

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

#### **Evolutionary developmental study of the caudal skeleton in teleosts utilizing the medaka spontaneous mutant *Double anal fin***

(メダカ変異体 *Double anal fin* を用いた真骨魚類尾部骨格に関する進化発生学的研究 )

氏名 守山 裕大

#### 【序論】

脊椎動物は進化の過程で尾部の形態を変化させてきた。特に水中環境に生息する種では様々な形態を示し、それらは大きく以下のように分類することができる。軟骨魚類にみられるような尾部が背側に歪曲し背腹非対称な形態となる歪型尾、シーラカンスなどの肉鱗類やポリプテルス属などにみられるような尾部が屈曲せず伸長し背腹対称な形態となる両型尾、そして真骨魚類にみられるような内部構造は非対称なもの、外見的には背腹対称な形態となる正型尾の3つである(図1)。正型尾は真骨魚類に特有の形態であり、水中環境での遊泳に最も適した形態であると考えられている。外見上は背腹対称な形態であるが、内部構造は極端に背腹非対称な形態となっている。尾部骨と呼ばれる脊椎後端部が背側に屈曲し、下尾骨と呼ばれる特殊化した腹側の骨要素が拡大し、尾鰭を支える形となっている。正型尾は真骨魚類の進化における最も重要な新規形質の一つであると考えられているが、どのような遺伝学的・発生学的メカニズムによって形成されるかはこれまで全く明らかになっていなかった。そこで、本研究では正型尾の形態が変化するメダカ自然突然変異体 *Double anal fin* (*Da*)に着目した。

*Da* は自然集団から単離された自然突然変異体であり、ホモ接合体で生存可能で形態が特異的に変化する。背ビレや色素パターン、体型が変化するという表現型に加え、尾の形態が変化するという興味深い表現型を示す。野生型メダカは他の真骨魚類同様に尾部骨が背側に屈曲する正型尾を有するが、*Da* では尾部骨が背側に屈曲せずまっすぐに伸長し、その結果として菱形の尾ヒレ

となる (図2)。このように、*Da* は正型尾の特徴を失い両型尾に似た尾部骨格を示す変異体であり、脊椎動物の尾部骨格の発生と進化を研究する上で有用なモデルであると言える。

先行研究により、*Da* の原因領域はメダカゲノム上の 174kb に絞込まれており、その領域内にはジンクフィンガータイプの転写因子をコードする *zic1* と *zic4* (以下 *zic1/zic4* と記す) 遺伝子のみが存在することが明らかにされていた。*zic1/zic4* は脊椎動物において神経管、体節中胚葉において発現することが知られており、発生過程において細胞増殖や分化決定などといった様々な役割を担っている。両遺伝子は近接して存在し、その発現パターンもほぼ一致することが報告されている。しかし、*Da* において *zic1/zic4* のコード領域に変異はみられず、また *Da* では中胚葉特異的な発現の消失がみられた。以上から、私は *Da* において *zic1/zic4* 周辺の非コード領域に変異が生じ、その結果として両遺伝子の中胚葉エンハンサーの活性が特異的に阻害されているのではないかと、そのために尾部骨格の形態が変化しているのではないかとという作業仮説を立て、研究を進めた。

### 【結果】

*Da* における変異を探索するために、*zic1/zic4* 周辺の非コード領域の配列を調べた。*Da* の Fosmid library を作製し、スクリーニングによって *zic1/zic4* 周辺領域をインサートに含むクローンを単離し、ショットガンシーケンスによってその配列を決定した。その結果、*Da* では 45kb 以上もの DNA 断片が *zic4* の下流 8.6kb の位置に挿入されていることが明らかとなった。この DNA 断片は挿入部位に順向き反復配列が挿入され、その両端には逆向き反復配列がみられた。これら二点は DNA 型トランスポゾンの特徴であることから、挿入されている巨大 DNA 断片は DNA 型トランスポゾンであると考えられる。これまでに報告されている DNA 型トランスポゾンよりもはるかに巨大であり、新規のものである。私はこれを "albatross" と名付けた。

次に、*zic1/zic4* の中胚葉エンハンサーの探索を行った。具体的には、*zic4* の下流および *zic1/zic4* の近傍領域について、レポーターアッセイによりそのエンハンサー活性を検討した。その結果、*zic4* の下流に存在する非コード領域は体節中胚葉における発現が、また *zic1/zic4* 近傍領域に存在するものでは神経管における発現が高頻度に観察された。以上から、*zic1/zic4* の体節エンハンサーは *zic4* の下流に存在することが示唆された。これら非コード領域は、*albatross* よりも遠位に存在する。

*zic1/zic4* が実際に *Da* の原因遺伝子であるかということを証明するために、*zic1/zic4* を含む DNA コンストラクトを *Da* 胚に導入し、トランスジェニック系統を作ることによって表現型がレスキューされるかを検討した。まず、*zic1/zic4* と両遺伝子の全ての調節領域を含むような BAC クローンをレポーターアッセイにより探索・同定した。次に同定した BAC クローンについて、相同組換え技術により *zic1*, *zic4* それぞれのコード領域をレポーター遺伝子に組換えたコンストラクトを作製し、*Da* 胚に導入した。その結果、*zic1*, *zic4* 両方、またはどちらか一方のみを導入したトランスジェニック *Da* 系統では表現型が完全にレスキューされた。また、*zic1*, *zic4* 両方をレポーター遺伝子に置き換えたコントロール BAC コンストラクトでは、*Da* の表現型はレスキューされな

かった。以上から、*zic1/zic4* は *Da* の原因遺伝子であることが示された。

次に、尾部の発生過程を詳細に観察、記述した。その結果、メダカ胚は st. 33 (受精後 4 日胚) で尾部が背側に屈曲し始めることが明らかとなった。また、体節形成に着目したところ、メダカ胚では st. 30 (受精後 3 日胚) で体節が 35 個形成されるものの、さらに発生が進むと後方体節 (31-35 番目体節) が融合し、st. 33 では体節数が 31 個となることが明らかとなった。体節融合により生じた領域について切片を作製し組織観察を行ったところ、硬節細胞が大部分を占める組織になっていることが明らかとなった。体幹部では筋節が大部分を占め、硬節はその中のごく一部を占めることから、体節融合によって生じた領域は体幹部とは異なり、特殊な組織であると言える。発生が進むとこの領域から尾部骨格が形成されることから、私はこの領域を“caudal-skeleton forming mesenchyme” (CSM) と名付けた。*Da* では体節融合とそれに伴う CSM 形成は正常であるが、尾部の屈曲は生じない。

次に上記で明らかとなった尾部の発生過程において、*zic1/zic4* がどのように発現しているかを詳細に観察した。その結果、st. 33 において背側 CSM で強く発現することが明らかとなった。また、この背側 CSM における発現は尾部骨格の形成中も維持されていた。一方 *Da* では体節背側の発現同様、背側 CSM の発現も消失していた。以上から、背側 CSM における *zic1/zic4* の発現が尾部の屈曲を制御していることが示唆された。

研究を進める過程で、私は *Da* 集団中から、表現型が部分的にレスキューされるリバータント系統を単離した。この系統はホモ接合体において尾部の形態のみが野生型と同様な形態を示す。私はこの系統を“*Da<sup>rcf</sup>*” (rcf, rescued caudal fin) と名付け、以下の解析に用いた。まず、*Da* と *Da<sup>rcf</sup>* を交配し、両表現型が分離しないことを確かめ、*Da<sup>rcf</sup>* が *Da* のアレルであることを確認した。*albatross* について調べると、*Da<sup>rcf</sup>* においても *Da* と同じ位置に *albatross* 様の DNA 断片が挿入されていることが明らかとなった。*Da<sup>rcf</sup>* における *zic1/zic4* の発現を調べたところ、st. 33 において体幹部体節での発現はほとんどみられなかったが、背側 CSM における発現は野生型と同程度にまで回復していた。このことから、背側 CSM における *zic1/zic4* の発現と尾部の屈曲の相関が強く支持された。

さらに、メダカ同様に真骨魚類であり正型尾を有するゼブラフィッシュにおける尾部組織と *zic1/zic4* の発現を調べた。その結果、受精後 42 時間胚において尾部で CSM が形成されていること、また、*zic1/zic4* が背側 CSM で強く発現していることが明らかとなった。このことから、*zic1/zic4* による尾部屈曲のメカニズムは真骨魚類内で保存されていることが示唆された。

最後に、尾部が屈曲しないポリプテルスとアフリカツメガエルについて尾部の組織と *zic1/zic4* の発現パターンを調べた。その結果、ポリプテルス、アフリカツメガエル共に発生後期における尾部で CSM 様の組織構造は観察されず、また *zic1/zic4* の尾部 (CSM 相当部位) 背側における強い発現は観察されなかった。以上から、CSM と CSM 背側における *zic1/zic4* の発現が正型尾形成を制御していることが示唆された。

## 【考察】

本研究では、*Da*における変異を同定し、さらにCSMという硬節細胞に富む特殊な組織を初めて記載した。CSMからは下尾骨や上尾骨といった尾部骨格が形成される。ポリプテルスは条鰭類で両型尾を有する種であり、本研究においてポリプテルス胚でCSMが観察されなかったことから、CSMの形成が正型尾形成に重要なステップであることが考えられる。さらに*Da*の解析結果から、CSMが上尾骨、下尾骨といった肥大化した特殊な骨要素を作り、それらが*zic1/zic4*の発現によって背腹の非対称な形態へ変化すると考えられた。ゼブラフィッシュにおいてCSMの形成と*zic1/zic4*の背側CSMにおける発現が観察されたことから、以上のメカニズムは真骨魚類内で保存されていることが考えられる。また、ポリプテルスとアフリカツメガエルにおいてCSMが観察されなかったことから、真骨魚類に至る系統においてCSMが獲得されたことが考えられる。

本研究の結果から、背側CSMにおける*zic1/zic4*の発現が正型尾形成を制御していることが示された。さらに*Da<sup>ref</sup>*の*zic1/zic4*の発現パターンから、体節とCSMの転写制御領域は別個のものである可能性が高い。実際、体節背側における*zic1/zic4*の発現は脊椎動物内で保存されている。本研究の結果から、脊椎動物の進化の過程で、真骨魚類に至る系統において*zic1/zic4*が背側CSMへco-optionされ、背腹非対称な尾部骨とそれによる正型尾が獲得されたと考えられる。

本研究は脊椎動物における重要な形質である尾部骨格について、その発生と進化の一端を明らかにした。本研究はゲノム、細胞、組織、器官と様々な階層からのアプローチによるものであり、このような統合的研究は進化発生学分野における新たな方向性を示すものであると期待できる。

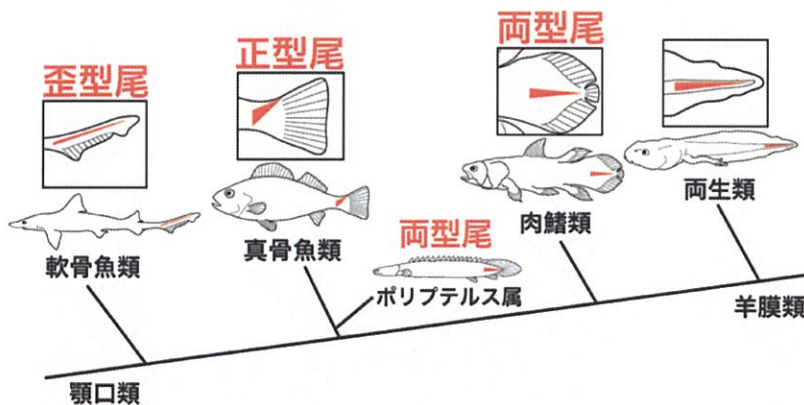


図1 脊椎動物における尾部骨格代表的な尾部形態の名称と脊椎動物の系統関係。赤矢じりは脊椎後端部の方向を示している。

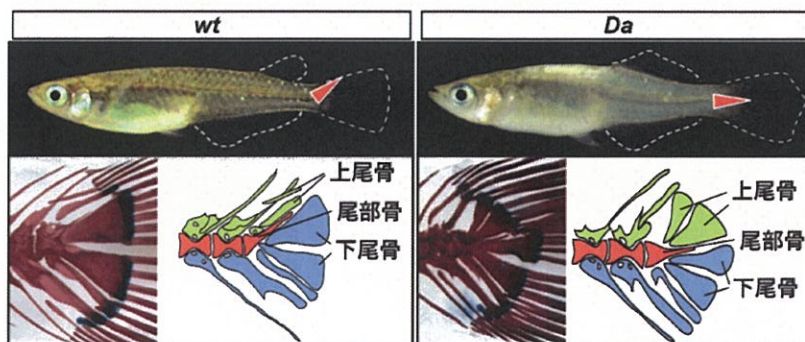


図2 メダカ野生型 (*wt*) と *Double anal fin* 変異体 (*Da*) *Da* では尾部骨格の形態が変化する。