

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	竹 本 あ ゆ み
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
Study on mechanism for the determination of left-right asymmetry mediated by cilia in sea urchin embryo (ウニ胚における繊毛を介した左右非相称性決定機構の研究)			
論文審査担当者			
主 査	准教授	坂 本 尚 昭	
審査委員	教 授	山 本 卓	
審査委員	教 授	井 出 博	
審査委員	教 授	坂 本 敦	
審査委員	准教授	粟 津 暁 紀	
〔論文審査の要旨〕			
<p>ヒトを含む動物の体は一見左右相称に見えるが、体を構成する器官は左右非相称に配置されている。このような非相称性は、限られた空間の中にすべての器官を収め、かつ正常に機能させるために必要である。体の左右非対称性を生じるメカニズムは、脊椎動物においてよく研究されており、ほ乳類や魚類では胚に形成される繊毛の回転運動により生じる水流が左右性を決定することが知られている。一方鳥類では、$H^+/K^+-ATPase$ イオンポンプによる電位の変化が左右性を決定することが知られている。どちらの決定機構においても、その後 <i>Nodal</i> 遺伝子が左右非相称に発現し、左右非相称に動物の形態が形成される。</p> <p>新口動物の進化プロセスにおいて、脊椎動物と共通の祖先動物から進化した棘皮動物では $H^+/K^+-ATPase$ イオンポンプによる左右非相称性決定機構が報告されていることから、$H^+/K^+-ATPase$ ポンプによる機構が祖先型の左右非相称性決定機構であり、繊毛を介した機構は脊椎動物以降で獲得されたものであると考えられてきた。そこで本論文の著者は、繊毛を介した左右非相称性決定機構が棘皮動物にも存在するかを明らかにするために、バフンウニ (<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>) をモデルとして左右非相称性の決定における繊毛の関与について解析した。</p> <p>脊椎動物と近縁な原索動物 (ホヤ) では、胚全体の回転運動が左右非相称性に関与することが報告されている。またウニ胚は胞胚期以降、進行方向に対し動植物軸を中心に左回りに回転しながら遊泳し、8 腕プルテウス幼生になると左側の体腔囊のみが成体原基を形成する。そこで著者は、ウニ胚を受精後から 24 時間 Dillapiol isoxazoline derivative 1 (DID1) 処理して繊毛運動による回転を阻害し、8 腕プルテウス幼生における成体原基の位置を解析した。その結果、コントロール胚では約 98% の幼生で体の左側に成体原基が観察されたのに対し、DID1 処理胚では約 25% の幼生で右側または両側に成体原基が形成された。また、低融点アガロースゲル中に物理的に包埋された胚でも、約 20% の幼生で右側または両側に成体原基が形成された。これにより、ウニの左右非相称性の決定に繊毛が関与することが示唆された。</p>			

次に、whole mount *in situ* hybridization により、*Nodal* mRNA の発現パターンへの DID1 処理の影響を解析した。98%以上の未処理胚で *Nodal* mRNA は胚の右側で検出されたのに対し、90%以上の DID1 処理胚では、*Nodal* mRNA 発現量の減少により *Nodal* の非相称な発現が観察されなかった。したがって、DID1 処理による繊毛運動の阻害により胚の左右非相称性が乱され、それにより右側に成体原基が形成される幼生の割合が増えたと考えられる。また、ダイニン前駆体形成に必要な因子で、左右非相称性を決定する繊毛の運動性に関与することがメダカやヒトで報告されている *Ktu/PF13 (Dnaaf2)* のバフンウニホモログをモルフォリノアンチセンスオリゴによりノックダウンしたところ、DID1 処理胚と同様に胚の右側での *Nodal* mRNA 発現量の低下が観察された。これは、バフンウニ胚の左右非相称性の決定に繊毛が関与することを支持する結果である。

ウニ胚の左右非相称性に重要な発生段階を明らかにするために、様々なタイミングで DID1 処理を行い、幼生における成体原基の位置を解析したところ、受精後 6 から 8 時間が左右非相称性の決定に重要であることが明らかになった。受精後 6 から 8 時間の胚は回転運動を行っていないことから、ウニ胚の左右非相称性の決定に関与するのは胚全体の回転運動ではなく、胚が回転する前の初期の繊毛であることが示唆される。そこで著者は、ウニ胚の左右非相称性決定に関与する繊毛を同定するために、抗アセチル化チューブリン抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、8 時間胚に存在する 4 個の小小割球のうちの数個に、通常より短い繊毛が形成されることが明らかになった。また、透過型電子顕微鏡観察によりこの繊毛は 9+2 の微小管構造をもつことが示唆され、小小割球上に形成されるこの繊毛は運動性の繊毛であると考えられる。

次に著者は、ウニ胚における繊毛を介した左右非相称性決定の分子機構を明らかにする目的で、*intraflagellar transport (IFT) 88* 遺伝子に着目した。*IFT88* は繊毛形成に関与する遺伝子であり、マウスの *IFT88* ノックダウン胚では左右非相称性決定に必要な繊毛が欠失することが報告されている。そこで、バフンウニ *IFT88* ホモログ (*Hp-IFT88*) の cDNA をクローニングし、その塩基配列および発現パターンの解析を行った。cDNA の塩基配列から予想される *Hp-IFT88* のアミノ酸配列は、脊椎動物を含む幅広い生物種の *IFT88* と高い相同性を示した。また、*Hp-IFT88* mRNA はすべての発生段階で胚全体に発現していたが、繊毛形成期である未孵化胞胚期には発現量の上昇が観察された。さらに、原腸胚期以降では動物極側の頂板領域で強い発現が検出された。この結果より *Hp-IFT88* がウニ胚の頂毛の形成に関与することが示唆されるが、小小割球に形成される繊毛を介した左右非相称性決定に関与するかは不明である。

以上の結果から、ウニ胚の左右非相称性の決定には、小小割球上に形成される初期の繊毛が関与することが示された。この成果は、繊毛を介した左右非相称性決定機構が新口動物の基部で獲得されたものであることを明らかにし、さらに従来生殖細胞の形成に寄与することで知られていた小小割球の新たな機能を示す研究として高く評価される。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士（理学）の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

Cilia play a role in breaking left–right symmetry of the sea urchin embryo.

Ayumi Takemoto, Tatsuo Miyamoto, Fumie Simono, Nao Kurogi,

Maki Shirae-Kurabayashi, Akinori Awazu, Ken-ichi T Suzuki, Takashi Yamamoto,

Naoaki Sakamoto

Genes to Cells, in press

参考論文