

京都大学	博士 (医学)	氏名	丹羽 康貴
論文題目	The Initiation and Propagation of Hes7 Oscillation Are Cooperatively Regulated by Fgf and Notch Signaling in the Somite Segmentation Clock (分節時計における Hes7 オシレーションの開始と伝播は Fgf シグナルと Notch シグナルによって協調的に制御される)		
(論文内容の要旨)			
<p>脊椎動物における肋骨や椎骨などの前後軸にそった繰り返し構造は、体節と呼ばれる発生時期に一過性の組織に由来する。体節は、胎仔の最尾部に位置する未分節中胚葉 (PSM) から、一定時間ごとにその前端がくびれ切られることによって生み出される。この時間は種ごとに決まっており、マウスでは約 2 時間である。それに伴って未分節中胚葉では周期的な遺伝子発現変動 (オシレーション) が起こっていることが知られており、それらが体節形成の周期性を制御していると考えられている。この仕組みは分節時計とよばれ、ニワトリの <i>hairy-1</i> 遺伝子のオシレーションの発見を契機として、ゼブラフィッシュの <i>her</i> 遺伝子、マウスの <i>Hes</i> 遺伝子が、それぞれの種の分節周期にあわせてオシレーションをしていることが報告された。さらにゼブラフィッシュの変異体やノックアウトマウスの結果などから、細胞間情報伝達に重要な Notch シグナルの体節形成への関与が報告された。また、ノックアウトマウスの解析より、Notch シグナルの下流因子である <i>Hes7</i> が体節形成において重要であることが示された。</p> <p>本研究では、まずオシレーションを生み出す機構を調べるために、<i>Hes7</i> のオシレーションと Notch シグナルとの関わりを検証した。その結果、Notch シグナルの抑制因子で <i>Hes7</i> の標的遺伝子でもある <i>Lfng</i> のノックアウトマウスでは <i>Hes7</i> のオシレーションは起こるが、Notch シグナルのリガンド <i>Dll1</i> やエフェクター <i>Rbp-jκ</i> のノックアウトマウスでは、<i>Hes7</i> のオシレーションは PSM 後方でのみ観察された。この結果より、Notch シグナルは <i>Hes7</i> オシレーションが PSM 前方でも起こるために必要であることが分かった。</p> <p>PSM 後方では Notch シグナルがなくても <i>Hes7</i> オシレーションが観察されるため、<i>Hes7</i> の上流と下流について、Notch シグナルや <i>Lfng</i> に代わるものの存在が予想された。下流については、まず <i>Hes7</i> の新規標的遺伝子をマイクロアレイ法を用いて探り、MAPK のホスファターゼである <i>Dusp4</i> を見出した。発現パターンの解析から、<i>Dusp4</i> は <i>Hes7</i> と同位相でオシレーションし、<i>Dusp4</i> タンパク質はそれと異なる位相でオシレーションすることが分かった。また、<i>Dusp4</i> タンパク質とリン酸化 ERK の量の間には負の相関が見られ、ERK のリン酸化状態も PSM においてオシレーションしていることが示唆された。上流については、Fgf/MAPK シグナルと <i>Hes7</i> や <i>Dusp4</i> との関係を調べるために、阻害剤を用いた培養実験を行い、<i>Hes7</i> や <i>Dusp4</i> に対する影響を観察したところ、Fgf/MAPK シグナルの阻害剤によって、<i>Hes7</i> や <i>Dusp4</i> の発現は著しく低下した。そこで Fgf シグナルの体節形成における役割を <i>Fgfr1</i> コンディショナルノックアウトマウスを作製して調べたところ、やはり <i>Hes7</i> や <i>Dusp4</i> の発現が著しく低下しており、体節形成も異常であった。</p> <p>以上の結果より、体節形成において <i>Hes7</i> は Notch シグナルと Fgf/MAPK シグナルによって協調的に発現が制御されており、<i>Hes7</i> は周期的な自身の発現抑制</p>			

と、それぞれのシグナルの抑制因子である *Lfng* や *Dusp4* の発現を周期的に抑制することで、Notch シグナルと Fgf/MAPK シグナルのオシレーションを同位相に合わせることが考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

体節は未分節中胚葉(PSM)が周期的に分節することによって形成され、この周期性を制御する生物時計は分節時計と呼ばれる。bHLH 型転写抑制因子 *Hes7* は、PSM で発現振動(オシレーション)しており、周期的な体節形成に必須な役割を担う。申請者は、分節時計の分子機構を明らかにする目的で、*Hes7* オシレーションに注目し、その制御機構を解析した。まず、*Hes7* のオシレーションと Notch シグナルとの関係を遺伝学的に調べたところ、Notch シグナルは PSM 後方での *Hes7* オシレーションの開始に必須ではなく、前方への伝播に重要であった。マイクロアレイ法により *Hes7* の新規下流標的遺伝子として Fgf シグナルの下流で働く MAPK の脱リン酸化酵素 *Dusp4* を同定し、その発現が *Hes7* に依存してオシレーションすること、*Dusp4* の標的である MAPK(ERK)のリン酸化状態もオシレーションしていることを示した。さらに、Fgf シグナルを薬理的もしくは遺伝学的に抑制すると、PSM 後方からの *Hes7* や *Dusp4* の発現が無くなり、体節形成が阻害されることを示した。これらの結果より、*Hes7* のオシレーションは、PSM 後方において Fgf シグナルによって開始され、Notch シグナルによって PSM 前方へ伝播すると考えられた。

以上の研究は、体節形成における分節時計の分子機構の解明に貢献し、発生学・形態学の研究分野の発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 1 月 30 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降