

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	廣瀬健太郎
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 ①・② 項該当		
論文題目			
Studies on novel molecular mechanisms in zebrafish fin regeneration (ゼブラフィッシュ尾びれ再生における新規分子メカニズムの研究)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	菊池 裕	
審査委員	教 授	小原 政信	
審査委員	教 授	矢尾板 芳郎	
審査委員	教 授	安井 金也	
〔論文審査の要旨〕			
<p>脊椎動物の中でも、私達哺乳類の再生能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びれやイモリの四肢は再生させることが可能である。このような高い再生能の制御機構を哺乳類へ応用することにより、新たな再生医療が可能になると考えられている。現在までの研究により、再生を制御する様々な分子メカニズムが示されてきたが、未だに不明な点が多く残されており、再生がどのようなメカニズムにより制御されているのかは十分に明らかにされていない。</p> <p>本論文の著者は、再生に関与する新規分子メカニズムを探索するために、ゼブラフィッシュの尾びれ再生を実験系として解析を行った。その結果、これまでに脊椎動物の再生で報告されていない2つの新規な分子メカニズムを明らかにした。</p> <p>1つ目は、DNA のメチル化・ヒドロキシメチル化修飾である 5-methylcytosine (5mC) と 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) の量が尾びれ再生過程で変化することを明らかにした。5mC と 5hmC は、DNA を構成する塩基 (シトシン) の修飾産物であり、5mC・5hmC の量により遺伝子発現がコントロールされ、様々な生命現象が変化する事が知られているが、現在まで再生過程における 5mC・5hmC の解析は行われていなかった。そこで本論文の著者は、尾びれ再生過程における時空間的 5mC・5hmC 量の変化を明らかにするため、ドットプロット法と蛍光免疫染色法によって解析を行った。その結果、再生の初期である切断後 30 時間では再生芽で特異的に 5mC と 5hmC 量の減少が生じており、再生の中期である切断後 72 時間においては 5mC 量は回復していたが 5hmC 量は減少したままである事が明らかになった。また、この 5mC と 5hmC の減少は、細胞増殖を介することなく DNA 複製非依存的に生じていたこと、能動的 DNA 脱メチル化に関与する遺伝子発現が再生過程で検出されたことから、能動的 DNA 脱メチル化に関与していることが示唆された。以上の結果より、本論文の著者は、ゼブラフィッシュ尾びれ再生過程においては、再生芽特異的な能動的 DNA 脱メチル化によって、5mC と 5hmC 量の減少が生じていることを示した。</p>			

2つ目は、尾びれ再生における Mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) の機能を明らかにした。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・代謝の制御を通して、多彩な生命現象に関与する事が報告されていたが、脊椎動物の器官再生における役割は未だ不明であった。そこで本論文の著者は、最初に mTORC1 活性化の指標であるリン酸化 S6 キナーゼ (Phosphorylated S6 kinase: p-S6K) 抗体を用いた蛍光免疫染色法によって、尾びれ再生過程における mTORC1 活性化の時空間的解析を行った。その結果、p-S6K シグナルは再生過程の尾びれにおいて、切断後 6 時間目という非常に早い時期から活性化が起こり、細胞増殖期に移行した繊維芽様細胞・骨芽細胞・表皮細胞において活性化されていることを見出した。また、特異的阻害剤であるラパマイシンを用いて mTORC1 の阻害実験を行った結果、劇的に尾びれ再生が抑制された。ラパマイシンの処理により、再生芽形成過程において細胞増殖の抑制が生じること、再生芽伸長過程においては細胞増殖の抑制・細胞死の誘発・骨芽細胞の分化抑制が起きていることが観察された。mTORC1 の阻害実験では、ラパマイシン以外の 2 種類の異なる阻害剤を用いた処理や、mTORC1 の構成因子の一つである Raptor のノックダウン実験も行い、ラパマイシンと同様の再生阻害が起こる事を確認した。また、様々なシグナル伝達経路阻害剤を用いることにより、mTORC1 を活性化する上流の因子の探索を行った結果、インシュリン様成長因子 1 受容体 (Insulin-like growth factor-1 receptor: IGFR) 及びホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (Phosphatidylinositol-3 kinase: PI3K) , canonical Wnt の各伝達経路阻害によって mTORC1 の活性化が抑制されることが明らかとなった。従って、本論文の著者は、IGFR-PI3K 経路及び canonical Wnt 経路によって活性化された mTORC1 が、細胞増殖・骨芽細胞分化の促進及び細胞死の抑制により尾びれ再生を制御していることを証明した。

以上本論文で発見された 2 つの新規分子メカニズム (能動的 DNA 脱メチル化による 5mC・5hmC 量の減少, IGFR-PI3K 経路及び canonical Wnt 経路による mTORC1 の活性化) は、脊椎動物の再生研究における最初の報告であり、再生制御機構の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) Hirose, K., Shimoda, N., and Kikuchi, Y. (2013).

Transient reduction of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine is associated with active DNA demethylation during regeneration of zebrafish fin.

Epigenetics 9: 899-906.

- (2) Hirose, K., Shiomi, T., Hozumi, S., and Kikuchi, Y. (2014).

Mechanistic target of rapamycin complex 1 signaling regulates cell proliferation, cell survival, and differentiation in regenerating zebrafish fins.

BMC Developmental Biology, 14(1): 42

参考論文

- (1) Hirose, K., Shimoda, N., and Kikuchi, Y. (2011).

Expression patterns of *Igr4* and *Igr6* during zebrafish development.

Gene Expression Patterns 11: 378-383.

- (2) Shimoda, N., Hirose, K., Kaneto, R., Izawa, T., Yokoi, H., Hashimoto, N., and Kikuchi, Y. (2014).

No evidence for AID/MBD4-coupled DNA demethylation in zebrafish embryos.

PLOS ONE 9(12): e114816.