

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07423

研究課題名(和文)脊椎動物体節形成における時空間情報の統合機構の解析

研究課題名(英文) Study of the integration of spatio-temporal information in vertebrate somitogenesis

研究代表者

矢部 泰二郎 (Yabe, Taijiro)

基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・助教

研究者番号：30470074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の体節形成は分節時計とwavefrontにより作られる時空間情報により制御されることが知られている。本研究ではゼブラフィッシュ体節形成においてこれらの時空間情報が統合され、体節形成を制御する分子機構の解明を試みた。

rippy変異体の解析から、ゼブラフィッシュの体節形成時の時空間情報の統合において、分節時計の停止はこれまで考えられてきたようには重要ではないことを明らかにした。さらに、ゼブラフィッシュの体節形成においてHer1/Her7とERKシグナルがそれぞれrippyの発現を抑制することにより、時空間情報が統合され体節の分節境界が周期的に形成されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚発生において、胚体内に形成される時空間情報をもとにして細胞の分化や増殖が厳密に制御されることにより、動物の複雑な体の構造は形成されると考えられているが、時間情報と空間情報が統合され個々の細胞の挙動を制御する仕組みについては不明な点が多く残されている。本研究において筆者は小型魚類であるゼブラフィッシュの体節形成において分節時計とwavefrontによって作られる時空間情報が統合され、体節の分節境界を作る仕組みを明らかにした。分節時計と同じような仕組みは神経や筋肉の形成にも利用されていることが知られており、本研究の成果は脊椎動物の器官形成を広く理解するうえでも重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In vertebrate, somitogenesis is known to be regulated by spatio-temporal information generated by cyclic activation of segmentation clock and posterior regression of wavefront respectively. In this study, I tried to identify the molecular mechanisms controlling the somite boundary formation in the downstream of segmentation clock and wavefront.

First, analysis of the phenotype of ripply1/rippy2 double mutant revealed that the significance of cessation of segmentation clock in somite boundary formation was less than previously predicted by theoretical model. Furthermore, I revealed that spatio-temporal information was integrated through the regulation of ripply expression during zebrafish somitogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：体節形成 時空間情報 ripply 分節時計 組織形成

1. 研究開始当初の背景

発生過程において個々の細胞の分化や増殖が時空間的に厳密に制御されることにより動物の体の持つ複雑な構造は形成される。そのような細胞の振る舞いはそれぞれの細胞が自律的に形成する、または細胞周囲の胚内環境に形成される時間情報と空間情報によって制御されると考えられる。このような時空間情報をもとにした組織形成の制御機構の基本的原理を理解するため、ゼブラフィッシュの体節形成における時空間情報の統合機構に注目して研究をおこなった。

体節は脊椎動物の発生過程において一過的に形成される繰り返し構造であり、その分節性は最終的に脊椎骨や骨格筋に引き継がれる。発生過程において体節は前駆細胞である未分節中胚葉の前方部に周期的に個々の体節を区分する分節境界が形成されることにより、前方部より順次形成される(図1参照)。そのような体節形成の周期性は『clock and wavefront』モデルにより説明できることが知られている。このモデルではPSMの個々の細胞が持つ分節時計の周期的な活性化により作られる時間情報と体軸の後方伸長に伴い後方へと移動する wavefront により作られる空間情報が PSM 前方部において統合されることにより周期的に分節境界が形成される。それまでの研究においてゼブラフィッシュにおいては分節時計の分子実体として転写抑制因子 *Her1/Her7* の発現振動が、また wavefront の分子実体として *Fgf/ERK* シグナルの活性勾配がそれぞれ同定されていた。

またマウスにおいては転写因子 *Mesp2* の発現を介して時空間情報が統合されると考えられているが、筆者らは以前にゼブラフィッシュ *mesp* 四重変異体において分節境界がほぼ正常に形成され得ることから、ゼブラフィッシュにおいて *mesp* は時空間情報の統合に必ずしも必要でないことを報告している。また、ゼブラフィッシュにおいてはこれらの時空間情報の統合機構として『Phase gradient モデル』が提唱されていた。このモデルでは時間情報が PSM 前方部において分節時計に作用し、その振動を停止させる。それによって固定化された位相をもとに予定体節部に前後極性が形成され、それにより作られる空間パターンをもとに分節境界が形成されるというものである。しかしながら、本モデルは分節時計遺伝子 *her1* の発現パターンをもとに作られた数理モデルにより予測されたものであり、実際の体制つ形成において分節時計の停止が果たす役割については全く明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究ではゼブラフィッシュの体節形成において、分節時計により作られる時間情報と wavefront のより作られる空間情報が統合され、分節境界形成を制御する分子機構を発現制御ネットワークのレベルで理解することを目的とする。

3. 研究の方法

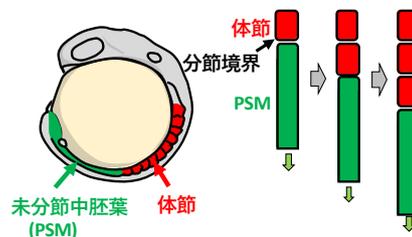
これまでに脊椎動物の体節分節境界の位置はPSMにおいて発現する *Tbx6* タンパクの発現の前方境界により規定されることが知られていた。また筆者らのグループの研究は、このような *Tbx6* の発現領域の前方境界形成は *rippy* により制御されることを明らかにしてきた。本研究では分節時計と wavefront による *Ripply* の発現制御機構に注目して解析を行うことにより、時空間情報の統合機構を遺伝子発現制御ネットワークとして理解することを試みた。

4. 研究成果

①分節時計停止機構の解析

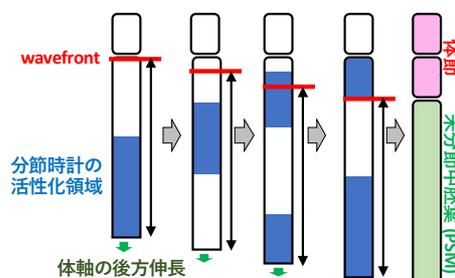
これまでゼブラフィッシュ体節形成において比較的広く受け入れられていた『phase-gradient モデル』では、分節時計が停止することにより固定化された位相が分節境界形成に重要な役割を果たすと考えられてきたが、実験的に分節時計の停止と分節境界形成の関係についてはほとんど明らかにされていなかった。その理由として脊椎動物の分節時計の停止を制御する分子機構が全く明らかにされていなかったことが考えられる。本研究において筆者は *rippy1/rippy2* 二重変異体胚において PSM 前方部において分節時計が停止せず、沿軸中胚葉前方部においても分節時計構成因子である *her1/her7* の発現振動が維持されていることを見出し

図1 脊椎動物の体節形成



脊椎動物の体節は前駆細胞であるPSMの前方部に周期的に分節境界が形成されることにより順次形成される

図2 "Clock and Wavefront" モデル



周期的に活性化する分節時計の波と体軸の後方伸長に伴い後方へと移動する空間情報がPSM前方部で統合され分節境界が形成される

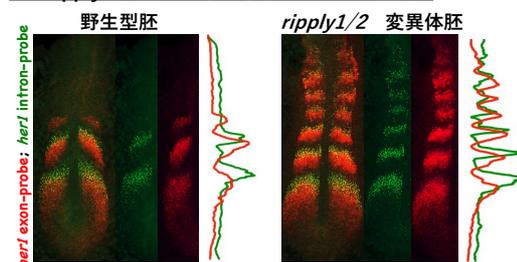
た。一方、*tbx6* 遺伝子を欠損する *fused somite* 変異体胚では、PSM 前方部での分節時計構成因子である *her1/her7* の発現が消失しており、*rippy1/rippy2/tbx6* 三重変異体は *her1/her7* の発現に関しては *tbx6* 単独変異体と同様の表現型を示した。*her1* 転写開始点の上流には *Tbx6* の結合配列が存在し、培養細胞を用いたレポーターアッセイを行ったところ、*Tbx6* の導入による *her1* プロモーターの活性化が確認された。さらに、このような *Tbx6* 依存的な *her1* プロモーターの活性化は *Ripply 1* または *Ripply 2* の導入により抑制されたことから、*Ripply* は *Tbx6* の抑制、分解を介して *her1/her7* の発現を負に制御することにより分節時計の停止を制御すると考えられた。このことより『Phase gradient モデル』で予測されたように分節時計の停止が分節境界の形成を制御しているのではなく、分節境界の形成と分節時計の停止は *Ripply* を介した *Tbx6* の分解によってパラレルに制御されていると考えられた。

② *rippy1* の発現制御機構の解析

マウス体節形成において PSM 前方部における *rippy1/rippy2* の発現は転写因子 *Mesp2* によって制御されることが知られている。一方、筆者らは既にゼブラフィッシュにおいて *mesp* は PSM における *rippy1/rippy2* の発現には必ずしも必要でないことを報告しており、ゼブラフィッシュ体節形成における *rippy* の発現制御機構は未解明のまま残されていた。そこで本研究ではゼブラフィッシュ *rippy* の発現制御機構に注目して解析を行った。ゼブラフィッシュ体節形成において *rippy1* と *rippy2* はストライプ状に発現するが、その発現領域は分節時計構成因子 *Her1* タンパクの発現部位とは相互排他的であることを見出した。このことは、分節時計構成因子である *Her1* が *rippy* の発現に対し抑制的に作用する可能性を示していた。つぎに、その可能性を変異体および過剰発現胚を用いて検討した。*her1/her7* 二重変異体胚では *rippy1* と *rippy2* はストライプ状の発現を示さずに PSM 前方部において一様に発現していた。一方で、*hsp* プロモーターをもちいて *her1* を一過的に胚全体で発現させた胚では、PSM 前方部における *rippy1* および *rippy2* の発現が著しく減少したことより、PSM 前方部において分節時計構成因子である *Her1/Her7* は *rippy* の発現に対し抑制的に作用することが明らかになった。次に、*Her1* による *rippy* の発現抑制機構を明らかにするために *rippy2* の発現制御領域を単離し、培養細胞を用いたレポーターアッセイを行った。*rippy2* の転写開始点から上流 8kbp の遺伝子断片に蛍光蛋白 *mclover* cDNA を結合したコンストラクトを導入したトランスジェニックフィッシュにおいて、*mclover* の発現は内在性の *rippy2* の発現と完全に一致したことから、本領域は内在性の *rippy2* の発現を再現するのに十分な領域を含んでいると考えられた。次に、こうして単離されたプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を繋いだコンストラクトを用いてレポーターアッセイを行った。*rippy2* の発現制御領域には *Tbx6* の結合配列と思われる配列が存在し、実際に *Tbx6* の導入により *rippy2* プロモーターは活性化され、そのような *Tbx6* 依存的なプロモーターの活性化は *Her1* の導入により抑制された。さらに、*rippy2* のプロモーター上には複数の *Her1* 結合配列と類似した配列が点在しており、それらに変異を導入することにより *Her1* 依存的な転写抑制は著しく減弱した。これらの結果より分節時計構成因子である *Her1* は直接的に *rippy* プロモーターに結合することにより、その発現を抑制していると考えられた。

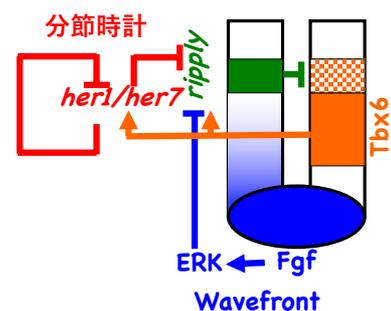
マウス体節形成において *Fgf/ERK* シグナルは *Mesp2* の発現を抑制することにより、分節境界形成を制御すると考えられているが、前述のようにゼブラフィッシュでは *mesp* が分節境界形成には必須でないことが明らかにされており、wavefront の分子実体である *Fgf/ERK* シグナルが体節形成を制御する仕組みはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では *Fgf/ERK* シグナルによる *rippy* の発現制御機構に注目して解析を行った。分節時計の影響を排除するために *her1/her7* 二重変異体における *rippy* の発現領域と *ERK* の活性化部位を比較したところ、*rippy* の発現領域の後方境界は *ERK* の活性化部位の前方境界とほぼ一致することが明らかになった。さらに、*ERK* の活性化を抑制するため *MEK1* 阻害剤で *her1/her7* 二重変異体胚を処理すると *ERK* の活性化の消失に伴い、*rippy* の発現領域は *Tbx6* の発現領域の後端まで拡大した。また、*msgn-gal4* ドライバーラインを用いて沿軸中胚葉全体で恒常的活性型の *MEK1* を過剰発現した胚では、沿軸中胚葉全体で *ERK* の活性化が見られるとともに、*rippy* の著しい発現減少がみられた。また、培養をもちいたレポーターアッセイにおいても *Tbx6* 依存的な *rippy2* のプロモーターの活性化は *ERK* の活性化により抑制された。これらのことより、ゼブラフィッシュの体節形成において *Fgf/ERK* シグナルは PSM 後方部において *rippy* の発現を抑制することにより分節境界の形成する位置を制御していると考えられた。これらの結果よりゼブラフィッシュ体節形成において *Tbx6* と

図3 *rippy* 変異胚にみられる分節時計の停止異常



Ripply1/2 を欠損する胚では分節時計遺伝子 *her1* の波状の発現が前方部へと拡大する

図4 ゼブラフィッシュ体節形成の制御ネットワーク



rippy, *her1/her7*, Fgf/ERK シグナルは図4で示すような転写ネットワークを構成すると考えられた。すなわち、時間情報である wavefront は Fgf/ERK シグナルを介して PSM の後方部において *rippy* の発現を抑制し、分節時計は Her1/Her7 が *rippy* のプロモータに直接作用することにより PSM 前方部において周期的に *rippy* の発現を抑制する。このようにして、PSM 前方部において周期的に発現する *Ripply* は Tbx6 を分解することにより、体節の分節境界を形成するとともに分節時計を停止させていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ban Hiroyuki, Yokota Daisuke, Otsuka Shiori, Kikuchi Morimichi, Kinoshita Hirofumi, Fujino Yuuri, Yabe Taijiro, Ovara Hiroki, Izuka Ayaka, Akama Kagari, Yamasu Kyo, Takada Shinji, Kawamura Akinori	4. 巻 146
2. 論文標題 Transcriptional autoregulation of zebrafish tbx6 is required for somite segmentation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.177063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Hirofumi, Ohgane Nanae, Fujino Yuuri, Yabe Taijiro, Ovara Hiroki, Yokota Daisuke, Izuka Ayaka, Kage Daichi, Yamasu Kyo, Takada Shinji, Kawamura Akinori	4. 巻 152
2. 論文標題 Functional roles of the Ripply-mediated suppression of segmentation gene expression at the anterior presomitic mesoderm in zebrafish	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mechanisms of Development	6. 最初と最後の頁 21~31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mod.2018.06.001	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 矢部泰二郎 高田慎治
2. 発表標題 Molecular mechanisms for the positioning of somite boundaries in zebrafish
3. 学会等名 14th International Zebrafish Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taijiro Yabe and Shinji Takada
2. 発表標題 "Molecular mechanisms for the positioning of somite boundaries in zebrafish"
3. 学会等名 oint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taijiro Yabe and Shinji Takada
2. 発表標題 “ The molecular mechanism for the termination of segmentation clock during zebrafish somitogenesis ”
3. 学会等名 3th International Zebrafish Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taijiro Yabe and Shinji Takada
2. 発表標題 “ Molecular mechanisms for the positioning of somite boundaries in zebrafish ”
3. 学会等名 第24回小型魚類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢部泰二郎、高田慎治
2. 発表標題 『ゼブラフィッシュ体節形成における時空間情報の統合機構』
3. 学会等名 JSDB秋季シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢部泰二郎、高田慎治
2. 発表標題 Molecular mechanism to convert the segmentation clock into the segmental pattern of somites in the zebrafish
3. 学会等名 50th Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------