

# 博士論文審査報告書

氏名 堀江 良子 (ほりえ りょうこ)  
学位の種類 博士 (理学)  
学位記番号 論博理第25号  
学位授与報告番号 乙第71号  
学位授与年月日 令和2年3月24日  
学位授与の要件 学位規則第4条2項  
論文題目 単一細胞トランスクリプトーム解析を用いたカタユウレイボヤにおける感覚神経細胞の分化機構に関する発生生物学的研究  
論文審査委員 (主査) 教授 八田 公平  
(副査) 教授 西谷 秀男  
(副査) 教授 樋口 芳樹  
(副査) 教授 梅園 良彦  
(副査) 教授 日下部 岳広  
(甲南大学理工学部生物学科)

## 1. 論文内容の要旨

脊椎動物の神経板の境界領域には頭部プラコードと神経堤予定領域があり、前者からは眼、鼻、耳などの感覚器、後者からは末梢神経系を含む様々な組織・器官が分化することが知られているが、両者の進化の過程についてはよくわかっていない。申請者は、脊椎動物の祖先型と考えられているホヤ胚について、詳細な細胞系譜解析をおこない、ホヤ胚においては、頭部プラコードと神経堤予定領域に対応する領域から特定の感覚神経細胞が分化する事を示した。また、遺伝子発現パタンの解析、遺伝子のノックダウンや強制発現解析により、複数の転写因子 (*Dmrt.a*, *Foxc*, *Six1/2*, *Pax3/7*, *Msxb*) が互いに排他的に発現し、プラコードと神経堤の区画化を担っていることを明らかにした。さらに、転写因子を強制発現させた胚の単一細胞トランスクリプトーム解析とレポーター発現解析から、1つの転写因子の発現を操作するだけで、頭部プラコードと神経堤予定領域から生じる感覚細胞で発現する遺伝子群の特徴を変換できることを発見し、これは、プラコードと神経堤が進化的に共通の起源を有することを示唆していると結論した。

また、ホヤ幼生のドーパミン細胞についても同様の解析を行い、2つの転写因子 (*Ptf1a* と *Meis*) が、ドーパミン細胞の分化に必要な十分であることを発見した。また、ホヤのドーパミン細胞は、ホルモンやペプチド遺伝子を発現しており、脊椎動物の視床下部との関連性が示唆された。

本論文の内容は Nature 560: 228-232 (2018) と Genes & Development 32: 1297-1302 (2018) に掲載されている。

## 2. 論文審査結果

ホヤ胚は、脊椎動物と体制が良く似ているが、その構造は極めて単純で細胞数が少なく、細胞系譜など発生生物学的な知見も豊富である。本論文では、ホヤ胚の特徴を生かし、DiIをもちいた細胞系譜追跡実験、レポーター遺伝子の発現、モルフォリーノアンチセンスオリゴによる転写因子の機能阻害、遺伝子の強制発現などの発生生物学的手法に加え、新しい実験手法である単一細胞トランスクリプトーム解析(単細胞で発現している mRNA 全体を、多数の細胞において一度に解析する手法)をうまく適用している。

第1章では、頭部プラコードと神経堤予定領域について、両者が複数の転写因子によって区画化されていること、また、それが脊椎動物における遺伝子発現パターンと良く似ていること、これらが互いに制御し合う転写因子ネットワークをつくっていることがわかった。さらに、1つの遺伝子の発現制御によって両者が互いに変換することが可能であることを初めて示した。

第2章では、パーキンソン病や薬物依存などさまざまな疾患と関連するドーパミン細胞について調べている。脊椎動物では、中脳(黒質)のドーパミン細胞についての研究があるものの、それ以外のドーパミン細胞の分化機構はまだよくわかっていない。本論文では、ホヤ胚の単一細胞トランスクリプトームと機能阻害実験から、ドーパミン細胞(コロネット細胞)の分化に必要な転写因子を同定した。さらに、この2つの転写因子を強制発現させると、中枢神経細胞のすべてがドーパミン神経細胞特異的遺伝子群を発現することを、発見した。一方、ホヤのドーパミン細胞は、単一細胞が13種類のホルモンや神経ペプチドを共発現していることをみいだした。このことは、この細胞が哺乳類の視床下部と似た働きをしている可能性を示している。

このように、本論文は、ホヤだけでなく、脊椎動物の神経系の発生と進化を考える上でも重要な発見を多く含んでいる。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。

また、令和2年1月21日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

# 博士論文審査報告書

論文題目： 単一細胞トランスクリプトーム解析を用いたカタユウレイボヤにおける感覚神経細胞の分化機構に関する発生生物学的研究

申請者： 堀江 良子

## 1. 論文内容の要旨

脊椎動物の神経板の境界領域には頭部プラコードと神経堤予定領域があり、前者からは眼、鼻、耳などの感覚器、後者からは末梢神経系を含む様々な組織・器官が分化することが知られているが、両者の進化の過程についてはよくわかっていない。申請者は、脊椎動物の祖先型と考えられているホヤ胚について、詳細な細胞系譜解析をおこない、ホヤ胚においては、頭部プラコードと神経堤予定領域に対応する領域から特定の感覚神経細胞が分化する事を示した。また、遺伝子発現パターンの解析、遺伝子のノックダウンや強制発現解析により、複数の転写因子 (*Dmrt.a*, *Foxc*, *Six1/2*, *Pax3/7*, *Msxb*) が互いに排他的に発現し、プラコードと神経堤の区画化を担っていることを明らかにした。さらに、転写因子を強制発現させた胚の単一細胞トランスクリプトーム解析とレポーター発現解析から、1つの転写因子の発現を操作するだけで、頭部プラコードと神経堤予定領域から生じる感覚細胞で発現する遺伝子群の特徴を変換できることを発見し、これは、プラコードと神経堤が進化的に共通の起源を有することを示唆していると結論した。

また、ホヤ幼生のドーパミン細胞についても同様の解析を行い、2つの転写因子 (*Ptf1a* と *Meis*) が、ドーパミン細胞の分化に必要なかつ十分であることを発見した。また、ホヤのドーパミン細胞は、ホルモンやペプチド遺伝子を発現しており、脊椎動物の視床下部との関連性が示唆された。

本論文の内容は *Nature* 560: 228-232 (2018) と *Genes & Development* 32: 1297-1302 (2018) に掲載されている。

## 2. 論文審査結果

ホヤ胚は、脊椎動物と体制が良く似ているが、その構造は極めて単純で細胞数が少なく、細胞系譜など発生生物学的な知見も豊富である。本論文では、ホヤ胚の特徴を生かし、DiIをもちいた細胞系譜追跡実験、レポーター遺伝子の発現、モルフォリーノアンチセンスオリゴによる転写因子の機能阻害、遺伝子の強制発現などの発生生物学的手法に加え、新しい実験手法である単一細胞トランスクリプトーム解析（単細胞で発現している mRNA 全体を、多数の細胞において一度に解析する手法）をうまく適用している。

第1章では、頭部プラコードと神経堤予定領域について、両者が複数の転写因子によって区画化されていること、また、それが脊椎動物における遺伝子発現パターンと良く似ていること、これらが互いに制御し合う転写因子ネットワークをつくっていることがわかった。さらに、1つの遺伝子の発現制御によって両者が互いに変換することが可能であることを初めて示した。

第2章では、パーキンソン病や薬物依存などさまざまな疾患と関連するドーパミン細胞について調べている。脊椎動物では、中脳（黒質）のドーパミン細胞についての研究があるものの、それ以外のドーパミン細胞の分化機構はまだよくわかっていない。本論文では、ホヤ胚の単一細胞トランスクリプトームと機能阻害実験から、ドーパミン細胞（コロネット細胞）の分化に必要な転写因子を同定した。さらに、この2つの転写因子を強制発現させると、中枢神経細胞のすべてがドーパミン神経細胞特異的遺伝子群を発現することを、発見した。一方、ホヤのドーパミン細胞は、単一細胞が13種類のホルモンや神経ペプチドを共発現していることをみいだした。このことは、この細胞が哺乳類の視床下部と似た働きをしている可能性を示している。

このように、本論文は、ホヤだけでなく、脊椎動物の神経系の発生と進化を考える上でも重要な発見を多く含んでいる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、令和2年1月21日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：八 田 公 平

副査：西 谷 秀 男

：樋 口 芳 樹

：梅 園 良 彦

：日 下 部 岳 広

(甲南大学理工学部生物学科、教授)

