

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651230

研究課題名(和文) Gene dosage を利用したマウス個体での Notch シグナル活性の調節

研究課題名(英文) Alteration of the level of Notch signaling activity in mouse embryo by gene duplication of Notch

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) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：動的な生命現象の動作原理を解析するためには、細胞内シグナル活性を操作することは有効である。しかしそれを安定的かつ定量的に制御することは困難である。我々はマウスにおいて Notch1 遺伝子の遺伝子座を重複させることを試みた。このノックインマウスラインでは、Notch1 遺伝子座の数が 0 個から 4 個までのマウスを作製することが出来、Notch シグナル活性を定量的に変化させることができる。このノックインマウスによって、例えば体節形成などの動的な生命現象において Notch シグナル活性強度の変化の影響が解析できる。

研究成果の概要(英文)：Manipulation of intracellular signaling activity in embryos is an effective tool for analysis of dynamic phenomena in developing embryo. However, it is very difficult to alter the intracellular signaling activity stably and quantitatively. We tried to generate knockin mice in which Notch1 gene is duplicated, thereby increasing the number of Notch1 allele. By using this knockin mice, we can generate mouse embryos with various number of Notch1 allele from 0 to 4, thus we can stably and quantitatively alter the Notch signaling activity in this knockin mouse line. With this Knockin mouse the analyses of Notch signal activity in dynamic phenomena in embryo such as somitogenesis are available.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：システムゲノム科学

キーワード：Notchシグナリング ノックインマウス 体節形成

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の発生過程において体節は、胚の最尾部の未分節中胚葉が分節化されることで形成される。ここでは Notch シグナル依存的に遺伝子の発現が振動しており、その周期性を利用して周期的に分節化され、均等大きさの体節が形成される。未分節中胚葉ではすべての細胞が Notch およびそのリガンドである Delta を発現している。我々は最近、遺伝子発現の振動周期が Notch シグナル強度に依存して変化することを発見した。具体的には、マウスの体節分節化周期 (= 振動周期) は約 120 分であるが、Notch 活性が 2 倍程度に増強されると周期が約 5 分延長する。未分節中胚葉の細胞一つ一つで遺伝子の転写の振動がおこっており、細胞間で振動が同調することで、組織全体で同調した振動が作り出される。Notch シグナルが同調に必須であると考えられているが、メカニズムの詳細は不明であった。我々は、未分節中胚葉の各細胞が、Notch 活性を検知し、その情報に基づいて自身の周期を変化させることで近隣細胞との同調性を保っているというモデルを提唱している。

体節形成周期が Notch シグナル活性に依存していることは明らかになったが、さらなる定量的な解析のためには、マウス胚の個体レベルで Notch 活性を人為的に操作できる系が必要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

マウス胚のレベルで Notch シグナル活性を変化させるために、我々は Notch1 遺伝子座を重複させたマウスを作製することを着想し、遺伝子組み換え技術によりそれを実現しようとした。具体的には Notch1 遺伝子座において Notch1 遺伝子をタンデムに重複させ、逆のアリルは Notch1 遺伝子が欠失しているマウスを作製する。つまり、個体レベルでは Notch1 遺伝子は 2 つ存在するために野生型マウスと同じ数の Notch1 遺伝子を持っていることになる。この遺伝型のマウス同士を交配させると、ゲノム中の Notch1 遺伝子の数が 0 から 4 までのマウスを作製することができる。

cell-cell communication 依存的な Notch シグナルは、隣接する細胞の膜表面に存在する Delta と結合することによって活性化され、細胞内ドメイン (Notch intracellular domain, NICD) が核に移行して標的遺伝子の転写を活性化する。細胞膜上の Notch 分子

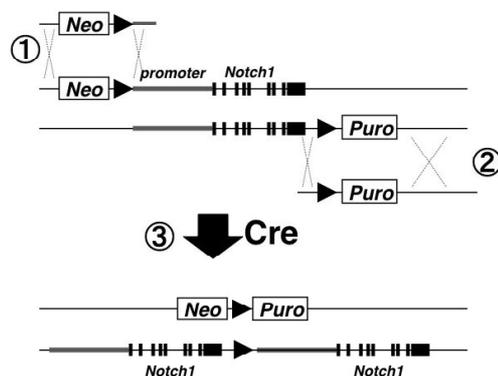
を増やせば、細胞外の情報が Notch シグナルに変換される効率が高まると考えられる。すなわち、Notch 分子の数を調節することで、シグナルの変換効率 (レバレッジ率) を調整できる。この手法で定量的にパラメータを変化させることができれば、数理モデルの検証が可能になり、生命現象の動作原理の理解につながると期待される。



## 3. 研究の方法

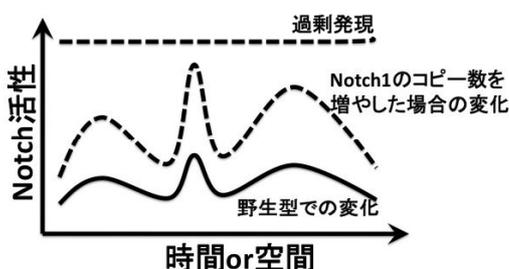
マウスゲノムの Notch1 遺伝子を重複させる。マウス ES 細胞において、対立遺伝子のうち、一方の allele のプロモーター領域を含む Notch1 遺伝子の 5'側に loxP 配列を挿入する。続いて、もう一方の allele の Notch1 遺伝子の 3'側に loxP 配列を挿入する。得られた ES 細胞クローンに Cre リコンビナーゼを発現させ、loxP 配列が相互に組み換えを起こしたクローンを選別する。得られたクローンでは一方の allele で Notch1 が欠失しており、他方の allele で Notch1 がタンデムに重複していることが期待される。そのクローンからキメラマウスを作製し、F1 世代を相互に掛け合わせて、遺伝型によってそれぞれ Notch1 を 0 コピーから 4 コピー持つマウスを作製する。

## 4. 研究成果



Notch1 遺伝子を重複させるために、ノックインベクターを作製した。ES 細胞にノックインベクターをトランスフェクションし、抗生物質でセレクションして、組み替えが起こっている細胞をセレクションした。

しかし、正しく組み替えが起こっている細胞を得ることができなかったため、ベクターを作り直して再度チャレンジする予定である。



本研究では、本来の遺伝子座にある遺伝子を重複させる手法によって上記の問題を解決することを試みる。つまり、Notch1の遺伝子量を変化させ、Notchシグナル活性を定量的に変化させることが可能になる。類似の方法との比較-活性型Notch(NICD)の過剰発現では恒常的にNotch活性が高まっているが、本手法ではcell-cell communication依存性、すなわちDeltaからの刺激依存的な活性を示す。外来プロモーターを使ったNotch1の過剰発現ではNotch1遺伝子の発現が制御されないが、本手法では、内在性プロモーターを使うために、本来の時空間的な変化を保ったまま、Notch活性がエンハンスされることが期待される。

#### 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 6 件)

1. 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
2. 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
3. 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

4. Tahara, N., Bessho, Y., and Matsui, T. (2013). Celf1 is required for formation of endoderm-derived organs in zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 18009-18023. doi: 10.3390/ijms140918009. 査読有
5. Matsui, T., Sasaki, A., Akazawa, N., Otani, H., and Bessho, Y. (2012). Celf1 regulation of dmrt2a is required for somite symmetry and left-right patterning during zebrafish development. *Development*, 139, 3553-3560. doi: 10.1242/dev.077263. 査読有
6. Matsui, T., and Bessho, Y. (2012). Left-right asymmetry in zebrafish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 3069-3077. doi: 10.1007/s00018-012-0985-6. 査読有

[学会発表](計 5 件)

1. Matsui, T., 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, 福岡県福岡市
2. 森本佳世子, 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, 福岡県福岡市
3. Bambang Retnoaji, 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, 京都府京都市
4. Tatsuro Matta, Cell clustering required for proper organogenesis, 第18回小型魚類研究会, 2012年9月22日, 京都府京都市
5. 別所 康全, 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(招待講演), 2012年8月04日, 茨城県つくば市

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

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

なし

(3)連携研究者

作村 諭一 (SAKUMURA, Yuich)  
愛知県立大学・情報科学部・准教授  
研究者番号： 50324968

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