

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310126

研究課題名（和文） 動的な生命現象を制御する時間制御機構の解明

研究課題名（英文） The mechanism of the molecular clock that controls developmental dynamics

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（和文）：本研究はせきつい動物の体節形成をモデル系として、動的な生命現象の代表例である体節形成の時間制御の機構を明らかにし、それによって時間制御を利用した形づくりの原理の理解を目指した。体節形成は、Notch シグナル系遺伝子などの一群の遺伝子発現の振動の周期性を利用して周期的に起こるが、Notch シグナル強度によって周期が調節されることを明らかにした。さらに Notch シグナルの修飾因子が時間制御の堅牢性にかかわることを発見した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to understand the mechanism of dynamics in somite formation in vertebrate development and uncover the principle of pattern formation by using temporal periodicity. During somite formation, the expression of several genes oscillate in the presomitic mesoderm, thereby controlling the cyclic somite segmentation. Here, we demonstrate that the period of the oscillatory gene expression and somite segmentation is fine-tuned by the strength of Notch signaling. Moreover, we show a modulator molecule of Notch signaling is essential for the robustness 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
2010 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2011 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：複合新領域

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：発生、体節、形態形成、振動、ロバスト性、Notch シグナル、生物時計、分節化

1. 研究開始当初の背景

せきつい動物のからだは、せきつい骨などの前後軸に沿った繰り返し構造を基本としているが、これは発生中期の一過的な構造物である**体節**の繰り返し構造に依存している。

体節は胚の両側に並ぶ均等な細胞塊であり、胚の最尾部の**未分節中胚葉**の前端が周期的に分節化されることで形成される。種ごとに固有（マウス：120 分、ゼブラフィッシュ：30 分）の分節化周期を持ち、**周期的分節化の結果、均一な大きさの体節が形成される。**

未分節中胚葉の細胞では、いくつかの遺伝子の発現が周期的に増減を繰り返しており（遺伝子発現の振動）、それが“生物時計”として分節化のタイミングを制御している。また、胚の最尾部に分泌因子である FGF8 が発現しており、前方に向かって濃度勾配をつくっている。この濃度勾配を利用して、胚後端からの距離を測り、予定分節化地点が決定される。これらのことから、**遺伝子発現の振動（時間情報）と FGF の濃度勾配（空間情報）が巧妙に組み合わせることが**、周期的に均等な大きさの体節が形成されるメカニズムであると考えられる。つまり、体節形成のメカニズムは

(1) **遺伝子発現が振動し、分節化のタイミングを決定するメカニズム**

(2) **FGF シグナルの濃度勾配が分節化可能な地点を決定するメカニズム**

(3) (1)と(2)の情報が統合され、形がつくられるメカニズム

に分けられる。われわれは(1)について、①未分節中胚葉特異的に発現する抑制性転写因子 *Hes7* 遺伝子を発見し、②*Hes7* の発現が振動していること、③*Hes7* が周期的な分節化および遺伝子発現の振動に必須であること、④*Hes7* が形成するネガティブフィードバックループが遺伝子発現振動の中心的なメカニズムであること、⑤*Hes7* がつくる振動が周期的な分節化を制御していること既に明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究では特に、体節形成周期を制御する遺伝子発現振動の**周期決定**と、体節形成の**ロバスト性獲得**を明らかにすることに焦点を絞り、時間制御を利用した形づくりの原理を明らかにすることを目的とした。

(1) 遺伝子発現振動の周期決定

体節形成周期は、マウスでは 2 時間、ニワトリでは 90 分、ゼブラフィッシュでは 30 分など、種ごとに固有の周期を持っている。またそのために、形成される体節の総数は種ごとに固有である。したがって体節形成周期は厳密に制御されていると考えられ、周期の調節メカニズムを明らかにすることは意義深い。我々は遺伝子発現振動のアクチベーターである Notch シグナルの強度に着目して、周期決定メカニズムを明らかにすることを目的とした。

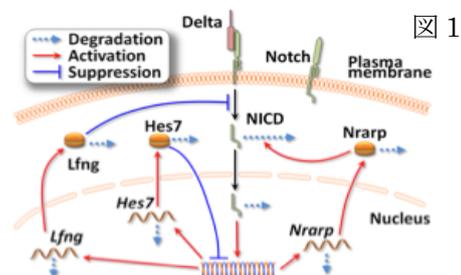
(2) 体節形成のロバスト性獲得メカニズム

未分節中胚葉のひとつひとつの細胞内で遺伝子発現が振動し、近隣の細胞で位相が一致しているため、組織全体で同調した振動が観察される。例えば体節形成期の胚に熱ショックを加えると、一過的に振動の同調が崩れて、その結果体節が正しく形成されないが、その後再び、正常に体節形成が再開することが知られている。また、未分節中胚葉では細胞分裂が活発に起こっており、細胞分裂中は遺伝子発現が中断するので、その細胞の位相は一過的に近隣の細胞からずれるが、数周期の間に再び近隣の細胞と位相が一致するようになることが知られている。これらのことから、細胞間で振動を同調させるメカニズムが存在すると考えられており、それによって外部環境の変化や生体内のノイズに抗って正常な体節の繰り返しパターンが形成されると考えられる。我々は細胞間で遺伝子発現振動が同調する仕組みを利用して、体節形成がロバストにおこなわれるメカニズムの解明を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現振動の周期決定

これまでに転写因子 *Hes7* のネガティブフィードバックループがメカニズムのコアにあることを示した。*Hes7* 遺伝子の転写は Notch シグナルによって活性化されるが、Notch シグナルのフィードバックインヒビターのひとつに *Nrarp* がある(図 1)。*Nrarp* のノックアウトマウスを作製することによって、内在性の Notch シグナルを強めることを試みた。*Nrarp* ノックアウトマウスの体節数やせきつい骨数などの表現型を観察することによって、Notch シグナルの強度が遺伝子発現振動の周期決定にどのように関与しているかを検討した。



(2) 体節形成のロバスト性獲得メカニズム

Nrarp ノックアウトマウスの表現型を観察した結果、せきつい骨や肋骨に軽微な異

常があり、その位置は不定であった。このことから *Nrarp* ノックアウトマウス胚は自発的な生体内のノイズや偶発的な外部環境の変化に対するロバスト性が減弱している可能性を予想した。そこで *Nrarp* ノックアウトマウス胚を、催奇形性があることが知られている薬剤であるバルプロ酸に暴露することによって、*Nrarp* ノックアウトマウス胚における体節形成機構のロバスト性を評価することにした。そして、*Nrarp* が細胞間で遺伝子発現振動が同調する仕組みにおける役割を明らかにし、体節形成のロバスト性メカニズムを解明しようとした。

4. 研究成果

Nrarp ノックアウトマウスを作製し、表現型の解析をおこなった。*Nrarp* ノックアウト

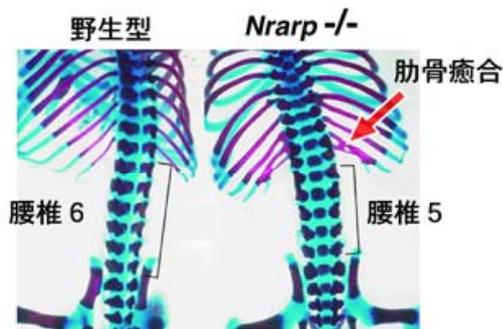


図 2

マウスヘテロ接合体では、形態異常や発生過程の異常は全く観察されなかった。ホモ接合において、椎骨数の減少と軽微なせきつい骨や肋骨の癒合などの形態異常が観察された(図 2)。

マウス胚において、約 2 時間周期で 1 対の体節が形成される。我々は経時的に *Nrarp* ノックアウトマウス胚の体節数を数えて、体節形成周期を求めたところ、野生型に比べて約 5 分周期が延長していることを発見した。5 分の周期延長のために体節数とせきつい骨

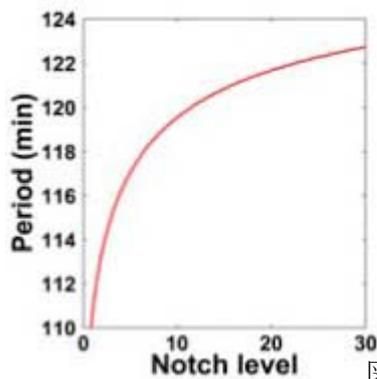


図 3

数が減少したと結論づけた。これまでの研究成果から

推測される遺伝子発現振動の発生メカニズム(図 1)をもとに数理モデルを構築し、コンピュータシミュレーションをおこなった。その結果、遺伝子発現振動のアクチベーターである Notch シグナルの強度と振動周期が正比例することが明らかになった。これらのことから、*Nrarp* ノックアウトマウス胚では、Notch シグナルのフィードバックインヒビターである *Nrarp* が失われたことによって Notch シグナル強度が高まり、その結果遺伝子発現振動の周期と体節形成周期が 5 分程度延長され、体節数とせきつい骨数がそれぞれ減少したと考えられる。

Nrarp ノックアウトマウスにおいて軽微なせきつい骨や肋骨の癒合などの形態異常が観察されたことから、*Nrarp* が失われたことによって、体節形成とそれから分化するせきつい骨形成のロバスト性が減弱したと可能性を考えて、体節形成期の *Nrarp* ノックアウトマウス胚を、催奇形性があることが知られているバルプロ酸に暴露することによって、外部環境変化を人為的に起こす実験をおこなった。バルプロ酸によって野生型では 2-3 個のせきつい骨が癒合したが、*Nrarp* ノックアウトマウスではそれよりも多く、4 個以上のせきつい骨の癒合が観察された。この結果から *Nrarp* は体節形成のロバスト性維持メカニズムに必須の役割を果たすことが示唆された。

本研究の結果から、体節形成を制御する分節時計の周期が Notch シグナル強度によって調節されて

いることと、Notch シグナルの修飾因子である *Nrarp* が分節時計と体節形成のロバスト性維持メカニズムに必須であることが明らかになった。

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Nakashima N, Ishii TM, Bessho Y, Kageyama R, and Ohmori H, Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channels regulate the spontaneous firing rate of olfactory receptor neurons and affect glomerular formation in mice, *J Physiol*, 591: 1749-1769, 2013. 査読有 doi: 10.1113/jphysiol.2012.247361

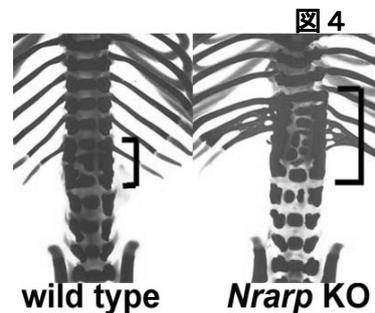


図 4

2. Bellet MM, Nakahata Y, Boudjelal M, Watts E, Mossakowska DE, Edwards KA, Cervantes M, Astarita G, Loh C, Ellis JL, Vlasuk GP, Sassone-Corsi P. Pharmacological modulation of circadian rhythms by synthetic activators of the deacetylase SIRT1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110: 3333-3338, 2013. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1214266110.

3. Matsui T, Sasaki A, Akazawa N, Otani H, and U, Celf1 regulation of dmrt2a is required for somite symmetry and left-right patterning during zebrafish development, *Development* 139: 3553-3560, 2012. 査読有 doi: 10.1242/dev.077263.

4. Kim W, Matsui T, Yamao M, Ishibashi M, Tamada K, Takumi T, Kohno K, Oba S, Ishii S, Sakumura Y, and Bessho Y, The period of the somite segmentation clock is sensitive to Notch activity, *Mol. Biol. Cell*, 22: 3541-3549, 2012. 査読有 doi: 10.1091/mbc.E11-02-0139

5. Matsui T, and Bessho Y, Left-right asymmetry in zebrafish, *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 3069-3077, 2012. 査読有 doi: 10.1007/s00018-012-0985-6.

6. 松井貴輝、岡本仁、別所康全 Canopy1 を介した FGF シグナルの活性制御機構、*細胞工学* 31 : 416-420, 2012. 査読無

7. Matsui T, Thitamadee S, Murata T, Kakinuma H, Nabetani T, Hirabayashi Y, Hirate Y, Okamoto H, and Bessho Y, Canopy1, a positive feedback regulator of FGF signaling, controls progenitor cell clustering during Kupffer's vesicle organogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 9881-9886, 2011. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1017248108.

[学会発表] (計 10 件)

1. 別所康全、2012形づくりを制御する2時間周期の生物時計、*生物リズム若手研究者の集い2012*、2012年8月4日、つくば市。

2. Matsui T, Sasaki A, Akazawa N, Otani H, and Bessho Y, Celf1 regulation of dmrt2a is required for somite symmetry and left-right patterning during zebrafish development, *第35回日本分子生物学会年会* 2012年12月11日、福岡市。

3. 森本佳世子、別所康全、松井貴輝、マウス発生過程における、vivo-Morpholino を用いた遺伝子ノックダウン法の確立、*第35回日本分子生物学会年会* 2012年12月11日、福岡市。

4. Retnoaji B, Akiyama R, Matta T, Bessho Y, and Matsui T, A possible mechanism which adjusts differences between anterior- and posterior-somitogenesis in zebrafish, *第18回小型魚類研究会*, 2012年9月22日、京都市。

5. Matta T, Tahara N, Kakinuma H, Hirate Y, Okamoto H, Bessho Y, Sakumura Y, and Matsui T, Cell clustering required for proper organogenesis, *第18回小型魚類研究会*, 2012年9月22日、京都市。

6. 松井貴輝、岡本仁、別所康全、ゼブラフィッシュの左右非対称性を規定するクッペル胞の形成メカニズム、*第153回日本獣医学会学術集会* 2012年3月27日、埼玉県

7. 松井貴輝、クッペル胞の発生をモデルとした細胞集団形成メカニズムの解析、*第11回関西小型魚類研究会*, 2011年9月30日、奈良県。

8. Matsui T, Sasaki A, Akazawa N, Otani H, and Bessho Y, Cugbp1 regulation of dmrt2a is required to generate proper somite symmetry and left-right patterning during zebrafish development, *第17回小型魚類研究会*, 2011年9月8日、三島市。

9. Akiyama R, Matsui T, Masuda M, and Bessho Y, Integration of segmentation clock and FGF signaling generates segmental pattern of somite, *第17回小型魚類研究会*, 2011年9月8日、三島市。

10. Matsuta T, Tahara M, Sumino E, Kakinuma H, Hirate Y, Okamoto H, Bessho Y, Sakumura Y, Matsui T, Cell clustering mechanism for organogenesis in zebrafish, *第17回小型魚類研究会*, 2011年9月8日、三島市。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
なし

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：60403333

中畑 泰和 (Nakahata Yasukazu)

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：50390810

(3)連携研究者

作村 諭一 (Sakumura Yuichi)

愛知県立大学・情報科学部・准教授

研究者番号：50324968