

## 論文内容の要旨

申請者氏名      Dini Wahyu Kartika Sari

体節は、発生過程に一過的に形成される中胚葉性の器官であり、未分節中胚葉 (PSM) の周期的な分節化によって形成される。ゼブラフィッシュの場合、分節化の周期性は一定で約 30 分周期で起こる。数理解析および動物実験によって、この周期的な体節の分節化は、clock と wavefront によって規定されることが報告されている。clock は分節化のタイミングを制御し、wavefront は体節境界が形成される場所を決定する。Notch 関連遺伝子 (マウスでは *Hes7* および *Lunng fringe*、ゼブラフィッシュでは *her1/her7* および *deltaC*) が clock 遺伝子として機能している。また、線維芽細胞増殖因子 Fgf (マウスの Fgf8、ゼブラフィッシュの fgf8a) は、PSM の後端部に高発現し前部に向かって徐々に減少する濃度勾配を形成しており、その活性を一過的に阻害すると、体節の大きさが変化することから、wavefront は、軸の伸長中に退行する Fgf 濃度勾配だと考えられている。しかし、Fgf 濃度勾配は胚の伸長に伴い、後方へ連続的に後退していく一方で、体節境界はステップワイズに形成されるので、どのように連続的パターンから離散的なパターンが形成されるのかについては理解されていなかった。申請者の所属する研究室では、Fgf シグナルの下流の Erk の活性化を免疫染色法で解析し、fgf8a の濃度勾配が、Erk の急な境界へ変換され、その境界が離散的なパターンを示す予定分節境界として機能することを提唱した。しかし、この解析は、胚を固定した静的なものであるため時間分解能が低く、時間分解能の高い解析でこのモデルを検証する必要があった。

申請者は、Förster 共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した Erk バイオセンサーを用いて、ゼブラフィッシュ胚における Erk 活性を生体で検出し、ライブイメージングを行った。PSM の後ろ側で Erk 活性が検出され、その領域の前端は急な境界を形成していた。また、その境界は分節化周期に同調して (約 30 分) ステップワイズに 1 体節相当分後方に移動することを観察し、過去の静的な解析の正しさを証明した。さらに、clock 機能を欠損させた胚 (clock 欠損胚) を作成し、Erk の活性境界は clock 欠損胚でも正常に形成されていたが、ステップワイズな移動のタイミングと移動する距離が不規則になった。細胞追跡と長さ測定の解析により、PSM 内の将来の体節境界付近で細胞の配置が変化せず、体節境界の移動距離が対応する体節のサイズと高い相関を有することが明らかになった。過去の研究では、clock 欠損胚において、体節の大きさが不規則になる理由は解明されていなかった。したがって申請者は本研究で、clock が機能しない胚でも、Erk の活性境界が不規則なタイミングと大きさで後退し、結果として不規則な大きさを持つ体節が形成されることを明らかにした。このことは、Erk の活性境界が体節境界の位置を決定することに重要な役割を担っていることを示唆している。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Dini Wahyu Kartika Sari

脊椎動物の体には、脊椎骨に代表される体の前後軸に沿った等間隔パターンが存在する。この脊椎骨の等間隔パターンは、発生過程に一過的に形成される体節と呼ばれる器官に由来している。体節は、体の尾部に存在する未分節中胚葉が一定の時間ごとにくびれ切れることによって形成される。体節形成において、時計遺伝子（ゼブラフィッシュでは、*her1/her7*、マウスでは *Hes7*）が未分節中胚葉で発現振動し、その時間情報が位置情報を規定する因子（線維芽細胞増殖因子 Fgf の濃度勾配）と出会うことで、未分節中胚葉の中に、予定分節境界が規定される。これまでに、申請者が所属する研究室では、多数のゼブラフィッシュ胚を Fgf のシグナルの下流因子 Erk の活性化を抗 pErk（リン酸化 Erk; 活性化フォーム）抗体を用いて免疫染色し、体節の数と未分節中胚葉の長さによって推定される時間順に並べることで、Erk の活性化は未分節中胚葉の後部で起こり、その活性部位の先端がステップワイズに後方へ移動することを報告した。しかし、これらの解釈は静的解析の結果に由来しているため、より高い時空間分解能を有する異なる解析を適用することによって、この解釈が正しいかどうかを検証する必要があった。

申請者は、Förster 共鳴エネルギー移動 (FRET) をベースにした Erk バイオセンサーを用いて、ゼブラフィッシュ胚における Erk 活性のライブイメージングシステムを開発した。このシステムを活用したことで、未分節中胚葉の後端で、Erk は強く活性化しており、その Erk 活性境界が、ステップワイズに後方に移動していることをタイムラプス観察することに成功した。さらに、そのステップワイズな移動の時間的な周期性が体節形成周期と一致し、Erk 活性境界細胞の挙動を合わせて追跡したことで、Erk 活性境界が予定分節境界であることを明確に示した。しかも、過去の静的解析では、clock 機能を欠失した胚の Erk 活性のステップワイズな移動は検出できていなかったが、この系では Erk 活性のステップワイズな移動が不規則なタイミングで起こり、結果、不規則な大きさの体節が形成されていることが明らかにすることができた。したがって、申請者らの解析システムは、静的解析の限界を克服し、ゼブラフィッシュにおける適切な体節形成に Erk 活性の時間的制御に依存した空間パターンニングが必要であることを明らかにした。

以上のように、本論文は、生体内で起こる動的で複雑なシグナルダイナミクスが形態形成を制御することを明確に示したもので、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。