

論文審査の結果の要旨

氏名 佐藤 朗

神経組織の正常な機能には、多様な神経細胞が作る秩序立った回路構造が必須である。特に本論文では、均一に見える神経細胞の集団内にも、細胞レベルでの違いが存在する点に注目している。このような細胞レベルの多様性は神経系の発生や機能に重要な役割を果たすと考えられるが、多くの神経系では複雑さが障壁となり、これまでほとんど研究されてこなかった。

本論文では単純な構造のゼブラフィッシュ側線神経系を用いることで、細胞表現型および遺伝子発現量の単一細胞解析を可能にした。側線系は構成する細胞数が少ない（20~30 個程度）ため、他の神経系では困難であった系全体にわたる単一神経細胞解析を行うことができる。これにより本論文は、軸索伸長過程の側線神経の振る舞いが細胞毎に大きく異なることを示した。さらに、振る舞いの違いが顕著な2つのサブタイプを同定し、両者の遺伝子発現量の違いを明らかにした。また、遺伝子発現の操作や網羅的な解析を行い、多様性が生じる機構に関しても考察している。

本論文は3章立てで構成されている。第一章では、側線の形成過程における単一神経細胞の振る舞いを解析している。側線神経の軸索は側線原基に先導されることが知られていたが、解析の結果、個々の神経軸索の振る舞いは非常に多様で、側線原基と接触しながら伸長する神経細胞は全体の1/3程度しか存在しないことがわかった。また、側線原基との接触の有無によって **Leader**（原基と共に伸長）と **Follower**（**Leader** の軸索上を伸長）に分類して比較すると、両者の間で軸索の伸長速度、成長円錐の形態に有意な違いがみられた。このような表現型の大きな違いから、2つのサブタイプは神経回路形成や感覚情報処理において、異なる役割を果たしている可能性が考えられる。

表現型の多様性を生み出す機構の解明を目的として、第二章では遺伝子発現量の単一細胞解析を行っている。まず9種の遺伝子（ハウスキーピング遺伝子、神経分化マーカー遺伝子など）の発現量を調べた結果、一部の遺伝子では発現量が細胞毎に大きく異なっており、側線神経細胞は遺伝子発現量に関しても多様であることが示された。続いて、遺伝子発現量をサブタイプ間で比較するため、単一細胞標識法と遺伝子発現解析を組み合わせを行った結果、**Leader** では *neurod* と *β -actin* の発現が強いことがわかった。加えて側線発生の初期から *neurod* 発現量は多様であったことから、*neurod* 発現量によって細胞のサブタイプが決定されることが予想され、*neurod* 過剰発現実験によりこの仮説は支持された。以上の結果から、初期の細胞集団における *neurod* 発現量の多様性が、表現型の多様性の要因となっていることが強く示唆された。

さらに本論文では、遺伝子発現量の多様性の全体像を理解するため、網羅的な発現解析も行っている。これにより *neurod* 発現量の多様性への外的な要因（他の遺伝子による発現制御など）の寄与度が相対的に小さいことが示唆された。また、網羅的解析により発現量の多様性が大きい遺伝子が明らかになったため、今後の機能解析により、表現型の多様化の詳細な機構が明らかになることが期待される。

第三章では、**Leader, Follower** が側線系全体の発生と機能にどのように寄与するかを明らかにするため、神経回路の構造を解析している。側線系では、トポグラフィックマップと呼ばれる多くの神経系に共通する機能的に重要な構造の存在が知られていた。本論文では単一細胞解析により、①**Leader** は細胞体の位置に関わらず後方まで伸長すること、②**Follower** はトポグラフィックマップを形成することを明らかにした。この結果は、2つの細胞集団が異なる機能（**Leader**: 後続の軸索のための足場、**Follower**: トポグラフィックマップを介した感覚情報処理）を持つ可能性を示唆している。

本研究は脊椎動物の神経系において、表現型と遺伝子発現の多様性を系全体にわたって明らかにした初めての例である。また、側線神経系の単純な構造に着目し、神経回路形成のモデル系として用いた点は独創的と言える。さらに単一細胞レベルで表現型と遺伝子発現を関連づける解析は、他の系にも応用可能であり、発生学、神経発生学に限らず様々な分野で新たな研究の可能性を広げるものとして高く評価できる。

なお、本論文は山口勝司氏、越田澄人氏、重信秀治氏、武田洋幸氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験を計画し、遂行したもので、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。