

氏 名	正 水 芳 人
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3199 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Real-time imaging of the somite segmentation clock: Revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells (分節時計のリアルタイム・イメージング: 個々の未分節中胚葉細胞での不安定なオシレーターの解明)
論文調査委員	(主 査) 教 授 松 田 道 行 教 授 野 間 昭 典 教 授 瀬 原 淳 子

論 文 内 容 の 要 旨

肋骨や椎骨などの前後軸に沿ったくり返し構造は、体節に由来する。体節は、マウスでは2時間ごとに尾側端にある未分節中胚葉からくびれ切られて形成されるが、この周期的な過程は分節時計によって制御される。bHLH 型転写抑制因子 *Hes1* の mRNA の発現領域は体節形成の周期に一致して、未分節中胚葉の尾側から頭側に移動している。この変化は1つ1つの細胞での mRNA の発現量が周期的に増減(オシレーション)し、周辺細胞同士が同調しかつ前後方向で位相差を生じることによる。*Hes* などが2時間周期で増減を繰り返すことにより振動体として働き、分節時計の中心的な役割を担う。また、*Hes1* は未分節中胚葉以外に線維芽細胞・筋芽細胞・神経芽細胞など多くの種類の培養細胞で発現し、血清刺激により mRNA およびタンパクの発現が2時間周期でオシレーションする。

本研究では、個々の細胞内での経時的な *Hes1* の発現を明らかにするために、*Hes1* の発現を可視化するリアルタイムイメージングの系を開発した。レポータータンパク質のルシフェラーゼの N 末端側にユビキチンをつなぐことにより(Ub-Luc)、半減期を数時間から約10分に短縮した。このようにレポータータンパク質の半減期を短くしなければならないのは、*Hes1* タンパク質の半減期は約20分と非常に短いので、レポータータンパク質の半減期も20分かそれより短いことが必要で、さもないと、数回オシレーションすればレポータータンパク質が蓄積してしまうからである。

Ub-Luc を *Hes1* プロモーター下につないだ *Hes1* レポーターを作製し、線維芽細胞で *Hes1* の発現を可視化し、個々の細胞内での経時的な *Hes1* の発現を顕微鏡下で観察したところ、多くの細胞では長時間にわたって *Hes1* の発現がオシレーションすることがわかった。平均の周期は約2時間であったが、約1時間30分のときや約3時間のときもあり、振幅もさまざまであった。すなわち、細胞集団として観察したとき *Hes1* の発現が3~6回オシレーションしてから定常状態になったようにみえたのは、すべての細胞がオシレーションしなくなったためではなく、オシレーションしている細胞が同期しなくなったためであった。

次に *Hes1* レポーター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックマウスの胎仔の尾側領域を培養し、未分節中胚葉における *Hes1* の発現を可視化し、顕微鏡下で観察した。可視化した *Hes1* の発現領域は未分節中胚葉の尾側端から頭側に向かってダイナミックに移動していた。また、未分節中胚葉での *Hes1* の発現は周期および振幅が安定であった。

線維芽細胞と異なり個々の未分節中胚葉の細胞は安定な振動体を持っているのかどうかを明らかにするために、未分節中胚葉の分散培養を行ったところ、個々の細胞は線維芽細胞と同様の不安定なオシレーションを示した。周期は約1時間30分のときや3時間を超えるとときもあった。このことは、個々の細胞がもつ振動体は未分節中胚葉といえども不安定であることを示唆している。

不安定な振動体しか持たない細胞同士が、相互作用することによって安定な振動体を形成できるのかどうかに関しては、まだ実験的な証明はできていない。そこで、その可能性について検討するために数理モデルによるシミュレーションを試み

た。隣接相互作用を含んだ確率共鳴のモデルでは、隣接する細胞間で相互作用がある時は振動体が同期し安定化した。この結果は、不安定な振動体同士でも細胞間相互作用があれば同期し、周期が一定の安定なオシレーションを形成できることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

bHLH 型転写抑制因子 *Hes1* は、体節形成過程の未分節中胚葉 (PSM) や多くの種類の培養細胞において、短周期の発現リズムを刻む。このリズムはネガティブフィードバックを介して自律的に起こることから、*Hes1* は生物時計として働くと考えられている。

本研究では、短周期生物時計の実体を明らかにするために、不安定化ルシフェラーゼをレポーターとして用いて *Hes1* の発現をリアルタイムで可視化した。

培養細胞に血清刺激を加えると、*Hes1* の発現は 3~6 回オシレーションして定常状態になることが知られている。しかし、個々の細胞の *Hes1* の発現を可視化したところ、全ての細胞がオシレーションしなくなるのではなく、オシレーションしている細胞が同期しなくなっていた。このことは、培養細胞における *Hes1* の発現オシレーションは不安定ですぐに同期しなくなることで、定常状態に見える場合でも個々の細胞では *Hes1* の発現はダイナミックに変化しており定常ではないことを示している。

一方、PSM では、*Hes1* の発現オシレーションは細胞間で安定に同期していたが、分散培養すると不安定になり同期しなくなった。このことは、PSM で *Hes1* の発現オシレーションが安定なのは、個々の PSM の細胞が安定な振動体を持っているからではなく、細胞間相互作用によって不安定な振動体が安定化するためであることを示唆している。

以上の研究は、*Hes1* の発現動態の解明に貢献し、時間生物学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みとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 1 月 28 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。