

氏名（本籍）	Nicholas John Treen		
学位の種類	博 士（ 理 学 ）		
学位記番号	博 甲 第	7326	号
学位授与年月日	平成 27 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	Novel Approaches for Determining Gene Functions in Ascidian Development and Evolution (新しい実験アプローチに基づいたホヤの発生と進化メカニズムの解明)		
主査	筑波大学教授	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	博士（理学）	和田 洋
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	丹羽 隆介

## 論 文 の 要 旨

動物の発生においては、一部の転写因子やシグナル因子が中心的な役割を果たす。これらの因子は、組織・時期特異的に発現し、下流の遺伝子の発現を細胞や組織毎にコントロールすることにより、細胞・組織に特異的なアイデンティティを与え、多細胞体のどの領域を形成するかについての指示を与える。このため、これらの転写因子やシグナル因子が制御する遺伝子ネットワークと、そのネットワークが細胞・組織において果たす機能を解明することが、多細胞生物の発生メカニズムの理解に必須である。

脊索動物ホヤは、その初期発生期には厳密なinvariantな発生様式を示し、細胞分化のタイミングや細胞分裂の回数などが組織毎に正確に決まったパターンで進行する。特に脊索細胞は一部の例外を除き、ほぼ全てのホヤで受精後からカウントして9回分裂した後に分裂停止を迎える。また筋肉細胞もホヤの種毎の少しの違いはあるものの、おおよそ9回の分裂後に休止する。本研究では、この脊索細胞と筋肉細胞にみられる分裂停止の共通性が、両者で共通して機能する遺伝子の働きによると推定し、過去の知見をサーチすることで、ZicL転写因子を候補として見いだした。ZicLは32細胞期から脊索及び筋肉系列の細胞で発現を開始するが、この発現を1細胞周期早めると、脊索細胞や筋肉細胞の分裂は1回早く停止する。またZicLを脊索・筋肉以外の系譜の細胞に、脊索細胞分化決定因子Brachyuryと共に16細胞期から強制発現させると、それらの細胞は脊索と同じ挙動を示し、8回で分裂を停止する。これらのことから、ZicLは脊索と筋肉細胞の分裂回数を決定する転写因子であることが示され、ホヤ研究者が長年研究テーマにしてきた「脊索細胞が9回の分裂回数をカウントする」謎が解明された。それと同時に、いくつかのホヤにおいて認められる、脊索や筋肉細胞の分裂回数の減少に伴う尾部構造の喪失も、ZicLの発現タイミングの変化によって生じた可能性を示唆している。

また本研究では、ホヤの遺伝子機能をより多角的に研究するための新技術の開発を試みている。TALENと呼ばれる人工ヌクレアーゼは、ゲノム中の狙った標的遺伝子に変異を導入することができる、いわゆるノックアウトを可能にするものである。本研究ではホヤにTALENを世界で初めて導入し、実際にターゲットとした遺伝子に特異的に変異を導入できることを、FGF3, FGF11, Hox12をターゲットとして証明した。また FGF3とHox

12については、過去のモルフォリノオリゴを用いた実験と同様の表現型がTALENによるノックアウト個体で観察されることも明らかにしている。カタユウレイボヤではエレクトロポレーション法により発現ベクターを簡単に初期胚に導入できる。このことをTALENに応用し、組織特異的プロモーターからTALENを発現させるベクターをホヤ初期胚に導入し、組織特異的にTALENを発現させ、遺伝子を条件付きで破壊することを証明した。さらに、FGF3遺伝子に対するTALENを後期発生期特異的に発現させることで、この遺伝子の神経系における機能が、初期発生期における脊索形成のみならず、変態の進行にも必須の役割を果たすことを明らかにした。

## 審 査 の 要 旨

本研究は長年謎とされてきた、ホヤの脊索細胞の分裂回数がコントロールされるメカニズムを明らかにした大変重要なものである。この発見には、ホヤの1種カタユウレイボヤで蓄積されてきた転写因子やシグナル因子のネットワーク情報が使われており、ホヤの過去の知見を正しく反映させて行われている。またホヤの個体差のほぼない発生様式に加えて、胚を構成する細胞数が少ないことに由来する細胞分裂研究の好材料という特徴を活かした研究となっている。またTALENはホヤにおいて長年求められてきた「遺伝子ノックアウト」を可能にするものであり、単なる遺伝子機能解析に留まらず、ホヤにおける今後の分子生物学的研究の新展開をもたらすものであり、大変意義深いものである。さらに本研究はTALENを用いた条件付き遺伝子破壊法の初の試みであり、ホヤ研究者以外にとっても重要なレポートである。実験は多角的に進められており、結論を十分サポートする内容となっている。また、全体的にオリジナリティの高い内容となっており、高い評価に値する。論文執筆も本人がほぼ全て独自に行ったものであり、論理的に記載されており、学術論文としての水準を十分にクリアしている。総じて、これらのことは筆者の研究者としての高い能力を示すものである。

平成27年2月3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。