

論文内容の要旨

申請者氏名 Wong Kah Loon

脊椎動物の発生において、Extracellular signal-regulated kinase (Erk)は、脳、体節、眼、四肢、耳などの多くの器官形成に重要な役割を果たしている。しかし、Erkが脊椎動物胚のいつ、どこで活性化されて、どのように多くの器官の形成を制御しているのかについては十分には理解されていなかった。これは、脊椎動物の胚発生過程で、Erk 活性化状態を観察する実験系が確立されていないことが要因であると考えられる。

そこで申請者は、Erk 活性化状態を可視化する脊椎動物モデルを構築することを目的に、FRET-based Erk biosensor を導入したゼブラフィッシュ胚の作製を行った。具体的には、ゼブラフィッシュのすべての細胞で発現する EF1 α プロモーター制御下に FRET-based Erk biosensor が発現するベクターを構築し、Tol2 システムを利用して、トランスジェニックゼブラフィッシュライン *Tg[EF1 α : Erk biosensor]*を樹立した。*Tg[EF1 α : Erk biosensor]*から得られた胚で、FRET/CFP シグナルを観察すると、リン酸化 Erk(pErk : 活性化型 Erk)に対する抗体を用いた免疫染色パターンと類似する活性化パターンが得られた。さらに、FGFR および MEK に対する阻害剤を処理したところ、FRET/CFP シグナルが、時間依存的に低下することを明らかにした。以上の結果から、*Tg[EF1 α : Erk biosensor]*を使って、脊椎動物の胚発生過程の Erk の活性ダイナミクスを観察する実験系が確立できたといえる。

*Tg[EF1 α : Erk biosensor]*胚を用いて、様々なステージで、Erk 活性のライブイメージングを行い、新規に Erk 活性化状態のダイナミクスを明らかにし、さらに、新たに活性化領域を発見した。原腸胚期の embryonic margin では Erk が活性化されることはこれまでに知られているが、活性化エリアが時間経過とともに拡大することを新たに明らかにした。体節形成期の脳領域では、中脳-後脳境界での Erk の活性は時間経過とともに増加するが、後脳では一過的に活性化されることを示した。さらに、尾部での活性は、体節原基である未分節中胚葉に由来するものと信じられているが、未分節中胚葉に近接する細胞層 (axial stem cell を含む) でも活性化されていることを発見した。axial stem cell は、体の首よりも後ろの構造を作りため、神経系や中胚葉系の細胞に分化する幹細胞であり、BMP や Wnt シグナルが神経-中胚葉への運命決定に関与することが報告されていたが、Erk の関与は報告されていなかった。そこで、Erk 活性を阻害し、神経-中胚葉への運命決定を解析したところ、中胚葉細胞の減少に伴い、神経系の組織の過形成が観察された。この結果は、Erk が神経-中胚葉への運命決定のバランスを制御する可能性を示唆している。したがって、申請者はゼブラフィッシュ胚で Erk 活性化状態を可視化するシステムを構築し、Erk シグナルの新規の活性化領域と詳細なダイナミクスの解析をおこなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Wong Kah Loon

Erk の活性は、増殖因子など細胞外因子に依存したシグナルによって活性化され、細胞レベルでは、増殖、分化、アポトーシス、移動など様々な生理現象を制御し、そのシグナルの破綻は、発生不全、ガンなど疾病に繋がることから、Erk シグナルの時空間的制御機構の理解は、生物学（特に、発生生物学、細胞生物学）だけでなく、医学的にも重要である。本研究では、この Erk 活性の時空間的制御機構を解明する足がかりとして、脊椎動物の胚発生過程を通して、Erk 活性をモニターできるライブイメージングシステムの構築を行った。

申請者は、EF1 α プロモーターに依存して FRET-based Erk biosensor が発現するトランスジェニックゼブラフィッシュライン *Tg[EF1 α : Erk biosensor]* を樹立した。過去のリン酸化 Erk(pErk: 活性化型 Erk) に対する抗体による免疫染色パターンとの類似性、および、FGFR、MEK に対する阻害剤による FRET/CFP シグナルの低下がから、*Tg[EF1 α : Erk biosensor]* を用いることで Erk の活性化がライブイメージングできることがわかった。過去にマウスでも FRET-based Erk biosensor を用いた Tg 系統は樹立されていたが、マウスでは胚が大きく、母体内で発生が進むため、胚発生のいつ、どこで Erk が活性化されているかについては報告されていなかった。つまり、申請者の樹立した *Tg[EF1 α : Erk biosensor]* 系統は、脊椎動物の発生過程で、Erk 活性をライブイメージングできる最初の実験系として位置付けることができる。

申請者は、この系を活用し、発生過程でダイナミックに変化する Erk 活性の時空間的なマップを完成させた。しかも、詳細に観察することによって、過去に知られていなかった Erk の活性ダイナミクス、活性領域を同定することに成功した。例えば、体節形成期の脳領域では、中脳-後脳境界と後脳で Erk は活性化されることが報告されていたが、中脳-後脳境界では、Erk は数時間オーダーで活性化され続けるのに対して、後脳では、一過的な活性化を示すことが明らかになった。この事実は、「Erk の活性調節には、フィードバック、フィードフォワードなどの異なるシグナル制御システムが存在し、しかも、そのシステムが、領域、時期特異的に利用されている」可能性を示唆している。また、申請者は、axial stem cell を含む secondary body(首より下の体)の構築に不可欠なオーガナイザー領域においても Erk が活性化されていることを示し、Erk が幹細胞から神経系/中胚葉系への分化に関与することを示した。

以上のように、本論文は、初めて脊椎動物の胚で Erk の活性をライブイメージングしただけでなく、そのシグナルの活性化ダイナミクス、複雑さを明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、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。