

# 論文内容の要旨

申請者氏名 藤室 武

せきつい動物の頭尾軸に沿った繰り返し構造は、発生中期に形成される体節のプレパターンに由来する。マウス胚では、体節は頭側から2時間周期で順々に形成されるため、周期的に起こる生命現象を理解するためのよいモデルであると捉え、体節形成の周期制御メカニズムを解明することを目指した。体節は、胚尾部の未分節中胚葉が分節化されることによって形成されるが、これまでの研究から未分節中胚葉で一群の遺伝子の発現が2時間周期で振動し、それが分節時計として働いて体節が周期的に形成されることが明らかになっている。さらに振動遺伝子のひとつがコードする転写因子 *Hes7* が自己の発現を抑制することでネガティブフィードバックループを形成し、それが遺伝子発現の振動を発生させていることが明らかになっている。

本研究では、マウス個体で分節時計の中心をなす *Hes7* 遺伝子に改変を加えることにより、分節化周期を変化させることを試み、それによって分節時計の周期決定メカニズムを明らかにすることを目指した。数理モデル解析から、振動周期が *Hes7* の転写活性化から *Hes7* の転写抑制するまでに要する時間である「時間遅れ」に依存することを予測したので、私は *Hes7* 遺伝子の 3'UTR にヒト *Dystrophin* 由来の大きなイントロンを導入することによって *Hes7* 遺伝子の転写時間を延長させ、「時間遅れ」を増加させて振動周期を延長させることを試みた。マウス ES 細胞で *Hes7* の 3'UTR に 5kb、10kb、20kb のヒト *Dystrophin* 由来のイントロンを導入し、組み替えられた ES を用いてマウスのホモ接合体 (*Hes7*<sup>7kb/5k</sup> *Hes7*<sup>10k/10k</sup> *Hes7*<sup>20k/20k</sup>) を作製した。

数理モデルから、転写時間の延長は安定した振動を導くことが予測されたが、ノックインマウスでは、*Hes7*<sup>-/-</sup> と類似した重篤な体軸骨格の異常が見られ、遺伝子発現振動が失われていることが明らかになった。*Hes7* タンパク質の量をしらべたところ、*Hes7* タンパク質量は劇的に減少していることが明らかになった。ノックインマウスにおける *Hes7* の転写産物を解析したところ、*Hes7* 3'UTR に導入した外来性のイントロンがスプライシングを受けずに残っており、さらに外来性イントロンの 2.4kb と 3.3kb にある polyA 付加シグナル類似配列を認識して polyA が付加されて終結されていることが明らかになった。すなわち、外来性イントロンを導入した変異 *Hes7* アリルの転写産物は *Hes7* の 5'UTR およびコード配列は正常であるが、本来の 3'UTR を欠き、ヒト *Dystrophin* のイントロン由来の配列を 3'UTR としている。この転写産物からは正常な *Hes7* タンパク質が生じると予想されるので、*Hes7* タンパク質量の著しい低下は *Hes7* タンパク質の分解が促進されたのではなく、mRNA の安定性の低下、mRNA の核外輸送効率の低下、翻訳効率の低下などの何らかの生産性の低下によるものと推定された。

以上の結果より、*Hes7* 3'UTR は *Hes7* タンパク質の蓄積に必要であり、分節時計の機能に必須であることが明らかになった。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 藤室 武

周期的に起こる生命現象は、概日リズムをその代表例として、数多く存在する。概日リズムを含め、そのいくつかは生物自身が内在的なリズム、すなわち振動子を持ち、それによって細胞や個体のふるまいが制御されていることが知られており、近年それらの分子メカニズムが解明されつつある。例えば概日リズムでは、いくつかの遺伝子の転写制御が複数のフィードバックループを形成して、それによって遺伝子発現の 24 時間周期の振動が引き起こされ、それが内在的なリズムとして概日リズムを刻み、一日の環境変化に適応するために使われている。しかし、周期がどのように調節されているかということについては不明な点が多く残っている。

本研究で着目している生物リズムは、せきつい動物の発生期に形態形成に寄与するリズムである。せきつい動物のからだは、せきつい骨に代表される前後軸に沿った繰り返し構造が基本となっているが、その繰り返しパターンは発生中期の一過的な構造である体節に由来している。体節はからだの前側から一対ずつ順番に、周期的に形成されるために、胚の正中線の両側には均等な大きさの体節が一行に並び、等間隔パターンを形成する。それがせきつい動物の繰り返し構造のもとになっている。本研究で扱うマウス胚では体節は 2 時間周期で形成され、それは分節時計と呼ばれる遺伝子発現の 2 時間周期の振動に制御されていることが知られている。振動は転写因子 *Hes7* の自己ネガティブフィードバック制御によって作られていることは既に明らかになっているが、その周期制御機構については不明な点は多く残っている。申請者は *Hes7* に大きな挿入配列を導入し、*Hes7* の転写時間を大きく延長させることを試みた。数理モデルの予測では転写時間の延長は、安定した振動と周期の延長を導くと予測された。申請者は *Hes7* 3'UTR に大きな挿入配列を導入したノックインマウスの作製を試み、3 種類の配列 (5kb, 10kb, 20kb) をもつノックインマウスの作製に成功した。しかしそれらの表現型は予想とは異なり、遺伝子発現の振動が失われ、発現が収束していることが明らかになった。申請者はその原因を探索し、挿入した外来性のイントロンがスプライシングを受けておらず、さらにイントロン配列の途中で終結して polyA 配列が付加されることを明らかにした。つまり、ノックインアレルの転写産物は正常な *Hes7* 3'UTR を失い、外来性の配列で置き換えられていた。その結果 *Hes7* タンパク質が劇的に減少して、ノックインマウスの表現型が *Hes7* 遺伝子の null 変異体と似た表現型になることを明らかにした。これらから申請者は *Hes7* 3'UTR が *Hes7* タンパク質の十分な蓄積に寄与することによって、体節形成を制御する遺伝子発現の振動に必須であることを明らかにした。

以上のように、本論文は体節形成を制御する分節時計の機構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。