氏名（本籍）	守野　孔明		
学位の種類	博　士（　理学　）		
学位記番号	博　甲　第　　7327　　　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	Evo-Devo Researches on Marine Invertebrates: Insights into the Evolution of Novel Developmental Patterns (海産無脊椎動物の進化発生学的研究: 新規発生パターン進化メカニズムの解明)		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	和田　洋
副査	筑波大学准教授	博士（生命科学）	谷口　俊介
副査	筑波大学教授	博士（理学）	本多　正尚
副査	筑波大学教授	理学博士	古久保-徳永克男

論　文　の　要　旨

棘皮動物及び冠輪動物を題材に用い、新規発生パターンの進化がどのような分子背景によって起こっているかを検証した。

棘皮動物の幼生はプルテウス(ウニ・クモヒトデ)とオーリクラリア(ヒトデ・ナマコ・ウミユリ)の２タイプに分けられる。両者の違いは、幼生骨片に支えられて長く伸びたプルテウス腕の存在である。幼生骨片の獲得は、転写因子の発現プロファイルや構成成分の類似から成体骨片の形成機構の Co-Option によって起きたと考えられている。しかし、幼生骨片や成体骨片を作る間充織細胞で発現する転写因子の多くが骨片を作らないヒトデの間充織細胞でも発現しており、どのような遺伝的な差異が骨片形成の有無に繋がるのかは明らかになっていなかった。加えて、幼生骨片を上皮と協調して伸長させ、プルテウス腕を形成する機構がどのタイミングで、どのように獲得されたのかということの知見もなかった。本研究では、幼生骨片の形成と伸長に関わる遺伝子の発現パターンを種々の棘皮動物の幼生期及び変態期で観察し比較する事により、幼生形態の進化史とその分子背景を明らかにする事を目的とした。

まず、ウニにおいて幼生骨片形成に必須である VEGF シグナリングのリガンドとレセプターの遺伝子をクモヒトデ及びヒトデで観察した。クモヒトデでは、ウニと同様に幼生骨片形成間充織とそれを覆う上皮で特異的に発現が見られた。祖先的な形質を持つと考えられるヒトデでは、骨を作らないビピンナリア幼生期には発現は観察されなかったが、発生後期に成体骨片形成領域で発現が見られた。以上の結果は、成体骨片形成に働いていた VEGF シグナリングが、発生初期でも働くようになることが幼生骨片獲得に必須だということを示唆する。

次に、ウニにおいて上皮と間充織の相互作用に働き、プルテウス腕形成に重要であるとされる遺伝子群(FGF-A, Pax2/5/8, Otp, Pea3, Tetraspanin, Wnt5)の発現パターンを他の棘皮動物幼生で観察した。クモヒトデにおいては、ウニとほぼ同一の発現パターンを示し、プルテウス腕の形成機構の共通性が強く示唆された。ヒトデでは、プルテウス腕領域での発現は見られず、また、プルテウス腕形成遺伝子の同所的な発現パターンも観察されなかった。これらの結果は、ウニとクモヒトデのプルテウス腕が相同であり、かつ祖先の幼生には存在しなかった形質であることを示唆している。一方、ヒトデと同じくオーリクラリア幼生を持つナマコでは、プルテウス腕に対応する原腸胚の外胚葉に４種のプルテウス腕形成

遺伝子(Pax2/5/8, Otp, Tetraspanin, Wnt5)の発現が見られた。これらのことは、ウニとクモヒトデのプルテウス幼生は独立に進化したとする説ではなく、プルテウスがウニ-ナマコ-クモヒトデの共通祖先で獲得され、ナマコの系統で失われたというシナリオを示唆する。

続いて、冠輪動物を題材とした実験を行った。冠輪動物は、後口動物・脱皮動物と共に左右相称動物を構成する動物の一群であり、軟体動物・環形動物・扁形動物等、多様な動物群を 包含する。冠輪動物はらせん卵割と呼ばれる特徴的な初期発生様式を持つ。らせん卵割の重要な特徴として、動植軸に沿った卵割に伴う細胞運命の分配が挙げられる。この発生パターンは冠輪動物以外には見られないユニークなものでありながら、冠輪動物内では良く保存されている。しかし、この発生様式を裏付ける分子機構は明らかになっておらず、その進化機構も解明されていない。本章の目的はこの新規発生パターン獲得の分子背景を明らかにする事である。

申請者は、アコヤガイ(*Pinctada fucuta*)のゲノム中のホメオボックス遺伝子のアノテーションを行う過程で、新規ホメオボックス遺伝子群がアコヤガイゲノム中に存在する事を発見した。その中でも特に多数存在している Homeobox 遺伝子群 ”TALE-Like”に着目した。系統解析及び Homeobox 配列の特徴から、TALE-Like 遺伝子群(以下 TL 遺伝子群)は、TALE Class に属するが、既知 family のいずれにも属さない事が明らかになった。また、ゲノム配列が明らかになっている動物種より、TALE　Class に属する遺伝子を抽出し、それらを用いて系統解析を行った結果、TL 遺伝子群は、冠輪動物にしか存在しない事が示唆された。また、いずれの冠輪動物ゲノム中にも多数の TL 遺伝子が存在した。 これらの新規遺伝子が冠輪動物の初期発生において果たす機能を明らかにする為に、祖先的な初期発生パターンを示すとされる軟体動物腹足綱のクサイロアオガイ(*Nipponacmea fuscoviridis*)及び環形動物多毛綱のヤッコカンザシ(*Pomatoleios kraussii*)における TL 遺伝子群の発現解析を行った。クサイロアオガイにおいては 4 種類(NfTL-A, B, C, E)の遺伝子の発現を *in situ* hybridization 法で観察した。いずれの遺伝子も、4-32 細胞期に発現し、動植軸に対して偏った発現パターンを示した。ヤッコカンザシにおいては 3 種類(PkTL-X, Y, Z)の遺伝子の発現が 4-32 細胞期に確認され、いずれも同様に動植軸に対して偏った発現パターンを示した。

実際に TL 遺伝子群が運命規定に関与しているかどうか確かめる為に、クサイロアオガイにおいて植物極側の割球で発現する NfTL-C 及び動物極側で発現する NfTL-E の mRNA を未受精卵に注入し、幼生の表現型を観察した。結果、発現領域に対応する部位のマーカー遺伝子の発現が増大しており、運命規定に関与する事が示唆された。

これらのデータは、冠輪動物の新規 Homeobox 遺伝子群が、冠輪動物特有の初期発生機構に重要である事を示唆する。このことは、冠輪動物の初期発生様式の進化には新規 homeobox 遺伝子群の獲得と重複・多様化が重要な役割を果たしたというシナリオを提示する。

審　査　の　要　旨

海産無脊椎動物を用いて、2つの大きな進化的なイベントに関する新しい知見を得た。1つは、棘皮動物の2つのタイプの幼生形態の進化について、プルテウスが多様性の進化にＶＥＧＦシグナリングが関わっており、またいくつかの遺伝子発現の比較から、プルレウス幼生が従来考えられてきたように収斂的に進化したのではなく、むしろナマコのオーリクラリア幼生が退化的な形態であることを示唆する成果を得た。もう一つは、冠輪動物のらせん卵割様式の進化に新規ホメオボックス遺伝子の形成が深く関わってきたことを明らかにした。後者の成果は、遺伝子進化と形態進化の関連を考える上で重要な示唆を与える画期的な成果であると評価できる。

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。