

論文 / 著書情報
Article / Book Information

| | |
|-------------------|--|
| 題目(和文) | 形態形成過程の四肢においてAP-1 転写因子のコンビネーションがプログラム細胞死を制御する新規メカニズムの解明 |
| Title(English) | |
| 著者(和文) | 須田夏野 |
| Author(English) | Natsuno Suda |
| 出典(和文) | 学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9675号, 授与年月日:2014年11月30日, 学位の種類:課程博士, 審査員:田中 幹子,駒田 雅之,梶川 正樹,鈴木 崇之,増田 真二 |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9675号, Conferred date:2014/11/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,, |
| 学位種別(和文) | 博士論文 |
| Category(English) | Doctoral Thesis |
| 種別(和文) | 論文要旨 |
| Type(English) | Summary |

(論文博士)

論 文 要 旨 (和文2000字程度)

(Summary)

| | | | | |
|------|-----|---|-----|-------|
| 報告番号 | 乙 第 | 号 | 氏 名 | 須田 夏野 |
|------|-----|---|-----|-------|

(要 旨)

四肢の原基である肢芽では、細胞が特定のタイミング・場所において自主的に死ぬプログラム細胞死が起き、不要な細胞を除去することで正常な形態形成がおこなわれる。肢芽のプログラム細胞死は BMP によって制御されることがすでに知られているが、BMP からプログラム細胞死へと至るシグナル経路についてはほとんど明らかになっていなかった。そこで本研究では、肢芽の形態形成過程において、プログラム細胞死を調節する機構を明らかにすることを目的として研究を行った。この目的で、私は AP-1 転写因子に着目した。AP-1 転写因子は、細胞死や細胞生存に関連した遺伝子の転写調節をおこなうだけでなく、いくつかの AP-1 転写因子については、BMP シグナルにより制御されることや、肢芽以外の多様な器官の形態形成にも関わることが知られていた。そこで私は、AP-1 転写因子が BMP シグナル経路とプログラム細胞死のシグナル経路をつなぎ、細胞死を起こす細胞数の調節をおこなう可能性を検証することとした。

まず、プログラム細胞死に関わる AP-1 転写因子の候補を選定するため、ニワトリ胚肢芽において AP-1 転写因子群の網羅的発現解析をおこなった。その結果、肢芽の細胞死領域特異的に発現する *MafB* 遺伝子が候補として挙げられた。そこで、ニワトリ胚肢芽における *MafB* の機能を調べるため、機能抑制実験と強制発現実験をおこなったところ、肢芽内において *MafB* はヘテロ二量体で機能し、二量体の組み合わせによって細胞死を正と負のどちらにも制御している可能性が示唆された。さらに、*MafB* と二量体を形成できる AP-1 転写因子の中から、肢芽の細胞死領域に分布しているものを探索したところ、*cFos* と *cJun* が二量体パートナーの候補と考えられた。次に *MafB* と *cFos*、および *MafB* と *cJun* ヘテロ二量体がそれぞれプログラム細胞死を制御する可能性を検証するため、*MafB* と *cFos*、もしくは *MafB* と *cJun* を同時にニワトリ胚肢芽で強制発現させた。その結果、*MafB/cFos* ヘテロ二量体は細胞死を負に、*MafB/cJun* ヘテロ二量体は細胞死を正にそれぞれ制御している可能性が示された。また、*MafB* や *cFos*、*cJun* の発現が BMP シグナルにより制御される可能性を検証するために、BMP2 を染み込ませたビーズを肢芽に移植して、これらの AP-1 遺伝子の発現を解析した。その結果、*MafB* のみが肢芽で BMP シグナルによって発現が調節されていることが明らかになった。さらに私は、*MafB/cFos* および *MafB/cJun* ヘテロ二量体の標的遺伝子を明らかにするために、ニワトリ胚肢芽の抽出液に対して *MafB*、*Fos*、*Jun*、あるいは *p300* の抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を行った。標的遺伝子の探索については、まず ChIP-seq の解析から、*Maf*、*Fos*、*p300* あるいは *Maf*、*Jun*、*p300* が重なって有意に結合しているサイト (fold enrichment>2.5 かつ peak 幅>400 bp) を明らかにし、それらの結合サイトから ± 50 kbp 以内に転写開始点を持つ遺伝子を探し出した。さらに、標的遺伝子候補を絞り込むために、先行研究のトランスクリプトーム解析で肢芽での発現が確認されている遺伝子を探索した。これらの標的遺伝子候補のうち、細胞死や細胞生存の制御に関わり、且つ肢芽で発現することを確認できた遺伝子について最終的な標的遺伝子候補とした。また、ChIP-seq 解析より絞り込まれた標的遺伝子候補には含まれなかったものの、他の系で AP-1 転写因子の標的として知られていたり、細胞死や細胞生存のプロセスにおいて鍵となる機能を持つことが知られる遺伝子についても併せて標的遺伝子候補とした。そこで、これらの標的遺伝子候補が肢芽内で *MafB/cFos* または *MafB/cJun* ヘテロ二量体によって発現を制御されるかを調べたところ、*MafB/cFos* ヘテロ二量体の標的候補遺伝子として *cyclin D1*、*MafB/cJun* ヘテロ二量体の標的候補遺伝子として *p63* および *p73* が挙げられた。さらに、*MafB/cFos* もしくは *MafB/cJun* の結合サイトを含む配列がエンハンサー活性を持つかをルシフェラーゼアッセイにより確認したところ、*p63* と *p73* については *MafB/cJun* ヘテロ二量体の直接の標的遺伝子である可能性が示された。

以上の結果から、ニワトリ胚の肢芽形成過程では *MafB/cFos* ヘテロ二量体が直接的ではないものの *cyclin D1* など細胞生存に関わる遺伝子の発現を制御することでプログラム細胞死を負に調節する一方、*MafB/cJun* ヘテロ二量体が直接 *p63* や *p73* など細胞死に関わる遺伝子の発現を制御することでプログラム細胞死を正に調節していることが考えられた。したがって、ニワトリ胚の肢芽でプログラム細胞死を起こす細胞数は、*MafB/cFos* と *MafB/cJun* ヘテロ二量体の存在量のバランスによって制御されていることが示唆された。

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(論文博士)

論 文 要 旨 (英 文)

(300語程度)

| | | | | |
|--|-----|---|-----|-------|
| 報告番号 | 乙 第 | 号 | 氏 名 | 須田 夏野 |
| (要 旨) | | | | |
| <p>Programmed cell death is an important mechanism for sculpting the developing avian limbs. Although numerous studies show that BMP signalling regulate programmed cell death in limbs, the molecular cascades from the BMP signals to the genes controlling programmed cell death have remained largely unclear. Members of the AP-1 transcription factor family are known to control genes involved in cellular proliferation and death during various organs development. Here we show that the AP-1 family members MafB, cJun and cFos regulate cell death and survival in apoptotic regions during limb morphogenesis. Gene expression profiles of all 41 AP-1 transcription factors during development of the chick limb bud led us to examine the function of <i>MafB</i>, which is expressed specifically in limb apoptotic regions, as well as its putative heterodimer partners, <i>cFos</i> and <i>cJun</i>. Functional analysis of MafB, cJun and cFos in limb buds suggested that they are involved in regulating the number of apoptotic cells by forming heterodimers. We also show the expression of <i>MafB</i>, but not <i>cFos</i> or <i>cJun</i>, was regulated by BMP in apoptotic regions of limb buds. We performed chromatin immunoprecipitation (ChIP), followed by deep sequencing (ChIP-seq) in chick limb buds, and identified potential target genes and regulatory elements controlled by Maf, Jun and Fos. In vitro and in vivo transient reporter assays showed that the expression of <i>cyclin D1</i> a key regulator of cell survival, is dependent on MafB and cFos, whereas the expressions of <i>p63</i> and <i>p73</i> key components of DNA damage signalling, are directly activated by MafB and cJun. Our data suggest that dimeric combinations of MafB, cFos and cJun, regulated by BMP signal, control the number of apoptotic cells by triggering pathways of cell death or survival during limb morphogenesis.</p> | | | | |

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).