

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780241

研究課題名(和文) 体節形成における位置情報の動的変化の測定および観察

研究課題名(英文) Measurement/observation of special information during somitogenesis

研究代表者

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：60403333

研究成果の概要(和文):脊椎動物の体節は、分子時計(Hes)が作り出す時間情報が空間情報(FGF)に変換されることで周期的に形成される。本研究では、この変換機構を解明するために、マウス、ゼブラフィッシュをモデル系として用いた研究を行った。その結果、マウスの時計遺伝子Hes7の作り出す周期性が、FGF抑制因子Sprouty4に伝達されることと、ゼブラフィッシュでは、Sprouty4を仲介因子としてFGFの細胞内のシグナルが離散的に変化することを突き止めた。

研究成果の概要(英文): During vertebrate development, somites are generated by periodic segmentation. In this study, we investigated the relationship between segmentation clock (Hes) and special information (FGF). We show that Sprouty4 oscillates in mouse presomitic mesoderm, and that clock-dependent modulation of FGF signal activity acts as a determinant for future somite boundaries.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：発生、体節、Hes、FGF

1. 研究開始当初の背景

申請者が所属する研究室では、体節形成における時間的制御機構を解析し、近年、マウスのPSMに特異的に発現する転写因子Hes7を単離し、その遺伝子発現が体節形成周期(12

0分)と一致して、ONとOFFを繰り返す(振動する)ことを明らかにした。さらに、実験遺伝学的手法と数理シミュレーションを用いて、Hes7を介したNotchシグナルのネガティブフィードバックループが“分子時計”の正体であることを突き止めた。このように申請者ら

のグループは、一つの細胞内で時間を計るメカニズムを明らかにしてきているが、“分子時計”によって生み出された時間的周期性がどのように分節化を制御するのかについては、ほとんど理解されていない。

胚の最尾部の尾芽領域では、増殖因子 FGF が強く発現しており、FGF シグナルの前方へ向かった濃度勾配が形成される。この勾配が分節化の位置決定をしていると考えられている(図1)。また体節は、分子時計の作り出す時間的周期性を利用して分節化するので、分子時計が FGF の勾配を変化させ、周期的に分節境界を規定する可能性が考えられる(図1)。

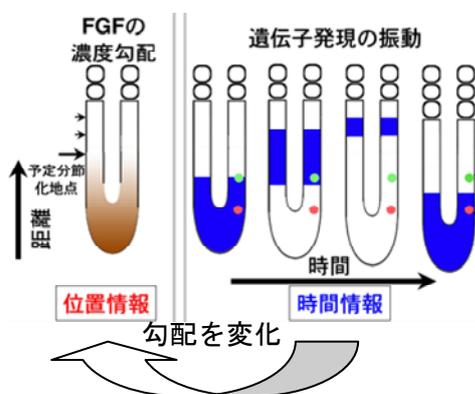


図1 時間情報の位置情報への変換

2. 研究の目的

分子時計の作り出す時間情報がどのように FGF 空間情報へ伝達されるかを解明することを通して、体節の分節境界が周期的に形成される分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

E10.5 日目のマウス胎仔における *Sprouty4* の発現は、*in situ* hybridization 法で解析した。PSM での発現の詳細を調べるため、100 個の個体の PSM での *Sprouty4* の発現領域の長さを測定し、時間変化を推定した。*Sprouty4* の振動周期を調べるために、E10.5 日目のマウス胎仔の尾部を左右半分に切断

し、左側の断片はすぐに固定し(培養前)、右側を60分または120分培養した。左右での *Sprouty4* の発現パターンを比較することで、*Sprouty4* の振動に要する時間を概算した。また、*Sprouty4* の発現を *Hes7* ノックアウトマウス胎仔でも調べ、*Sprouty4* の振動への *Hes7* の関与を調べた。

また、ゼブラフィッシュでは、FGF シグナルの活性化領域をリン酸化 Erk に対する抗体を用いた免疫染色法で検出した。染色した胚をフラットマウントして、Erk の活性化領域の大きさ、強度などの定量データを取得した。さらに、体節数と長さ情報を元にその定量データを並べ、Erk の活性化領域の時間的変化を予測した。

また、野生型だけでなく、モルフォリーノ(MO)によって時計遺伝子(*her1/her7*)や *sprouty4* をノックダウンした胚でも同様の定量解析を行うことで、時間情報が位置情報への変換機構を考察した。

4. 研究成果

FGF シグナルの抑制因子である *Sprouty4* は、*FGF 8* の発現パターンと一致して、midbrain-hindbrain boundary、somites、PSM で発現する。マウスの E10.5 の 100 個の胚について、PSM での *Sprouty4* の発現を詳細に解析したところ、*Sprouty4* の発現は、PSM の後端のみ、中間部位のみ、前端のみ発現する個体が存在し、異なる発現パターンを示すことが明らかになった。

このようなパターンは、遺伝子の発現が振動することが知られている *Lfng*、*Hes7* などと類似していることから、*Sprouty4* の発現は、PSM において振動している可能性が示唆された。そこで、これを検証するために、E10.5 胚の尾部を左右に分断し、*Sprouty4* と *Lfng* の発現をそれぞれの断片で調べたところ、

Sprouty4 の発現領域は、*Lfng* の振動パターンと同様に変化することが明らかになった。また、右半分を60分培養したときの発現パターンと、培養前のパターンを比較すると、左右で異なる発現パターンを示したが、120分培養すると、培養前のパターンと一致した発現パターンを示した。この結果は、*Sprouty4* の発現が2時間周期で振動していることを示唆している。

Lfng の発現振動は、*Hes7* に依存することが知られている。*Sprouty4* の発現振動は、この *Lfng* の振動と同調しているので、*Sprouty4* の振動も、*Hes7* に依存する可能性が考えられる。そこで、*Hes7* を欠損した *Hes7* ノックアウトマウス胚で、*Sprouty4* の発現を調べたところ、野生型で認められる発現パターンの変化は認められず、PSM の全体に様に広がって発現することが分かった。この結果は、*Sprouty4* の振動に *Hes7* が必要であることを示している。以上の結果から、マウス胚において、*Sprouty4* の発現は、*Hes7* に依存して、2時間周期で振動することが明らかになった。よって、*Sprouty4* は *Hes7* の持つ時間情報をFGF位置情報へ周期的に伝えるメディエーターとして機能している可能性が示唆された(図2)。

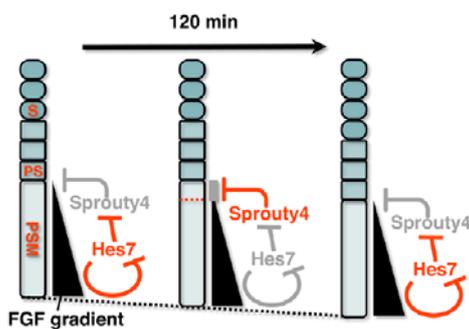


図2 体節の分節化メカニズム
PSM：未分節中胚葉，PS：予定体節，S：体節

また、ゼブラフィッシュにおいて、FGFシグナルの活性化領域を調べた結果、FGFシグナルは尾部で活性化されているが、*fgf8* mRNA の発現のような濃度勾配は認められなかつ

た。そこで、FGF活性化領域、体節、PSMなどの長さを41個体で測定し、体節数とPSMの長さ順に並べて、FGFシグナル活性化領域の時間的変化を計測した。その結果、*fgf8* では発現領域の大きさは一定であったのに対して、FGFシグナル活性化領域は個体ごとに大きさが変化していることがわかった。この変化は、不活性化領域の大きさが約200 μ mに維持されていて、体節形成される周期と似たタイミングで、その位置が後方へ移動する“離散パターン”を取ることを明らかになった(図3)。

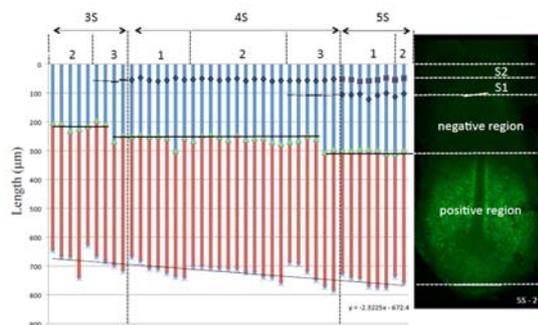


図3 FGF活性化領域の時間的変化

この離散パターンは、時計遺伝子(*her1/her7*)のノックダウンおよび、時間-空間情報を中継する *sprouty4* のノックダウンでは認められなくなることから、FGFシグナルが作り出す離散パターンが予定分節境界を決定する目印として機能する可能性が示唆された。

以上のマウスとゼブラフィッシュを用いた研究から、Hesが作り出す時間情報はFGFシグナル抑制因子Sproutyを周期的に制御することで、体節の位置を正確に決定していることが示唆された(投稿準備中)。また、マウスではFGFシグナルが振動しているが、ゼブラフィッシュではしないことが明らかになり、その違いが何に由来するかについても、今後解析して行きたい。

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1件)

①Shinichi Hayashi, Taiju Shimoda, Masato Nakajima, Yuki Tsukada, Yuichi Sakumura, J. Kim Dale, Miguel Maroto, Kenji Kohno, **Takaaki Matsui**, and Yasumasa Bessho (2009) Sprouty4, an FGF inhibitor, displays cyclic gene expression under the control of the Notch segmentation clock in the mouse PSM **PLoS One**, 4:e5603 査読あり

[学会発表] (計3件)

①ワークショップ (英語口頭) & ポスター
第32回 日本分子生物学会年会 横浜 (パシフィコ横浜) 2009/12/9-12

Takaaki Matsui, Siripong Thitamadee, Tomoko Murata, Hisaya Kakinuma, Takuji Nabetani, Yoshio Hirabayashi, Yoshikazu Hirate, Hitoshi Okamoto, and Yasumasa Bessho

Self-amplification of the Fgf signal regulates functional cell clustering during zebrafish embryo development

②一般演題 (口頭)

第15回 小型魚類研究会 名古屋大
2009/9/11-12

松井 貴輝, Siripong Thitamadee, 村田 朋子, 柿沼 久哉, 鍋谷 卓司, 平林 義雄, 平手 良和, 岡本 仁, 別所 康全

Fgf シグナルの自己増幅システムを利用した細胞のクラスタリング機構

③一般演題 (ポスター)

第15回 小型魚類研究会 名古屋大
2009/9/11-12

秋山 隆太郎, 松井 貴輝, 別所 康全

体節形成過程におけるFGFシグナルの役割

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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: 60403333

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: