

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5月8日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24657153

研究課題名（和文） 分節時計の周期を変える

研究課題名（英文） Changing the period of the somite segmentation clock

研究代表者

影山 龍一郎 (RYOICHIRO KAGEYAMA)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：80224369

研究成果の概要（和文）：体節は周期的に形成されるが、この周期性は *Hes7* が遅れたタイミングで自己抑制して自律的に発現振動することによる。*Hes7* 遺伝子のイントロン数を削減したところ、速いタイミングで自己抑制が起こり、*Hes7* の発現振動が加速化し、分節時計のリズムが速くなった。さらに、頸部から上位胸部の体節数が増加し、この領域の椎骨数も増加した。したがって、*Hes7* 遺伝子の正常なイントロン数が分節時計の正常な周期に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Periodic somite segmentation is controlled by the cyclic gene *Hes7* whose oscillatory expression depends upon negative feedback with a delayed timing. Here, we show that reducing the number of introns within the *Hes7* gene shortens the delay and results in a more rapid tempo of both *Hes7* oscillation and somite segmentation, increasing the number of somites and vertebrae in the cervical and upper thoracic region. These results suggest that the number of introns is important for the appropriate tempo of the segmentation clock.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：分節時計、イントロン、*Hes7*、発現振動、数理モデル、体節、椎骨、自己抑制

1. 研究開始当初の背景

発生の進行を制御する生物時計の実体については多くの点が不明であるが、唯一明らかにされてきたのが、体節形成過程を制御する分節時計である。体節はマウスでは約2時間毎に形成されるが、この周期的な過程は分節時計によって制御される。我々は、分節過程では転写抑制因子 *Hes7* は自己抑制によって自律的に振動すること、*Hes7* によって多くの下流因子の発現も振動すること、さらに *Hes7* の発現が振動なくなると体節は癒合し、体節由来の組織である椎骨や肋骨も癒合することを明らかにしてきた。さらに、この分節時計における *Hes7* の発現振動は、微分方程式を用いた数理モデ

ルで表されることを示してきた。この数理モデルから、*Hes7* が適度なタイミングで自己抑制することが、安定な発現振動に必須であると予測された。*Hes7* 遺伝子には3つのイントロンがあり、このイントロンの転写およびスプライシングに約20分近くかかっていた。20分早く自己抑制が起こると、数理モデルからは発現振動が起らなくなることが予想されたので、*Hes7* 遺伝子からイントロンを除去したマウスを作製したところ、*Hes7* の発現は定常になり、体節も激しく癒合することがわかった。以上から、数理モデルの予測が正しいことがマウスの変異導入実験で検証された。

今までマウスやゼブラフィッシュを中心

に多くの変異体の解析が行われてきたが、いずれも発現振動が遅くなったり、発現振動が阻害されて体節癒合を引き起こすのみで、2時間周期が有意に短くなるような変異は見つかっていなかった。発生現象の一般的な異常でも分節時計の進行が遅くなったり、分節時計が働かなくなるので、上記の結果からは厳密には Hes7 が分節時計の本体であるという証明にはなっていなかった。

2. 研究の目的

分節時計が加速化するような Hes7 遺伝子の変異がデザインできて、初めて Hes7 が分節時計の本体という証明になる。数理モデルからは、自己抑制を起こすタイミングを適度に短くすることによって分節時計が加速化することが予測された。そこで、本研究では、適度に速いタイミングで Hes7 の自己抑制が起こるような変異を導入し、数理モデルの予測を検証することにした。

3. 研究の方法

Hes7 遺伝子のイントロン数を1個（正常より2個少ない）、あるいは2個（正常より1個少ない）にして自己抑制のタイミングを速くすることによって分節時計の周期がどのように変化するのか、その結果、体節数や椎骨数が増加するのかどうかを解析した。

4. 研究成果

図1に示すように、Hes7 遺伝子のイントロン数を1個あるいは2個にした遺伝子改変マウスを作製した。コントロールとして、Hes7 遺伝子のイントロン数を3個（正常）にしたものと0個にしたものも解析した。

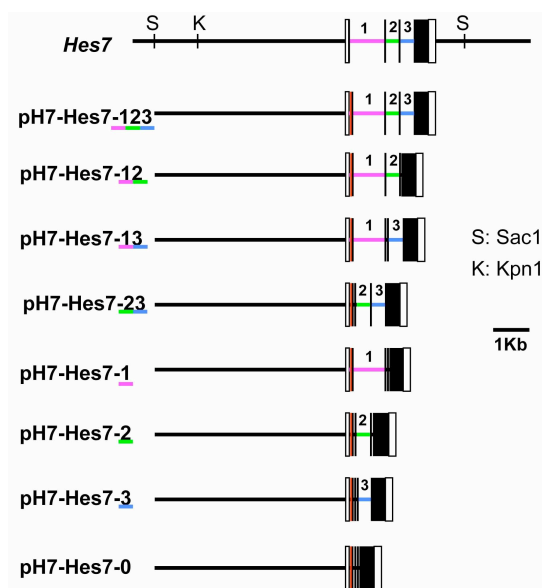


図1：Hes7 遺伝子のイントロンを削減したコンストラクトの模式図。

Hes7 遺伝子のイントロン数を2個にしてもほとんど影響は見られなかったが、1個にした場合、5分早いタイミングで自己抑制が起こり、Hes7 の発現振動と分節時計のリズムが加速化した（図2）。

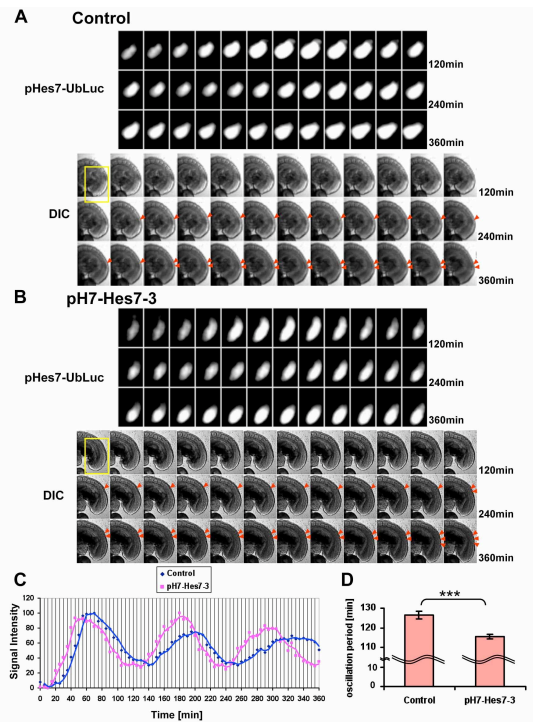


図2：Hes7 遺伝子のイントロン削減による Hes7 の発現振動と分節時計の加速化。

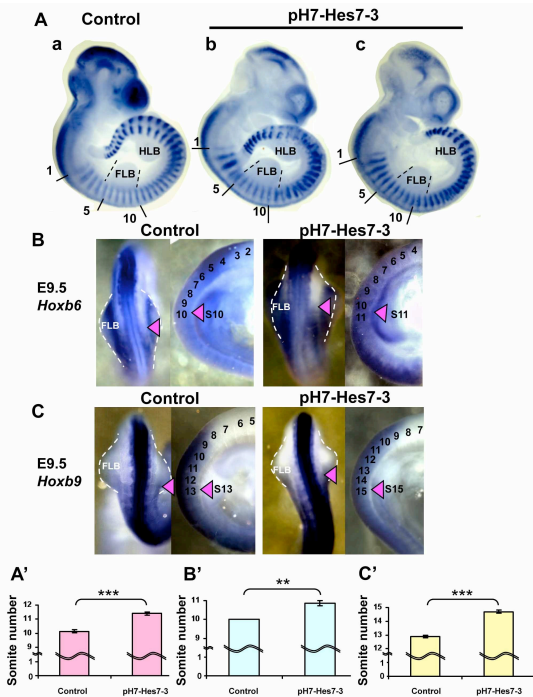


図3：Hes7 遺伝子のイントロン削減による頸部から上位胸部の体節数の増加。

さらに、頸部から上位胸部の体節数が増加し（図3）、個々の体節のサイズは小さくなった（図4）。また、この領域の椎骨数も増加した（図5）。特に、頸椎骨は正常では7個形成されるのに対して、Hes7 遺伝子のイントロン数を1個にしたものは9個形成されていた（図5）。すなわち、数理モデルの予測が正しいことが明らかになった。

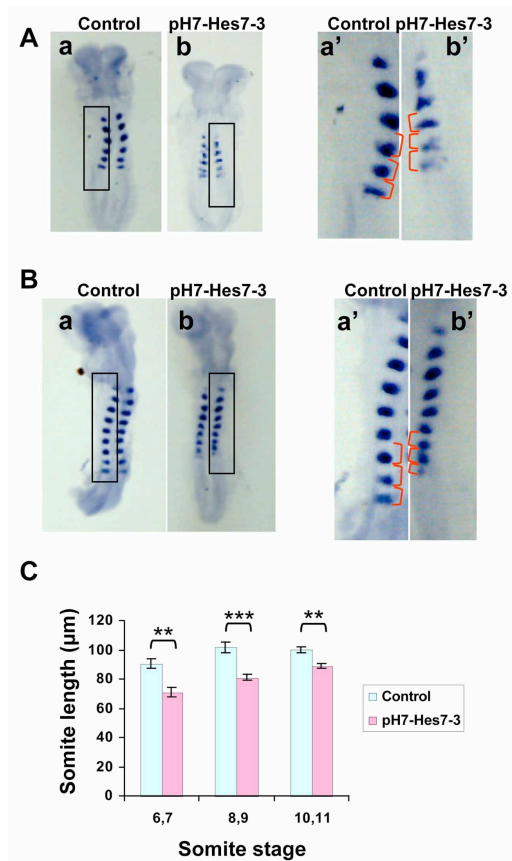


図4：Hes7 遺伝子のイントロンを削減したマウスにおける体節サイズの減少。

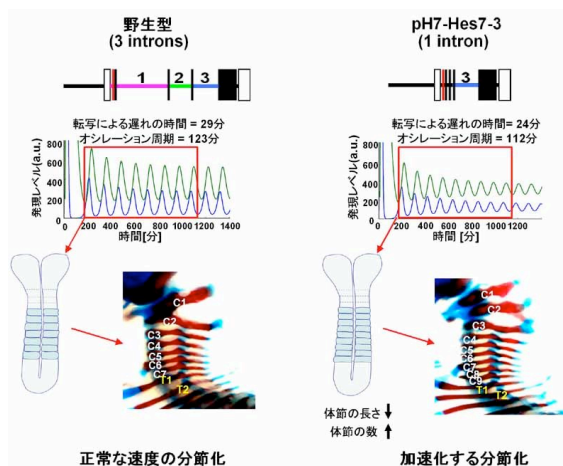


図5：Hes7 遺伝子のイントロン削減による分節時計の加速化と頸椎骨数の増加。

以上から、Hes7 遺伝子におけるイントロンの数が分節時計の正常な周期に重要であることが示され、Hes7 遺伝子は分節時計の周期形成に中心的な役割を担うことが明らかになった。

発生過程で重要な役割を担う遺伝子の多くは、エキソンの塩基配列だけでなく、イントロンの数も進化上よく保存されていることが知られている。エキソンの塩基配列はアミノ酸配列をコードしていることから、進化上保存されていることはよく理解できるが、そのような遺伝情報をコードしないイントロンがなぜ保存されているのかは、よくわかっていなかった。今回の研究から、イントロンの数は正常なタイミングの遺伝子発現に重要であることが初めて明らかになり、進化上保存されていることをよく説明できた。

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2件)

(1) Harima, Y., and Kageyama, R. (2013) Oscillatory links of Fgf signaling and Hes7 in the segmentation clock. **Curr. Opin. Genet. Dev.** in press. 査読有り
DOI: 10.1016/j.gde.2013.02.005.

(2) Harima, Y., Takashima, Y., Ueda, Y., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2013) Accelerating the tempo of the segmentation clock by reducing the number of introns in the *Hes7* gene. **Cell Reports** 3, 1-7. 査読有り
DOI: 10.1016/j.celrep.2012.11.012.
機関リポジトリ[KURENAI アクセス URL]: <http://hdl.handle.net/2433/163492>

[学会発表] (計7件)

- ① Harima, Y., Takashima, Y., Ueda, Y., Ohtsuka, T., and Kageyama, R.: Accelerated tempo of the segmentation clock by reducing the number of introns in the *Hes7* gene. CDB Symposium, 神戸, 3月4日～3月6日, 2013.
- ② Harima, Y., Takashima, Y., Ueda, Y., Ohtsuka, T., and Kageyama, R.: Accelerated tempo of the segmentation clock by reducing the number of introns in the *Hes7* gene. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月11日～12月14日, 2012.
- ③ Kageyama, R.: Hes oscillations in somitogenesis and neurogenesis. Swiss Japanese Developmental Biology Meeting, Kyoto, 11月5日～11月8日, 2012.
- ④ Harima, Y., Takashima, Y., Ueda, Y., Ohtsuka, T., and Kageyama, R.: Accelerated

tempo of the segmentation clock by reducing the number of introns in the *Hes7* gene. Swiss Japanese Developmental Biology Meeting, Kyoto, 11月5日～11月8日, 2012.

- ⑤ Kageyama, R.: Ultradian oscillations in somitogenesis and neurogenesis. Department of Systems Biology Harvard Medical School Systems Biology Seminar Series, Boston, USA, 10月11日, 2012.
- ⑥ Kageyama, R.: The significance of oscillatory gene expression in the maintenance and differentiation of neural stem cells. The 4th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation. Dresden, Germany, 7月18日～7月20日, 2012.
- ⑦ Kageyama R.: Ultradian rhythms in somite segmentation and other biological events. BSDB/BSCB/JSDB Joint Spring Meeting, Warwick, UK, 4月15日～4月18日, 2012.

[その他]

ホームページ :

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2012/121207_1.htm

http://www.kyoto-u.ac.jp/en/news_data/h/h1/news6/2012/121207_1.htm

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/about/y2012/kageyama20121226.html>

新聞報道 :

京都新聞 (2012年12月7日 33面)

科学新聞 (2013年1月1日 2面)

6. 研究組織

(1)研究代表者

影山 龍一郎 (RYOICHIRO KAGEYAMA)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号 : 80224369

(2)研究分担者

(3)連携研究者