

Title	ゼブラフィッシュの中枢神経系後方誘導に関わる遺伝子群の単離と解析
Author(s)	依田, 宏樹
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44086">https://hdl.handle.net/11094/44086</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	依田宏樹
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 17552 号
学位授与年月日	平成 15 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	ゼブラフィッシュの中樞神経系後方誘導に関わる遺伝子群の単離と解析
論文審査委員	(主査) 教授 近藤 寿人 (副査) 教授 八木 健 教授 小倉 明彦

#### 論文内容の要旨

脊椎動物の中樞神経系の前後軸に沿った領域化は、初期発生過程に起こる。ゼブラフィッシュの神経系の前後軸に沿った領域化のモデルとして、次の二段階を経るといものが有力である。すなわち、(1)原腸期においてオーガナイザー組織によって背側外胚葉に前方神経系の性質を持った神経板が誘導され、(2)続いてオーガナイザー側方の予定中胚葉・内胚葉に由来するシグナルによって後方神経板が後方神経系へと転換される(後方化)。これまでに、繊維芽細胞成長因子(FGF)ファミリー蛋白質、Wntファミリー蛋白質、レチノイン酸、Nodal蛋白質などの分泌性因子が、後方神経系の誘導を担う候補分子(後方化因子)として提案されてきた。しかし、これらだけでは後方化を説明できず、別の分子が関与している可能性もある。私は後方神経板に直接作用する後方化因子や、それに反応して活性化される分子群を明らかにすることで後方化の分子機構を理解したいと考え、以下の実験を行った。

まず、ゼブラフィッシュの神経板の後方化に FGF、Wnt、Nodal 分子が必要であるかどうか調べた。FGF、Wnt、Nodal のシグナルを個々の細胞において抑制した後期胞胚(受精後 4.7 時間)の前方神経板に、初期原腸期(受精後 6 時間)のオーガナイザー側方の予定中胚葉・内胚葉を移植した。この胚において、野生型胚と同程度に移植片の周囲に後脳マーカーの発現が誘導されることから、これらの分泌因子が単独で直接神経板に作用している可能性が低いことを示した。

そこで、後方神経系の誘導に関わる一連の遺伝子群を明らかにするために、後方神経板が後方神経系に特異化される初期原腸期(受精後 6 時間)から中期原腸期(受精後 8 時間)の間にゼブラフィッシュの後方神経板及びそれを裏打ちする中胚葉・内胚葉において限局して発現される遺伝子を探索した。中期原腸胚(受精後 8 時間)の前方・後方それぞれの組織から得た cDNA の間でサブトラクションを行うことで作製された後方組織に特異的な cDNA プールを利用し、420 個のクローンの原腸胚における発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより調べた。このうち、76 個の cDNA 断片が後方組織に限局した発現を示した。これらは新規の分泌性因子 1 個、膜蛋白質 1 個を含む 32 個の異なる遺伝子に相当していた。

次に、単離した遺伝子群の発現が神経板と中胚葉・内胚葉のどちらに局在しているかを明らかにするために、中期原腸胚(受精後 8 時間)において *in situ* ハイブリダイゼーションを行った胚の矢状面の切片を作製した。これにより遺伝子群を、(1)後方神経板のみで発現される遺伝子、(2)後方神経板とそれを裏打ちする中胚葉・内胚葉の双方で発現される遺伝子、(3)後方の中胚葉・内胚葉のみで発現される遺伝子、3つのグループに分類した。発現領域が前後軸

方向に広い遺伝子については中脳と後脳の境界のマーカーとの二重染色を行い、中脳と後脳の境界と部分的に重なる領域にまで発現が達している3つの遺伝子を同定した。

最後に、単離した遺伝子群のうち、オーガナイザー側方の予定中胚葉・内胚葉からのシグナルによって発現が誘導される遺伝子を調べた。初期原腸期（受精後6時間）の胚盾側方の予定中胚葉・内胚葉の移植により、中期原腸期（受精後8時間）において発現が誘導される7個の遺伝子を同定した。このうち3つは後方神経板とそれを裏打ちする中胚葉・内胚葉双方で発現され、発現の前端が中脳と後脳の境界にまで達している転写制御因子及び膜蛋白質であった。後方化因子に反応して、後方神経板でこれらの遺伝子の発現が誘導されることで後方神経系へと特異化される可能性がある。

今回単離した類似した発現領域を示す遺伝子群は、神経系後方の誘導と領域性の確立に関わるシグナル経路の新規構成分子である可能性がある。今後、モルフォリーノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた複数の遺伝子の同時抑制などの実験を体系的に行うことで、後方神経板に後方神経系の特異性を与えるシグナル経路の構成分子を明らかにして行く。

### 論文審査の結果の要旨

中枢神経系原基の誘導は、胚発生初期の重要な過程であるとともに、発生過程における誘導の代表例として重視されている。

本研究では、ゼブラフィッシュ胚において、中枢神経系の後半部分（後脳、脊髄）の原基が、正中線を外れた、将来中・内胚葉になる組織からの誘導によって外胚葉内に生ずることをまず確認した。次いでその後方側の中枢神経系原基の誘導に関与する分子群を明らかにするために、将来中・内胚葉や後部中枢神経系原基に片寄って発現される遺伝子のcDNAを集めた。サブトラクション法によって得られた420個のcDNAクローンの各々について、対応する遺伝子の発現をゼブラフィッシュ胚の*in situ*ハイブリダイゼーションによって解析し、目的とする遺伝子の候補32を得た。そのうち7個の遺伝子は、後部中枢神経系を組織移植によって異所的に誘導した際に発現が誘導された。これらは誘導をうけた側の組織において、後部中枢神経系の分化に直接的に関与する可能性がある。他の遺伝子の中には、誘導シグナルを生成する機構にかかわるものがあると予想される。

本研究は、後部中枢神経系の誘導にかかわる遺伝子群を網羅的に同定・単離し、それらを発現パターンと作用段階によって分類したもので、中枢神経系の誘導機構の理解に大きな貢献をした。博士（理学）の学位論文に価する。