

Title	顕微注入法を用いたクモ胚の頭部体節形成機構の解析
Author(s)	金山, 真紀
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/27643">https://hdl.handle.net/11094/27643</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	金 山 真 紀
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 2 4 3 4 0 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	顕微注入法を用いたクモ胚の頭部体節形成機構の解析
論文審査委員	(主査) 招聘教授 橋本 主税 (副査) 教 授 西田 宏記 特任准教授 藤本 仰一 招聘准教授 小田 広樹

#### 論 文 内 容 の 要 旨

多くの動物は体軸に沿って繰り返し構造を持っている。しかし、この繰り返し構造を形成する仕組みには、動物によって違いがある。

節足動物の形づくりにおける体節形成の仕組みには 2 つの様式が知られている。1 つは同時にほとんどの体節を形成する様式 (同時型) である。この様式はショウジョウバエでもっともよく研究されている。もう 1 つは次々と付け加える様式 (付け加え型) である。多くの節足動物は、細胞化された環境で連続的に後方から体節を付け加える様式を持つことが知られている。後者のような細胞環境において、どのように細胞が運動し遺伝子の発現パターンが変化するかについては、まだ理解が進んでいない。

近年、オオヒメグモ胚を用いた研究から、その胚発生の過程では細胞と細胞の相互作用の重要性が指摘されてきた。そこで私はこのオオヒメグモ胚を用いて、細胞化された環境で達成される体節形成過程についての研究を行なった。

より動的な視点での解析を進めるために、外来の物質を直接、胚へ注入する顕微注入法の開発を行なった。16 核期の胚の段階で蛍光デキストランを注入すると、1 つの核を含む一定の細胞質領域に取り込まれ、周りの領域に漏れることなく受け継がれた。このことから、クモ胚の 16 核期にはすでに細胞化が完了し、細胞環境が早期に形成されることが示唆された。

私はこの顕微注入法を応用し、クモ胚における頭部体節形成過程の仕組みを細胞運動と遺伝子の機能の 2 つの側面から解析した。その結果、クモ胚の頭部において新規の体節形成様式を発見した。

オオヒメグモの頭部では、ショウジョウバエのセグメントポラリティ遺伝子 *hedgehog* の相同遺伝子である *Ah-hh* の発現のストライプが移動する波のように変化した。細胞の標識実験より、この *At-hh* の発現の移動は、前方の細胞が *At-hh* の発現をやめて後方の細胞が *At-hh* を発現するようになることで起きることがわかった。さらにこのストライプが分割を繰り返すことで、2 つの頭部体節が 1 つずつ形成された。*At-hh* のストライプの移動と分割に特徴づけられるこの体節形成は、細胞の割り込みによる収斂伸長運動を伴っていた。次に、この頭部体節形成における分子機構を解析するために、EST ライブラリーからその候補因子を探索した。すると、ショウジョウバエのギャップ遺伝子 *orthodenticle* の相同遺伝子 (*At-otd*) とペアルール遺伝子 *odd-paired* の相同遺伝子

(*At-opa*)が見つかった。胚全体で影響を与える parental RNAi と、顕微注入によって局所的に影響を与える embryonic RNAi を用いて、この2つの遺伝子の機能を解析した。その結果、*At-hh* ストライプの発現の移動と維持には *At-otd* が、その分割には *At-opa* が必要であることが示唆された。ショウジョウバエのセグメントポラリティ遺伝子 *armadillo* 相同遺伝子の機能解析から、Wg/Wnt シグナルの関与も考えられた。

これらの結果は、ショウジョウバエの胴体部体節形成過程では階層構造状のカスケードネットワークを形成する遺伝子が、クモ胚の頭部体節形成ではフィードバック機構をもつネットワークを形成することを示唆している。このオオヒメグモの解析システムは、細胞環境における遺伝子発現のパターン形成の仕組みと体節形成の多様性を理解するよりよいモデルとなりうる。

## 論文審査の結果の要旨

金山真紀氏の学位論文では、繰り返し構造を作るために遺伝子発現のパターンがどのように変化し制御されているかという問題に対して、オオヒメグモ胚の実験系を用いた研究を展開しています。

オオヒメグモは、その胚発生の観察のしやすさ、卵の得やすさ、parental RNAi による遺伝子機能解析が可能であること等の利便性がありますが、より動的に頭部大切形成過程をとらえるために、新しく顕微注入法の技術を開発したことにより、細胞の標識や embryonic RNAi の技術を確立し、研究の発展性を飛躍的に上昇させた点が大いに評価できます。本研究で示されたような、外来物質の顕微注入による細胞の追跡を向上させた例や局所的な機能解析を行なった例は、今までの節足動物の研究ではほとんど知られていません。

実際にこの顕微注入法を用いて、彼はオオヒメグモ胚の頭部体節形成過程において以下の事実を発見しています。

- ①オオヒメグモ胚が少なくとも16核期には細胞化していること。
- ②頭部体節形成過程では、細胞の割り込みによる収斂伸長運動がおきつつ、遺伝子の発現パターンが動的に変化していること。
- ③局所的に dsRNA を導入する embryonic RNAi (eRNAi) によって、頭部体節に関わる遺伝子の機能に対して、動的な視点を取り入れることに成功したこと（実際には、*At-hh* の発現が胚盤の縁にあるときと、その後縁から離れたとき、*At-otd* eRNAi がそれぞれの時点で *At-hh* のストライプに与える影響が異なっていた点）。さらに、これらの結果から、新しい様式の体節形成過程のモデルを提案していること。

これらの点を実験的に示した事は個体発生の見地のみならず、動物進化の観点から重要な意味を持っていることは確かであり、その先進的な金山氏の取り組みは高く評価できます。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認めます。