

# 論文審査の結果の要旨

氏名 守山 裕大

本論文では、メダカ自然突然変異体 *Double anal fin (Da)* とその原因遺伝子 *zic1, zic4* を手掛かりとし、条鰭類・真骨魚類における正型尾形成機構を明らかにしている。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、どのような遺伝的・発生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。本論文では正型尾の形態が変化するメダカ変異体 *Da* を手掛かりとして真骨魚類尾部骨格の発生と進化のメカニズムの一端を明らかにした。

先行研究により *Da* の原因領域はメダカゲノム上の 174kb に絞り込まれており、その領域内には *zic1* と *zic4* (*zic1/zic4*) というジンクフィンガータイプの転写因子をコードする 2 つの遺伝子が近接して存在することが明らかにされていた。しかし、*Da* において *zic1/zic4* のコード領域に変異はみられず、その発現は *Da* では中胚葉特異的に発現が消失していた。以上から、論文提出者は *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、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作業仮説を立て、研究を進めた。

*Da* における変異を探索した結果、*Da* では 41kb 以上の DNA 型トランスポゾンが *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。これを”*Albatross*”と名付けた。さらに、*zic1/zic4* のシス制御領域 (エンハンサー) の解析結果から、*Da* では *Albatross* によって *zic1/zic4* 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ことが示唆された。

*zic1/zic4* が実際に *Da* の原因遺伝子であるということを証明するために、*zic1/zic4* を含む野生型 BAC 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でその表現型がレスキューされるかを検討した。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* 系統ではその表現型が完全にレスキューされた。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した。その結果、メダカ胚は stage (st.) 33 (受精後 4 日胚) で尾部骨先端部が背側に屈曲し始めること、またその際に後方体節が融合し、硬節細胞に富む特殊な組織が形成されることが明らかとなった。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、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 形成は正常であった。しかし、尾部の屈曲は生じなかった。

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。一方 *Da* では体節背側の *zic1/zic4* 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。

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 (進化的に最も古い条鰭類) 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 形成と CSM 背側における *zic1/zic4* の発現が正型尾形成には必須であることが強く示唆された。

論文提出者は、メダカ変異体 *Da* を手掛かりとして長年不明であった真骨魚類における正型尾の形成メカニズムを明らかにした。さらに、様々な脊椎動物種を用いる事により、その進化の一端を明らかにした。本論文はゲノム、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。

なお、本論文は、河西通氏、中村遼平氏、塚原達也氏、隅山健太氏、Maximiliano L. Suster 氏、川上浩一氏、豊田敦氏、藤山秋佐夫氏、安岡有理氏、長尾佑介氏、猿渡悦子氏、清水厚志氏、若松祐子氏、日比正彦氏、平良眞規氏、岡部正隆氏、成瀬清氏、橋本寿史氏、島田敦子氏、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。