

京都大学	博士 (医学)	氏名	吉岡 久美子
論文題目	Coupling delay controls synchronized oscillation in the segmentation clock カップリングの時間遅れが分節時計における同期振動を制御する		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>個々の細胞における様々な活性は揺らいでいるが、細胞間相互作用によるカップリングにより、組織レベルでは非常に秩序だった振る舞いを見せる。しかし、その詳細な分子機構は未だ不明の点が多い。顕著な例が、脊椎動物の体節形成過程にはたらく分節時計である。分節時計は、周期的におこる体節形成を調節する機構であり、その中心となるのが、未分節中胚葉(Presomitic mesoderm: PSM)における <i>Hes7</i> などの時計遺伝子の発現振動(オシレーション)である。このオシレーションによって PSM の前端部分が周期的にくびれ切れて体節が形成される。<i>Hes7</i> のオシレーションのタイミングは PSM 細胞間で同期している。この同期は Notch シグナル経路を介した細胞間相互作用であることがわかっている。PSM において Notch シグナルを阻害すると、オシレーションの同期が乱れ、その結果として、体節の癒合を引き起こす。しかしながら、Notch シグナルが <i>Hes7</i> オシレーションの同期に寄与するメカニズムは明らかになっていない。本研究では、マウスの PSM において <i>Hes7</i> のオシレーションを一細胞レベルで定量可能な蛍光レポーター (<i>Hes7</i>-Achilles)を開発し、これを用いたライブイメージングの実験系を確立した。野生型、および Notch の調節因子である <i>Lunatic fringe (Lfng)</i>の変異体における <i>Hes7</i>-Achilles の観察により、野生型の細胞はオシレーション位相の変動を速やかかつ正確に合わせるができるが、<i>Lfng</i>欠損マウスでは、細胞間同期が低下することを明らかにした。さらに、<i>Lfng</i>欠損マウスの PSM では、個々の細胞における <i>Hes7</i> のオシレーションも減弱化した。しかしながら、<i>Lfng</i>欠損マウスの PSM 細胞を分散培養すると、個々の細胞における <i>Hes7</i> のオシレーションの周期と振幅は、ほとんど正常と変わりなかった。すなわち、<i>Lfng</i> は主に細胞間のオシレーション位相のカップリングに寄与していることが示唆された。野生型と <i>Lfng</i>欠損マウスの共培養、およびオプトジェネティクスを用いた Notch シグナルのレポーターアッセイにより、<i>Lfng</i> は Notch シグナルの伝達時に、シグナルを送信する細胞で時間遅れを生み出していることが明らかになった。これらの結果と、数理モデルによる検証により、<i>Lfng</i>欠損の PSM ではカップリングの時間遅れが短くなり、同期が低下し、オシレーションの死(オシレーションデス)と呼ばれる状態に近づいている可能性が示唆された。実際に、カップリングの時間遅れを長くする低分子化合物を <i>Lfng</i>欠損 PSM に作用させると、オシレーションの振幅と同期が部分的に回復した。これらの結果から、細胞間相互作用の時間遅れの調節が体節形成に重要であり、適切な時間遅れがオシレーションの細胞間同期に必須であることが示された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

体節は椎骨、肋骨、骨格筋等の元になる節状の組織で、未分節中胚葉の頭側部が周期的に分節することによって形成される。この分節の周期性は、転写抑制因子 *Hes7* の発現がネガティブフィードバックを介して振動することによって制御される。*Hes7* の発現振動は Notch シグナルを介して未分節中胚葉細胞間で同期しており、この同期が乱れると体節や体節由来の組織が癒合するが、同期振動を可能にする分子機序は不明であった。

本申請者は、マウス未分節中胚葉において *Hes7* の発現を一細胞レベルで定量可能な蛍光レポーター (*Hes7*-Achilles)を開発してライブイメージング系を確立した。野生型および Notch の調節因子である *Lunatic fringe (Lfng)*の変異体における *Hes7*-Achilles の観察から、野生型細胞は振動の位相のずれを速やかに補正できるが、*Lfng* を欠損すると個々の細胞における *Hes7* の振動が減弱して細胞間同期も低下することを見出した。野生型と *Lfng*欠損細胞の比較および数理モデルによる検証から、*Lfng* は Notch シグナルの送信時間の遅れを生み出すことで、同期振動を活性化することを明らかにした。さらに、Notch シグナルの送信時間を長くする低分子化合物を *Lfng*欠損未分節中胚葉に作用させると、*Hes7* 発現振動の振幅と同期が部分的に回復した。これらの結果から、細胞間相互作用の適切な時間遅れが振動現象の同期化に必須であることが示された。

以上の研究は、細胞間同期現象の分子機構の解明に貢献し、発生生物学研究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、令和2年1月15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