

氏名（本籍）	小椋 陽介 （ 奈良県 ）		
学位の種類	博 士（ 理学 ）		
学位記番号	博 甲 第 6901 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	Studies on the Cell Cycle Lengthening of Epidermal Cells during Neurulation in Ascidian Embryos (ホヤ胚の神経管閉鎖過程における表皮細胞の細胞周期伸長化に関する研究)		
主査	筑波大学准教授	博士（理学）	笹倉 靖徳
副査	筑波大学教授	理学博士	稲葉 一男
副査	筑波大学教授	理学博士	齊藤 康典
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	中野 賢太郎

## 論 文 の 要 旨

動物の発生過程でみられる細胞の分裂、運動、分化といった発生現象には、それぞれに特徴的な細胞骨格や遺伝子発現の制御が必要とされる。そのため、これらの発生現象は同時には実行されず、胚を構成する個々の細胞においては、それぞれが適切な時期に起こるように制御されている。したがって、動物の発生を理解するためには分裂、運動、分化に対する個別の制御に加え、それらを協調させる仕組みを解明することが重要である。本論文では、脊索動物に属するホヤの一種、カタユレイボヤの神経管閉鎖に注目して細胞の分裂、運動、分化の協調を司る仕組みを解明した。神経管閉鎖は背側神経管を形成する複雑な形態形成運動であり、神経板の形成、陥入、背側中線における左右の神経褶の融合などからなる。神経褶は神経と表皮からなり、表皮細胞の形態変化、再配置、分裂などによって発する力が神経管閉鎖に重要であることが脊椎動物のモデル生物で明らかにされている。しかし、神経管閉鎖における細胞の分裂、運動、分化の協調に関しては十分に理解されていない。ホヤの神経胚はわずか500個程度の細胞からなり、細胞の分裂、運動、分化およびそれらの協調関係を細胞レベルで解析することが可能である。

カタユレイボヤの表皮細胞は1細胞期から幼生期までに11回の細胞分裂を行う。共焦点顕微鏡を用いた観察から、神経管を閉じるための表皮細胞の運動が神経管閉鎖直前の11回目の細胞周期の間期に起こることが明らかとなった。表皮細胞の11回目の細胞周期の間期の長さは10回目までの細胞周期の間期の長さ比べて顕著に長い。そのため、表皮細胞では間期を伸長化させることで細胞運動を行うための時間が確保されていると推測された。ここで、表皮の細胞周期進行に関与する遺伝子を同定するために、ライブ観察の結果と種々の細胞周期制御因子の *in situ* hybridization による遺伝子発現解析の結果を比較した。その結果、出芽酵母において細胞周期の進行を促進することが知られている *cdc25* の相同遺伝子 (*Ci-cdc25*) が表皮細胞の細胞周期進行と対応する発現パターンを示すことが明らかになった。実際に *Ci-cdc25* の機能をモルフォリノオリゴヌクレオチド (MO) によって阻害したところ、表皮細胞の10回目の細胞周期の間期が伸長した。一方で、*Ci-cdc25* mRNA を過剰発現させたところ、表皮細胞の10回目の細胞周期の間期は短縮された。これらの結果から、表皮細胞においては *Ci-cdc25* の転写レベルでの調節が間期の長さの制御に関与していることが示唆された。続いて、*Ci-cdc25* を神経管閉鎖時の表皮細胞特異的に強制発現させて分裂と運動のバランス

を乱したところ、神経管閉鎖が阻害されることが判明した。これらの胚では表皮細胞の 11 回目の分裂が神経管閉鎖の途中で引き起こされ、神経管を閉じるための表皮細胞の運動が阻害されていることが明らかとなった。正常胚においては神経管閉鎖の際に表皮細胞の進行方向にアクチン繊維の集積が見られる。しかし、*Ci-cdc25* を強制発現された胚ではこのアクチン繊維の集積が乱されていた。*Ci-cdc25* の強制発現によるこれらの細胞運動と細胞骨格への異常は、表皮細胞の 11 回目の細胞分裂を再び神経管閉鎖後まで遅らせることによって回復された。そのため、*Ci-cdc25* を強制発現された胚では神経管閉鎖途中で引き起こされた細胞分裂によって表皮細胞の運動に必要な細胞骨格の構成が乱されて神経管閉鎖が阻害されていることが示唆された。

最後に、*Ci-cdc25* の上流シス制御配列の活性を、レポーターコンストラクトを作製して解析し、表皮発現に重要な役割を果たす領域を同定した。この領域には GATA, AP-2 といった転写因子の予測結合部位が存在し、これらの予測結合部位は表皮でのレポーター遺伝子の発現に必要であった。特に AP-2 に関しては、MO による機能阻害実験と分化誘導実験により、表皮の分化制御に重要な役割をもつことが判明した。さらに、AP-2 の機能が阻害されると *Ci-cdc25* の発現が低下するとともに表皮細胞の 10 回目の細胞周期の間期が伸長することが明らかになった。以上の結果から、ホヤの神経管閉鎖においては表皮細胞の分裂と運動が 11 回目の細胞周期の間期の長さの制御によって協調されており、表皮細胞の細胞周期の間期の長さの制御には表皮の分化プログラムが関与していると結論づけた。

## 審 査 の 要 旨

本学位論文において著者は、ホヤの神経管を閉鎖する際に生じる表皮細胞が中線方向へと移動する際に、表皮細胞が細胞周期の間期を長くすることにより分裂までの時間的猶予を作り、そのため細胞運動が阻害されることなく生じるという現象を発見し、またその分子メカニズムについて、AP-2 と GATA という 2 つの表皮分化の必須転写因子による *cdc25* の転写制御により生じることを解明した。発生過程において細胞周期が調節を受けていることは多くの動物で知られているものの、その分子メカニズムについて詳細に解明された例は少なく、特に生物界で広く保存されている *cdc25* の転写制御機構をシス解析から明らかにしたこと、脊索動物特有の構造である神経管形成メカニズムにおける表皮の貢献を明らかにしたという点など、非常に価値の高い重要な研究を行ったと言える。

平成 26 年 1 月 29 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。