

論文内容の要旨

申請者氏名 金 雄

マウスの未分節中胚葉において *Hes7* や *Lfng* など Notch シグナルの標的遺伝子の発現振動が周期的な分節化に必須である。しかしこれまでの解析では、Notch シグナルが破綻し発現振動および体節形成が乱れてしまうために、Notch シグナルがいかに体節形成を制御するのかについては十分に理解されていない。本研究では体節形成の周期制御メカニズムを探ることを目的とする。具体的には、Notch 細胞内ドメイン(NICD)を分解促進することで Notch シグナルを負に制御する因子である *Nrarp*(Notch-regulated ankyrin repeat protein) を遺伝学的に欠失(*Nrarp*^{-/-})させて Notch シグナル変化と体節形成の様子を観察する。さらに、Notch シグナル阻害剤を投与して、体節形成の変化を変異体と比較する。また、細胞間の振動同調メカニズムにおいて Notch シグナルの役割を探る。

Nrarp^{-/-}では 尻尾の屈曲、腰椎と肋骨の奇形が認められた。また *Nrarp*^{-/-}では腰椎と尾椎が減少しており、椎骨全体では約2本減少していた。椎骨は胎生中期から後期にかけて体節ひとつに相当する部分から分化形成されるため、*Nrarp*^{-/-}の椎骨数の減少は体節数の減少に起因すると考えられる。体節数を比較したところ、体節形成の初期には同数であるが、発生が進むと *Nrarp*^{-/-}では体節数が有意に減少した。即ち、*Nrarp*^{-/-}では一体節の形成にかかる時間が延びたために、発生が進むにつれて体節数が減少するものと考えられる。野生型と *Nrarp*^{-/-}間の周期の差は約5分と予測された。一方、*Nrarp*^{-/-}の未分節中胚葉では、NICD の量が約2倍に増加しており、Notch シグナルの標的遺伝子の発現も上昇していた。マイクロアレイ解析と 定量 PCR により、*Nrarp*^{-/-}では FGF と Wnt シグナルは変化せず Notch シグナルのみが特異的に上昇していた。しかし遺伝子発現振動パターンには変化がなかった。次に、周期の延びと Notch シグナルとの関連性を証明するために、野生型マウスに Notch 阻害剤を投与し Notch シグナルを減衰させたところ、投与量に比例して NICD の量が減少し、体節数が増加していた。さらに *Nrarp*^{-/-}に阻害剤を投与したところ体節数が増加した。しかし、阻害剤の投与により、体節形成がわずかに乱れ、*Nrarp*^{-/-}ではより顕著な奇形が観察された。Lewis らによって提唱されている分子振動の数理モデルにおいて Notch シグナルと振動周期の相関を検討したところ、実験結果と同様に振動周期が Notch シグナルに依存していた。

Nrarp^{-/-}では腰椎、肋骨、尻尾に形成異常がみられるが、その原因は明らかになっていない。生体内の遺伝子発現は確率的に起こるために、様々な要因(ノイズ)により発現が影響を受け、かく乱される。未分節中胚葉細胞においても細胞移動、分裂、温度変化などがノイズとして働くことが知られている。そこで、*Hes7*^{-/-}と *Nrarp*^{-/-}から得られた二重変異体を解析することと薬理学的方法で遺伝子発現をかく乱させることで体節形成時のノイズの影響を調べた。HDAC 阻害剤であるホウ酸やバルプロ酸を投与し、発現振動を観察したところ、*Nrarp*^{-/-}の未分節中胚葉細胞では振動の位相が揃っていない(同調しない)細胞が多く現れた。さらに、非同調細胞は *Nrarp*^{-/-}に比べ二重変異体で増加していた。すなわち、マウスでは *Nrarp* や *Hes7* など Notch シグナルの標的遺伝子が形成するネガティブフィードバックが細胞間の振動同調と維持に関与していることを示唆している。

今後、様々なノイズ存在下で非同調細胞を定量し統計的に比較すること、未分節中胚葉で分子(*Nrarp* タンパク質)を可視化することが求められる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 金 雄

せきつい動物のからだは、脊椎骨に代表されるように、前後軸に沿った繰り返し構造から構成されている。この繰り返し構造は、発生中期の構造物である体節の等間隔パターンに依存している。体節のもととなる組織である未分節中胚葉では、いくつかの遺伝子が周期的な遺伝子発現の変化を示しており、それに同調して周期的に分節化が起こることによって、体節の等間隔パターンは形成される。すなわち、体節形成では遺伝子発現の振動の時間的な周期性が、組織構造の空間的な周期性に変換されている。本論文は、マウスの体節形成をモデル型として、体節形成過程における遺伝子発現の振動の周期の調節メカニズムを明らかにし、さらにその調節メカニズムが、遺伝子発現振動の細胞間での同調に関与することを示したものである。

マウスの未分節中胚葉ではいくつかの遺伝子の発現が 2 時間周期で振動しており、その結果、体節は頭側から尾側にかけて、約 2 時間周期で順々に形成されることが知られている。しかし、遺伝子発現の振動の周期がどのように調節されているかはこれまで不明であった。遺伝子発現の振動には、多細胞生物間で保存された細胞間シグナル経路である Notch シグナルが必須であることがこれまでに明らかにされてきたが、本論文では、Notch シグナルのフィードバック制御因子である Notch regulated ankyrin repeat protein (Nrarp) のノックアウトマウスおよび Notch シグナルの阻害剤を用いて、Notch シグナル強度を個体レベルで人為的に変化させることによって、遺伝子発現振動の周期が Notch シグナル強度と正の相関があることを示した。具体的には Notch 強度を調節することにより、5%程度の振動周期の調節が行われていることを明らかにした。さらに、外的攪乱や生体内のノイズによって細胞間の振動の同調性が失われたときに、細胞間で振動の位相が調節されて再同調が行われることによって、振動の同調性が維持されているが、今回発見した Notch シグナル強度を利用した振動周期の調節機構がこの再同調に必須であることを明らかにした。

以上のように、本論文は体節形成過程における分節化の周期性に関するメカニズムを明らかにし、その堅牢性のメカニズムの一部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。