

論文内容の要旨

申請者氏名 横田 泰宏

脊椎動物において、神経堤細胞(Neural crest cell, 以下 NCC)は、全ての末梢神経系を構成する細胞を始めとする数多くの組織/細胞種を生み出す極めて重要な細胞である。これまで、NCC の研究に有用なモデル生物として、胚操作の容易なニワトリ胚が頻りに用いられてきた。ニワトリ胚では、遺伝子機能を解析する強力な手法として、in ovo エレクトロポレーション法が確立されている。しかしながら、従来の手法では、NCC 以外の運動神経をふくむ脊髄にも外来遺伝子は発現される。また、その発現は NCC 発生後期まで持続しない。これらの問題を解決するため、NCC 特異的な活性を持つ転写因子 *Sox10* のエンハンサーを独自に単離した。これと、長期的な遺伝子発現を可能にする Tol2 法、マウスを用いた遺伝学などで組織/細胞種特異的な遺伝子操作によく用いられる Cre/loxP 法、薬剤誘導的な遺伝子操作を可能とする tet-on 法を併用することで、NCC 特異的、長期的かつ任意の時期に遺伝子操作する手法を確立した。さらに、NCC 由来細胞種であるシュワン細胞の発生過程に伴った形態変化を捉えるため、新規手法のモザイクに遺伝子が発現される特性を活用した。シュワン細胞と神経軸索を波長の異なる蛍光タンパク質で同時にラベルし、ex vivo においてタイムラプスイメージングを行った。その結果、無作為な方向から軸索とその垂直方向へと突起を伸縮させるシュワン細胞が、発生過程の進行に伴って見られた。さらに発生が進むと、松葉のような双極性の形状になり、突起の伸縮が停止することを見いだした。これより、新規手法が発生後期の NCC の解析に適用可能であることが立証された。

脊椎動物の皮膚には、外的刺激を感受する感覚神経(NCC 由来組織の 1 つ)の区画が見られる。これまで、組織学的に区画形成機構を知る実験系は確立されていたが、その分子機構を解析する実験系は確立されていなかった。これにあたり、技術的に感覚神経の観察が容易なニワトリ胚の胴体部背側に着目し、E9 には感覚神経の区画が分節状に形成されることを見いだした。このような分節状の区画は、神経管から遊出した NCC の分節と対応する。特定区画の感覚神経を遺伝子操作するため、ミネラルオイルを用いて、プラスミド溶液を神経管の限局した頭尾軸のレベルにとどめることで、一部の NCC の分節に外来遺伝子(EGFP)を発現させた。すると、特定区画の感覚神経に EGFP の発現が見られた。これより、特定区画の感覚神経を遺伝子操作する手法が確立された。さらに、遺伝子操作および外科的な胚操作により NCC の遊出を阻止し、特定区画を占める感覚神経の形成を阻害した。その結果、本来形成されるはずの区画に、それと隣接した区画を支配する感覚神経が侵入していた。これより、背側の区画形成に感覚神経の競合が働くことを示唆した。今後この実験系により、皮膚性感覚神経の区画形成の分子機構が、明らかにされると期待される。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 横田 泰宏

申請者は、神経堤細胞(Neural crest cell, 以下 NCC)の発生に興味を持ち、発生後期の NCC における時空間特異的な遺伝子操作法の確立を進めた。

脊椎動物において特有に見られる NCC は、しばしば第 4 の胚葉と呼ばれるように、末梢神経系、内分泌細胞、頭骸骨などさまざまな組織/細胞種を生み出す極めて重要な細胞である。これまで、ニワトリ胚は胚操作の容易性から NCC の研究にはかかせないモデル生物として利用されてきた。ニワトリ胚では、遺伝子機能を解析する簡便な遺伝子操作法として *in ovo* エレクトロポレーション法が確立されている。しかしながら、従来の手法では、NCC 特異的に、および NCC 発生後期での遺伝子操作は困難であった。申請者はこれらの 2 つの問題を解決するために、NCC 特異的、長期的かつ任意の時期に遺伝子操作する手法を確立した。さらに、モザイクに遺伝子が発現される新規手法の特性を活用して、NCC 由来細胞種の 1 つであるシュワン細胞の発生過程に伴った形態変化に新たな記載を与えた。今後、申請者が確立した新規手法は、NCC 発生後期の研究に貢献すると期待される。以上の結果は、申請者が筆頭著者である論文 (Yokota et al., *Developmental Biology*, in press) などで報告されている。

また申請者は、NCC 由来組織の皮膚性感覚神経に興味を持ち研究を進めた。脊椎動物の成体の皮膚には、感覚神経の区画が形成されている。この区画は外的刺激が体表のどこに与えられたのかを認識する上で極めて重要な役割を果たす。これまで、組織学的に区画形成機構を解析する実験系は確立されてはいたものの、その分子機構を解析する実験系は確立されていなかった。申請者は、感覚神経の分布が容易に観察できるニワトリ胚の胴体部の背側に着目し、そこに感覚神経の区画が形成されることを見いだした。さらに、特定区画の感覚神経を遺伝子操作する手法を確立した。この新規手法を用いて、遺伝子操作により神経管から遊出する一部の NCC を阻止し、特定区画を占める感覚神経の形成を阻害した。その結果から、隣接間の感覚神経が互いに競合することで、背側の区画が形成されることを示唆した。今後、申請者が確立した実験系を用いた皮膚性感覚神経の区画形成の解析に期待がかかる。

以上のように、本論文は発生後期の NCC において時空間特異的な遺伝子操作法を新規に確立した報告で、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。