

(続 紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	高嶋 良樹
論文題目	体節形成におけるHes7の振動発現にはイントロンによる発現の遅れが必要である		
(論文内容の要旨)			
脊椎動物胚に見られる体節と呼ばれる特徴的な繰り返し構造は、神経管の両側に位置しており、椎骨・肋骨・骨格筋・皮下組織等に分化する。マウスでは受精後8日目頃から13日目頃まで、頭側から尾側へと順番に約65対形成される。体節は、胎仔尾部側の未分節中胚葉（presomitic mesoderm, PSM）の前側部分が周期的に分節することによって1対ずつ形成される。この周期的な分節過程を制御する生物時計は、分節時計と呼ばれる。分節時計の周期は種によって異なり、マウスの場合は約2時間である。 周期的な分節過程は、PSMにおける遺伝子群の発現振動によってもたらされている。発現振動を示す遺伝子群にはNotchシグナル、Fibroblast growth factor (Fgf)シグナル、Wntシグナル伝達にかかわるものが多い。この中で中心的な役割を担うのが、basic-helix-loop-helix型の転写抑制因子Hes7である。Hes7の発現はNotchシグナルとFgfシグナルによって制御され、また、転写抑制因子として他の遺伝子発現を抑制するとともに、自身のプロモーターも負に制御する。そのため、Hes7の発現は次のように変動する。1) NotchやFgfシグナルによるHes7プロモーター活性の上昇、2) Hes7 mRNAの蓄積、3) Hes7蛋白の発現と蓄積、4) Hes7蛋白によるHes7プロモーターの抑制、5) Hes7 mRNAおよびHes7蛋白の減少 6) ネガティブフィードバックの解除によりHes7プロモーター活性の上昇。このように、Hes7はネガティブフィードバックを介して自律的に発現振動し、また多くの遺伝子発現の振動を誘導することから、分節時計の本体と考えられている。 Hes7の発現動態をあらわす数理モデルが構築されており、そのモデルから発現振動に必要な条件が予測されてきた。特に、プロモーターの活性化からHes7蛋白が産生されてネガティブフィードバックが起こるまでにかかる時間（遅れ）が十分に長いことが、Hes7の発現振動に必須であると予測されていた。そこで、イントロン配列のスプライシングが発現の遅れを生み出すことに注目し、Hes7の発現振動に果たすイントロンの役割を解析することにした。まず、スプライシングによる発現の遅れを測定するために、イントロンあり、あるいはイントロン無しのHes7レポーターマウスを作製したところ、Hes7のイントロンの存在によってレポーター蛋白の発現が約19分遅れることがわかった。数理モデルはこの遅れがHes7の発現振動に必須なことを示唆していたことから、Hes7のすべてのイントロンを欠損させたマウスを作製して検証実験を行った。その結果、このマウスではHes7の発現は振動せず、一定になり、分節化に異常が見られた。しかし、イントロン欠損Hes7マウスではHes7タンパクの発現量も低下していたことから、Hes7タンパク発現量の低下が原因で振動的な発現が失われた可能性も考えられた。この可能性を否定するために、イントロンを持つ、あるいは持たないHes7遺伝子をそれぞれ複数コピーHes7ノックアウトマウスに導入したところ、両方の遺伝子ともに発現量は十分回復したが、イントロンを持つHes7遺伝子のみがHes7ノックアウトマウスの分節異常も回復させることができた。また、イントロン無しのHes7遺伝子は、野生型のバックグラウンドにおいても優性的に分節異常を引き起こした。これらの結果から、Hes7のイントロンがネガティブフィードバックのタイミングを遅らせることで、Hes7の振動的な発現を可能にしていることが明らかになった。			

(論文審査の結果の要旨)

マウスの体節は約2時間周期で形成されるが、これは転写抑制因子Hes7がネガティブフィードバックによって約2時間周期のリズムを刻むことによって起こる。Hes7の発現動態をあらわす数理モデルが構築されており、プロモーターの活性化からHes7蛋白が産生されてネガティブフィードバックに至るまでにかかる時間(ネガティブフィードバックのタイミングの遅れ)が十分に長いことが、Hes7の発現振動に必須であると予測されていた。しかし、今までこの予測に対する検証実験は行われてこなかった。

この予測を検証するために、申請者はスプライシングによる遅れに注目した。まず、イントロンを持つHes7レポーターあるいはイントロンを持たないHes7レポーターを導入したトランスジェニックマウスを作製し、レポーターの発現のタイミングを解析したところ、イントロンが存在することによってレポーターの発現が約19分遅れることを見出した。数理モデルのシミュレーションから、この19分の遅れが無くなると、Hes7の発現は振動しなくなることが予測されたので、次に、申請者はHes7遺伝子からイントロンを除去した変異マウスを作製した。この変異マウスは、Hes7の発現が振動せずに定常になること、その結果、下流の遺伝子発現も定常になり、体節および体節由来の組織が癒合することを示した。しかし、イントロン除去によってHes7蛋白の発現が野生型に比べて約34%程度にまで減少しており、この発現低下によってHes7の発現が振動しなくなる可能性が示唆された。そこで、この可能性をしらべるために、イントロンを持つHes7トランスジェンあるいはイントロンを持たないHes7トランスジェンを作製し、それぞれHes7ノックアウトマウスに導入した。どちらのトランスジェンからも十分量のHes7蛋白が発現した。しかし、イントロンを持つHes7トランスジェンはHes7ノックアウトマウスの分節異常を正常化したのに対して、イントロンを持たないHes7トランスジェンはHes7ノックアウトマウスの分節異常を正常化できなかった。さらに、イントロンを持たないHes7トランスジェンは、野生型マウスに対しても分節異常を引き起こした。この結果から、イントロンは、Hes7の発現量ではなく、スプライシングを介してネガティブフィードバックのタイミングを遅らせることによって、Hes7の発現振動を可能にしていることが示された。

よって本研究は、Hes7の発現振動および規則正しい分節過程には遅れたタイミングでネガティブフィードバックが起こることが必須であることを明らかにするとともに、遺伝子発現のタイミングを制御するというイントロンの新たな役割を解明した。

以上より、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

また、平成23年5月9日論文公聴会を開催し、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、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。

要旨公開可能日： 年 月 日