

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	高山 和也
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 ①・② 項該当		
論文題目			
Mechanistic analysis of position-dependent fin regeneration in zebrafish (ゼブラフィッシュにおける位置特異的ヒレ再生機構の解析)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	菊池 裕	
審査委員	教 授	小原 政信 (附属理学融合教育研究センター)	
審査委員	教 授	千原 崇裕	
審査委員	教 授	矢尾板 芳郎 (両生類研究センター)	
審査委員	教 授	荻野 肇 (両生類研究センター)	
〔論文審査の要旨〕			
<p>脊椎動物において、私達哺乳類の再生能力は非常に限定的であるが、真骨魚類や有尾両生類は、非常に高い再生能を有している。例えば、マウスの四肢は切断されると再生できないが、ゼブラフィッシュの尾ビレやイモリの四肢では、失われた部分が完全に元の状態に回復する事が知られている。この様な高い再生能による完全な再生には、切断位置に依存した精密な細胞増殖制御機構が重要である。すなわち、深く傷つけられた場合には、細胞増殖を増大させることで早く再生させ、浅く傷つけられた場合には、細胞増殖を抑制する事で遅く再生させるメカニズムが働いていると考えられている。この様な位置特異的細胞増殖制御には、現在までに Fibroblast growth factor (Fgf), レチノイン酸, Prod1 等の因子の関与が示唆されているが、位置特異的再生制御メカニズムの詳細に関しては、ほとんど明らかにされていないのが現状である。</p> <p>Mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) は、様々な外部からのシグナル伝達を統合し、細胞増殖・細胞成長・代謝の制御等を通じて、多彩な生命現象に関与するタンパク質複合体として知られている。論文著者が所属する研究室においては、ゼブラフィッシュの尾ビレ再生において、mTORC1 が細胞増殖制御を介して再生をコントロールしている事を報告していた。そこで本論文の著者は、ゼブラフィッシュ尾ビレ再生を実験系として、mTORC1 の位置特異的細胞増殖制御への関与に関して解析をスタートさせた。その結果、尾ビレ切断後 3 時間という非常に早い時間から、切断位置依存的に mTORC1 が活性化される事を見出した。切断後 3 時間は、尾ビレ再生を制御する増殖因子 [canonical Wnt, Fgf, Insulin-like growth factor (Igf)] の発現よりも早い時間である事から、現在までに明らかにされている細胞増殖制御因子の中で、最も早く機能している事が明らかになった。</p> <p>培養細胞を用いた解析により、mTORC1 は主にアミノ酸/リソソーム膜上に形成されるタンパク質複合体 (v-ATPase, Regulator, Slc38a9 等) を介して活性化されることが報告されている。しかしながら、生体内における mTORC1 の活性化機構に関しては、未だ不明な</p>			

点が多く残されていた。本論文の著者は、尾ビレ再生過程における位置特異的 mTORC1 活性化機構を明らかにするため、LysoTracker 色素によるリソソームの染色及び薬剤処理によるプロトンポンプ v-ATPase 阻害実験を行った。その結果、切断後 3 時間目において v-ATPase の活性化を介した切断位置依存的なリソソームの酸性化が起こる事、v-ATPase によるリソソームの酸性化は、mTORC1 活性化・増殖関連因子 [*wnt10a*, *igf2b*, *aldehyde dehydrogenase 1a2 (aldh12)*, *fgf20a*] の発現に必要である事を明らかにした。また、切断位置依存的な発現を示すアミノ酸トランスポーター Solute Carrier 7a5 (Slc7a5) が、v-ATPase の活性化・リソソームの酸性化を介して、mTORC1 活性化に必要である事を見出した。更に、切断尾ビレにアミノ酸（ロイシン、グルタミン）を添加する事により、切断位置に依存することなく mTORC1 の活性化が観察されたが、細胞死の増加により元の大きさを越える尾ビレ伸長を誘導する事は出来なかった。以上の結果より、本論文の著者は、位置特異的に発現するアミノ酸トランスポーター（Slc7a5）により輸送されたアミノ酸（ロイシン、グルタミン）が、v-ATPase の活性化・リソソームの酸性化を介して、位置特異的な mTORC1 の活性化・増殖因子の発現を誘導し、切断位置特異的な細胞増殖をコントロールしていることを証明した。

以上、本論文で明らかにされた位置特異的細胞増殖制御経路（アミノ酸トランスポーター→v-ATPase の活性化→リソソームの酸性化→mTORC1 の活性化→増殖因子の発現制御）は全く新規な報告であり、完全な再生のメカニズム解明に関して新たな知見を与えるものであることから高く評価できる。審査の結果、本論文の著者は博士（理学）の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

- (1) Takayama, K., Muto, A., and Kikuchi, Y. (2018).

Leucine/glutamine and v-ATPase/lysosomal acidification via mTORC1 activation are required for position-dependent regeneration.

***Scientific Reports* 8: 8278.**

参考論文

- (1) Takayama, K., Shimoda, N., Takanaga, S., Hozumi, S. and Kikuchi, Y. (2014).

Expression patterns of *dnmt3aa*, *dnmt3ab*, and *dnmt4* during development and fin regeneration in zebrafish.

***Gene Expression Patterns* 14: 105-110.**