

平成23年6月6日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17017027

研究課題名（和文） 生体における分子振動メカニズム

研究課題名（英文） The mechanism of molecular oscillation in animal development

研究代表者

別所 康全 (BESSHO YASUMASA)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：70261253

研究成果の概要（和文）：本研究は、生体における分子の動的なふるまいの代表例として、脊椎動物の体節形成に伴って観察される遺伝子発現の振動に着目し、そのメカニズムを研究したものである。生化学／分子生物学的な解析からえられたデータをもとに遺伝子発現の振動の分子メカニズムをモデル化し、コンピュータシミュレーションによって解析を行い、パラメータを変化させたと分子のふるまいの変化を実験で検証することによって真のモデルを追求した。

研究成果の概要（英文）：In this project, we clarified mechanism of oscillatory gene expression in somite formation in vertebrate development. According to accumulated data of our molecular biological and biochemical experiments, we established a molecular model for the oscillatory gene expression. We analyzed this model by mathematical simulation in silico, and inspected it by molecular experiments. Our interdisciplinary approach revealed the mechanism of the oscillatory gene expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	24,000,000	0	24,000,000
2006年度	12,400,000	0	12,400,000
2007年度	18,100,000	0	18,100,000
2008年度	12,400,000	0	12,400,000
2009年度	12,400,000	0	12,400,000
総計	79,300,000	0	79,300,000

研究分野：システム生物学、発生生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：振動、波、体節、生物時計、形態形成、シミュレーション、転写因子

1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報の解析から、遺伝子・生体分子の相互作用は複雑なネットワークをつくることが明らかになった。ネットワークは、振動や波などの“分子の動的な振る舞い”を引き起こす可能性があり、それが発生や神経回路網形成などの複雑な生命現象のキーにな

っているという理論的な予測がある。しかし、動的な変化の実験的な観測の難しさや、振動など動的変化の理解には計算機シミュレーションなどを使わざるを得ないことなどから、依然として分子の動的な振る舞いを分子レベルで解明した例はなかった。脊椎動物の未分節中胚葉では、転写因子Hesなどの遺伝

子発現の振動が観察されており、その振動自体が体節の等間隔パターンの形成に必須であることが明らかになっていた。分子振動が形態形成に働くことが証明された初めての例であり、その分子レベルのメカニズムに注目が集まっていたが、上述の理由のためにその全体像は未だ明らかになっていなかった。我々はマウスの培養細胞においても未分節中胚葉でおきているのと全く同じ周期のHesの振動が起きることを発見し、さらにHesのネガティブフィードバックループが、振動メカニズムのコアにあることを明らかにしていた。これらの実験系を用い数理的な解析を組み合わせることにより、生体における分子振動メカニズムの全容とそれを使った形態形成のメカニズムを解明することを計画した。

脊椎動物の体節が周期的に分節化されることによって、等間隔パターンとして形成されることは古くから知られていた。しかし、その周期性がどのようなしくみで決められているかは全く不明であった。しかし、1997年に、Olivier Pourquieらのグループによって、体節原基である未分節中胚葉(presomitic mesoderm, PSM)においていくつかの遺伝子の発現が振動していることが明らかにされ、体節形成を制御する“分子時計”が実在することが分子生物学的に強く示唆された。その後、我々を含むいくつかのグループにより、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュなどのPSMにおいてその発現が振動する遺伝子が複数同定された。我々のグループは転写因子Hes7のネガティブフィードバックループが振動発生の中心的なメカニズムであることを明らかにした。Hes7はNotchシグナルの直接の下流因子であり、Hes7がさまざまな遺伝子の発現を周期的に抑制することによって、遺伝子の発現が同調して振動し、それによってPSMが周期的に分節化されることによって均等な大きさの体節が形成されると考えられている。

一方でPSMの後端から前方に向けてFGFシグナル活性の濃度勾配が形成されており、それを位置情報として利用し、体節の分節化の位置が決定されるということを示唆する報告がなされていた。このことから、Notchシグナル/Hes7が作り出す遺伝子発現の振動が時間情報を担い、FGFシグナル活性の濃度勾配が空間情報を担っており、それらが統合されることで等間隔パターンとしての体節が形成されることが予想されていた。

2. 研究の目的

生物は、発生過程でさまざまな現象が正確

なタイミングでおこる結果、正確にかたちづくられる。しかし発生過程がどのようなメカニズムで時間的制御を受けているかは、ほとんど明らかにされていない。我々は発生過程の時間的制御のしくみを明らかにすることによって、生物の発生機構の解明をめざした。

脊椎動物のからだは、規則正しく分節化された体節に由来する、前後軸に沿った繰り返し構造が基本になっている。胎仔の最尾部に位置する未分化なPSMが一定時間ごとに括れ切れ、その結果一定の大きさの体節が形成される。すなわち体節形成は、発生過程において時間的制御を受ける現象の代表例であり、時間的周期性を利用して形態形成がおこなわれる。本研究は体節形成を時間的制御機構のモデル系とし、この周期性を規定する“生物時計”のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

これまでの研究で、PSMにおける遺伝子発現の振動が生物時計として利用されていることが明らかになっていた。またそのメカニズムは、我々が発見したNotchシグナルのエフェクターである転写因子Hes7のネガティブフィードバックループを中心とするメカニズムによって振動が発生することが明らかになっており、またそれに加えていくつかのフィードバックループが、生物時計の全体的なメカニズムの含まれることが示唆されていた。

さらに、FGFシグナル活性の濃度勾配が位置情報を担っており、それが遺伝子発現の振動の時間情報と統合されることによって、体節の等間隔パターンが作り出されることが示唆されていたが、そのメカニズムは全く不明であった。本研究ではそのメカニズムを明らかにすることを目的の一つとした。

また、遺伝子発現の振動発生のメカニズムの全体像は依然として不明であった。とくに、遺伝子発現の振動は、環境によるかく乱や、内的な遺伝子転写時のノイズなどにロバストである必要があるが、そのメカニズムは全く明らかにされていない。本研究は遺伝子発現振動発生のメカニズムの全体像を明らかにすることをさらなる目的とした。

3. 研究の方法

位置情報を担うと考えられているFGFシグナルの下流因子であり、同時にFGFシグナルの抑制因子、すなわちフィードバックインヒビターとして多くの分子が知られている。それらのうち、発現がHes7に依存して振動する分子を同定し、遺伝子発現の振動の時間

情報をFGFシグナル活性に伝える仲介因子の候補として探索した。

NotchシグナルのフィードバックインヒビターとしてNrarpが知られている。NrarpはNotchシグナルの直接のターゲットであり、Nrarp活性化Notchに直接結合して分解を促進することによって、Notchシグナルを抑制することが知られている。我々はNrarpのネガティブフィードバックループの遺伝子発現振動発生における役割を解析するために、Nrarpノックアウトマウスを作製し、解析をおこなった。

4. 研究成果

我々は多くのFGFシグナル系のフィードバックインヒビターのうち、*Sprouty4*の発現がマウスのPSMにおいて振動していることを発見した。*Sprouty4*の発現の振動はHes7などの他のNotchシグナル系の振動分子の発現と同調して振動していること、同時に体節形成周期と一致して振動していることを見いだした。(図1)

*Sprouty4*のプロモーター活性をHes7が抑制すること、*Sprouty4*の発現振動はHes7ノックアウトマウスやHes7を強制発現させたトランスジェニックマウスで見られなくなることから、*Sprouty4*の発現振動はHes7を中心的なメカニズムとする“生物時計”に依存して振動していることを明らかにした。

また、ゼブラフィッシュのPSMでは

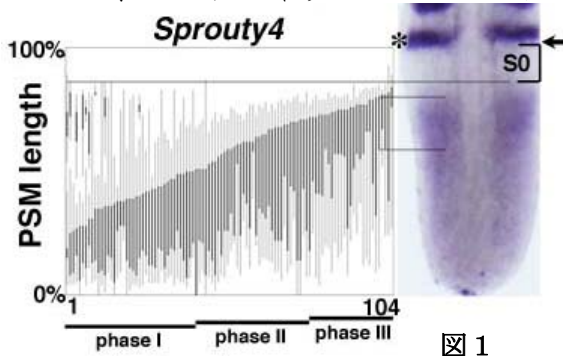


図1

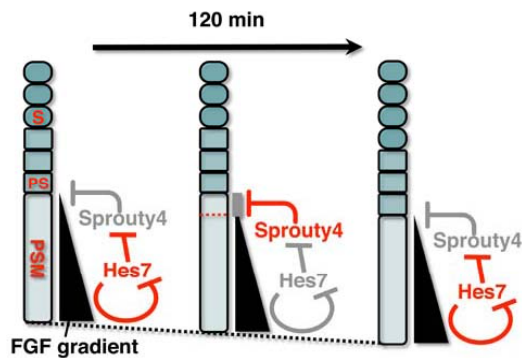


図2

*Sprouty4*の発現振動は見られなかったため、この現象は進化的には保存されておらず、ゼブラフィッシュでは異なるメカニズムが存在することが示唆された。

これらの結果から*Sprouty4*が遺伝子発現の振動の時間情報をFGFシグナル活性に伝える仲介因子の候補となり得ることを明らかにした。図2に想定する作用メカニズムを記す。すなわち、PSM前端ではFGFシグナル活性の限界点が予定分節地点を決めると考えられているが、そこでFGFシグナルを周期的に抑制することによって、FGFシグナル活性の限界点を、時空間的に離散的に変化させると考えられる。それによって体節の等間隔パターンが形成されると考えられた。

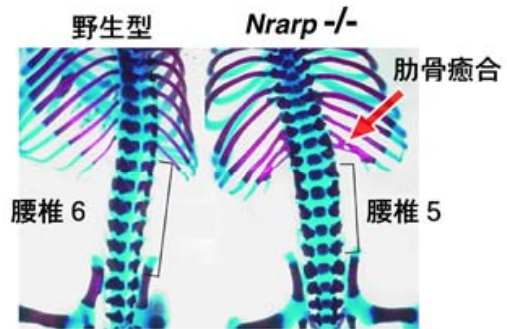


図3

ゼブラフィッシュを用いてFGFシグナル活性が離散的なパターンをとることを、既に発見しているので、現在FGFシグナルカスケードのどのステップで離散的なパターンが作り出されるかを解析することによって、*Sprouty4*の関与を検討している。

我々はNotchシグナルのフィードバックインヒビターであるNrarpの体節形成における役割を解析した。とくにNrarpのフィードバックループの役割を解析した。これまでにNrarpのフィードバックループは体節時計にロバスト性を与える役割があることを、数理解析によって予測している。それを検証するためにNrarpノックアウトマウスを作成した。

我々の構築した数理モデルではNrarpノックアウトマウスのPSMでNotchシグナルは2倍から数倍に増加すること、体節形成周期は野生型に比べて数分長くなる。実験的に、NrarpノックアウトマウスのPSMでNotchシグナルが2倍に増加すること、体節形成周期は野生型に比べて4分長くなることを明らかにし、我々の数理モデルが妥当であることを証明した。図3は、Nrarpノックアウトマウスにおいて体節形成周期が伸びたことによって要椎骨の数が1つ少なくなったことを示している。

胚発生中期に、促奇形性作用のあるハウ酸を妊娠マウスに投与したところ、野生型ではほとんど体節形成の乱れが見られない濃度において、*Nrarp*ノックアウトマウス胚の体節は高度な乱れが観察された。これらの結果を合わせて、*Nrarp*のフィードバックループは体節時計にロバスト性を与える役割があることを数理解析と遺伝学的解析を組み合わせて証明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Matsui T, Thitamadee S, Murata T, Kakinuma H, Nabetani T, Hirabayashi Y, Hirate Y, Okamoto H, Bessho Y, Canopy1, a positive feedback regulator of FGF signaling, controls progenitor cell clustering during Kupffer's vesicle organogenesis Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, in press, 査読有
- ② Hayashi S, Shimoda T, Nakajima M, Tsukada Y, Sakumura Y, Dale JK, Maroto M, Kohno K, Matsui T, Bessho Y, Sprouty4, an FGF inhibitor, displays cyclic gene expression under the control of the notch segmentation clock in the mouse PSM, PLoS ONE, 4, e5603, 2009, 査読有
- ③ Ferjentsik Z, Hayashi S, Dale JK, Bessho Y, Herreman A, De Strooper B, del Monte G, de la Pompa, JL, Maroto M, Notch is a critical component of the mouse somitogenesis oscillator and is essential for the formation of the somites, PLoS Genet., 5, e1000662, 2009, 査読有
- ④ 別所康全, 遺伝子発現の振動が制御する生物の形づくり, システム/制御/情報, 51 巻 493-498, 2007, 査読無
- ⑤ 別所康全, 形づくりを制御する生物時計としての分子振動, 細胞工学, 26 巻 755-758, 2007, 査読無
- ⑥ 別所康全, 体節の分節メカニズム, 蛋白質核酸酵素, 50 巻 650-654, 2005, 査読無
- ⑦ 別所康全, 影山龍一郎, 体節形成を支配する生物時計のメカニズム, 細胞工学, 24 巻 499-503, 2005, 査読無

[学会発表] (計 13 件)

- ① Bessho Y, The mechanism of the biological clock that controls animal development, HUS-UET-NAIST Symposium in Hanoi, 2011 年 3 月 2 日,

Hanoi

- ② 別所康全, 体節分節化のロバスト性を担うフィードバックループ, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 24 日, 神戸
- ③ 別所康全, 体節形成周期の制御機構, 第 114 回日本解剖学会総会, 2009 年 3 月 28 日, 岡山
- ④ Bessho Y, The mechanism of the biological clock that controls animal development, International Joint Symposium Frontier In Biomedical Sciences: From Genes to Applications, 2008 年 11 月 25 日, Yogyakarta
- ⑤ 別所康全, 時間制御を利用した形態形成, 第 113 回日本解剖学会総会, 2008 年 3 月 28 日, 大分
- ⑥ 別所康全, 生物の形づくりを制御する分子振動, 第 2 回SICE生物制御システム調査研究会, 2008 年 1 月 31 日, 京都
- ⑦ Bessho Y, The mechanism of the biological clock that controls animal development, NAIST Global COE International Symposium Developmental Biology, 2008 年 1 月 15 日, Nara
- ⑧ Bessho Y, The mechanism the biological clock that controls animal development, NAIST The 21st century COE Program International Symposium, 2007 年 1 月 16 日, Nara
- ⑨ Shimoda T, Matsui T, Bessho Y, The biological clock generates repetitive patterns in mouse development, 8th KRIBB-KU-NAIST Symposium, 2006 年 11 月 10 日, Seoul
- ⑩ 別所康全, 2 時間を刻む生物時計ー時間制御を利用した形づくりー, 関西眼科先進医療研究会, 2006 年 10 月 18 日, 大阪
- ⑪ 別所康全, 2 時間を刻む生物時計, 第 25 回分子病理学会 2006 年東京シンポジウム, 2006 年 8 月 4 日, 東京
- ⑫ Bessho Y, The segmantation clock generates metamer patterns in mouse development, 7th Northeastern Asia Symposium on Biotechnology, 2005 年 12 月 4 日, Nara
- ⑬ Bessho Y, The segmantation clock generates metamer patterns in mouse development, NAIST-CDB International Symposium Frontiers in Developmental Biology, 2005 年 11 月 7 日, Gyeongju

[図書] (計 1 件)

- ① Maroto M, Iimura T, Dale JK, Bessho Y, bHLH proteins and their role in somitogenesis, Somitogenesis: Advances in experimental medicine and biology, vol.

638 (ed. Maroto, M. and Whittock, N. V.),
124-139, 2008, 査読無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

別所 康全 (BESSHO YASUMASA)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエ
ンス研究科・教授

研究者番号：70261253

(2) 研究分担者

松井 貴輝 (Matsui Takaaki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエ
ンス研究科・助教

研究者番号：60403331