

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291050

研究課題名(和文)形態形成のロバスト性を維持するシグナルのファインチューニングシステム

研究課題名(英文)The system for fine tuning of signal transduction that maintains the robustness in morphogenesis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物の胚は、発生過程において外部環境からの攪乱にさらされているにもかかわらず、正確な形態形成が行われる。本研究ではせきつい動物の体節形成をモデルとして、形態形成過程におけるロバスト性維持機構を明らかにすることを試みた。体節原基である未分節中胚葉の細胞ではNotchシグナル依存的に一群の遺伝子の発現が振動し、それが細胞間で同調することによって分節化のタイミングが正確に制御されている。本研究でNotchシグナルの調節因子であるNrarpのノックアウトマウスの解析などにより、Notchシグナルの調節が形態形成のロバスト性維持機構に關与することを明らかにした。

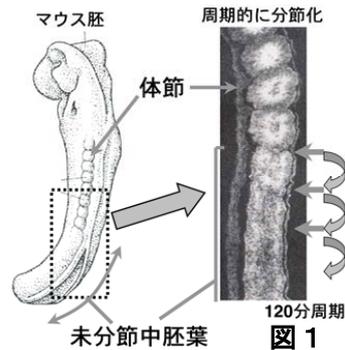
研究成果の概要(英文)：During development, the body of the embryo is formed in a precise manner, although embryos are exposed to fluctuation of external environment. In this research project, we attempted to uncover the mechanism of robustness of the morphogenesis in embryo, using somite formation in vertebrate as a model. In the presomitic mesoderm, which is the primordium of somites, the expression of a group of genes oscillates under the Notch signaling, and this oscillatory expression controls the periodic somite segmentation. Each cell in the presomitic mesoderm can generate this oscillatory gene expression and its phase is synchronized among the cells, thus the machinery of the synchronization should be a key mechanism of the robustness in somite formation. In this project, we analyzed the knockout embryos of Nrarp, which is a feedback regulator of Notch signaling, and revealed that the fine tuning of Notch signal activity plays a critical role in the robustness of the morphogenesis of somites.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 体節形成 ロバスト性 Notch 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

せきつい動物の体はせきつい骨や肋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。この構造は、発生中期の一過的な構造物である“体節”の繰り返し構造に由来している。体節は胚の正中の両側に左右対称にならぶ均等大きさの細胞塊であり、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。たとえばマウス胚では120分ごとに一对の体節が形成される(図1)。



未分節中胚葉の一つ一つの細胞内では、一群の遺伝子の発現が周期的に増減を繰り返す、体節形成周期と同期して、マウスでは120分周期で振動している。近隣の細胞同士でその位相は同調しており、全体として遺伝子発現の振動が観察される。我々はこれまでに、それぞれの細胞が自律的に遺伝子発現の振動を生み出すことを明らかにし、Notchシグナル依存的な転写因子のフィードバックループがそのメカニズムのコアになっていることを示してきた。

(1) 未分節中胚葉の細胞相互の接触によりNotchシグナルが活性化され、一群の下流遺伝子の転写が活性化される(転写ON)。

(2) 活性化されるNotch下流遺伝子の一つHes7は抑制性転写因子をコードするが、Hes7タンパク質が核内に蓄積すると、Hes7自身を含むNotch下流遺伝子の転写を抑制する(転写OFF)。

(3) Hes7タンパク質は半減期が非常に短いので(半減期約20分)、転写抑制は一過性に終わり、再びNotchシグナルによる転写活性化が起こる(転写ON)。

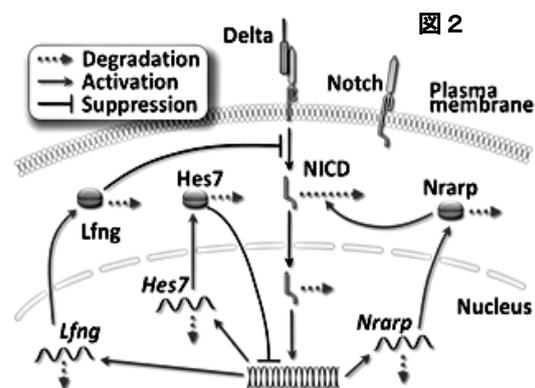
以上のステップが繰り返されることによって、未分節中胚葉で遺伝子発現の振動が生じる。この遺伝子発現の振動が“分節時計”として120分周期の体節分節化のタイミングを指示している。すなわち、Notchシグナルの下流で転写因子Hes7がネガティブフィードバックループを形成することが、分節時計の中心的なメカニズムである。また、それに加えてNotchシグナルの下流で振動しているLunatic fringe (Lfng)およびNotch-regulated ankyrin repeat protein (Nrarp)はNotchシグナルを抑制する活性があるために、それぞれフ

ィードバック制御をおこないNotchシグナルをファインチューニングしている。我々はこれまでに振動周期がNotchシグナル活性強度に依存することを明らかにした。その成果に基づき、Notchシグナルのファインチューニングシステムが振動周期を調節することによって、外部環境からの攪乱や内部ノイズによる細胞間の振動の位相のずれを修正することで、分節時計のロバスト性を維持していると予測するに至った。

本研究は我々のこれまでの研究成果に基づくものであり、我々独自の研究である。体節形成は動的な生命現象のモデルとして国内外でよく研究されている。これまでに我々はこの分野の発展に貢献してきた。

2. 研究の目的

多細胞生物の胚は発生過程において、温度変化や有害物質による外部環境からの攪乱にさらされており、さらに転写や細胞移動、細胞分裂などの素過程は、ゆらぎに満ちたものであると考えられる。それにもかかわらず、形態形成は正確におこなわれ、生物はきわめて正確に均整のとれたかたちに作られる。このことから生物の形態形成機構はロバスト性を維持する仕組みを備えていると考えられる。本研究では、せきつい動物の体節形成をモデルとして、シグナル伝達がフィードバックループによってファインチューニングされることが、形態形成のロバスト性機構を支えていることを明らかにすることを目指した。



未分節中胚葉のそれぞれの細胞では、Hes7、Lfng、Nrarpなどの遺伝子の転写はNotchシグナルによって活性化され、蓄積したHes7タンパク質によって周期的に抑制される。また、Lfngタンパク質、Nrarpタンパク質はNotchシグナル活性を周期的に抑制するので、Hes7、Lfng、NrarpのmRNAとタンパク質、Notchシグナル活性はそれぞれ同調して振動している(図2)。また近隣の細胞間でこれらの振動が同調している。

我々は Notch シグナル活性をファインチューニングする *Nrarp* によるフィードバック制御 (Notch シグナル→*Nrarp*→Notch シグナルの抑制) に着目し、*Nrarp* 遺伝子のノックアウト (KO) マウスを作製した。その表現型の一部はすでに報告している。すなわち、*Nrarp* が欠損した状態では、未分節中胚葉における Notch シグナル活性が約 2 倍に増強され、遺伝子発現の振動 (分節時計) の周期が約 5 分長くなることを発見し、振動周期が Notch 活性強度依存的に変化することを示した。また、*Nrarp* KO マウスが、(1) せきつい骨や肋骨に軽微な形態異常を持つこと、(2) バルプロ酸などの催奇形性を持つ薬剤に感受性が高く、重篤な骨格異常が誘発されること、を我々は見出している。これらから、*Nrarp* が体節形成のロバスト性維持に寄与していることが予想された。

バルプロ酸投与により、遺伝子発現の振動が乱されることを既に明らかにしていたので、外部環境からの攪乱や内部ノイズは、近隣細胞間での振動の同調を乱すことによって形態異常を引き起こしているという作業仮説を立てた。すなわち、未分節中胚葉の細胞間には、振動の位相を再同調させるメカニズムが存在し、それがロバスト性維持を担っているという仮説を立て、その分子メカニズムを探ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

予備実験の結果から *Nrarp* ノックアウトマウス胚における体節形成は、外部環境の攪乱や内部ノイズに対して脆弱であると考えられたので

- ・催奇形性のあるバルプロ酸に暴露することによって外部環境を攪乱する。
- ・振動の中心遺伝子である *Hes7* の一方のアレルを破壊して細胞内部の転写のノイズを増大する。

これらを胚の発生に対する攪乱とノイズのモデルとして、体節形成のロバスト性維持に *Nrarp* が必須の役割を果たしていることを解明することを試みた。特に数理モデルを用いて *Nrarp* がどのように働いているかを予測し、それを実験によって検証する手法をとった。特に *Nrarp* ノックアウトマウスに *Nrarp* を発現させることによって、脆弱性をレスキューすることを試み、動的な形態形成のロバスト性維持機構の解明を目指した。

(1) バルプロ酸投与による胚の外部環境の攪乱

バルプロ酸はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤として働き、ヒストンのアセ

チル化を抑制することにより遺伝子の発現を活性化する。体節形成期の胚がバルプロ酸に暴露されると HDAC 阻害活性依存的に遺伝子の発現が攪乱され、その結果、体節形成に異常が起こり、引き続きせきつい骨、肋骨に形態異常が起こると考えられている。

マウスでは、妊娠 7.5 日 (E7.5) から E12.5 までの間に約 2 時間周期で約 64 個の体節が形成される。E8.5 から E10 までの間の決められた時間に、妊娠マウスの腹腔内にバルプロ酸水溶液 (100-600 mg/kg 体重) を注射する。妊娠マウスは、*Nrarp* KO マウスのヘテロ接合体 (*Nrarp*+/-) 同士、またはヘテロ接合体とホモ接合体 (*Nrarp*-/-) をかけ合わせて作製する。腹腔内投与から 24 時間後に胚を取り出し、体節マーカー (*Uncx4.1*:各体節の後ろ半分で発現する) で *in situ hybridization* をおこなうことによって体節の形態を観察する。また出生直後に骨染色をおこない、体軸骨格の異常を観察する。

- ① 使用するバルプロ酸水溶液の濃度、腹腔内投与する時期を検討する。
- ② *Nrarp* KO マウス胚をバルプロ酸に暴露し、その影響を観察する。
- ③ 体節形成の異常を観察する。約 2 時間で 1 対の体節が形成されるので腹腔内投与 24 時間後に観察した場合に、新しく 12 個程度の体節が形成されたと考えられる。
- ④ 体軸骨格の異常を観察する。
- ⑤ 遺伝子発現の振動の異常を観察する。*Hes7*、*Lfng* などの振動遺伝子の発現パターンの乱れを経時的に観察し、定量化する。

(2) *Hes7* KO による内部ノイズの増加

Hes7 KO マウスのホモ接合体は遺伝子発現の振動と体節形成の周期性が全く失われ、その結果体軸骨格に大きな異常が見られる。しかし *Hes7* アレルの一方を失ったヘテロ接合体は振動、骨格ともに正常である。予備実験で *Nrarp* KO マウスの一方の *Hes7* アレルを欠失させた場合 (*Nrarp*-/-, *Hes7*+/-) は *Hes7* KO マウスと同程度の大きな体軸骨格異常が観察された。

本研究では、体軸骨格の異常を定量的に観察することを試みた。

(3) 数理モデルの構築

以前に Notch シグナル活性強度と振動周期が正に相関することを示し、それを説明する数理モデルの構築に成功していた。本研究では *Nrarp* や *Lfng* という Notch シグナル活性を制御する因子の働きを含めた数理モデルを構築し、*Nrarp* が存在しない場合に細胞ごと

の振動の同調性が低下することを、数理モデルを使って説明することを試みた。

4. 研究成果

(1) *Nrarp* KO マウスの形態異常の定量化

未分節中胚葉での振動遺伝子の発現パターン、形成された体節の前後極性、体節から形成される体軸骨格の形態、これらを定量的に計測し、*Nrarp* KO マウスではこれらすべてが野生型に比べて軽微に乱れていることを明らかにした。遺伝子発現振動が体節のパターンを決め、体節パターンが骨格の形態を決めるので、未分節中胚葉での振動遺伝子の発現パターンが最上流である。胚は定常的に微細な環境変化の影響を受けており、それによって細胞間の振動の同調が崩れるが、再同調させるメカニズムによって同調性が保たれていると考えられる。そのことから、*Nrarp* KO マウスの軽微な異常は、*Nrarp* の欠失により振動遺伝子の発現が細胞間で同調する能力が低下しているためであると推論した。そのために *Nrarp* KO マウス胚で遺伝子発現振動同調させる能力が低下していることを本研究の作業仮説とした。

(2) バルプロ酸投与による胚の外部環境の攪乱

妊娠中に母マウス (E9.5) にバルプロ酸を腹腔内投与することにより、体節形成期の胚をバルプロ酸に暴露した。新生マウスの骨格を骨染色によって観察すると、*Nrarp* KO 新生マウス、野生型新生マウスともにせきつい骨、肋骨に異常があったが、異常のある範囲は KO 新生マウスの方が広がった。また、バルプロ酸投与から 24 時間後に体節を観察すると、野生型胚では 2-3 体節が、*Nrarp* KO 胚では 4-7 体節が不整な形態に形成された。これらのことから、*Nrarp* KO マウスはバルプロ酸による環境攪乱に感受性が強く、ロバスト性が失われていることが明らかになった。

さらに、バルプロ酸投与から経時的に未分節中胚葉における振動遺伝子の発現パターンを観察した。投与後 3 時間では野生型胚、KO 胚ともに、遺伝子発現振動の同調性が大きく崩れていた。8 時間後には野生型胚は再び同調性を取り戻していたが KO 胚は同調性が乱れたままであった。このことから *Nrarp* KO マウス胚は遺伝子発現振動を同調させるメカニズムが減弱していることが強く示唆された。

(3) *Hes7* KO による内部ノイズの増加

かけ合わせにより、*Hes7* 遺伝子と *Nrarp* 遺伝子の双方が失われたマウスを作製した。*Hes7*^{-/-}マウスの体節や体軸骨格は大きく乱れ

るが、*Hes7*^{+/-}マウスはほとんど野生型と同じであり異常が見られない。しかし *Nrarp*^{-/-}バックグラウンドにすると *Hes7*^{+/-}マウスの体軸骨格には大きな異常が見られ *Hes7*^{+/-}マウスと同等の表現型になった。*Hes7*^{+/-}マウス胚では未分節中胚葉において *Hes7* の遺伝子発現のばらつきが大きくなることを示した。これらのことから *Nrarp* KO マウス胚は遺伝子発現のばらつきの許容度が低くなっており、ロバスト性が低下していることが示唆された。

(4) 数理モデルの構築

これまでに *Hes7* のフィードバックループに基づいた数理モデルを構築することに成功しているが、そこに *Nrarp* などのフィードバック制御因子を加えた数理モデルを構築した。Notch シグナル活性強度の微調整により、遺伝子発現振動の細胞間での同調が強められていることを示唆する結果が得られた。このことから *Nrarp* のフィードバック調節による Notch シグナル活性強度の微調整が遺伝子発現振動の細胞間の同調のメカニズムの一つであり、形態形成のロバスト性に寄与していることが示唆された。

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 6 件)

1. Matsui, T., and Bessho, Y. (2017) Analyzing ERK signal dynamics during zebrafish somitogenesis. *Methods in Molecular Biology*, 1487, 367-378. https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-6424-6_27 査読なし
2. Nakahata, Y., and Bessho, Y. (2016) The Circadian NAD⁺ Metabolism: Impact on Chromatin Remodeling and Aging. *Biomed Res. Int.*, 2016, 3208429. doi: 10.1155/2016/3208429. 査読有り
2. Matsui, T., Ishikawa, H., and Bessho, Y. (2015) Cell collectivity regulation within migrating cell cluster during Kupffer's vesicle formation in zebrafish. *Front Cell Dev. Biol.*, 3, 27. doi: 10.3389/fcell.2015.00027. 査読有り
3. Fujimuro, T., Matsui, T., Nitanda, Y., Matta, T., Sakumura, Y., Saito, M., Kohno, K., Nakahata, Y., and Bessho, Y. (2014) *Hes7* 3'UTR is required for somite segmentation function. *Sci. Rep.*, 3, 6464. doi: 10.1038/srep06462. 査読有り
4. Akiyama, R., Masuda, M., Tsuge, S., Bessho, Y., and Matsui, T. (2014) An anterior limit of FGF/Erk signal activity marks the earliest future

somite boundary in zebrafish. *Development*, 141, 1104-1109. doi: 10.1242/dev.098905. 査読有り

5. Nitanda, Y., Matsui, T., Matta, T., Higami, A., Kohno, K., Nakahata, Y., and Bessho, Y. (2014) 3'UTR-dependent regulation of mRNA turnover is critical for differential distribution patterns of cyclic gene mRNAs. *FEBS Journal*, 281, 146-156. doi: 10.1111/febs.12582. 査読有り

6. Retnoaji, B., Akiyama, R., Matta, T., Bessho, Y., and Matsui, T. (2014) Retinoic acid controls proper head-to-trunk linkage in zebrafish by regulating an anterior-posterior somitogenetic rate difference. *Development*, 141, 158-165. doi: 10.1242/dev.097568. 査読有り

[学会発表] (計 17 件)

1. Ashimori, A., Nakahata, Y., Matsui, T., and Bessho, Y. Molecular Mechanism to Lengthen the Circadian Period by Low NAD⁺. **第23回日本時間生物学会学術大会** 2016年11月12日~13日名古屋大学豊田講堂 (愛知県名古屋市)

2. Iwamoto, S., Nakahata, Y., Ashimori, A., Matsui, T., and Bessho, Y. The Impact of Decrease in NAD⁺ with Cellular Senescence on the Period of Circadian Gene Expression. **第23回日本時間生物学会学術大会** 2016年11月12日~13日名古屋大学豊田講堂 (愛知県名古屋市)

3. Ashimori, A., Nakahata, Y., Matsui, T., and Bessho, Y. Molecular Mechanism to Lengthen the Circadian Period by Low NAD⁺. **International Symposium on Biological Rhythms** 2016年11月11日名古屋大学豊田講堂 (愛知県名古屋市)

4. Iwamoto, S., Nakahata, Y., Ashimori, A., Matsui, T., and Bessho, Y. The Impact of Decrease in NAD⁺ with Cellular Senescence on the Period of Circadian Gene Expression. **International Symposium on Biological Rhythms** 2016年11月11日名古屋大学豊田講堂 (愛知県名古屋市)

5. Bessho, Y. Dynamics of cellular behavior during zebrafish development. **KRIPIK-SciFiMaS 2016 International Conference** 2016年5月26日 (Purwokerto, Indonesia)

6. Ishikawa, H., Yamada, S., Iino, T., Bessho, Y., Hosokawa, Y., and Matsui, T. Organ size regulation Zebrafish laterality organ. **CDB Symposium 2016**, 2016年3月28日理化学研究所多細胞システム形成研究センター (兵庫県神戸市)

7. 中畑泰和, 別所康全 細胞内 NAD⁺による概日時計遺伝子発現変動の制御 第93回日本生理学会大会 2016年3月23日 札幌コ

ンベンションセンター (北海道札幌市)

8. 山田壮平, 別所康全, 細川陽一郎, 松井貴輝 弾性性質を利用した創傷治癒機構の解明 **第5回細胞競合コロキウム** 2016年3月18日 北海道大学医学部学友会館フラテ (北海道札幌市)

9. Ashimori, A., Nakahata, Y., Matsui, T., and Bessho, Y. NAD⁺の減少は概日時計遺伝子発現周期の延長を惹起する **BMB2015** 2015年12月1日神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

10. 中畑泰和, 芦森温茂, 松井貴輝, 別所康全 概日時計機構および細胞老化における NAD⁺/NAMPT の影響 **BMB2015** 2015年12月1日神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

11. Ashimori, A., Nakahata, Y., Matsui, T., and Bessho, Y. Reduction of intracellular NAD⁺ promotes the extension of periods of circadian clock genes. **日本時間生物学会学術大会** 2015年11月21日東京大学本郷キャンパス伊藤国際学術研究センター (東京都文京区)

12. Yamada, S., Iino, T., Bessho, Y., Hosokawa, Y., and Matsui, T. Mechanical property of epithelial cells affects speed of wound healing. **1st International Symposium on Cell Competition**. 2015年9月10日京都大学芝蘭会館 (京都府京都市)

13. Bessho, Y. The mechanism of the biological clock that controls animal development. **The 4th International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences**. 2015年9月8日 (Yogyakarta, Indonesia)

14. 山田壮平, 飯野敬矩, 別所康全, 細川陽一郎, 松井貴輝 ゼブラフィッシュの創傷治療メカニズム **第37回日本分子生物学会年会** 2014年11月25日パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

15. 石川寛, 山田壮平, 田原直幸, 飯野敬矩, 別所康全, 細川陽一郎, 松井貴輝 正常に機能するクッセル胞を形成するために必要な最小細胞数 **第37回日本分子生物学会年会** 2014年11月25日パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

16. 田原直幸, 別所康全, 松井貴輝 内胚葉細胞を制御することで、膵臓や肝臓の形成を制御する **第37回日本分子生物学会年会** 2014年11月25日パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

17. Nitanda, Y., Kim, W., Matsui, T., Nakahata, Y., Sakumura, Y., and Bessho, Y. A negative feedback loop of Nrarp provides robustness to the somite segmentation clock. **The 62nd NIBB**

Conference Force in Development, 2014年11月17日~18日岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

〔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〕

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/courses/courses308.html>

<http://bsw3.naist.jp/bessho/>

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・准教授

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)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：50324968