

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17370081

研究課題名（和文）体節形成周期を規定する分子時計のメカニズム

研究課題名（英文）The mechanism of the molecular clock that controls somite segmentation

研究代表者

別所 康全（YASUMASA BESSHO）

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：本研究は、体節原基での分子発現のオシレーションの周期性が、体節分節化の時空間的周期性に変換される分子メカニズムを明らかにすることを目的として行われた。空間情報を担う FGF シグナル活性と時間情報を担う Notch シグナルの振動が、FGF シグナルの抑制因子を介して結びつくことを明らかにした。また、Notch シグナルのフィードバックインヒビター Nrarp が振動のロバスト性を担っていることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	3,900,000	0	3,900,000
2006 年度	3,500,000	0	3,500,000
2007 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
総計	14,400,000	2,100,000	16,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：振動，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

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。

その後、振動発生のメカニズムが盛んに研究され、マウスにおいて我々のグループが転写因子 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)

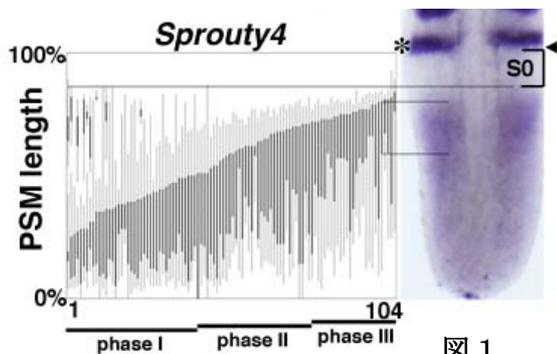


図 1

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 *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間隔パターンが形成されると考えられた。

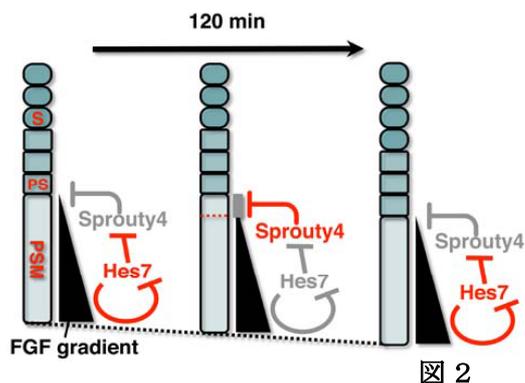


図 2

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

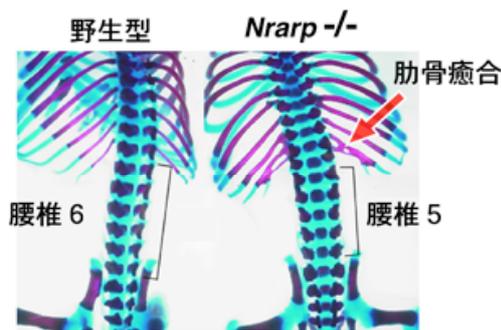


図 3

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 5 件)

- ① 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
- ② 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
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 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 11 件)

- ① 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, 2009.3, 岡山
- ② 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, 2008.3, 大分
- ③ Bessho Y, The mechanism of the biological clock that controls animal development, International Joint Symposium Frontier In Biomedical Sciences: From Genes to Applications, 2008.11, Yogyakarta
- ④ 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, 2008.1, 京都

⑤ Bessho Y., The mechanism of the biological clock that controls animal development, NAIST Global COE International Symposium Developmental Biology, 2008.1, Nara

⑥ Bessho Y., The mechanism the biological clock that controls animal development, NAIST The 21st century COE Program International Symposium, 2007.1, Nara

⑦ Shimoda T., Matsui T., Bessho Y., The biological clock generates repetitive patterns in mouse development, 8th KRIBB-KU-NAIST Symposium, 2006.11, Seoul

⑧ 別所康全, 2時間を刻む生物時計 ～時間制御を利用した形づくり～, 関西眼科先進医療研究会, 2006.10, 大阪

⑨ 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, 2006.8, 東京

⑩ Bessho Y., The segmentation clock generates metamer patterns in mouse development, NAIST-CDB International Symposium Frontiers in Developmental Biology, 2005.11, Gyeongju

⑪ Bessho Y., The segmentation clock generates metamer patterns in mouse development, 7th Northeastern Asia Symposium on Biotechnology, 2005.12, Nara

[図書] (計1件)

① Maroto M., Iimura T., Dale J. K. 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 (YASUMASA BESSHO)

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