

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	高橋知佳
論文題目	多繊毛細胞およびイオノサイトの形成における <i>mab21-13</i> 遺伝子の機能		
(論文内容の要旨)			
<p>アフリカツメガエルの尾芽胚の表皮組織は、多繊毛細胞 (数百本の運動性繊毛をもち、細胞外液の流れを創出する細胞) やイオノサイト (イオントランスポーターなどにより細胞外液のイオン濃度を調節する細胞) を有する。哺乳類でも、多繊毛細胞は気道上皮などに、イオノサイトは腎臓の集合管上皮などに見られ、それらの細胞形成異常は様々な疾病を引き起こす。哺乳類の上皮組織やアフリカツメガエル胚表皮組織において、多繊毛細胞とイオノサイトの形成は、共に Notch シグナルによって抑制されている。また、アフリカツメガエル胚の表皮組織における多繊毛細胞とイオノサイトは、共に分化過程において、表皮組織の内側から表層に移動する。このように、多繊毛細胞とイオノサイトは、細胞分化における幾つかの類似点をもつ。したがって、多繊毛細胞とイオノサイトの形成を共通に制御する未知因子が存在している可能性が考えられるが、今までにそのような因子は報告されていなかった。</p> <p>申請者は、アフリカツメガエル胚表皮に発現する遺伝子の中に、多繊毛細胞やイオノサイトの形成に重要な新規因子があるのではないかと考えた。そして、当研究室で既に行われていたマイクロアレイのデータから選出した胚表皮に発現する候補遺伝子群の一つ、<i>male abnormal 21 like 3 (mab21-13)</i> に注目し、機能解析を行った。</p> <p>アフリカツメガエル胚での発現解析の結果、<i>mab21-13</i> は胚表皮のイオノサイトと多繊毛細胞に発現することが明らかとなった。モルフォリノを用いた <i>mab21-13</i> のノックダウンにより、イオノサイト分化のマスター因子である転写因子 <i>foxi1</i> の発現および多繊毛細胞分化のマスター因子である coiled-coil タンパク質 <i>multicilin</i> と転写因子 <i>foxj1</i> の発現が減少し、イオノサイト形成や多繊毛細胞形成が抑制された。これらの結果は <i>mab21-13</i> が多繊毛細胞とイオノサイトの形成を共通に制御する因子であることを示唆している。また、Notch Intracellular Domain (NICD) の過剰発現により Notch シグナルを活性化させたところ、<i>mab21-13</i> の発現が抑制された。NICD の過剰発現は <i>multicilin</i> や <i>foxi1</i> の発現を抑制するが、NICD と <i>mab21-13</i> の共発現により、それら遺伝子の発現がレスキューできた。これらの結果は、Notch シグナルとイオノサイト分化、多繊毛細胞分化をつなぐ重要な因子として <i>mab21-13</i> を同定できたことを示唆している。さらに、マウスの気道上皮細胞の初代培養系を用いて、<i>Mab21-13</i> の機能解析を行った。マウスの NICD を過剰発現させると、<i>Mab21-13</i> の発現が抑制された。shRNA による <i>Mab21-13</i> のノックダウンは、気道上皮細胞の多繊毛細胞分化を阻害した。これらは、多繊毛細胞分化における <i>mab21-13</i> の機能が哺乳類でも保存されていることを示唆している。本研究により Notch シグナルにより抑制される <i>mab21-13</i> が、多繊毛細胞とイオノサイトの形成を制御することが明らかとなった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、主にアフリカツメガエル胚を用いた実験により、新規因子 *mab21-13* が多繊毛細胞とイオノサイトの形成に必須であることを明らかにした。まず申請者は、*mab21-13* が原腸胚期には外胚葉に発現し、神経胚期、尾芽胚期には表皮に斑点状に発現することを明らかにした。多重染色によって尾芽胚期では *mab21-13* はイオノサイトおよび多繊毛細胞に発現していることが明らかとなった。表皮組織は上層と下層から構成されており、原腸胚期に多繊毛細胞前駆細胞およびイオノサイト前駆細胞は下層で形成され、発生の進行と共に上層へ移動して最終分化を起こすが、*mab21-13* も原腸胚期には下層に発現しており、発生が進行すると上層へ発現が移動することを明らかにした。また申請者は、イオノサイト前駆細胞や多繊毛細胞前駆細胞が形成される原腸胚期後期および神経胚期初期において、各マスター制御因子の発現解析を行い、*mab21-13* のノックダウンはイオノサイトのマスター制御因子 *foxi1* および多繊毛細胞のマスター制御因子 *multicilin* の発現を阻害することを示した。*multicilin* の下流で働くことが報告されている *foxj1* の発現や、多繊毛細胞前駆細胞のマーカーの *α-tubulin* の発現もノックダウンによって抑制されることを見出した。さらに、多繊毛細胞前駆細胞やイオノサイト前駆細胞の形成を阻害することが知られていた Notch シグナルによって、*mab21-13* の発現が阻害されることを明らかにした。また申請者は、Notch シグナルによる *mab21-13* の発現抑制が細胞自律的である可能性を示唆する結果を提示した。そして、レスキュー実験によって、Notch シグナルによる多細胞細胞前駆細胞やイオノサイト前駆細胞の形成不全が、*mab21-13* の発現抑制を介していることを明らかにした。以上の結果は、アフリカツメガエル胚表皮において、Notch シグナルによって発現抑制を受ける *mab21-13* が、イオノサイトと多繊毛細胞の両方の形成に必須であることを示唆するものである。さらに、*mab21-13* の機能が哺乳類でも保存されているのかを調べるため、申請者はマウス気道上皮細胞の初代培養系を用いて実験を行った。その結果、Notch を活性化させると *Mab21-13* の発現が低下すること、および *Mab21-13* のノックダウンによって多繊毛細胞の形成が抑制されることが明らかになった。これらの結果は、哺乳類でも、*mab21-13* が Notch シグナルによって発現抑制を受けること、および *mab21-13* が多繊毛細胞の形成に必要なことの二点が保存されていることを示唆している。本論文は、*mab21-13* の多繊毛細胞やイオノサイトの形成における重要性を提示し、これらの形成機構の解明に大きく貢献するものである。生命科学に関する高度で幅広い学識、専攻分野における優れた研究遂行能力、及び生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見が示されていると判断できる。また、本論文は、論理的かつ一貫性をもって記述されていた。以上より、本論文は、博士（生命科学）の学位論文として価値のあるものと認めた。また、平成27年1月27日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日