

機関番号：82601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570215

研究課題名（和文）マウス体節パターン形成における Notch リガンド Dll1, Dll3 の機能的差異

研究課題名（英文）Functional difference between Notch ligands Dll1 and Dll3 in mouse somitogenesis

研究代表者

高橋 雄（TAKAHASHI YU）

研究者番号：60321858

研究成果の概要（和文）：Notch リガンド Dll1 と Dll3 の遺伝子を置換し、Dll1 の代わりに Dll3 を発現するノックインマウスを作製し、体節形成及び分子時計に対する影響を解析した結果、Dll3 は Notch リガンドとしては機能せず抑制的な調節因子として働くことが示唆された。またこのノックインマウスでは Notch シグナルの振動がないにも関わらず脊椎骨の椎体が分節していたことから、Notch シグナルとは異なる機構の関与が予測された。

研究成果の概要（英文）：We generated a Dll3-knockin mouse, which express Dll3 instead of Dll1, and analyzed effects on somitogenesis and molecular clock mechanism. Our results suggested that Dll3 is not a Notch ligand but acts as a suppressive modulator. In addition, these mice showed segmentation of vertebral body without Notch signal oscillation, implying presence of another mechanism.

交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,600,000	0	1,600,000
21年度	1,200,000	0	1,200,000
22年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	0	3,800,000

（金額単位：円）

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：体節形成、Notch シグナル、マウス、遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の体節の規則正しい繰り返しパターンは、体節を形成する未分節中胚葉に内在する分子時計に依存している。分子時計には Notch シグナリングが関わっている。多細胞組織である未分節中胚葉において、Notch シグナルを細胞から細胞へと伝達するためには細胞表面に発現する Delta や Serrate のような Notch リガンドが必要である。脊椎動物の未分節中胚葉には、生物種によって少し

ずつ異なる Notch リガンドが存在する。マウス胚の未分節中胚葉には、Delta-like1 (Dll1), Delta-like3 (Dll3) の2種類の Notch リガンドが発現しているが、それらの機能的な差異についてはほとんどわかっていない。マウスでは遺伝子ターゲティングによるノックアウトマウスの解析から、Dll1 と Dll3 は異なる機能をもつことが示唆されている。

我々はこれまでに Dll1, Dll3 に加えて、

転写因子 *Mesp2*, Notch シグナリングを仲介する PS-1 の 4 種の遺伝子のノックアウトマウスを用いた発生遺伝学的解析を行い、D111, D113 のシグナルに対して PS-1 が異なる関与をすること、D113 のシグナリングは PS-1 依存的な D111 のシグナリングと拮抗することなどを見出ししてきた (Takahashi et al., 2003)。これらの結果からも、D111 と D113 は異なる機能をもつことが示唆された。

## 2. 研究の目的

そこで、我々はマウス胚において、D111 と D113 の遺伝子を置換し、D111 の代わりに D113 を発現するノックインマウスを作製し、体節形成及び分子時計の振動を含む遺伝子発現パターンに対する影響を解析することで、D111 と D113 の機能的差異を解明したいと考えた。

## 3. 研究の方法

*in vivo* でマウス体節パターン形成における D111 と D113 の機能的差異を明らかにするため、D111 遺伝子座に D113 をノックインし、D111 の代わりに D113 を発現するノックインマウスを作製し、体節形成及び分子時計の振動を含む遺伝子発現パターンに対する影響を解析する。

この D113 ノックインマウスのホモ胚の形質を、コントロールとなる D111 ノックアウト胚と比較し、D111 の欠損による異常が D113 によってレスキューされるかどうか、つまり D113 は D111 の機能を代替できるかどうか、あるいは新たに異常な表現型がみられるか解析する。また、D113 ノックインマウスのヘテロ胚の形質を正常胚と比較し、過剰な D113 の発現が体節パターン形成にどのような影響を及ぼすかを解析する。具体的には体節の形態形成 (分節化、上皮構造)、体節に由来する脊椎骨・肋骨の形態、未分節中胚葉における Notch シグナル (Notch 細胞内ドメイン)、Hes7, lunatic fringe の mRNA あるいはタンパクの局在、その他の Notch シグナル標的遺伝子、体節関連のマーカー遺伝子の発現を *in situ* hybridization、免疫組織化学、二重染色等の手法で検討する。

## 4. 研究成果

1) 体節形成において D113 は D111 の機能を代替しない

マウス D111 遺伝子座に対して D113 遺伝子及びネオマイシン耐性遺伝子、CAT 遺伝子を

挿入するターゲティングベクターを作成し、TT2 細胞にエレクトロポレーションし、ネオマイシン耐性クローンを得た。PCR により相同組み替えクローンを 2 クローン選択した。野生型マウスとの凝集キメラを作製し、交配によりヘテロマウスを得た。Cre 及び *flp* マウスとの交配でネオマイシン耐性遺伝子、CAT 遺伝子を除去し、D111 の代わりに D113 を発現するノックインマウスを作製した。この D113 ノックインマウスのホモ胚、ヘテロ胚について、体節形成及び分子時計の振動を含む遺伝子発現パターンに対する影響を解析した。

ホモ胚は D111 ノックアウト胚と同様の形態であった。D113 の発現を検討したところ、ヘテロ胚、ホモ胚ともに神経管の ventral 側に強い D113 のシグナルが観察された。ヘテロ胚では体節で本来の D113 の発現に加えて、D111 の発現領域に明確な D113 の発現がみられたが、体節は正常に形成されている。ホモ胚では D111 ノックアウト胚と同様に *Uncx4.1*, *EphA4* の発現がほとんど失われていた (図 1)。また Notch シグナルにより振動する *Hes7*, *lunatic fringe* の発現についても D111 ノックアウト胚と同様であった。

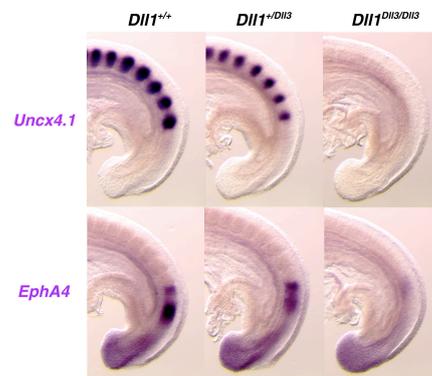


図 1 D113 ノックインマウス胚における *Uncx4.1*, *EphA4* の発現

この D113 ノックインアレルを D113 ノックアウトのバックグラウンドに導入したダブルヘテロ個体が得られた。これを用いて D113 ノックアウトの状態に D111 の発現領域に D113 を発現した場合にどのような表現型を示すかを解析した。まず D113 の発現を確認したところ、未分節中胚葉全体で発現していることが確認された。この胚では体節が正常に形成されているように見え、さらに体節の前後極性を検討するため *Uncx4.1* の発現パターンをみると、正常に体節後半部に局在しており、また分子時計を反映する *L-fng* の発現を検討したところ、D113 ノックアウト胚では局在しない未分節中胚葉前方のストライプが局在している像が観察された。さらに骨格標本を観察すると、D113 ノックアウトと比較

して脊椎骨、肋骨の形成は明らかに回復していることがわかった。このように D113 ノックアウトの表現型が D113 ノックインアレルによってレスキューされることから、機能的な D113 が発現していることが確認された(図 2)。

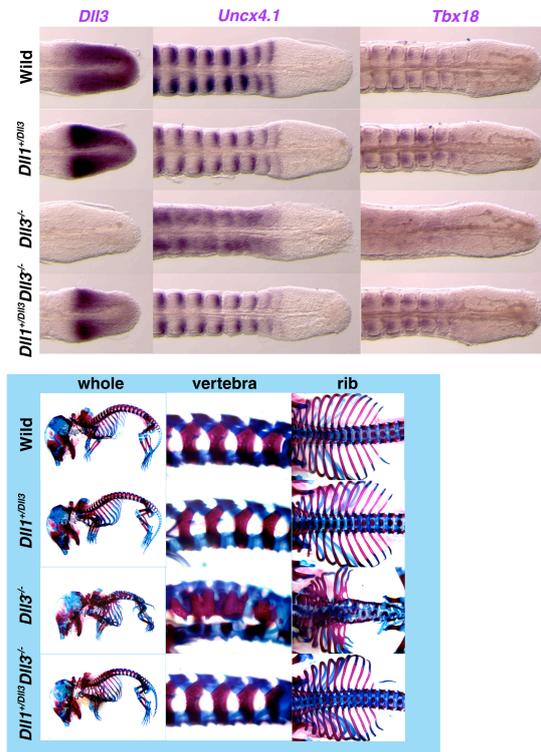


図 2 D113 ノックインアレルによる D113 ノックアウトの表現型の回復

これらの観察により、D113 ノックインマウスでは分子時計の振動および体節形成は回復しないことから、体節形成において D113 は D111 の機能を代替しないことがわかった。

## 2) D113 ノックインマウスのヘテロ胚では頸椎の神経弓に異常が観察される

また、D113 を過剰に発現するヘテロ胚では、体節形成はほとんど正常に見えるが、骨格標本を詳細に観察した結果、頸椎の神経弓が部分的に欠損していることがわかった(図 3)。さらに頸椎領域の体節において、神経弓の形成を指定するホメオボックス遺伝子 *Uncx4.1* の発現が低下していることがわかった。*Uncx4.1* の発現は Notch シグナリングの下流にあると考えられることから、この結果は生化学的研究で提唱されたように D113 はむしろ Notch シグナリングの負の制御因子とし

て働いている可能性を示唆するものである。

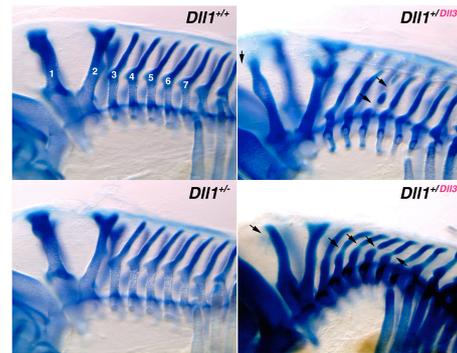


図 3 D113 ノックインマウスのヘテロ胚では頸椎の神経弓に部分的欠損がみられる

## 3) 脊椎骨の椎体の分節化には Notch シグナリングの振動とは別のメカニズムが関与している

またこの D113 ノックインマウスのホモ胚では、D111 ノックアウトマウスと同様に体節形成は起こらないが、脊椎骨のうち椎体部分には分節化がみられることから、椎体の分節化には Notch シグナリングの振動による周期性とは別のメカニズムが関与していると考えられた(図 4)。

そこで、体節が形成されない D111 ノックアウトマウスと *Mesp2* ノックアウトマウスにおいて、椎体の分節化はどのように生じているのか解析するため、新たに体節後半部の発生運命を追跡する *Uncx4.1-LacZ* トランスジェニックマウスを用いた解析を開始した。脊椎動物のうち羊膜類で体節から脊椎骨の椎体が生じる際には、1 個の体節の後半部が次の体節の前半部と結合する再分節化という過程を経る。ニワトリ胚では再分節化の過程が移植実験によって実証されているが、マウス胚では古典的な記載しかなくされていない。マウス胚における再分節化の過程を明らかにするため、まず野生型の *Uncx4.1-LacZ* トランスジェニックマウスにおいて脊椎骨の形成過程を観察した。その結果、体節後半部の細胞から椎間板と椎体の前半部が生じることが確認された。また脊椎骨の各領域(頸椎、胸椎、腰椎、仙椎、尾椎)において、脊椎骨形成の様式は少しずつ異なっていた。次に *Mesp2* ノックアウトマウスのバックグラウンドでは、体節中胚葉全体が *Uncx4.1-LacZ* を発現し  $\beta$  ガラクトシダーゼ染色されたが、脊椎骨のうち神経弓は顕著に癒合していたのに対して、椎間板と椎体の交互的分節構造は形成された。*Mesp2* ノックアウトマウスでは、後方化した体節中胚葉から椎間板と椎体

の両方が形成されていた。これらの観察結果から、体節の分節化と前後パターンの形成は、椎間板と椎体の繰り返しパターン形成に必須ではなく、その規則性に必要であると考えられた。

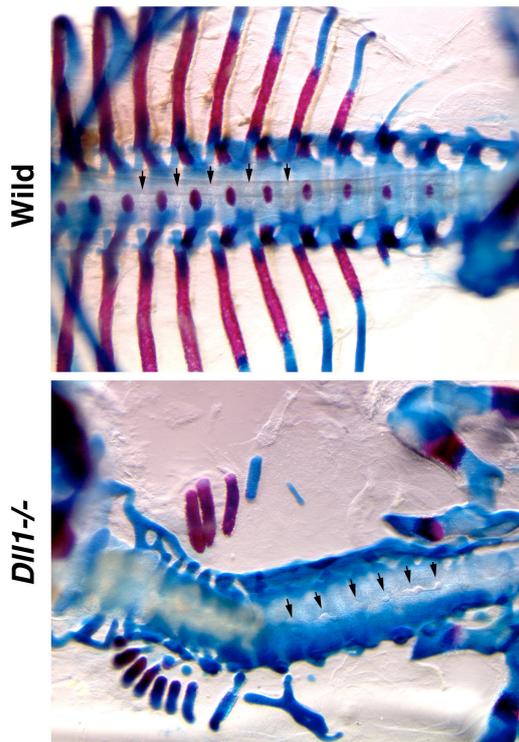


図4 DII1 ノックアウトの状態でも椎間板と椎体の分節構造は形成される

##### 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2件)

①\*Oginuma, M., \*Takahashi, Y., Kitajima, S., Kiso, M., Kanno, J., Kimura, A., Saga, Y. The oscillation of Notch activation, but not its boundary, is required for somite border formation and rostral-caudal patterning within a somite. *Development*, 137, 1515-1522. (2010) (\*First 2 authors equal contribution) 査読有

② Yasuhiko, Y., Kitajima, S., Takahashi, Y., Oginuma, M., Kagiwada, H., Kanno, J., and Saga, Y. Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm-specific enhancer of *Mesp2*. *Development* 135, 3511-3519. (2008) 査読有

[学会発表] (計5件)

① 高橋 雄, 安彦行人, 相賀裕美子, 菅野純: Segmentation and rostro-caudal patterning of somites is not essential for metameric pattern of vertebral body/intervertebral disc formation.

第43回日本発生生物学会 (2010.6) 京都

② 高橋 雄, 安彦行人, 相賀裕美子, 菅野純: Segmentation and rostro-caudal patterning of somites is not essential for vertebral body segmentation.

第32回日本分子生物学会 (2009.12) 横浜

③ 高橋 雄, 北嶋 聡, 安彦行人, 菅野純, 相賀裕美子: Novel mouse Delta-like 1 (DII1) alleles yield insights into involvement of Notch signal in segmentation of vertebrae.

BMB2008 (2008.12) 神戸

④ 高橋 雄, 北嶋 聡, 安彦行人, 菅野純, 相賀裕美子: Overexpression of Delta-like 3 (DII3) in the presomitic mesoderm causes defects in the axial skeletal formation.

第3回 Notch 研究会 (2008.7) 三島

⑤ 高橋 雄, 北嶋 聡, 安彦行人, 菅野純, 相賀裕美子: Delta-like 3 (DII3) does not substitute for Delta-like 1 (DII1) in somitogenesis in vivo but modulates DII1/Notch signaling in the posterior PSM.

第41回日本発生生物学会 (2008.5) 徳島

[図書] (計2件)

① 高橋 雄 他多数: “生物学辞典”, 石川統 他編, 東京化学同人, 東京 (2010), pp1600

② 高橋 雄: “4章 2-II) ホールマウント in situハイブリダイゼーション”, 改訂第5版 新遺伝子工学ハンドブック, 村松正実, 山本雅, 岡崎康司編, 羊土社, 東京 (2010), pp155-159

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 雄 (TAKAHASHI YU)  
国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長  
研究者番号：60321858

### (3) 連携研究者

北嶋 聡 (KITAJIMA SATOSHI)  
国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長  
研究者番号：30270622

安彦 行人 (YASUHIKO YUKUTO)  
国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任  
研究官  
研究者番号：40370944