

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	余 徳立
論文題目	Temporal control of muscle gene expression in an ascidian embryo (ホヤ胚における筋肉で発現する遺伝子の時間的な調節)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>ホヤ幼生尾部に分化する36個の筋肉細胞のうち28個は、自律的に分化する。この28個の細胞は3つの細胞系譜から生じることがわかっているが、いずれの系譜においても、母性因子であるMacho-1転写因子の活性によって分化プログラムが始まる。Macho-1の制御下で発現する3つの転写因子Tbx6-r.b、Zic-r.b、Mrfは筋肉の構造タンパク質をコードする遺伝子を活性化するが、3つの転写因子遺伝子の相互の制御関係はよくわかっていない。また、Tbx6-r.bとMrfは筋肉構造遺伝子上流配列に直接結合することがわかっている。一方、別種のホヤでは、レポーター解析によって、アクチン遺伝子の発現を調節する調節領域がわかっている。しかし、この調節領域にTbx6-r.bやMrfが結合するのかわかかっていない、など統一的理解がなされていない。さらに、筋肉の構造遺伝子は様々なタイミングで発現を開始することがわかっており、そうしたタイミングの調節がどのようにおこなわれているのかもわかっていない。</p> <p>本研究では、ホヤ幼生の筋肉細胞分化の遺伝子調節機構を統一的理解することを目指した。細胞単位での詳細な遺伝子発現パターンの解析を行い、それをもとにして、Tbx6-r.b、Zic-r.b、Mrfをコードする遺伝子が相互に活性化する遺伝子調節回路を作っており、それによって、Tbx6-r.bとMrfの発現が原腸胚以降まで維持されることを見いだした。</p> <p>また、ミオシン調節軽鎖遺伝子の5'側に位置する発現調節領域の解析をおこない、2つの調節領域を見いだした。上流の調節領域は64細胞期の発現を担い、下流の調節領域は後期の原腸胚から尾芽胚にかけての発現を担っていた。上流および下流の調節領域のそれぞれにはTbx6-r.bの結合モチーフが一つずつ存在し、加えて、下流の調節領域にはMrfの結合モチーフが存在していた。<i>in vitro</i>の実験によって、実際にこれらの領域にはTbx6-r.bおよびMrfタンパク質が結合することを確認した。下流の調節領域によく似た配列は他の筋構造遺伝子にも存在しており、また、先述の別種のホヤのアクチン遺伝子の調節領域に見つかった調節領域にも酷似していた。Tbx6-r.bとMrfの組み合わせによって、後期胚では多くの筋肉構造遺伝子が発現することを示唆している。</p> <p>初期の発現は、Tbx6-r.b結合配列のみを含む調節領域を介して活性化されるという結果を踏まえて、Tbx6-r.bの結合の程度をクロマチン免疫沈降実験とディープシーケンシングによって解析した。その結果、Tbx6-r.bを強く結合する遺伝子ほど早い時期から発現が始まることが分かった。つまり、Tbx6-r.bの結合の程度によって、遺伝子発現の開始時期が遺伝子ごとに異なっている、ということが明らかとなった。</p> <p>ホヤ胚の転写調節遺伝子の発現は、これまで上流因子の組み合わせだけでほぼ説明できており、量的な調節は重要ではない、と考えられてきた。今回の解析では、筋肉の構造遺伝子の初期における発現は、量的制御を受けていることがあらたにわかった。遺伝子調節ネットワークの中で、調節遺伝子と最終分化に必要な遺伝子では、質的及び量的という異なる調節を受けている可能性が示唆された。</p> <p>今回の研究によって、これまで断片的にしか理解されていなかったホヤ胚の筋肉細胞分化における遺伝子調節機構の全体像が、統一的理解できるようになった。明らかになった遺伝子回路はいくつかの未解明な点は残っているものの、母性因子に始まって、筋肉構造遺伝子の発現に至るまでの一連の遺伝子発現調節を体系的に明らかにするものである。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ホヤ幼生の筋肉細胞は、自律的に分化する組織の代表例として、100年以上にわたって発生生物学の研究対象とされ、多くの研究成果が積み重ねられてきた。この自律的分化能は卵内に存在する母性決定因子によって担われていると考えられてきた。20年余り前にその母性決定因子の実体が解明され、また、その母性決定因子によって活性化される転写調節因子遺伝子の同定がなされるなど、筋肉細胞分化の背景にある分子機構の解明が進められてきた。一方で、こうした理解は断片的であり、一連の過程の統合的な理解には至っていなかった。

申請者の研究は、こうした断片をつなぎ合わせ、母性決定因子に始まって筋肉の細胞機能を担う構造タンパク質をコードする遺伝子の発現に至るまでの遺伝子調節回路を統合的に明らかにすることを目的としている。

第一に、申請者は、遺伝子調節回路において重要な働きを持つことが示されている3つの転写因子(Tbx6-r.b、Mrf、およびZic-r.b)をコードする遺伝子の発現パターンを時間を追って詳細に調べることから解析を始めた。それぞれの遺伝子の発現の時間的変化は、従来考えられていたよりも複雑であった。機能解析実験によって、その複雑な発現パターンの背景には、お互いに調節しあう遺伝子回路が存在すること、また、それによって、Tbx6-r.bおよびMrfの発現のレベルが増減しながら維持されていくことを明らかにした。

第二に、筋肉の構造タンパク質をコードする遺伝子の発現開始時期を詳細に調べ、こうした筋肉の構造タンパク質をコードする遺伝子は、遺伝子ごとに異なるタイミングで発現を開始することを明らかにした。これらの遺伝子はTbx6-r.bおよびMrfによって直接に調節されているので、申請者は、この2つの転写因子がどのようにして異なるタイミングで標的を活性化できるのか、という点に問題意識をもってさらに解析をすすめた。その結果、初期胚での発現はもっぱらTbx6-r.bによって担われ、その結合が強いほど早い時期に発現が始まることを明らかにした。同時に尾芽胚以降の後期胚での発現はTbx6-r.bおよびMrfの両方によって担われていることも明らかにした。

本論文の成果によって、ホヤ胚の筋肉細胞の分化における一連の遺伝子発現調節の過程が明らかとなった。ホヤ胚の筋肉細胞の自律的分化という長年にわたる問題が遺伝子発現調節のレベルで統合的に理解されたことは、大きな成果として認められる。また、母性因子に始まり分化細胞の構造を作り出す遺伝子の発現に至るまでの一連の遺伝子調節回路が明らかになっている例は他の動物胚でもほとんどなく、動物胚発生における遺伝子調節回路の理解という点でも重要である。

また、筋肉の構造タンパク質をコードする遺伝子の発現開始のタイミングがTbx6-r.bの結合の強さの程度によって量的な調節を受けているという発見は、発生における遺伝子発現の時間的調節の研究に新しい視点を与えるものである。このようなタイミング調節が示すホヤ胚筋肉細胞における生物学的意義は必ずしも明らかではないが、質的な調節によって調節遺伝子発現のタイミングが厳密に決まっているというこれまでの知見と対をなすものであり、発生における遺伝子発現調節の新しい展開を予想させるものである。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年2月12日に論文内容とそれに関連した口頭試問をおこなった結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降