

論文内容の要旨

申請者氏名 Bambang Retnoaji

During vertebrate development, the primary body axis elongates towards the posterior and is periodically divided into somites, which give rise to the vertebrae, skeletal muscles and dermis. The anterior somites are formed early, and then the posterior somites are progressively generated along with the axis elongation. A difference between the anterior and posterior somitogenesis has been observed in several species. However, how the pace of somitogenesis is changed and whether the anterior-posterior difference is important, remain unclear.

I observed somitogenesis of the first 8 somites in zebrafish, and found a clear difference between the first 4 and the later 4 somites. Segmentation period between somites didn't show obvious difference. However, overlapping rate of somitogenesis differs from somites 1-4 to 5-8. In zebrafish, somite segmentation is regulated by the combined action of Notch, fibroblast growth factor (FGF) and retinoic acid (RA) signaling activities. Knockdown of a Notch ligand, *deltaD*, or an FGF ligand, *fgf8*, did not affect the anterior-posterior transition. However, knockdown of *raldh2*, which encode an enzyme for RA synthesis, resulted in a transient extension of segmentation period at somites 4 and 5, which leads missing a somite, and its resultant the second cervical vertebra. Rescue experiment resulted in normal formation of somites, leading to recover loss of a somite and the vertebra. These results suggest that RA signaling is essential for proper transition between the anterior and posterior somitogenesis. Next, I investigated whether RA modulates the somite segmentation clock during late gastrulation, by checking expression of gene *her1*. In *raldh2* morphants, the expression pattern of *her1* was similar to that in control. Although the number of *her1* stripes in control increased from two to three at a period between 9 to 10 hpf, but was delayed in *raldh2* morphants. I also investigated expression of *fgf8*, *mespb*, *papc* or *tbx16*, which are implicated in somite size determination but could not any defect. I also investigated the expression of *rippy1*, which encodes a transcriptional repressor that inhibits the transcription of *her1*. I found that the ectopic expression of *rippy1* in *raldh2* morphant, which overlap with the supposed position of third stripe of *her1*. Showing the possibility that ectopic expression of *rippy1* inhibits the expression of *her1*, at the transition between the anterior and posterior somitogenesis. This is also supported by the data showing that, over expression of *rippy1* down regulate of *her1* expression in zebrafish embryo.

These results suggest that a mechanism in which RA regulates the cycle number of the clock is possibly trough controlling the *her1* repression by *rippy1*-co repressor association.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Bambang Retnoaji

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。体節は体の前側から後ろ側に向けて、順々に周期的に形成されることが知られている。体節形成周期は、例えばマウスでは 120 分周期、ニワトリでは 90 分周期、ゼブラフィッシュでは 30 分周期であるが、同じ種であれば前側、すなわち初期に形成される体節の形成周期は速く、後ろ側、すなわち後期に形成される体節の形成周期は遅いことが知られている。しかし、体節形成周期の前側と後ろ側での違いの分子メカニズムはこれまでに全くわかっていなかった。本学位論文では、ゼブラフィッシュ胚をモデル系として、ゼブラフィッシュでは最初に形成される 4 つの体節の形成周期が速く、それ以降に形成される体節の形成速度が遅いことを新たに見だし、その移行にレチノイン酸シグナルが重要な役割を果たしていることを明らかにした。

ゼブラフィッシュ胚のタイムラプスイメージングをおこない、ゼブラフィッシュの体節形成周期を計測した。最初に形成される 4 つの体節では、体節形成に要する時間はそれ以降に形成される体節と同じだが、前の体節の形成が完了する前に次の体節の形成が始まるために、結果として体節形成周期が速くなっていることを発見した。5 つめ以降の体節では、前の体節の形成が完了すると同時に次の体節の形成が始まっていた。体節形成には Notch シグナル、FGF シグナル、Wnt シグナル、レチノイン酸シグナルなどが協調して働いていることが知られている。ゼブラフィッシュはいてそれぞれのシグナルを抑制すると、レチノイン酸シグナルを抑制した場合にのみ最初の 4 つの体節の形成とそれ以降の体節の形成の移行がうまくいかずに、結果として 1 つの体節が失われ、そのためにゼブラフィッシュ個体の 2 番目の頸椎骨が消失することが明らかになった。レチノイン酸シグナルを抑制すると転写抑制因子である *ripply* の局在が広がり、*ripply1* が抑制している *her1* 遺伝子の発現領域を、最初の 4 つの体節形成と以降の体節形成の移行期に一致して一過的に狭めるために、移行期に作られるべき 1 つの体節が失われたことが示唆された。

以上のように、本論文はレチノイン酸シグナルが初期の体節形成において重要な役割を果たすことを示すもので、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。