

2013. 5

特集号



(題字：脇口宏学長)

国立大学法人
高知大学学報

高知大学学位授与記録第六十一号

法人企画課広報戦略室発行

本学は、次の者に博士（理学）の学位を授与したので、高知大学学位規則第14条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

*
*
*
*
*

高知大学学報

本学は、次の者に博士（理学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲総科博第9号	神田 美幸	カタユウレイボヤの胚発生における <i>Hox1</i> 遺伝子の転写調節	1

ふりがな 氏名(本籍) 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目 発表誌名	かんた みゆき 神田 美幸(広島) 博士(理学) 甲総科博第9号 学位規則第4条第1項該当 平成25年3月22日 カタユウレイボヤの胚発生における <i>Hox1</i> 遺伝子の転写調節 (1) <i>Developmental Biology</i> , 335. 454-463 (2009) (2) <i>Development</i> , 139. 2156-2160 (2012) (3) <i>Development, Growth and Differentiation</i> , 55 (2) 260-269(2013)
	審査委員 主査 教授 藤原 滋樹 副査 教授 川村 和夫 副査 教授 松岡 達臣

論文の内容の要旨

本研究で用いるカタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) は脊索動物門に属している。尾索動物であるホヤは脊椎動物に最も近い無脊椎動物である。つまり、ホヤは無脊椎動物から脊椎動物への進化の過程を探るための鍵となる動物だといえる。カタユウレイボヤはゲノムの配列がすでに解読済みであり、さらに実験発生学的研究を進めるための基本技術が既に確立されているため、脊索動物の進化発生学的研究において優れたモデル生物といえる。

レチノイン酸は、ビタミンAの誘導体である。脊索動物あるいは脊椎動物を特徴づける体構造のほとんどがレチノイン酸に依存して作られる。具体的には、中枢神経系の前後軸に沿ったパターンニングや神経堤細胞の分化、四肢の形成などである。脊椎動物が正常に発生するためにはレチノイン酸の濃度が正しい時期と場所で適切に保たれていなければならないことが分かっている。しかし、ホヤにおけるレチノイン酸のはたらき、レチノイン酸が引き金を引く発生制御カスケードの詳細は明らかとはなっていない。

本研究では、カタユウレイボヤのレチノイン酸標的遺伝子である *Ci-Hox1* の転写調節について解析を行なった。*Ci-Hox1* はカタユウレイボヤの尾芽胚において、表皮と神経管で発現する。*Ci-Hox1* のエンハンサー/プロモーター領域に *lacZ* 遺伝子をつないだレポーターコンストラクトを胚に導入し、*Ci-Hox1* の転写調節に重要な領域を探索した。表皮の発現に重要な領域(表皮エンハンサー)は *Ci-Hox1* の5'上流領域にあることが明らかになった。この5'上流領域にはレチノイン酸応答エレメント(RARE)類似配列が含まれていた。このRARE類似配列に変異を入れたレポーターコンストラクトを作製したところ、表皮における発現が消失した。よって、このRARE類似配列が *Ci-Hox1* の表皮エンハンサーの活性化に必要であることがわかった。また、神経管での発現に重要である領域(神経エンハンサー)は *Ci-Hox1* の第2イントロンであるとわかった。この第2イントロンの中にもRARE類似配列が存在した。このRARE類似配列に変異を導入すると、神経索でのエンハンサー活性は減少したが、完全には消失しなかった。これらの結果から、*Ci-Hox1* の表皮エンハンサーは完全にレチノイン酸依存的な経路で活性化されており、神経索エンハンサーは二つの redundant な経路で活性化されると考えられる。一つはレチノイン酸依存的な経路であり、もう一つはレチノイン酸非依存的な経路である。

ホヤと同じ尾索動物に属するオタマボヤ (*Oikopleura dioica*) は、外部からレチノイン酸で処理をしても形態形成に大きな影響が見られず、そのゲノム中にレチノイン酸の合成酵素や受容体をコードする遺伝子を持っていない。それにも関わらず、オタマボヤの *Hox1* (*Od-Hox1*) は *Ci-Hox1* とよく似た発現パターンを示す。本研究では、*Od-Hox1* の 5' 上流領域を含む *lacZ* レポーターコンストラクトをカタユウレイボヤ胚に導入した。*Od-Hox1* の 5' 上流領域は、神経管で *lacZ* の発現を活性化させたが、レチノイン酸には応答しなかった。つまり、この神経索での発現はレチノイン酸非依存的な経路で活性化していると考えられる。これらの結果から、ホヤとオタマボヤとでレチノイン酸非依存的な転写制御が保存されている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文は、ホヤ胚における *Hox1* 遺伝子の転写調節に関する研究を三部構成でまとめたものである。第一部と第二部では、胚における *Hox1* の正常な転写活性化にレチノイン酸が重要であることを証明した。第三部では、ホヤと、これに近縁な原索動物オタマボヤとの間で *Hox1* の転写調節領域の比較発生的な実験を行い、脊索動物における遺伝子発現制御機構の進化に関する考察を行った。

第一部では、ホヤ胚の表皮において *Hox1* の転写を活性化するエンハンサー領域が転写開始点の上流にあることを示し、その領域にレチノイン酸応答配列を発見した。この配列にレチノイン酸受容体が結合することをゲルシフト解析で実証した。また、この配列に突然変異を作ると、エンハンサーは表皮で全く活性化しなくなり、レチノイン酸にも応答しなくなった。これらの結果から、ホヤ正常胚の表皮における *Hox1* の発現にレチノイン酸が必要であることが世界で初めて証明された。

第二部では、ホヤの中枢神経系（神経索）において *Hox1* の転写を活性化するエンハンサーが第二イントロン中にあることを見出し、その領域にレチノイン酸応答配列を発見した。この配列に突然変異を作ると、エンハンサーは神経索でほとんど発現しなくなった。ただし、この実験では神経索における転写活性は完全には失われなかった。わずかに転写活性の残ったエンハンサーはレチノイン酸には全く応答しなかった。これらの結果から、神経索において *Hox1* の転写を活性化するエンハンサーは二つあり、一方はレチノイン酸に依存し、もう一方は依存しないことが推測された。

第三部では、ホヤに近縁な原索動物オタマボヤの *Hox1* エンハンサーに関する研究が行われた。オタマボヤ *Hox1* の発現パターンはホヤの *Hox1* とよく似ている。しかしオタマボヤゲノムにはレチノイン酸の合成酵素や受容体をコードする遺伝子が存在しない。したがって、オタマボヤ *Hox1* の発現がレチノイン酸に依存しないことは明らかである。この研究では、オタマボヤ *Hox1* のエンハンサーが、ホヤ胚の神経索で活性化することを示した。このエンハンサーはレチノイン酸には応答しなかった。これらの結果から、レチノイン酸に依存しない転写調節機構がホヤとオタマボヤに共通して存在することが示唆された。

慎重にデザインされた研究計画、説得力のあるデータの積み重ね、ストレートに結論へと向かう論理的な考察、全ての面において優れた論文である。これらの成果は3編の査読付き論文として、国際的に評価の高い学術誌（*Developmental Biology* や *Development* など）に掲載されており、その研究の質の高さが証明されている。よって、学位申請者 神田 美幸 は博士（理学）の学位を得る資格があると認める。