

## 論文内容の要旨

申請者氏名 秋山 隆太郎

せきつい動物の体節形成は、分節構造の形成を理解するための良いモデルである。体節は、未分節中胚葉 (PSM) が頭側から尾側へ、一定時間おきに等間隔にくびれ切れることで形成される。これまでに PSM には体節 5 個分 (S0 から S-IV) のプレパターンが存在することが示唆されている。しかし、もっとも尾側の S-IV において予定体節境界が決定される分子メカニズムは不明であった。本論文では、体節のサイズを制御するとされている FGF/MAPK シグナルに着目した。具体的には、ゼブラフィッシュ胚を用い、PSM で濃度勾配を形成する *fgf8* の発現と、その下流因子である Ras, Erk 活性の時空間な変化を調べた。

PSM における *fgf8* は尾側から頭側へ向かって濃度勾配を形成し、その発現領域は尾の慎重とともに尾側へ移動していた。一方、PSM におけるリン酸化 Erk は FGF のような濃度勾配を形成せず、二峰性のパターンを示した。さらに、フラットマウントした胚を用いてリン酸化 Erk の局在の時空間的变化を推定したところ、リン酸化 Erk の局在は体節形成周期に連動して、尾側へ周期的に移動することがわかった。このことから申請者は、リン酸化 Erk の局在が、その頭側端において予定体節境界を決めているのではないかと予想した。

そこで Erk のリン酸化を一過的に阻害・亢進させる実験を試みた。FGFR のリン酸化阻害剤を体節形成期のゼブラフィッシュ胚に一過的に処理すると、リン酸化 Erk は処理直後にのみ一過的に消失した。さらに、リン酸化 Erk の一過的消失の時点から数えて 5 個目に形成された体節でのみ、体節サイズの一過的な増大がみられた。反対に、Erk の脱リン酸化酵素阻害剤を処理して Erk 活性を亢進させた場合には、一過的なリン酸化 Erk 局在の頭側への伸展と、5 体節目における体節サイズの減少がみられた。これらの結果は、リン酸化 Erk による境界が S-IV での予定体節境界を規定することを示唆している。

PSM では、Notch シグナル下流の転写因子 *her1, her7* の発現が振動し、体節の等間隔パターンが作られていると考えられている。そこで申請者は、*her1, her7* が周期的に頭側 PSM の Erk リン酸化を制御することで、リン酸化 Erk 局在が周期的に変化するのではないかと考えた。*her1, her7* をノックダウンしたところ、リン酸化 Erk の局在の頭側端は最終分節面から一定の位置に収束しなかった。このことから、リン酸化 Erk 局在の周期的な移動には、*her1, her7* が必須であることがわかった。

以上の結果より、一様にみえる未分節中胚葉組織の中に最初に分節境界を生み出すのは、分節周期に連動した FGF/MAPK シグナル下流の局在パターンであることが明らかになった。さらに、この局在パターンの確立には *her1, her7* の発現が必要であることから、遺伝子発現の振動という時間情報が FGF/MAPK シグナルという空間情報に結びつくことにより、分節構造へと変換されることを示唆している

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 秋山 隆太郎

せきつい動物の前後軸に沿った、せきつい骨や肋骨などの繰り返し構造は、発生中期の構造物である体節の繰り返し構造に由来している。体節は、未分節中胚葉が頭側から尾側へ、一定時間おきに等間隔にくびれ切れることで形成される。未分節中胚葉は一様な中胚葉組織に見えるが、実際には、体節 5 つ分のプレパターンすなわち予定体節境界がすでに形成されていることが知られている。この 5 個分の境界のうち、未分節中胚葉に生じる最初の予定体節境界を決める分子メカニズムは、これまでよくわかっていなかった。本学位論文では、ゼブラフィッシュの体節形成をモデル型として、ゼブラフィッシュ未分節中胚葉では FGF/MAPK シグナル下流のリン酸化 Erk が周期的に変動し、それによって生じるシグナル境界が、最初のプレパターンの位置を決定することを明らかにしたものである。

未分節中胚葉では尾側から頭側へ向かって FGF の濃度勾配が形成されており、FGF の濃度がある閾値を下回った地点で予定体節境界が形成されると考えられてきた。しかし、FGF の下流因子も同様の挙動を示すかどうかは不明であった。本論文では、FGF/MAPK シグナルの各因子について、時空間的な変化を調べた。リガンド *fgf8* の発現は、ゆるやかな濃度勾配を示し、その発現領域は尾の伸長に伴って連続的に変化することを明らかにした。一方、下流のリン酸化 Erk は濃度勾配を示さず、その頭側端は一定の位置にとどまり、体節形成と連動して、周期的に尾側へ動くことを明らかにした。リン酸化 Erk の頭側端の位置を一過的に操作したところ、操作からちょうど 5 個目に形成された体節境界の位置のみ変化したため、これが最初の予定体節境界を決めていることが明らかになった。未分節中胚葉で発現振動する *her1, her7* をノックダウンすると、リン酸化 Erk の周期的な変動が失われ、体節の周期性も失われたことから、遺伝子の発現振動が FGF シグナル下流へ働きかけることによって体節プレパターンが決定されていることが示唆された。

以上のように、本論文は、体節のプレパターン形成における分子メカニズムの一部を明らかにし、学術上、貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。