

氏名（本籍）	岡田 和訓 （ 岐阜県 ）		
学位の種類	博 士 （ 理学 ）		
学位記番号	博 甲 第 6900 号		
学位授与年月日	平成26年 3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Ancient Constraint Sow the Seed of Vertebrate; Evolutionary Insight for the Segmental Development of the Vertebrate Pharyngeal Arch (脊椎動物咽頭弓の起源に関する進化発生学的研究)		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	和田 洋
副査	筑波大学教授	理学博士	古久保一 徳永 克男
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	本多 正尚
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	笹倉 靖徳

論 文 の 要 旨

近年の分子生物学の発展に伴い、かつて比較形態学の立場から考察された動物の形態進化の歴史を、分子系統解析によって明かされた系統関係を前提に分子発生学的なレベルで考察することが可能になった。進化発生生物学と呼ばれるこの分野の研究によって、結果的に多様な形態に至る動物の発生過程には進化上動くことのないステップがあることが発見されてきた。発生拘束と称されるこれらの保存された段階が一体どのように組上げられてきたのかという問題は、進化生物学における大きな課題となっている。

まず、ヤツメウナギについて、発生学の材料に用いるための野外集団の種同定分子マーカーの探索を行った。脊椎動物の進化学において重要な系統学的位置にあるヤツメウナギは、寄生性の大型種を除いて一生の大部分をアンモシート幼生と呼ばれる状態で過ごす。このアンモシート幼生は種同定の基準となる形態的特徴が乏しく、大型になる種であっても幼生期の正確な種同定は困難である。しかも日本に生息する4種のヤツメウナギは生息域が重なるケースが多い。そこで著者は DNA の配列の差異を利用して種同定を行うための分子マーカーを探索した。mtDNA の制御領域の配列を解析すると、同じ地域の個体間でも特定の配列の反復回数や組み合わせが異なることが明らかとなった。さらにスナヤツメの南方種 (*Lethenteron* sp. S) の mtDNA には tRNA コード領域を分断するような反復配列が見られ、これも個体間で反復回数が異なった。しかし、このようなダイナミックな配列進化を経験した mtDNA の中でも最も判別の難しいカワヤツメ (*L. japonicum*) とシベリアヤツメ (*L. kessleri*) を分類する固定された塩基多型は検出されず、核遺伝子 (*soxD*) のイントロンにも固定された多型は検出されなかった。このことからカワヤツメとシベリアヤツメは極めて最近種分化を遂げた種であり、2種間のゲノムの中の固定された塩基多型は少数である可能性が考えられる。

脊椎動物の咽頭弓は内胚葉が咽頭嚢と呼ばれる膨出構造を前から後ろに繰り返し形成していくことで分節する。しかし、この内胚葉の分節性が起きるメカニズムは分かっていない。咽頭内胚葉の分節機構に迫るために、まず咽頭嚢特異的に発現する *pax1* という遺伝子に着目した。この遺伝子をノックダウンしたメダカは咽頭弓に由来する鰓の骨格を大きく欠損し、それは胚時期の咽頭嚢の分節が正常に起こらなかったことが原因となっていることを突き止めた。この分節性の喪失が咽頭嚢が一度できた後に二次的に起こった可能性が考えられたので、次に *pax1* の発現パターンを時系列を追って観察し、咽頭嚢での発現開始のタイミングと同じ時期の咽頭内胚葉の形態とを比較した。すると、*pax1* は分節前の咽頭内胚葉の細胞で発現し、その場所に次の

咽頭嚢が形成されることが分かった。つまり *pax1* は咽頭嚢の分節位置を予め示すように発現を開始したのである。機能阻害の実験結果を踏まえると、咽頭内胚葉で前から後ろへ分節的に *pax1* が発現することで咽頭嚢の分節が生じると考えられる。

次に *tbx1* という遺伝子に着目した。*tbx1* は *pax1* と同様に咽頭弓の分節に必須の遺伝子であり分節的な発現パターンを呈するが、内胚葉だけではなく、咽頭中胚葉でも発現する。*pax1* と *tbx1* の遺伝的な上下関係を明らかにするために *pax1* の機能阻害胚で *tbx1* の、*tbx1* の機能阻害胚で *pax1* の発現をそれぞれ観察した。この実験の結果から、*pax1* は *tbx1* に非依存的に内胚葉での発現を開始するが、分節的な発現パターンを実現するためには *tbx1* の機能が必要であることが明らかになった。さらに興味深いことに、*pax1* の機能を阻害した場合であっても、中胚葉の *tbx1* はある程度分節性を保つように発現していたのである。このことは咽頭弓に入る中胚葉は咽頭嚢に非依存的に分節することを示しており、内胚葉の分節性の上流に中胚葉の分節があることを示唆している。

さらに詳しく中胚葉の状態を観察するために、咽頭中胚葉で特異的に発現する *tcf21* の発現パターンを *pax1* の機能阻害胚で観察した。すると、*tcf21*-positive な中胚葉細胞は *pax1* の機能阻害によって咽頭嚢の分節が抑えられた状態でもある程度分節的な細胞の配置を示した。先行研究で中胚葉は内胚葉の分節に必要なシグナルのソースであることが示されてきたが、この実験によって咽頭中胚葉自体に分節性がある可能性が示唆された。つまり、中胚葉の分節性をもとに咽頭嚢の形成が誘導されるという咽頭弓の分節機構が見えてきた。メダカで明らかになった咽頭の分節性の起源を探るためにヤツメウナギやナメクジウオの咽頭内胚葉において *pax1* と *tbx1* の相同遺伝子の発現パターンを観察すると、これらの遺伝子はメダカとよく似た発現パターンを示した。そして、ナメクジウオの鰓裂（咽頭嚢）の分節の間隔は体節の分節の間隔と全く同じであることが分かった。ナメクジウオの咽頭領域の中胚葉は先に分節の完了した体節の中胚葉細胞が腹側へ侵入してきたものであり、その侵入後の細胞で *tbx1* が発現していたことから、ナメクジウオの鰓裂の分節は体節の分節リズムを踏襲していると考えられる。

これまで咽頭弓を含め、後口動物の咽頭の分節性の起源は全く分かっていなかった。本研究により、脊椎動物の咽頭弓は体節の分節と内胚葉との相互関係が成立したことに起源することが示唆された。左右相称動物の共通祖先で獲得された分節性が“種”となり左右相称動物の発生拘束として現生に保存される一方で、咽頭弓という新たな拘束と今日の脊椎動物の多様性をもたらす基盤となったと考えられる。

審 査 の 要 旨

脊椎動物の咽頭分節は、脊椎動物のボディープランの形成に直接結びつく重要な形質であり、19世紀のゲーテによる頭部分節性の問題提起以降、脊椎動物比較形態学の中心的課題であった。その分節性の一次的な情報が、中胚葉にあるという画期的な成果を上げた。このような成果は、著者の緻密な研究デザインと粘り強い努力の賜物であると高く評価された。また、ヤツメウナギの種同定に関する研究も、今後のヤツメウナギの研究の基盤を提供するものとして、高く評価された。

平成26年1月30日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。