

別紙 4

報告番号

※ 甲 第 号

主 論 文 の 要 旨

論文題目 メダカ体色異常自然突然変異体 *ml-3* を用いた色素細胞運命決定機構の解明

氏 名 長 尾 勇 佑

論 文 内 容 の 要 旨

本論文では、色素細胞の運命決定機構の解明を目的として、メダカ色素細胞形成異常変異体 *many leucophores-3 (ml-3)* の表現型解析および責任遺伝子の同定とその機能解析を行った。多能性幹細胞から多様な細胞運命が決定されるメカニズムを理解することは発生生物学の分野において重要かつ基本的な課題の一つである。幹細胞から個々の異なる細胞種が生み出される過程では、まず多能性の制限された中間的な前駆細胞が産生され、その前駆細胞から最終的な異なる細胞種へと次第に運命決定が進められると考えられている。このメカニズムは多能性幹細胞の発生分化過程において共通して観察されることから、一般的に保存されるメカニズムだとされているが、その運命決定の制御機構についてはまだほとんど明らかになっていない。神経堤細胞は脊椎動物に特有な多能性を持つ前駆細胞の集団である。体幹部背側で形成される神経堤細胞は特定の経路を経由し、胚体の様々な部位で多様な細胞種へと分化をする。そのため、多能性幹細胞からの運命決定を研究するのに適した材料である。特に、神経堤細胞由来である色素細胞は複数のサブタイプに分けられ、それぞれが本来持つ色によりその細胞種の同定ができるという点で優れたモデルである。また、哺乳類が持つ色素細胞は黒色素細胞のみであるのに対し、魚類は複数の色素細胞を同時に持つことから、その運命決定機構はより複雑なものであると考えられる。それらの各色素細胞サブタイプは神経堤細胞から産生される 1 つの共通の前駆細胞から発生することが示唆されているが、その前駆細胞や、そこから複数のサブタイプへと運命決定される分子メカニズムはほとんど理解されていない。そのため、神経堤細胞からの色素細胞発生過程を明らかにすることにより、多能性幹細胞から個々の細胞運命が決定される共通原理を理解するための新たな知見が得られると考えられる。

本研究では、メダカにおいて 2 つの色素細胞の運命決定を制御するメカニズムについて検証した。メダカは 4 種類の色素細胞（黒色素胞、虹色素胞、黄色素胞そして白色素胞）を持っている。メダカ *many leucophores-3 (ml-3)* 変異体は胚発生において、

白色素胞を異所的に過形成する変異体として単離された。色素細胞の詳細な観察により、*ml-3*ホモ接合体胚では、さらに黄色素胞が形成不全となることを明らかにした。一方では、黒色素胞や虹色素胞の発生に異常は見られなかった。*ml-3*ヘテロ接合体の黄色素胞と白色素胞の数は野生型と *ml-3* ホモ接合体の中間的な値を示したことから、白色素胞の増加と黄色素胞の減少には相関関係があり、また *ml-3* 遺伝子の濃度依存的なものであることが示唆された。次いで、*ml-3*変異がそれらの前駆細胞の発生に与える影響について、遺伝子マーカーを用いて検証した。*GTP cyclohydrolase I (gch)* は、メダカと同じ小型モデル魚類であり白色素胞を持たないゼブラフィッシュにおいて、黄色素胞前駆細胞で発現が確認されている。一方、野生型メダカ胚では予想に反して、*gch* は黄色素胞と白色素胞の両系譜で発現していることが明らかとなった。*ml-3* 変異体では、黄色素胞系譜における *gch* の発現が欠損していたことから、黄色素胞前駆細胞の形成自体が起きず、代わりに白色素胞系譜へと運命が変えられていることが示唆された。これらの結果は *ml-3* 遺伝子が黄色素胞と白色素胞の運命決定を制御していること、そして黄色素胞と白色素胞はそれら2種類のみを産生する共通の前駆細胞から発生する可能性を示唆している。当研究室では過去に、ポジショナルクローニング法により *ml-3* 遺伝子座近傍には Sox (*Sry-related HMG box*) 遺伝子群に含まれる *sox5* が存在すること、*ml-3* 変異体では *sox5* のスプライシング異常があることが明らかになっているが、実際の変異は見つけることが出来ていなかった。本研究では、*sox5* のモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドによるノックダウン胚は白色素胞の異所的な過形成を示すことを明らかにした。さらに TILLING 法により、2 系統の異なる変異を持つ *sox5* 対立遺伝子変異体を単離し、それぞれのホモ接合体が *ml-3* 変異体と同様の表現型を示すことを明らかにした。これらの結果から *ml-3* 変異体の責任遺伝子が *sox5* であることが確かめられた。in situ ハイブリダイゼーション (ISH) の結果から、メダカ胚では *sox5* は遊走前および体幹部を遊走する神経堤細胞で発現していることが明らかとなった。さらに *gch* と *sox5* の二重染色をすることにより、体幹部を遊走する *sox5* 陽性神経堤細胞の一部が *gch* 陽性の黄色素胞前駆細胞と一致することを見出した。また、野生型および *ml-3* 変異体間の細胞移植実験では、移植個体において形成される黄色素胞はすべて野生型ドナー細胞に由来することを明らかにした。以上の結果から、Sox5 は細胞自律的に黄色素胞系譜への運命決定を行っていることが示唆された。

これまでには、*pax7a* がメダカ黄色素胞と白色素胞の両方の発生に必須であることが明らかにされている。本研究では、*pax7a* の機能欠損を示す自然突然変異体 *leucophore free-2 (lf-2)* が *gch* の発現を完全に欠損していることが確かめられ、*pax7a* が黄色素胞と白色素胞の前駆細胞の形成に重要な役割を担っていることを示

すことが出来た。ISH では、*pax7a* は神経堤細胞および黄色素胞と白色素胞の両系譜で発現していることを見出した。また、*ml-3* 変異体と *lf-2* 変異体における *sox5* と *pax7a* の発現解析および *ml-3/lf-2* 二重変異体の表現型の観察を行うことにより、*sox5* が *pax7a* の下流で働いていることを示した。*lf-2* 変異体では色素細胞前駆細胞および遊走前神経堤細胞における *pax7a* の発現が欠損している一方で、*ml-3* 変異体では黄色素胞前駆細胞における *pax7a* の発現は欠損するが、遊走前の神経堤細胞でのその発現は検出できることが明らかとなった。遊走前の神経堤細胞は運命決定前の前駆細胞であると考えられているため、以上の結果から *pax7a* 陽性の遊走前神経堤細胞が黄色素胞と白色素胞の共通の前駆細胞（黄・白色素胞共通前駆細胞）であると考えられる。同時に、*pax7a* は黄色素胞・白色素胞の発生過程において、その共通前駆細胞の発生に必須であることが示唆された。さらに、*ml-3* 変異体では黄・白色素胞共通前駆細胞自体は正常に形成されていることが明らかとなった。

本研究から得られた結果から、メダカ色素細胞形成過程においては黄色素胞・白色素胞の系譜は黒色素胞および虹色素胞とは異なる分岐をたどることが示唆される。また、黄色素胞と白色素胞の系譜では、まず神経堤細胞に由来する色素細胞前駆細胞から *pax7a* を発現する黄・白色素胞共通前駆細胞が形成されることが考えられる。そして、*Sox5* が黄色素胞と白色素胞の運命選択をする分子スイッチとして働くことにより、共通前駆細胞から黄色素胞への細胞運命を決定していると結論した。この過程は多能性幹細胞から中間的前駆細胞、そして個々の細胞種への分化という段階的な運命決定が行われる様子を表しており、その過程に必要な遺伝子カスケードを明らかにした。そのため、この色素細胞発生過程は多能性幹細胞からの細胞運命の決定が行われるメカニズムを理解する新たなモデルとなることが期待できる。今後はメダカで得られた知見を一般的な法則へと展開させるため、メダカと同じく色素細胞研究が盛んであるゼブラフィッシュとの比較解析を行っていきたい。