

氏 名 多 田 基 紀

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第778号

学位授与の日付 平成16年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Genomic organization and neurological
significance of *CNR1/Protocadherin1- α*
gene clusters in zebrafish

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 河西 春郎
教授 池中 一裕
教授 岡村 康司
教授 八木 健 (大阪大学)
チーフリーダー 清木 誠 (独立行政法人科学技術振興機構)

CNR (cadherin-related neuronal receptor)/プロトカドヘリン (*CNR/Pcdh*) ファミリーは、ゲノム中で、遺伝子クラスター構造をとっており、神経回路形成やシナプス形成に関わっているのではないかと考えられている。本研究で彼は、発生研究において有用なモデル動物であるゼブラフィッシュを用いて、脊椎動物における *CNR/Pcdh* のゲノム構造解析、及び機能解析を行なった。

彼はゼブラフィッシュゲノム BAC ライブラリーから *CNR/Pcdh* 領域の BAC クローンをスクリーニングし、その塩基配列を決定した。また、この配列を元に BLAST サーチを行なった結果、異なる染色体上に存在する *CNR/Pcdh1* (LG14) と *CNR/Pcdh2* (LG10) の 2 つの染色体領域に存在する *CNR/Pcdh* 遺伝子クラスターを見出した。ゼブラフィッシュ *CNR/Pcdh* のゲノム構造は、*CNR/Pcdh1* においては *CNR/Pcdh1-o*, *CNR/Pcdh1-aa*, *CNR/Pcdh1-ab* の 3 つのクラスターからなり、*CNR/Pcdh2* においては、*CNR/Pcdh2-a*, *CNR/Pcdh2-g* の 2 つのクラスターが存在することが明らかになった。

また、彼は、ゼブラフィッシュ *CNR/Pcdh* の発現解析を行なった。彼は、Whole-mount in situ hybridization および whole-mount immunohistochemistry を用いて、発生段階におけるゼブラフィッシュ *CNR/Pcdh* の転写産物及びタンパク質の時間的、空間的発現パターンを明らかにした。この結果、神経細胞の発生時期・領域と一致して *CNR/Pcdh* の発現が見られ、*CNR/Pcdh* タンパクは主要な軸索経路に局在することが明らかになった。また、Morpholino アンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を用いて、*CNR/Pcdh* のノックダウン実験を行い、*CNR/Pcdh* の機能解析を行なった。この結果、MO をインジェクションした胚において、側線軸索、および運動神経軸索の投射異常と束形成異常が見られた。また、網膜—視蓋投射が欠失しており、軸索伸長に障害を受けていることが見受けられた。さらに、網膜構造の形成異常も見られたことから、*CNR/Pcdh* は網膜において軸索投射、シナプス形成に関わる可能性が見受けられた。また神経細胞分化の起こる領域にアポトーシスによる脊髄における神経細胞死が起こっており、菱脳領域における介在神経の減少が見られ、それに付随して脳神経の形態異常もみられた。このようなことから、*CNR/Pcdh* は神経細胞の分化過程、及び軸索投射とその維持において重要な機能を持っていることが考えられ、神経系における *CNR/Pcdh* の機能の重要性が示唆された。

論文の審査結果の要旨

CNR(cadherin-related neuronal receptor)/ プロトカドヘリン (CNR/Pcdh) ファミリーは、ゲノム中で、遺伝子クラスター構造をとっており、神経回路形成やシナプス形成に関わっているのではないかと考えられている。本研究では、発生研究において有用なモデル動物であるゼブラフィッシュを用いて、脊椎動物におけるCNR/Pcdhのゲノム構造解析、及び機能解析を行なった。

ゼブラフィッシュゲノムBACライブラリーからCNR/Pcdh領域のBACクローンをスクリーニングし、その塩基配列を決定した。また、この配列を元にBLASTサーチを行なった結果、異なる染色体上に存在するCNR/Pcdh1 (LG14)とCNR/Pcdh2 (LG10) の2つのCNR/Pcdh遺伝子クラスターを見い出した。ゼブラフィッシュCNR/Pcdhのゲノム構造は、CNR/Pcdh1においてはCNR/Pcdh1-o, CNR/Pcdh1-aa, CNR/Pcdh1-abの3つのクラスターからなり、CNR/Pcdh2においては、CNR/Pcdh2-a, CNR/Pcdh2-gの2つのクラスターが存在することが明らかになった。

また、ゼブラフィッシュCNR/Pcdhの機能解析を行なうため、発現解析を行なった。Whole-mount in situ hybridization および whole-mount immunohistochemistry を用いて、発生段階におけるゼブラフィッシュCNR/Pcdhの転写産物及びタンパク質の時間的、空間的発現パターンを明らかにした。この結果、神経細胞の発生時期・領域と一致してCNR/Pcdhの発現が見られ、CNR/Pcdhタンパクは主要な軸索経路に局在することが明らかになった。また、Morpholinoアンチセンスオリゴヌクレオチド(MO)を用いて、CNR/Pcdhのノックダウン実験を行い、CNR/Pcdhの機能解析を行なった。この結果、MOをインジェクションした胚において、側線軸索、および運動神経軸索の投射異常と束形成異常が見られた。また、網膜ム視蓋投射が欠失しており、軸索伸長に障害を受けていることが見受けられた。また、網膜構造の形成異常も見られたことから、CNR/Pcdhは網膜において軸索投射、シナプス形成に関わる可能性が見受けられた。また神経細胞分化の起こる領域にアポトーシスによる脊髄における神経細胞死が起こっていることが明らかになった。また、菱脳領域における脳神経の形態異常と、介在神経の減少が見られた。このようなことから、CNR/Pcdhは神経細胞の分化過程、及び軸索投射とその維持において重要な機能を持っていることが考えられ、神経系におけるCNR/Pcdhの機能の重要性が示唆された。これらのことから申請者の論文は学位論文として十分にふさわしい内容であるものと審査委員会委員全員一致で判定した。

審査委員会において発表を行い、委員からのさまざまな質問に適切に答えたので、専門及び周辺分野の基礎知識や理解については、博士号取得に十分と判断した。

英語の実力は、多田君が書いた英文の学位論文を審査委員全員で見て、十分と判断した。