

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17082010

研究課題名（和文） 体節の周期的分節パターン確立機構の解析

研究課題名（英文） The mechanism of somite segmentation with periodic patterning

研究代表者

相賀 裕美子 (SAGA YUMIKO)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：50221271

研究成果の概要（和文）：我々脊椎動物の分節性は発生過程で形成される体節の分節性に依存する。体節形成に関与する遺伝子の異常は脊椎融合症などのヒトの疾患遺伝子として同定されている。体節形成過程では Hes7 という転写抑制因子の振動が時計として機能することは示されていたが、その時間情報を体節の分節境界の形成、また個々の体節における前後極性の形成という実際の形態変化に結びつける機構に関しては不明の点が多かった。我々は転写因子 Mesp2 の機能、発現制御機構の解析を通じて、この転写因子が主に体節時計と形態形成をつなぐ鍵因子であること、また糖鎖修飾酵素 L-fng を介した Notch シグナルが Mesp2 の発現パターンを設定することにより、体節の分節性が確立することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Somites provide bases of segmental structure such as vertebra and rimb of our body. Somites are generated periodically every 2 hours in mouse embryos. The periodicity is known to be regulated by so-called molecular clock which is regulated by an oscillation of transcriptional repressor, Hes7. However, the mechanism to translate the clock information into the special pattern of each somite remained elusive. We have revealed that a transcription factor Mesp2 is a key regulator required for this process. We demonstrated that the expression of Mesp2 is positively regulated by Tbx6 and Notch signal oscillation and repressive function of Mesp2 on Tbx6 and Notch signaling is critically important to generate segmental border formation and establishing rostro-caudal patterning of somites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	25,200,000	0	25,200,000
2006 年度	25,200,000	0	25,200,000
2007 年度	30,900,000	0	30,900,000
2008 年度	28,800,000	0	28,800,000
2009 年度	24,800,000	0	24,800,000
総計	134,900,000	0	134,900,000

研究分野：生物系生物分野

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：体節形成、Notch シグナル、脊椎骨、体節時計、Mesp2, Tbx6, 未分節中胚葉

1. 研究開始当初の背景

体節形成過程はショウジョウバエの分節と全く異なったメカニズムが機能しているという点で非常にユニークな分野であり、またその形態形成のダイナミクスが分節時計という概念で説明されるという特徴をもつ。この時計機構に関しては Notch シグナルの関与は周知の事実となっているが、この分子時計の振動が分子レベルでどのように調節されているのか？またこの時計がどのようなメカニズムで止まるのかに関しては解析困難な分野として残されており、この点に正面から取り組み問題解決を図ろうとする研究として当該分野内での独創性はきわめて高い。

2. 研究の目的

脊椎動物の分節性の基盤となる体節の形成は、未分節中胚葉の後方における Notch 関連遺伝子の周期的な発現(いわゆる分節時計)が分節直前に停止し形態的な分節構造として翻訳されることにより完結する。しかしこの過程で Notch シグナルがどのようなレベルで制御をうけてこの分節時計が同調的に動き停止するかという問題はまだ解決していない。我々は体節形成過程で作用する2つのリガンド(Delta1とDelta3)の使い分け、糖転移酵素 Fringe による Notch レセプターの修飾、また分節直前に発現する転写因子 Mesp2 の機能に着目し、これらが Notch シグナルを介した細胞間相互作用にどのように作用することにより体節の周期的分節パターンが確立するのか、その分子機構解明を目的とした。

3. 研究の方法

研究成果の部分で具体的に述べるが、我々は、体節形成過程を制御する Notch シグナル系と、その発現制御にかかわる糖鎖修飾酵素である L-fringe の機能解析を中心に解析した。またこれらの因子によって制御され体節形成の鍵分子である転写因子 Mesp2 の発現を体節形成の指標として利用した。方法は主にマウスの発生工学を用いた遺伝子改変動物の作成とその解析、またこれらの変異細胞を用いたモザイク胚解析(キメラ解析)を用いた。

またコンピューターを用いた数理モデルを用いたシミュレーションと実験を組み合わせることで結論を見出した。

4. 研究成果

1) 体節時計として機能する Notch のシグナル活性を可視化

未分節中胚葉後方では Notch シグナル関連分子が分節クロックとして、振動していることがわかっていたが、Notch のシグナルそのものが振動している証拠はなかった。我々は活性化した Notch 分子のみを特異的に認識する抗体を用いて未分節中胚葉を解析したところ、後方部で確かに Notch シグナル自身が振動しており、それが未分節中胚葉前方部で安定化することを見出した。その Notch シグナルは D111-KO マウスでは消失し、Lunatic fringe (L-Fng) -KO マウスでは逆に活性が上昇しているとともに、振動も見られなかった。よって後方部における Notch シグナルは D111 により誘導され、L-Fng により負の制御を受けていると考えられる。一方、Mesp2-KO マウスでは前方部の Notch シグナルが安定化せず、分節境界が形成されないことをわかった。Notch シグナルと Mesp2 シグナルの関係を分節境界形成過程で詳細に調べた結果、Notch シグナルは分節境界において Mesp2 により抑制されることにより Notch シグナルの境界面が形成されこれが将来の分節境界を形成することがわかった(図1)。

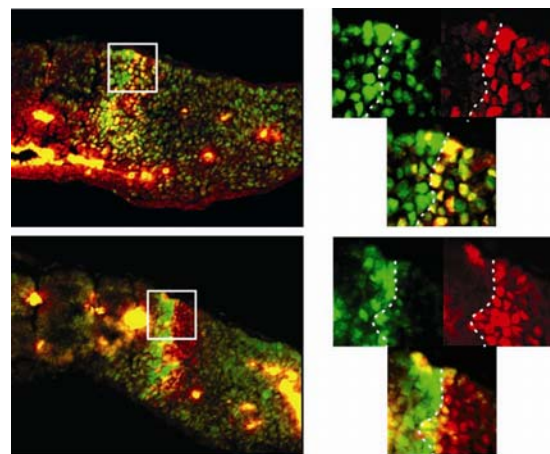


図1、体節の分節境界における Notch シグナル(赤)と転写因子 Mesp2(緑)の関係

またこのとき Mesp2 は L-Fng を誘導しており、それが Notch 活性の抑制に寄与すると考えた。したがって、Mesp2 はこれまで明らかにしてきた体節の前後極性の形成に加えて分節境界の形成に関わる非常に重要な転写因子であることが明らかになった。

2) 分節性の確立に寄与する転写因子 Mesp2 を可視化しライブイメージングに成功
Mesp2 は体節形成を通して重要な役割をになう。我々は Mesp2 を生体内で可視化するために、YFP を融合した Mesp2 遺伝子をノックインしたマウスを作成した。そのマウスはホモで生存可能であり、体節形成過程で Mesp2 が実際に分節形成部位で周期的発現することを世界で初めてライブイメージングにより証明した (図2)。

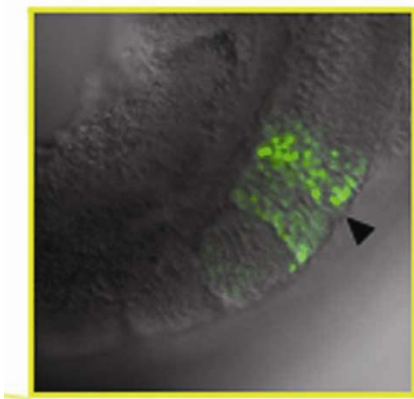


図2、Mesp2-venus ノックインマウスによる Mesp2 タンパク質のライブイメージ

(3) 体節時計の同調振動機構の解明
体節は一定周期で形成される。この周期性は遺伝子の発現振動を制御する体節時計によって調節されている。しかしもし個々の細胞の時計が同調性なしに振動すれば、正確なパターンは形成されない。したがって周囲の細胞間で時計を同調させる機構が必要である。この同調機構を明らかにするためにモザイク胚解析を行った。Notch リガンドである Dll1, Notch 受容体の糖修飾酵素で Notch シグナルを制御することが知られている Lunatic-Fringe の2種類のノックアウト胚を用いた。その結果、Notch シグナルは時計として機能するだけでなく、時計の振動を同調させる機能をもつことが明らかになった。しかし Dll1 自身は振動していないため同調化の OUTPUT としては役割を果たせない。一

方、マウス胚で振動している Notch signal の修飾因子 Lfng が Dll1 と Notch1 それぞれを修飾することで Notch シグナル活性を変化させ OUTPUT として作用しうることが明らかになった。

(4) 糖鎖修飾酵素である L-fng の体節形成過程における必要性

L-fng の発現パターンは複雑で、未分節中胚葉の後方では、振動パターンを示し、これが Notch シグナルの負の因子として機能して Notch シグナルの振動をうみだす。一方、未分節中胚葉の前方では安定的な発現を示し、ここでの活性が体節の分節境界の形成に重要であると考えられていた。我々はこの2つの発現を分離できるトランスジェニックマウスを作成し、それらを L-fng 欠損マウスと交配し、内在性の L-fng がいない状態で解析し、どちらの発現がどのような機能をレスキューできるかを検討した。その結果、Hes7-プロモーターでドライブした L-fng (すなわち、後方の振動をつくりだす L-fng) のみで正常な体節の分節及び体節の前後極性の確立に必要な・十分であることが明らかになった (図3)。

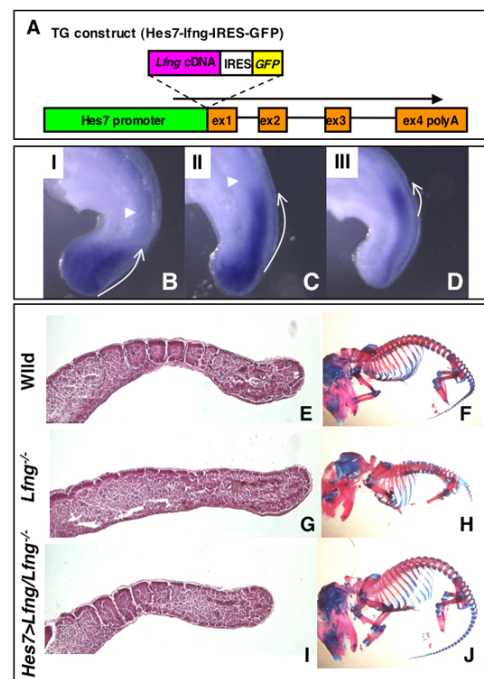


図3、Hes7 遺伝子の発現領域で L-fng を発現させると L-fng の機能がレスキューされる。

また前方の L-fng は Notch の切断には必要であることが分かったが、その結果分節境界に形成される Notch の切断は分節境界の形成には必要ではないことが明らかになった。また我々はコンピューターシミュレーションを用いて、Notch シグナルの振動が分節境界の形成や体節の前後極性の確立に必須な分子である Mesp2 の転写制御に必須であり、そのために L-fng が機能していると結論づけた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件) (すべて査読付)

- ① Takahashi J, Ohbayashi A, Oginuma M, Saito D, Mochizuki A, Saga Y, Takada S. Analysis of Ripply1/2-deficient mouse embryos reveals a mechanism underlying the rostro-caudal patterning within a somite. *Dev Biol.* 2010 Mar 24. [Epub ahead of print]
- ② Oginuma M, Takahashi Y, Kitajima S, Kiso M, Kanno J, Kimura A, Saga Y. The oscillation of Notch activation, but not its boundary, is required for somite border formation and rostral-caudal patterning within a somite. *Development.* 2010 Mar 24. [Epub ahead of print]
- ③ Yasuhiko Y, Kitajima S, Takahashi Y, Oginuma M, Kagiwada H, Kanno J, Saga Y. Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm (PSM) specific enhancer of *Mesp*. *Development*, 135:3511-9, 2008
- ④ Okamura Y, Saga Y. Notch signaling is required for the maintenance of enteric neural crest progenitors. *Development.* 135:3555-65, 2008
- ⑤ Oginuma M, Niwa Y, Chapman DL, Saga Y. Mesp2 and Tbx6 cooperatively create periodic patterns coupled with the clock machinery during mouse somitogenesis. *Development.* 135:2555-62, 2008
- ⑥ Okamura Y, Saga Y. Pofut1 is required for the proper localization of the Notch receptor during mouse development. *Mech Dev.* 125:663-73, 2008
- ⑦ Oginuma M, Hirata T, Saga Y. Identification of presomitic mesoderm (PSM)-specific Mesp1 enhancer and generation of a PSM-specific Mesp1/Mesp2-null mouse using BAC-based rescue technology. *Mech Dev.* 125(5-6):432-40, 2008
- ⑧ Takahashi Y, Takagi A, Hiraoka S, Koseki H, Kanno J, Rawls A, Saga Y. Transcription factors Mesp2 and Paraxis have critical roles in axial musculoskeletal formation. *Dev Dyn.* 236:1484-94, 2007
- ⑨ Saga Y. Segmental border is defined by the key transcription factor Mesp2, by means of the suppression of notch activity. *Dev Dyn.* 236:1450-5. Review, 2007
- ⑩ Morimoto M, Sasaki N, Oginuma M, Kiso M, Igarashi K, Aizaki K, Kanno J, Saga Y. The negative regulation of Mesp2 by mouse Ripply2 is required to establish the rostro-caudal patterning within a somite. *Development.* 134:1561-9, 2007
- ⑪ Takahashi Y, Yasuhiko Y, Kitajima S, Kanno J, Saga Y. Appropriate suppression of Notch signaling by Mesp factors is essential for stripe pattern formation leading to segment boundary formation. *Dev. Biol.* 304:593-603, 2007
- ⑫ Morimoto M, Kiso M, Sasaki N, Saga Y. Cooperative Mesp activity is required for normal somitogenesis along the anterior-posterior axis. *Dev. Biol.* 300, 687-698, 2006
- ⑬ Nakajima Y, Morimoto M, Takahashi Y, Koseki K, Saga Y. Identification of EphA4 enhancer required for segmental expression and the regulation by Mesp2. *Development* 133:2517-25, 2006
- ⑭ Yasuhiko Y, Haraguchi S., Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J, Saga Y. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific *Mesp2* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3651-3656, 2006
- ⑮ Morimoto M, Takahashi Y, Endo M, Saga Y. The transcription factor Mesp2 establishes segmental borders by suppressing Notch activity. *Nature* 435:354-359, 2005

[学会発表] (計 28 件)

- ① Sasaki, N et al. Saga Y. Repression of the Notch signaling activity via Mesp2 is essential for somitogenesis. 16th International Society of Developmental Biologists Congress 2009,

9/6-10, Edinburgh

- ② Okubo Y, Saga Y. The coupling mechanism to generate synchronized oscillation in mouse somitogenesis. 第42回 発生生物学会、新潟、2009
- ③ 相賀 裕美子、荻沼政之、A translation mechanism of the segmentation clock for periodic somite formation. 第32回 日本分子生物学会、横浜、2009
- ④ 佐々木伸雄、相賀裕美子、Functional analysis of the degradation mechanism of Mastermind via Mesp2 to repress the activation of the Notch signaling pathway. 第32回 日本分子生物学会、横浜、2009
- ⑤ Saga Y. Mesp2 and Tbx6 cooperatively create periodic patterns during mouse somitogenesis. Joint meeting of French and Japan Societies for Developmental Biology, France, 2008
- ⑥ Oginuma, M., Saga Y. The stable and cyclic expression of L-fng, which is required for somitogenesis. Joint meeting of French and Japan Societies for Developmental Biology, France, 2008
- ⑦ 佐々木伸雄、木曾誠、相賀 裕美子、マウス体節形成には Mesp2 による Notch 情報伝達系の抑制が必要である。BMB2008、神戸、2008
- ⑧ Takahashi Y. et al, Saga Y. Delta-like3(Dll3) does not substitute for Delta-like1(Dll1) in somitogenesis in vivo but modulates Dll1/Notch signaling in the posterior PSM. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Tokushima, 2008
- ⑨ Yasuhiko Y. et al. Saga Y. Functional importance and evolutionary conservation of Tbx6 binding sites in presomitic mesoderm(PSM)specific enhancer of Mesp2. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Tokushima, 2008
- ⑩ Oginuma M et al. Saga Y. Mesp2 and Tbx6 cooperatively create periodic patterns, coupled with the clock machinery during mouse somitogenesis. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Tokushima, 2008
- ⑪ Sasaki N. Saga Y. Genetic evidence for the

Mesp2 function as the suppressor of Notch signaling. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Tokushima, 2008

- ⑫ Saga Y. The spatio-temporal regulation of somitogenesis. The Notch Meeting, Athens, 2007
- ⑬ Saga Y. The Mesp2 transcription factor establishes segmental borders by suppressing Notch activity, KORNBERG symposium, Tokyo, 2007
- ⑭ Saga Y. The spatio-temporal regulation of somitogenesis. Pan-American SDB Congress, Cancun, 2007
- ⑮ Saga Y. The spatio-temporal regulation of somitogenesis. IMGC2007(第21回国際哺乳類ゲノム会議)、京都 2007
- ⑯ Saga Y. Translation of the temporal information provided by the Segmentation Clock. THE TERATOLOGY SOCIETY. 47th Annual Meeting, Pittsburgh, 2007
- ⑰ Oginuma, M., Saga Y. Identification of different enhancers for Mesp1 and Mesp2 expression in the presomitic mesoderm. 日本発生生物学会第39回大会、広島、2006
- ⑱ Okamura, Y, Saga Y. Analyses toward understanding the function of Protein O-fucosyltransferase1 on Notch signaling. 日本発生生物学会第39回大会、広島、2006
- ⑲ 安彦行人、原口清輝、北嶋聡、高橋雄、菅野純、相賀裕美子、体節形成に関わる転写因子 Mesp2 の発現制御における転写因子 Tbx6 の役割、日本発生生物学会第39回大会、広島、2006
- ⑳ 佐々木伸雄、森本充、荻沼政之、相賀裕美子、Mesp2 の負の制御因子 Ripply2 による体節の前後極性決定機構の解析、日本発生生物学会第39回大会、広島、2006
- ㉑ Saga Y. A mechanism of somite segmentation. UK-Japan Developmental Biology Meeting. London, 2005
- ㉒ Saga Y. Mesp2, the function and regulation. Segmentation meeting, France 2005
- ㉓ 荻沼政之、渡辺裕介、相賀 裕美子、BAC トランスジェニックマウスを用いた bHLH 型転写因子 Mesp1 と Mesp2 の発現制御機構

の解析, 日本発生生物学会第 38 回大会, 仙台, 2005

- ⑭ 森本充, 木曾誠, 相賀 裕美子, Mesp2 タンパク質の機能ドメインの固体レベルでの解析, 日本発生生物学会第 38 回大会, 仙台, 2005
- ⑮ 安彦行人, 原口清輝, 高橋雄, 菅野純, 相賀裕美子. Notch シグナルは Tbx6 の依存的に Mesp2 発現を活性化する. 第 28 回日本分子生物学会, 福岡, 2005
- ⑯ 高橋雄, 北嶋聡, 菅野純, 相賀 裕美子. 体節形成におけるストライプパターンの形成には未分節中胚葉前方における Notch シグナルのネガティブフィードバックが本質的に重要である. 日本発生生物学会第 38 回大会, 仙台, 2005
- ⑰ 森本充, 相賀 裕美子. Mesp2 は L-fringe を誘導し、Notch-signaling を抑制する事で分節境界を確率する. 日本発生生物学会第 38 回大会, 仙台, 2005
- ⑱ 安彦行人, 原口清輝, 菅野純, 相賀 裕美子. Notch シグナルおよび Tbx6 による Mesp2 発現制御機構の解析, 日本発生生物学会第 38 回大会, 仙台, 2005

6. 研究組織

(1)研究代表者

相賀 裕美子 (SAGA YUMIKO)
国立遺伝学研究所・
系統生物研究センター・教授
研究者番号：50221271

(2)研究分担者

小久保 博樹 (KOKUBO HIROKI)
国立遺伝学研究所・
系統生物研究センター・助教
研究者番号：10270480

三井 薫 (MISTUI KAORU)
鹿児島大学大学院・
医歯学総合研究科・講師
研究者番号：40324975

高橋 雄 (TAKAHASHI YU)
国立医薬品食品衛生研究所・
毒性部・主任研究官
研究者番号：60321858

(3) 連帯研究者

菅野 純 (KANNO JUN)
国立医薬品食品衛生研究所・
毒性部・部長
研究者番号：90186172

安彦 行人 (YASUHIKO YUKUTO)
国立医薬品食品衛生研究所・
毒性部・主任研究官
研究者番号：40370944

北嶋 聡 (KITAJIMA SATOSHI)
国立医薬品食品衛生研究所・
毒性部・主任研究官
研究者番号：30270622