部である包皮腺の形成不全、そして肋骨に形態異常をひき起こす。*mab2112* 欠損マウスは胎生致死となる。また、水晶

体及び網膜の形成不全、腹部体壁の形成不全なども観察される。これらの知見から、*mab21* 遺伝子はマウスの発生過程において、また生命維持に重要な役割を担っていることがわかる。

目的

現在までに *mab21* 遺伝子の解析に用いられた生物種は主にマウス、ゼブラフィッシュ、カエルなどの脊椎動物と線虫などの線形動物のみで、脊椎動物と線形動物の系統間に位置する生物種では解析されていない。そこで、本研究では、その系統間に位置する生物種を用いて *mab21* 遺伝子の解析を行った。実際、解析に用いた生物種は脊索動物尾索動物亜門に属するホヤを用いた。尾索動物亜門は、脊椎動物亜門、頭索動物亜門とともに脊索動物門を構成しており、脊椎動物の進化を考える上で貴重な情報を提供しうるグループである。ホヤ幼生の中樞神経系はわずか 300 個程度と少数の細胞から構成されているが、脊椎動物の脳神経系の基本設計が単純な形で見られる。背側に中樞神経系を持つことや、尾部にある脊索など、脊椎動物と共通の基本的体制を備えており、これらの特徴及び遺伝子の塩基配列をもとにした分子系統学的解析から、ホヤは脊椎動物と同じ脊索動物門に分類され、脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物と考えられている。このような系統学的に興味深い位置に存在するホヤを用いて、より詳細な *mab21* 遺伝子の機能を推測し、種を超えて存在する *mab21* 遺伝子の機能を解析することを目的として実験を行った。

結果

第一章 カタユウレイボヤの *mab21* 遺伝子の発現解析

現在までに、カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) の全ゲノム配列は解読されており、情報はカタユウレイボヤのゲノムデータベース <http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/searchGM?db=Cioin2> に公開されている。上記のデータベースを検索し *mab21* 遺伝子の配列情報を得た。

whole mount *in situ* hybridization 法により、受精卵から幼生期における *mab21* 遺伝子の発現パターンを調べた。受精卵から神経胚期までの間は発現が観察されなかった。尾部が伸長し始める初期尾芽期では頭部の予定脳胞領域の背側正中面に対して左右対称に 2 箇所発現が観察された。発生が進むと、尾芽胚では体幹部と尾部がより明確になり、尾部は更に伸長し、体幹部の先端では付着突起が形成され、神経系の発達とともに脳胞内に感覚器、眼点と平衡器の 2

つの色素細胞が見えてくる。この時期、*mab21* 遺伝子は脳胞内の膨らみに沿って発現し、分化した 2 つの色素細胞を取り囲むように色素細胞の両側に左右対称に発現していた。カタユウレイボヤ卵は受精後およそ 18 時間(18°C)で孵化し、体長約 1mm のオタマジャクシ型の遊泳幼生になる。遊泳幼生の眼点は、単一の色素細胞からなる眼杯と 3 個のレンズ細胞と 30 個程度の視細胞で構成され、レーザーによる眼点の破壊実験と行動解析により眼点が遊泳行動の光応答に関与していることが明らかにされている。幼生期における *mab21* 遺伝子の発現は、眼点を形成する色素細胞の眼杯の前側先端に局限して発現していた。眼点を形成する視細胞の細胞体は一層の層を形成し、眼杯の前端から後端にかけて眼杯全体を覆うようにして存在することから、*mab21* 遺伝子は視細胞の一部で発現しているのではないかと考えた。そこで、視細胞のマーカー遺伝子で視細胞伝達情報系のオフ機構に重要なタンパクをコードするアレスチン遺伝子と二重染色をおこなったところ、眼杯の前側先端で共発現していた。このことから、*mab21* 遺伝子は視細胞の一部で発現していることが明らかとなった。幼生期において *mab21* 遺伝子はこの他にも、感覚器である平衡器(重力感知器)の後ろ側の脳胞腹側部でも発現が確認された。

第二章 マボヤ *mab21* 遺伝子の単離と発現パターンの解析

カタユウレイボヤとともに、もう一種別のホヤ、マボヤ(*Halocynthia roretzi*)を用いて *mab21* 遺伝子の発現パターンの解析を行った。

カタユウレイボヤとは違いマボヤのゲノム配列は解読されていない。そのため、マボヤのゲノムライブラリーを作製し、カタユウレイボヤのエクソンの一部をプローブとしてライブラリーをスクリーニングし、マボヤ *mab21* ゲノム DNA を単離、遺伝子構造を明らかにした。その結果、マボヤ *mab21* 遺伝子は、ゲノム上 3464bp にわたって 6 つのエクソンからなり、359 アミノ酸で構成されるタンパク質をコードしていた。エクソン-イントロン構造を、線虫、マウス、カタユウレイボヤと比較したところ、マボヤ-カタユウレイボヤのホヤ間ではほぼ保存されていたが、それ以外の動物種である線虫やマウスとは全く保存されていなかった。アミノ酸配列の相同性を種間で比較すると、マボヤ-マウス間では、*mab21l1* とは 66%、*mab21l2* とは 65%であった。カタユウレイボヤ-マボヤ間では、68%であった。

whole mount *in situ* hybridization 法を用いて *mab21* 遺伝子の発現パターンを解析したところ、神経胚において発現は観察されなかった。初期尾芽期、中期尾芽期では、胚の背側神経管に沿って左右対称に二箇所発現が観察された。

これらの発現パターンはカタユレイボヤの *mab21* 遺伝子の発現パターンと類似していた。マボヤもカタユレイボヤと同様に、後期尾芽期になると、神経系の発達とともに脳胞内に、眼点と平衡器の 2 つの色素細胞が見えてくるが、この時期、*mab21* 遺伝子は脳胞内の色素細胞の付近に発現が観察された。

総括

本実験では、カタユレイボヤとマボヤを用いて、*mab21* 遺伝子の発現パターンの解析を行った。その結果、尾芽期では、視細胞の前駆細胞と考えられる場所で発現していた。また、カタユレイボヤの幼生期では、眼点の視細胞の一部で発現していることが明らかとなった。これらのことより *mab21* 遺伝子は、系統学的に脊椎動物の下流に位置する生物種ホヤでもマウスと同様に眼の形成に寄与している可能性が示唆された。

マウス *mab21* 遺伝子は眼形成のマスター遺伝子として知られている *pax6* 遺伝子の下流遺伝子で、*pax6* 遺伝子に発現が制御されている遺伝子であることがわかっている。カタユレイボヤにおいて *pax6* と *mab21* の発現パターンを尾芽期において比較したところ、予定脳胞領域で *pax6* の発現は *mab21* の発現領域と重複していることが明らかとなった。ホヤにおいても *mab21* 遺伝子と *pax6* 遺伝子の相互作用がマウスと同様の機構で成立する可能性があることが、本研究より明らかとなった。