

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ゼブラフィッシュの再生応答エンハンサーの同定と制御メカニズムの解析
Title(English)	
著者(和文)	田牧輝久
Author(English)	Teruhisa Tamaki
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12332号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:川上 厚志,山口 雄輝,立花 和則,田中 幹子,白木 伸明
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12332号, Conferred date:2023/3/26, 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

(博士課程)

Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	田牧 輝久		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	川上 厚志	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

【はじめに】

ゼブラフィッシュは哺乳類とは異なりヒレ、心臓、神経などの様々な組織において高い組織再生能力をもっており、再生の過程では非損傷時とは異なるパターンで遺伝子が発現することが知られている。これまで再生にตอบสนองして発現が上昇する複数の再生応答遺伝子の周囲において、数 100 塩基の長さの再生過程での発現誘導に関わるエンハンサー (再生エンハンサー) の存在や、その機能に特定の転写因子が必要となることが報告されている。しかし、再生初期の遺伝子発現の誘導メカニズムには不明な部分が多く、さらなる解析が必要である。再生応答遺伝子の周辺から再生エンハンサーを新たに同定し、その制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

再生応答遺伝子の周辺からエンハンサーの候補となる配列を探すために、*fn1b* と複数の再生応答遺伝子の周辺配列の比較をした。その結果、300~400 塩基の配列が高度に複数保存されていることが明らかとなった。これらの配列を E1-E6 とそれぞれ命名し、再生応答エンハンサーの候補配列と仮定した。E1-E6 を報告されている配列と比較したところ、トランスポゾン配列の一部と一致しており、ゲノム中に多数存在していることが示唆された。

保存配列の再生過程における遺伝子発現誘導の対する機能を可視化するために、プラスミド上の EGFP 遺伝子の 5' 上流に目的の配列を挿入したコンストラクトを作製し、ゼブラフィッシュ胚に導入した。これによりエンハンサーの発現誘導にตอบสนองして EGFP を発現するトランスジェニック (Tg) を作製した。この Tg をそれぞれ幼生と成体のステージにおいて尾ひれを切断し、その後の再生過程における EGFP の発現の変化を観察した。

この実験系を用いて *fn1b* の転写開始点の上流における再生応答を調べた。すると、転写開始点から 3.2kb の範囲で再生過程における *fn1b* の発現を再現でき、1.8kb の範囲では *fn1b* とは異なる組織での発現誘導が観察された。このことから、再生応答に必要な十分な配列と *fn1b* と類似した上皮での発現を誘導する配列が別に存在していることが示唆された。また、E2,E4,E5,E6 について同様に再生に対する応答を観察した。すると E4,E5 は単独では機能せず、E6 と協働することによりエンハンサーとして機能することが明らかとなった。また、E2 に隣接する 100 塩基の部分が再生エンハンサーとして機能しており、この領域を E2S と命名した。E2S, E4, E5, E6 やこれまで報告されている再生エンハンサーの共通のメカニズムについて調べるために、これらの配列に対して転写因子の結合配列のデータベースを用いて検索を行なった。すると再生エンハンサーの内部に共通して E-box と AP-1 の転写因子結合モチーフが含まれていた。以上より E-box/AP-1 の組み合わせが再生応答に必要であることが推測できる。

E-box/AP-1 が再生応答に必要であることの検証のために、E2S から E-box と AP-1 をそれぞれ除いた配列と、E-box と AP-1 の組み合わせた配列を用いて実験した。すると E-box, AP-1 の両方を含む配列のみ再生エンハンサーとして機能し、再生にตอบสนองした発現は E-box と AP-1 の両方のモチーフを含む必要があることが示された。さらに、尾ひれ以外の組織においても E-box/AP-1 による再生応答の保存を検証するために、幼生の脊索、成体の胸鰭、鱗の再生過程を観察した。結果、いずれの組織でも再生エンハンサーとして機能した。また、山形大学の越智先生との共同研究により、アフリカツメガエルの幼生の後脚でも再生エンハンサーとして機能することが明らかとなった。このことから生物種や組織を超えて E-box/AP-1 による再生応答が機能することが示された。

【考察】

Tg を用いたアッセイにより、再生エンハンサーは E-box と AP-1 モチーフが協働することにより活性化することが明らかとなった。近年報告されている再生エンハンサーにおいても E-box/AP-1 モチーフが保存されていることや、様々な組織や別の脊椎動物においても機能したことから、この再生応答メカニズムが組織、種を超えて広く保存されているものであると推測できる。ただし、E-box/AP-1 以外の転写因子による再生応答の存在は否定できないので更なるエンハンサーの同定や解析が必要となる。また、今回用いた Tg による EGFP の発現に組織の違いが見られたことから、発現組織を制御するメカニズムが別に存在することが予想される。また、ここで見られた再生エンハンサーがトランスポゾンに由来するものであったことから、ゲノム中に多数存在するトランスポゾンが進化の過程で再生の能力の獲得に関与することも推測できる。

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).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	田牧 輝久		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	川上 厚志	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Tissue regeneration is one of challenging mysteries of life science. Injury triggers a genetic program and induces gene expression for regeneration. Recently, identification of the regeneration-response enhancers (RRE) has been reported in zebrafish and other species. Analyses of the zebrafish *leptin b* (*lep**b***) and *inhibin beta a* (*inh**ba***) enhancers have suggested that activator protein 1 (AP-1)-binding motif is crucial for the enhancer activity. However, as AP-1 signal is involved in a variety of biological processes, it remains elusive whether only the AP-1 signal is sufficient for regenerative response. Here, we show that E-box motifs cooperates with AP-1 for functioning as a complete RRE. From comparison of genomic sequences around the regeneration-response genes in zebrafish, we realized there are several highly conserved sequences of 300-500 bp. These sequences were found to be derived from transposable elements (TEs) splashed in zebrafish genome. By transgenic (Tg) assay, two of them displayed the RRE activity only if they combined with -0.7kb *fn1b* promoter. In addition, a short non-TE genomic region was also found to function as a standalone enhancer with a minimum promoter. Searching for transcription factor-binding motifs suggested that E-box and AP-1 motifs are commonly contained in these regions. Indeed, we showed that the E-box repeat sequence displays the regeneration response with -0.7kb *fn1b* promoter or AP-1 repeat, proving that the E-box and AP-1 combination is the entity of the RRE. Further analyses showed that the E-box/AP-1 RRE is activated by injuries in a variety of tissues, and that it also functions beyond species in the *Xenopus* limb bud regeneration. Our findings revealed that the regeneration program is faithfully regulated by two activating signals to ensure its proper control. Regeneration capacities may be shaped and maintained during evolution by a huge pool of potential enhancer motifs splashed by transposons in the genome.

Conference presentations

Tamaki, T.*, Shibata, E., Kawakami, A. Enhancer elements for tissue regeneration in zebrafish. 52th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologist, 14th March, 2019, Osaka, Japan.

Tamaki, T.*, Kawakami, A. Mechanism of gene induction in response to regeneration in zebrafish fin. 53th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 21th March, 2020, Kumamoto, Japan.

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).