



Title	Analyses of Ectodermal Transcription Factors and Identification of Cis-regulatory Elements for the Left-Sided Nodal Gene Expression during Embryogenesis of the Ascidian, <i>Halocynthia roretzi</i>
Author(s)	施, 禹
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82030
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 (施 禹)	
論文題名	Analyses of Ectodermal Transcription Factors and Identification of <i>Cis</i> -regulatory Elements for the Left-Sided <i>Nodal</i> Gene Expression during Embryogenesis of the Ascidian, <i>Halocynthia roretzi</i> (マボヤの胚発生における外胚葉転写因子および左側特異的 <i>Nodal</i> 遺伝子の発現制御領域の解析)
論文内容の要旨	
<p>In developing embryos, appropriate gene expression mediates cell fate decision, differentiation, and morphogenesis. The spatiotemporal expression of zygotic genes is regulated by transcription factors. Investigation of the expression patterns and the transcriptional regulatory relationships is thus essential to understand embryonic development. The ascidian, <i>Halocynthia roretzi</i>, is a tunicate characterized by fast and invariant embryogenesis. Taking advantages of ascidian embryogenesis, gene regulatory networks for ectodermal development and left-right determination were analyzed.</p> <p>First, spatiotemporal expression patterns and developmental roles of three transcription factors that are expressed in ectodermal cells of the early embryos were studied. Staged RNA-seq of the ascidian <i>H. roretzi</i> has previously suggested that these genes encoding transcription factors are transiently expressed at the blastula stage, which is the stage at which cell fates are specified and differentiation starts. In the present study, the expression patterns and functions of the transcription factors, FoxJ-r, SoxF, and SP8/9 were studied. The results showed that all three genes were expressed in the animal hemisphere as early as the 16-cell stage. Functional analyses using FoxJ-r morphants showed that they resulted in the disruption of laterality and the absence of epidermal mono-cilia, suggesting its functions in cilia formation and, consequently, in the generation of left-right asymmetry. SoxF knockdown resulted in incomplete epiboly by the ectoderm during gastrulation, while SP8/9 knockdown showed no phenotype until the tailbud stage in the present study, although it was expressed during blastula stages. These results indicate that transcription factor genes expressed at the cleavage stages play roles in diverse functions, and their roles are not limited to cell fate specification.</p> <p>Second, the <i>cis</i>-regulatory elements of <i>nodal</i> gene were analyzed. The <i>nodal</i> signaling pathway plays an important role in establishment of the left-right axis during embryogenesis in many animals. Previous studies have shown that the left-sided expression of <i>nodal</i> gene in <i>H. roretzi</i> is triggered by the contact of left epidermis with and sensing vitelline membrane proteins. However, due to aggregation of the vitelline membrane proteins, it was difficult to identify the responsible proteins by biochemical methods. Here, using comparative genomics approach and reporter gene assay, I tried to identify the <i>cis</i>-regulatory elements of <i>nodal</i> gene. Phylogenetic footprinting analyses between two ascidian species suggested the putative regulatory regions locate both in the upstream region and the first intron. The reporter gene</p>	

assay showed that -249 to -156 upstream region and the first intron both play crucial role for the left-sided *nodal* expression. In silico analysis provided a list of candidate receptor proteins that could be activated by the vitelline membrane signal for specification of the left-right asymmetry via the *nodal* expression.

The above results provide fundamental information for further studies on transcriptional regulatory relationships during embryogenesis, and shed a light on our understanding of embryonic development.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (施 禹)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 西田 宏記
	副 査	教授 松野 健治
	副 査	准教授 今井(佐藤) 薫

論文審査の結果の要旨

動物の胚発生過程では、遺伝子の発現/転写制御が重要な役割を担っている。それには、遺伝子の発現を引き起こす転写因子とそのターゲット遺伝子の Cis 制御領域が重要な役割を果たす。本博士論文では、マボヤ (*Halocynthia roretzi*) の初期胚発生の転写制御に注目して、以下の(1)、(2)の項目に関する研究が実施された。

(1) 外胚葉転写因子 FoxJ-r、SoxF、SP8/9 の発現・機能解析

所属研究室の先行研究で実施された RNAseq によって同定された転写因子のうち、機能未知であった FoxJ-r、SoxF、SP8/9 遺伝子の発現と機能が解析された。これらは全て、16 細胞期の外胚葉割球で発現が開始することが明らかになった。アンチセンスオリゴを用いた機能解析の結果、FoxJ-r は、繊毛形成と幼生形態の左右非対称性に関与していることが示された。また、SoxF に対するモルフォリノ処理では、原腸陥入の際、外胚葉によるエピボリーが不完全になることが示された。SP8/9 遺伝子は、胚芽期から尾芽期まで発現していたが、モルフォリノ処理による発生異常は検出されなかった。本解析結果から、卵割期に発現する転写因子遺伝子は多様な機能を担っており、その役割は細胞運命の特定に限定されないことが明らかにされた。

(2) *nodal* 遺伝子の左側表皮での発現に必要なシス制御領域の解析

上記の研究において、FoxJ-r 遺伝子が、*nodal* 遺伝子の左側表皮での特異的な発現に必要であることが示された。そこで、*nodal* 遺伝子の左側表皮特異的な発現制御機構が解析された。レポーター遺伝子アッセイの結果、*nodal* 遺伝子の-249~-156 領域と第一イントロンの両方が、その左側表皮での発現に必要であることが示された。これらの結果は、胚発生における左右非対称形態をもたらす転写制御ネットワークの理解を深めるものである。この転写制御ネットワークを上流で制御する細胞シグナルの候補について、既知の大規模データの探索から議論がなされた。

なお、本博士論文の内容の一部は、*Zoological Science* に施を第一著者として印刷中になっている。

上記の研究は、発生学研究において新しい見解をもたらしたのみならず今後の研究の発展に寄与するもので、初期胚の外胚葉で発現を開始する転写因子が、胚細胞の発生運命決定のみならず、様々な発生現象を制御していることを発見した、また幼生形態の左右非対称形成に関して重要な知見を得たことから、新奇性と学術的価値が高いと考えられる。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分に価値のあるものであると認める。