

博士論文番号：0781016

体節形成において Notch シグナルによって制御される分
節化時計の役割、および FGF シグナルとの相互作用

林 真一

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 遺伝子発現制御学講座

(別所 康全 教授)

平成21年12月21日提出

序論

脊椎動物の発生において体節は特徴的な繰り返し構造を形成し、脊椎、肋骨、体幹筋肉と背側皮膚を生じる (Fig. 1, Christ et al. 2000, Scaal et al. 2006)。体節は未分節中胚葉の頭部側から規則的な間隔で連続して分節化する球形の細胞塊である。分節化は時計遺伝子の制御下で正確な周期性を持って起こる。体節形成における時間的周期性は振動遺伝子の周期的な発現に

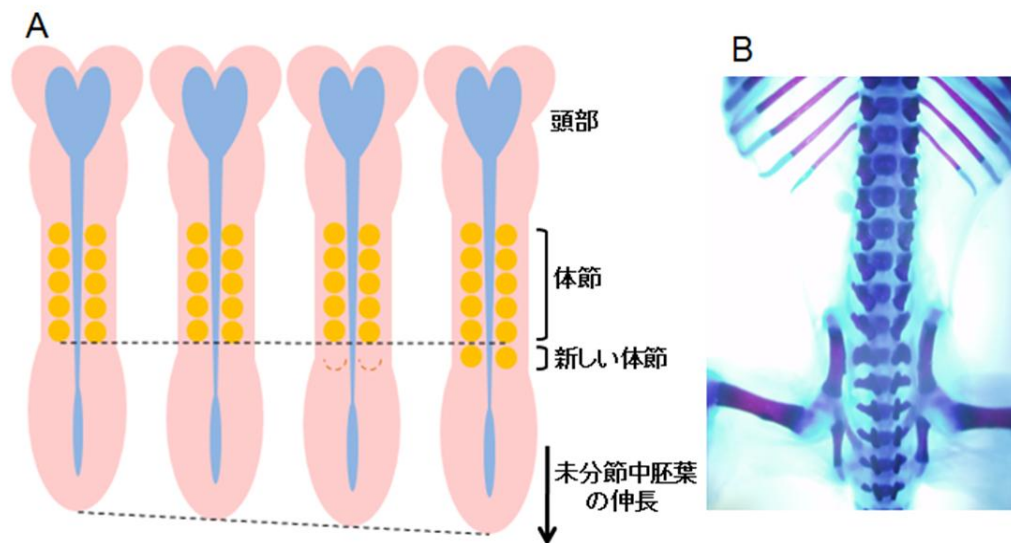


Figure1. マウスの胚発生期における体節形成

A、発生期に胚の後端にある未分節中胚葉が伸長し、時間的空間的に一定間隔を持って体節形成が繰り返される。未分節中胚葉の頭部側が括れ切れることによって神経管の左右両側に一对の球状細胞塊として体節が形成される。体節は胚期に一過的に生じ、やがて脊椎、肋骨、体幹筋肉、背側上皮に分岐する。B、P0マウスにおけるAlizarin Red/Alcian Blue染色。生体における繰り返し構造は体節から生じる。脊椎は繰り返し構造を基礎として頸椎、胸骨、腰椎、仙椎、尾対に特化する。骨組織(赤)、軟骨組織(青)。

よって制御されている。最初に発見された振動遺伝子はニワトリ *c-hairy1* であり、その振動発現パターンは体節形成と一致している (Palmeirim et al. 1997)。 *c-hairy1* の発現は未分節中胚葉において尾部側から頭部側への周期的なウェーブ状の進行パターンを示す。体節形成における時間的空間的周期性は Notch、FGF(Fibroblast Growth Factor)、Wnt(wingless-type MMTV integration site family member)シグナルとその下流の振動遺伝子によって制御されている (Fig. 2、Dequeant et al. 2008)。Notchシグナルは増殖や幹細胞の維持、分化の制御において重要な役割を果たしている (Fig. 3)。Notchは進化的に高度に保存された一回膜貫通型の受容体であり、哺乳類では4つの Notch遺伝子 (Notch1-4) がある (Dunwoodie et al. 2009)。実験的にNotch受容体を欠損させると体節形成において異常が生じることが知られている。Notch1欠損マウスでは体節の規則性が損なわれ、受精後

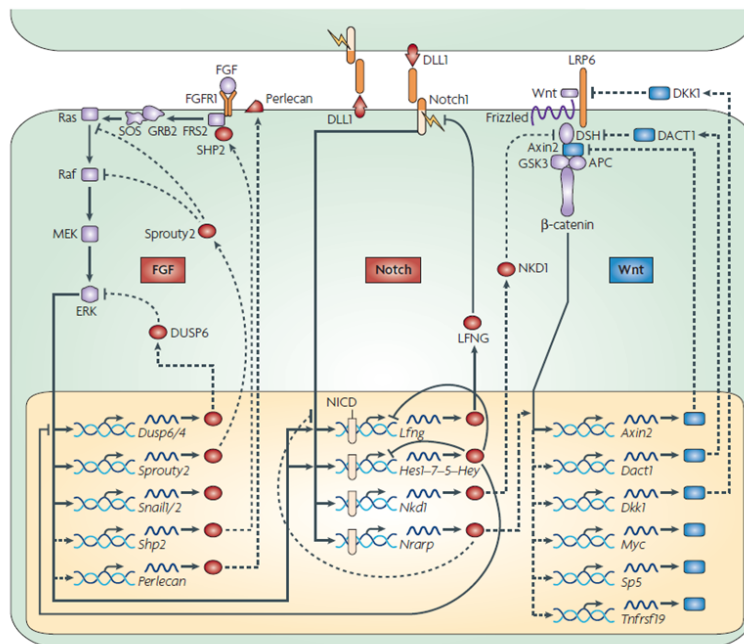


Figure2. マウス体節形成におけるFGF、Notch、Wntシグナル経路と振動遺伝子

FGF受容体がFGFリガンドと結合し、細胞内シグナル伝達経路によってターゲット遺伝子を活性化する。RafはRas依存的にMEKをリン酸化し、活性化したMEKがERKをリン酸化によって活性化し、遺伝子の発現を誘導する。DII1を受け取ったNotch受容体は細胞内ドメインが切断され、核内へ移行して下流遺伝子の発現を活性化する。Wnt経路においてはリガンドと結合したFrizzledがDSH、GSKを介してbeta-cateninにシグナルを伝達し、beta-cateninが核内へ移行してターゲット遺伝子の発現を促進する。振動遺伝子の多くはネガティブフィードバックを形成する。FGFシグナルとNotchシグナル下流の振動遺伝子(赤)はWntシグナル経路の振動遺伝子(青)と異なるフェイズで振動する。点線はマイクロアレイのデータ、もしくはは体節形成以外の研究からの推定。APC, adenomatous polyposis coli; DACT1, dapper homologue 1; DKK1, dickkopf homologue 1; DLL1, delta-like 1; DSH, dishevelled; DUSP6, dual specificity phosphatase 6; ERK, mitogen-activated protein kinase 1; FGFR1, FGF receptor1; GRB2, growth factor receptor-bound protein 2; GSK3, glycogen synthase kinase 3; Hes1, hairy and enhancer of split-related1; LFNG, lunatic fringe; LRP6, low density lipoprotein receptor-related protein 6; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase 1; NICD, Notch intracellular domain; NKD1, naked cuticle 1 homologue; Nrarp, Notch-regulated ankyrin repeat protein; SHP2, Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2; SOS, son of sevenless; Sp5, trans-acting transcription factor 5; Tnfrsf19, tumour necrosis factor receptor superfamily, member 19. Dequeant and Pourquie. (2008) Nature, vol. 9, 370-382

10日で胎生致死に至る (Swiatek et al. 1994, Conlon et al. 1995)。Notchの細胞外ドメインはリガンドとの結合に必要なepidermal growth factor-like repeatsとリガンド非特異的なシグナル伝達を抑制するLin-12/Notch repeatsを持つ。細胞内ドメインはRBPjkと結合するRBPjk associated molecule domainとタンパク質間の相互作用を調節するAnkiyrin repeats domain、転写促進に関わるtranscription activation domainとタンパク質の分解に関わるPEST配列を持つ。細胞間接触によって細胞膜に提示されるリガンドであるDelta-like (Dll)、もしくはJaggedとNotchが相互作用することによって細胞内へNotchシグナルの伝達が起こる。DII1を欠損したマウスでは体節の前後軸形成と上皮化が損なわれる (Hrabě de Angelis et al. 1997)。

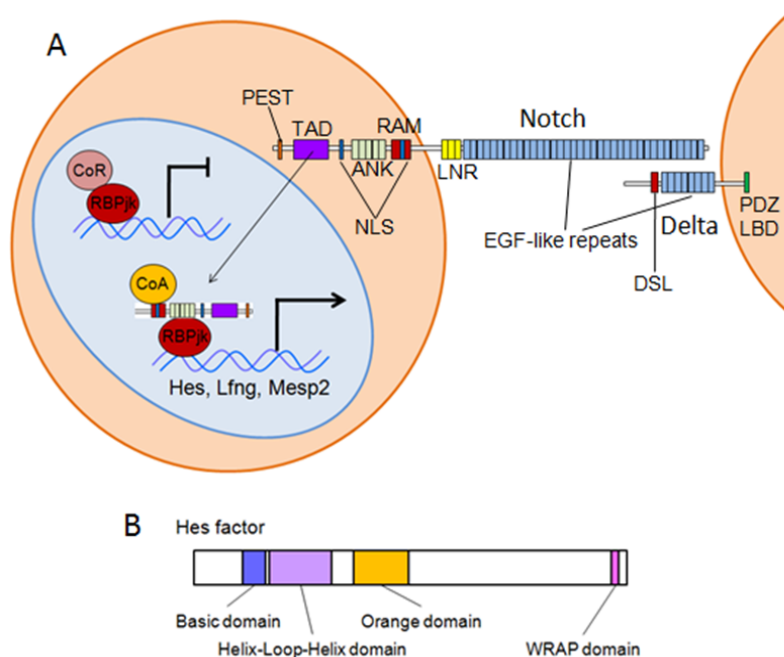


Figure3. Notch経路におけるシグナル伝達様式とタンパク質の構造

A, Notchは細胞膜貫通型の受容体でDIIとの結合によって細胞内にシグナルを伝達する。リガンドと結合するとNotchの細胞内ドメインは γ -secretaseによって切り離され、細胞内へと移行する。Notchの細胞内ドメインはコアクチベーターと共にRBPjkと結合し、ターゲットの転写を引き起こす。Notch細胞内ドメインはマウスの未分節中胚葉で振動パターンを示す。LNR: Lin-12/Notch repeats, RAM: the RBPj associated molecule domain, ANK: ankyrin repeats, NLS: Nuclear localization signals, TAD: a transactivation domain. Deltaは細胞膜表面に提示されるリガンドでEGF-like repeatを介してNotchと結合する。ゼブラフィッシュにおけるdelta-likeCは未分節中胚葉において振動発現しているがマウスにおけるDelta-like1, 3, 4は振動していない。DSL: Delta/Serrate/Lag2 domain, PDZLBD: Post synaptic density protein/Drosophila disc large tumor suppressor/Zonula occludens-1 protein ligand binding domain. B, Notch下流の振動遺伝子Hes転写因子。Hesファミリーの遺伝子は抑制性転写因子でDNA結合能を持つ。Hesタンパク質は4つの保存されたドメインを持つ。Basic domainはDNAの結合に重要であり、Helix-Loop-Helix domainは二量体形成に働く。Orange domainは二量体のパートナーの選択に影響を与える。WRAP domainは転写抑制に必要な領域で、またユビキチン化シグナルとしても機能する。Hes遺伝子はNotchシグナルの下流で制御を受けて発現が誘導される。下流(ターゲットE-box&N-box)E-box、N-boxを介してターゲット遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を抑制する。Hes1、Hes5、Hes7はマウス胚の未分節中胚葉で振動発現している。

*Dll3*を欠失させると遺伝子の振動発現はステージの進行に伴って失われて体節形成の異常を引き起こす。結果として骨格の異形成症を引き起こす (Dunwoodie et al. 2002, Kusumi et al. 2004)。リガンドとの結合によってNotch受容体は初めにADAM-family of metalloproteaseによる切断を受け、次に γ -secretaseによる切断を受ける。 γ -secretaseはpresenilin、nicastrin、PEN2、APH1をサブユニットに持つタンパク質分解酵素である (Borggreve and Oswald. 2009)。presenilinはNotchの切断に必須のサブユニットであり (De Strooper et al. 1999)、Presenilin1欠損マウスでは体節形成とその発生器官における異常を示すと共に*Notch1*、*Dll1*の発現も失われる (Wong et al.

1997) *Presenilin2*欠損マウスでは体節形成に異常が見られないが *Presenilin1* と *Presenilin2*を両方欠損するマウスでは胚発生によりシビアな異常を示す (Herreman et al. 1999)。二度目の切断で切り離されたNotchの細胞内ドメイン (Notch intracellular domain, NICD) は核へ移行してコアクチベーターとして働く。NICDは直接DNAと結合できないがDNA結合能を持つRBPjk (Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region; CSL, CBF1, Su(H), LAG-1, de la pompa et al. 1997) と複合体を形成する。RBPjkはNICD非存在下ではコリプレッサーと結合し、RBPjk結合サイト (GTGGGAA) を持つ遺伝子の転写を抑制しているがNICDとRBPjkが結合してアクチベーターコンプレックスが形成されるとターゲット遺伝子の転写を活性化する。マウスの未分節中胚葉においてNICDは振動パターンを示し、体節形成におけるNotchシグナル下流の振動遺伝子の発現を制御している。

これまでの研究から脊椎動物を通して振動発現遺伝子が発見され、機能的に保存されていることが示されてきた。その中でも Notch シグナルによって制御される振動遺伝子としてマウスの *Hes* (Hairy and Enhancer of Split)、魚類の *her*(hairy-related)ファミリーが重要な機能を持つことが示されている (Kageyama et al. 2007, Holley. 2007)。*Hes* 転写因子は遺伝子上流に RBPjk binding site を持ち、Notch シグナルによって発現誘導される (Ong et al. 2006, Bessho et al. 2003, Kageyama et al. 2007)。*Hes* ファミリーは basic Helix-Loop-Helix 転写因子をコードする遺伝子群で胚発生における多分化能の維持と分化・形態形成に重要な役割を担っている。DNA 結合を担う Basic domain、二量体形成に働く Helix-Loop-Helix domain、パートナーの選択性に重要な Orange domain と転写抑制に重要でユビキチン化シグナルとして働く WRAP domain を持つ。*Hes* 転写因子は抑制性の活性を持ち、E-box (CANNTG)、あるいは N-box (CACNAG) をプロモーター領域に持つ遺伝子の転写を抑制する。マウス胚の未分節中胚葉において Notch シグナル制御下で *Hes* ファミリーの *Hes1*、*Hes5*、*Hes7* は体節形成と一致した周期で振動発現する (Dunwoodie et al. 2002, masamizu et al. 2006, Fischer et al. 2007)。*Hes1* と *Hes5* は中枢神経系と末梢神経系、未分節中胚葉で発現する。*Hes7* は神経系での発現は見られず、未分節中胚葉に限局している。*Hes1*、*Hes5* に関して、体節形成における役割は分かっていないが未分節中胚葉で発現する *Hes7* は体節形成の時間的周期性を制御していることが知られている (Bessho et al. 2001a)。*Hes7* 欠損マウスでは体節形成の規則性に異常が見られる (Bessho et al. 2001b)。ホモ欠損マウスで、体節の不完全な分節化や融合が見られ、発生器官である脊椎と肋骨に異常が見られる。*Hes7* は自身のプロモーター領域に結合し (Chen et al. 2005)、自己抑制系を形成している。また、

Notch 受容体を修飾する O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase をコードする *Lfng* (Lunatic Fringe) のプロモーター領域にも結合して、発現パターンを制御している (Bessho et al. 2003)。*Lfng* は Notch シグナルによって発現し、Notch 活性を抑制するネガティブフィードバックを形成する (Dale et al. 2003)。*Lfng* 欠損マウスでは体節と末梢神経系における繰り返し構造の規則性が損なわれる (Zhang et al. 1998, Evrard et al. 1998)。*Hes7* の周期的な転写抑制によって、*Hes7* と *Lfng* の振動発現における転写のオフフェイズを生み出している。これらの機構を介して *Hes7* は自身に対する直接的なネガティブフィードバックと *Lfng* を介して Notch シグナルに対する間接的なネガティブフィードバックを形成している。翻訳されたタンパク質はユビキチンプロテアソーム系によって速やかに分解されるため、再び転写が開始し、周期的な発現が繰り返される (Bessho et al. 2003, Hirata et al. 2004)。振動遺伝子による周期性は体節形成における時間を制御する分子時計として機能する (Fig. 4)。

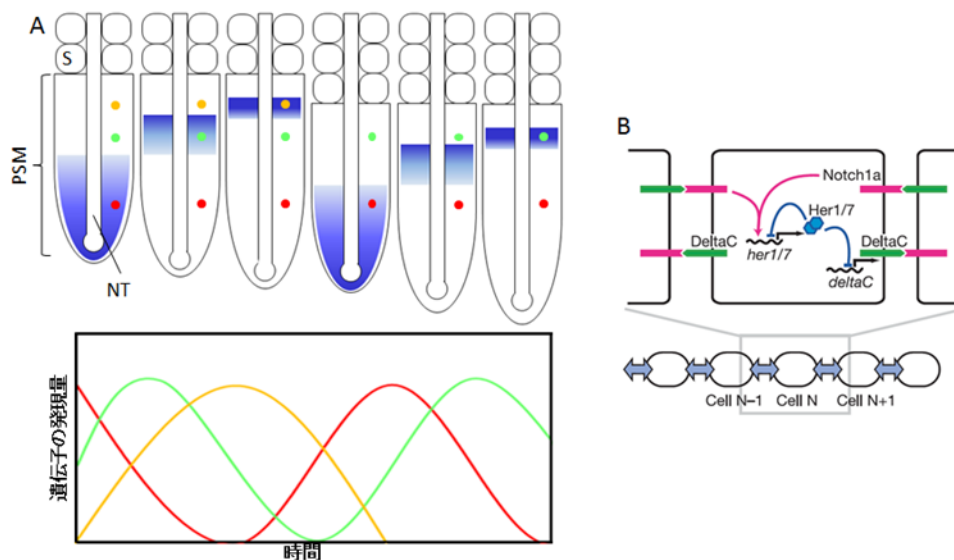


Figure4. Notchシグナルは体節形成において遺伝子の振動発現と同調化に働く

A、上図、体節形成期において、未分節中胚葉で振動遺伝子の発現領域は後端から前端へ向かって進み、体節形成の周期と一致して繰り返し起こる。下図、ドットで示した領域(上図)の振動遺伝子の発現量。時間遅延を伴って各領域で順に発現の増加と減少が起こる。S: somite, NT: Neural Tube, PSM: presomitic-mesoderm。B、細胞間接触によってNotchシグナルは同調化に働く。隣接する細胞の膜表面に提示されるDeltaCリガンドによってNotchシグナルが活性化され、ゼブラフィッシュのHesホモログであるher1、her7が発現してdeltaCを負に制御し、隣接する細胞のNotchシグナルを制御する。細胞間接触を介して隣接化する細胞のNotchシグナルがお互いに制御されることによって同調化が起こる。

Notch シグナル同様に FGF シグナルも体節形成に重要な役割を持っている (Fig. 5)。FGF ファミリーはシグナルのリガンドとして働く分泌因子によっ

て構成されている。ヒトとマウスでは 22 の FGF 遺伝子が存在する (Itoh et al. 2008)。細胞外に分泌された FGF は FGF 受容体との結合を介して細胞内にシグナルを伝達する (Yang et al. 2003)。FGF シグナル経路は細胞運命の決定、極性の決定、細胞増殖に必要とされる。FGF 受容体は receptor tyrosine kinase クラスの細胞膜貫通型タンパク質である。FGF リガンドとの結合によって二量体化しキナーゼ活性が活性化する。FGF 受容体の二量体化は FRS2 との結合を促進し、Grb2 と SOS を動員する。SOS は Ras のグアニンヌクレオチドの置換を促進して活性化させる。Ras 依存的に活性化した Raf は MEK をリン酸化し、MEK (MAP kinase-ERK kinase) によって ERK (extracellular signal-regulated protein kinase / mitogen-activated protein kinase) を、ERK によって Ets (E26 transformation specific) をそれぞれリン酸化することでシグナルを伝達する (Tsang et al. 2004, Ekerot et al. 2008)。Ets は FGF シグナル依存的な遺伝子の発現を促進する。

現在までに FGF シグナル経路におけるフィードバック制御因子は複数報告されている。Sef、Mkp、Sprouty ファミリーの遺伝子は FGF 依存的に発現が誘導され、FGF の発現パターンと類似して鼻芽や鰓弓、肢芽、体節、未分節中胚葉で発現する。Sef は細胞膜貫通型のタンパク質で FGF の受容体と結合して FRS2 のリン酸化を阻害する。また、シグナルペプチドが欠落し細胞質に局在するスプライシングバリエーションである Sef-b は MEK を抑制する。Mkp ファミリーの因子は ERK 特異的な脱リン酸化酵素で ERK のシグナル伝達を阻害する。Sprouty ファミリーの因子は C 末側のシステインリッチな領域の中に Raf1 との結合に重要な Raf1 binding domain と N 末側に高度に保存された tyrosine を持つ。Sprouty は Raf と結合し、そのリン酸化を妨げることで Ras 依存的な Raf の活性化を阻害する。また Sprouty のチロシン残基がリン酸化されると Grb2 と結合し、Grb2 依存的な SOS の活性を阻害する。そのため、Sprouty は FGF シグナルの複数のステップでの伝達阻害機構を担っている。

FGF と Wnt シグナルは分節化の位置決定に重要な役割を担っている。FGF8 と Wnt3a は未分節中胚葉の尾部側から頭部側への濃度勾配を形成している (Sawada et al. 2001, Delfini et al. 2005, Dubrulle et al. 2001, Dequéant et al. 2008)。FGF8 は分裂伸長組織において発現し、細胞間のシグナル伝達を担う分泌性のリガンドとして働く。FGF8 は未分節中胚葉では後端でのみ転写され、mRNA の分解とタンパク質の拡散によって濃度勾配が形成されている (Dubrulle et al. 2004)。未分節中胚葉への FGF8 浸潤ビーズの移植の結果、分節境界は前方へシフトし、FGF シグナルの阻害剤の浸潤ビーズの移植では後方へシフトする (Sawada et al. 2001, Dubrulle et al. 2001)。濃度勾配の域

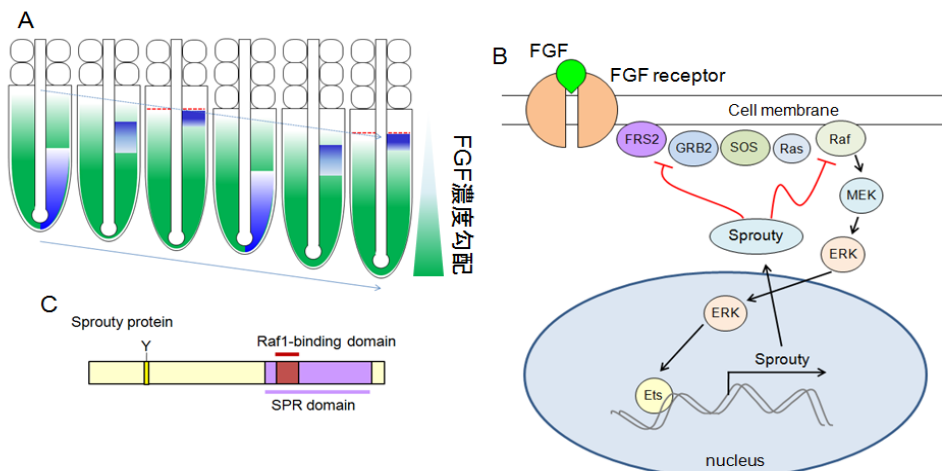


Figure 5. 分節化の位置決定に重要なFGFシグナル経路

A, FGFは未分節中胚葉の後端から前端にかけて濃度勾配を形成している(緑)。未分節中胚葉の伸長に伴ってFGFも未分節中胚葉先端からの勾配が維持され、空間的に一定間隔で起こる分節化の位置決定に働いている。B, FGFを介したシグナル伝達経路。FGFリガンドを受け取ったFGF受容体はアダプター因子FRS2と結合し、GRB2とSOSを介してRasのGTP交換を促進して活性化させる。活性化したRasがRafをリン酸化し、順次MEK、ERK、Etsへとそれぞれのターゲットをリン酸化させ活性化させることでシグナルが伝えられ、FGF依存的な遺伝子の発現が誘導される。FGF下流のSproutyファミリーの遺伝子はFGFシグナルを阻害する負のフィードバックを形成する。(Tsang and Dawid. 2004 Science's STKE改編)
C, Sproutyタンパク質のドメイン構造。ショウジョウバエから哺乳類まで保存される遺伝子で象同性の高いドメイン構造を持つ。SPR(Cystein rich domain related to Sprouty)ドメインの中にRaf1-binding domainが含まれ、Raf1との結合に働く。N末側に高度に保存されたtyrosineを持ち、この残基は抑制機能に重要である。

値境界線上で未分節中胚葉の細胞が分節化し、振動遺伝子の発現は空間的周期性に変換される。また FGF と Wnt は分節化の位置決定だけではなく、分子時計の制御にも貢献している。

Dups4 と *Sprouty2* は FGF 経路を構成する因子で FGF シグナルの制御下において未分節中胚葉で振動発現する (Niwa et al. 2007, Dequant et al. 2006)。マウスの *Axin2* は Wnt の下流で発現し、マウスの未分節中胚葉で振動発現する (Aulehla et al. 2003)。マウス未分節中胚葉において *Axin2* のネガティブフィードバックもまた周期的に Wnt シグナルを制御している (Aulehla et al. 2003)。FGF と Wnt シグナルの両方から制御を受ける *Snail1* も振動発現している (Dale et al. 2006)。しかし、他の種ではそれらのホモログは振動発現していない。*Lfng* の振動発現はマウスとニワトリで知られているが、魚類では振動していない (Dale et al. 2003, Appel et al. 2003, Qiu et al. 2004)。そのため、シグナル経路は脊椎動物間で保存されていても分子時計に対する各遺伝子の貢献度は異なると考えられる。

Notchシグナルは体節形成に関連する遺伝子の発現制御に重要であることは分かっているが振動遺伝子の周期性と体節の分節化における役割の詳細に関して正確に査定されていない。Notchシグナルには二つの役割がある。一つは振動遺伝子発現の同調化であり、二つ目は体節の分節化である。分節化の誘導

因子である *Mesp2* は Notch シグナルによって制御され、*Mesp2* 遺伝子を欠くと沿軸中胚葉における分節化が起こらない (Saga et al. 1997, Morimoto et al. 2005)。ニワトリにおける *Mesp2* ホモログの *cMeso-1* は *Eph4* の発現を誘導し、*Eph4* と隣接する細胞の *EphronB2* との相互作用によって両方の細胞の上皮化を促すことが知られている (Watanabe et al. 2009)。そのため、Notch シグナルは分節化に働くと考えられてきた。またゼブラフィッシュにおいて隣接する細胞同士が *delta* と *notch* を介してお互いの細胞内シグナルを制御することによって振動遺伝子の同調化を生んでいると考えられている (Horikawa et al. 2006)。しかし、ゼブラフィッシュにおける振動遺伝子 *her1* と *deltaC* の振動発現が失われても、不完全ながら体節形成は起こる (Holly et al. 2002)。またマウスにおいても同様に Notch シグナルの制御下にある時計遺伝子 *Hes7* と *Lfng* を欠失しても不完全ながら体節は形成される。2008年に Feller らは未分節中胚葉全域で恒常的に Notch の細胞内ドメインを発現させ、Notch シグナルの周期性がなくなった状態でも体節が形成されることを報告した (Feller et al. 2008)。これらの結果から、Notch シグナル非依存的に分節化が起こり、Notch シグナルは体節形成に必須ではない可能性が考えられた。そのため遺伝子発現の同調化のみに限局されるのか、もしくは Notch シグナルは分節化に必須であるか、再検討する必要がある。そこで体節形成において Notch シグナルが振動遺伝子と分節化に対してどのような役割を持つのかについて検討した。

本研究では Notch シグナルが分節化に必須であり、Notch シグナルによって制御される分節化時計が *Sprouty4* を介して位置決定に重要な FGF シグナルを制御していることを示す。Notch シグナルが完全に消失した条件下では遺伝子の振動は失われ、体節の分節化は起こらない。そのため、Notch シグナルは振動遺伝子の同調化だけではなく、分節化にも必須であると考えられる。また Notch 下流の振動遺伝子 *Hes7* により、FGF 制御因子の *Sprouty4* が振動発現することを観察し、分節化時計と FGF シグナルとリンクする仲介因子であることを示した。

さらに Notch シグナルを自身の振動発現を通して分子時計に反映させ、下流遺伝子の振動発現の誘導によってシグナル間のクロストークを可能にしている *Hes7* の発現制御機構の解明を行った。転写抑制を介して Notch 依存的な振動遺伝子と FGF 依存的な振動遺伝子を制御する *Hes7* の遺伝子発現は Notch と FGF シグナルによって引き起こされている。*Hes7* の尾部先端における発現の開始は FGF シグナルによって誘導され、頭部側への進行は Notch シグナルに依存することが報告されている (Niwa et al. 2007, Ferjentsik et al. 2009)。そのため、FGF、Notch シグナルによる転写の活性化と *Hes7* による自己抑制機構が

*Hes7*の振動発現を引き起こしていると考えられる。またこれらのシグナルに T-box転写因子が協調して働くことが知られている。T-box転写因子ファミリーは体節形成に関与し、沿軸中胚葉を神経系の細胞系譜から体節の細胞系譜へと誘導する (Chapman et al. 1998, Yamaguchi et al. 1999)。T-box転写因子の一つである *Tbx6*はWntシグナルと協調して *Mesogenin1*と *Delta-like1*を制御する (Beckersa et al. 2000, Wittler et al. 2007, Hofman et al. 2004)。また分節化を引き起こす *Mesp2*も Notchシグナルと *Tbx6*による相乗作用によって制御されている (Saga et al. 1997, Yasuhiko et al. 2006, Yasuhiko et al. 2008)。既にゼブラフィッシュにおける *Tbx6*のホモログである *tbx24*は振動遺伝子 *her1*の頭部側未分節中胚葉での進行を誘導することで分節化時計を制御していることが報告されている (Brend et al. 2009, Nikaido et al. 2002)。

Hes7 の遺伝子発現に関与するシグナル経路は明らかになっているが、それらのシグナル経路がどのように *Hes7*プロモーターを制御しているかの分子メカニズムは分かっていない。Notch 依存的な振動遺伝子と FGF 依存的な振動遺伝子を制御する *Hes7* とそれらのシグナルの遺伝子ネットワークを調べるために *Hes7*の転写制御に注目した。

材料と方法

In Situ Hybridization

マウスE9.5、もしくはE10.5胚を4% paraformaldehyde/PBS (4°C、一晚) で固定後、methanol置換による脱水処理後に-30°Cで保管した。PBSに置換後、6% H₂O₂ (常温、15分間) による脱色処理を行い、10µg/mL Proteinase K (常温、10分間) 処理後、4% paraformaldehyde, 0.2% gluteraldehyde/PBS (常温、20分間) で再固定した。Pre-hybridization buffer (50% Formamide, 1% SDS, 50µg/mL tRNA, 50µg/mL Heparin, 5× SSC pH4.5; 70°C、1時間) で前処理を行った後、Digoxigenin-RNAプローブを用いてハイブリダイズ (70°C、一晚) した。洗浄液1 (50% formamide, 1% SDS, 5x SSC pH4.5; 70°C、1時間) で洗浄を3回、洗浄液2 (50% formamide, 2x SSC pH4.5; 65°C、1時間) で洗浄を2回行い、TBSTによる洗浄を5分間、3回行った。10% 羊血清でブロッキングを行った後、Alkaline phosphatase結合 抗Digoxigenin抗体 (1/2000、4°C、一晚) とインキュベーションした。TBSTで洗浄後、NTMT (0.1 mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween20, 100 mM Tris-HCl pH9.5) に置換処理後、発色液中 (225µg/mL NBT, 175µg/mL) で反応を行った。プローブは以下の領域を用いた: マウス *Sprouty4*-25-1177; *Lfng*, 17-1382; *Uncx4.1*, -14-1680, ゼブラフィッシュ *sprouty4*, 32-830。

Alcian Blue and Alizarin Red staining

マウスE18.5胚は95% ethanolで固定（常温、一晚）した後、150mg/mL Alcian Blue、25% 酢酸、80% ethanolで軟骨染色（24-48時間、常温）した。95% ethanolで1時間洗浄後、胚を1% KOHで処理した。次に75 mg/mL Alizarin Red S、1% KOHで一晩骨染色した。透明化のために20% glycerol、1% KOHで数日処理した後、50% glycerol, 50% ethanol中で保管した。

Immunohistochemistry

Hes7タンパク質の染色はホールマウス胚を用いた。マウスE10.5胚を4% paraformaldehyde/PBSで固定（4°C、3時間）し、内在性peroxidaseの不活性化のために0.1% H₂O₂で処理（4°C、一晚）した。マウス胚を抗Hes7モルモット抗体（1/100）（Bessho et al. 2003）で4°C、3-5日処理し、Horse radish peroxidase結合抗モルモットIgG抗体で4°C、一晚処理した。検出には4-chloro-1-naphtholを用いた。

NICDの染色は凍結切片を用いた。E10.5胚を4% paraformaldehyde / PBSで4°C、3時間固定し、10-30% sucroseに置換後、OTC compoundに包埋した。10µm厚の切片を作成し、Target retrieval solution (DacoCytomation)中で105°C、15分間オートクレーブした。

一次抗体には抗cleaved Notch1 抗体（1/100 Val1744, Cell Signaling Technology）を用いて4°C、一晚処理、二次抗体にはHorse radish peroxidase結合抗ウサギIgG抗体を用いて常温で1時間処理した。シグナルの検出はTyramide Signal Amplification Kits（Molecular Probes）を用いた。

Explant Culture

マウスの未分節中胚葉を神経管に沿って二分し、片方の組織片は直ちに固定し、もう一方は10% FBS-DMEM/F12培地にて一定時間培養した後、固定した。阻害剤は100 mM DAPT(Calbiochem)、100 nM LY411575、50 mM SU5402 (Calbiochem)を用いた。Hes7欠損マウスは20ng/mL basic FGF存在下、あるいは非存在下の1%FBS-DMEM/F12培地で4時間培養後、固定した。サンプルはin situ hybridizationを用いて解析した。

Transgenic mice

Hes7過剰発現マウスの作製に当たって、5.4kbのHes7プロモーターの下流にHes7の第一イントロンを含むエキソン領域を挿入し、IRES-VenusとSV40のポリアデニレーションシグナルが続くコンストラクト（Niwa et al. 2007）

を用いてインジェクションを行った。

Hes7 レポーターマウスの作製に当たって、*LacZ* 遺伝子をレポーターに用いた。*Hes7* 上流領域を PCR によって増幅し、フォワードプライマーには XhoI と NotI サイトをつけ、リバースプライマーには NheI サイトをつけた。PCR 産物は XhoI site と NheI site で *LacZ* gene と *SV40* poly(A) signal を持つ pBluescriptII (stratagene) に挿入した。ヒト *beta-globin* minimal promoter の挿入には 5'末端をリン酸化した相補的な合成オリゴ DNA を用いて NheI サイトに導入した。プラスミドは competent *E. coli*, DH5 α に形質転換して増幅した。コンストラクトは NotI で直鎖化し、ICR マウスの受精卵にインジェクションした。

Detection by X-gal staining

トランスジェニックマウスは E10.5 で解剖し、固定液 (0.5% glutaraldehyde, 2 mM MgCl₂, 1x PBS) に浸し、4°C で 30 分間処理した。PBS で 3 回、洗浄した後、color solution (1 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-Dgalactoside, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl₂, Nonidet P-40, 0.01% sodium deoxycholate) に 37°C で浸して発色させた。

Luciferase Assays

Sprouty4 のプロモーター解析には *Sprouty4* の上流領域 (-1521 to +171) が挿入された luciferase レポーター (pGL3 Promega, 50ng) を用いた。NIH3T3 細胞 (3x10⁴ cells/well) を 10% FBS-DMEM 培地中で 24 ウェルプレートに播種し、50ng レポーターと 0、25、50ng の *Hes7* 発現 vector (pCI, Progema) を Trans IT LT1 (Mirus) を用いてトランスフェクションした。コントロールとして 5ng の *SV40* プロモーター制御下の *Renilla luciferase* を用いた。24 時間後、10 ng/mL basic FGF を加えてさらに 24 時間培養した。Passive Lysis Buffer (Promega) により細胞を可溶化した後、luciferase 活性を Dual luciferase reporter assay system (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。*Hes7* のルシフェラーゼレポーター解析は以下の手順で行った。*Hes7* の 1.5kb 上流、C 領域は PCR によって増幅され、KpnI と NheI サイトで pGL3basic に挿入した。C 領域のレポーターに関して *Beta-globin* のミニマルプロモーターはルシフェラーゼ遺伝子の直前にある NheI サイトに挿入された。転写因子は未分節中胚葉の cDNA からクローニングし、RBPjk は未分節中胚葉由来のバリエント 2 を用いた。T、RBPjk バリエント 2、Ets2、Etv4 は EcoRI と XhoI を用いて、C 末側に Flag タグを持つ pcDNA3 に挿入した。Tbx6 と Etv5

は KpnI と XhoI、BamHI と XhoI を用いた。Hes7 ルシフェラーゼレポーターの解析には CH310T1/2 細胞を用い、 3×10^4 細胞を 24 ウェルプレートに播種した。24 時間後、Trans IT LT1 (Mirus) を用いて 300ng の *Hes7* レポーターと 200ng の転写因子発現ベクターを導入し、さらに 24 時間後に解析に用いた。

Mutagenesis

ミュータジェネシスは Sawano et al. 2000 に述べられたように Site-directed and semi-random mutagenesis を行った。フォワードプライマーのみを用いて一回目の PCR を行った。PCR 反応は全量 25ul で以下の反应用液で行った。

(0.5x Pfu バッファー, 0.5x Taq ligase バッファー, 1 mM dNTPs, 0.28 pmol フォワードプライマー, 2 U PfuUltra high-fidelity DNA polymerase (Stratagene), 0.4 U Taq DNA ligase (New England Biolabs), 鑄型プラスミド 50ng, total 25ul)。

Hes7 C 領域レポーターを鑄型プラスミドとして用い、フォワードプライマーはライゲーションのために 5'末端がリン酸化されているものを用いた。反応条件は 65°C;5 分、95°C;2 分、(95°C;30 秒、55°C;30 秒、65°C;7 分) x18 サイクル、75°C;7 分。その後大腸菌由来のメチル化プラスミドは 10 U の DpnI を加えて 37°C、一時間、消化してから 2 U の PfuUltra high-fidelity DNA ポリメラーゼを二回目の PCR を行う。反応条件は 95°C;30 秒、(95°C;30 秒、55°C;1 分、70°C;7 分) x2 サイクル。DpnI によって消化された DNA 断片がリバープライマーとして働くため、リバープライマーは不要。

ミュータント *Sprouty4* レポーターの作製に当たって、以下のプライマーを用いた。配列(下線は置換した塩基を示す)。

N-box1 Mutant: CTATGAAGGCCAAACCATGGCAAGATAGATCTATC,

E-box1 Mutant: CTGCTCCACCCATCTGCTCAGCTCATTCTCCCTAT,

N-box2 Mutant: AAAGGGGAGAGGGCCCATGGAATACAAAGGCCTGG,

E-box2 Mutant: CCACGCAGCTAAGCTTGGTCACTGCAGTCGCCGCCG,

E-box3 and N-box3 Mutant:

GCGCGCACGGGGTTGGTCGACCCCCACCCATTCATA.

Hes7C 領域レポーターの変異プライマーは以下のものを用いた。

T/RBPjk-binding site mutation primer:

ATCCTACTTCTAGGTTTTAAACAAGGTTGTAGAGAAT

T-box site1 mutation primer:

GGCCAGGGGCGGCCCGATATCCGGGTGCAAACCTGC

T-box site2 mutation primer:

GGGGCCTGCTGGGACGATATATCTGTGCTTCCATT

Pull down assay

10cm dishに4 x 10⁵細胞を播種し、24時間後に15 ugのFlagタグを持つ転写因子発現ベクターをTrans IT LT1を用いて導入した。33時間後にbinding buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.5% NP-40, 5% Glycerol, 1/100 proteinase inhibitor cocktail(Nacalai))を用いて溶解した。4°Cで20分間、ローテーターで攪拌し、15000rpmで5分遠心した後、上清を回収した。30 ulの50% slurryと100 pmolの5'末端をビオチン化した二本鎖オリゴDNAを10分間、常温で混合する。細胞上清を加えて30分間、4°Cで攪拌する。その後、3000rpm、4°Cで5分間遠心して上清をSupサンプルとする。沈殿を1 mlのbinding bufferを加えて懸濁し、3000rpm、4°Cで5分間遠心して上清を捨てる。これを3回繰り返した後、30 ulのSDS-PAGE用sample buffer (200 mM Tris-HCl pH6.8, 80 mg/ml SDS, 40% glycerol, 0.2 mg/ml Bromophenol Blue, 10% 2-mercaptoethanol)を加えて、95°C、5分処理でタンパク質を溶出する。15000rpm、4°Cで5分間遠心し、上清を30 ul回収する。これをPptサンプルとする。回収したサンプルはウェスタンブロットによって検出した。5-20% 勾配ゲルを用いてRunning buffer (3.03g Tris, 14.4g Glycine, 1% SDS/L)中で、一枚当たり10 mAで泳動した。泳動後、Transfer buffer (14.5g Tris, 17.3g Glycine, 200ml methanol/L)中でHybond-P membrane (Healthcare)に1.5 mA/cm²で30分間、転写した。5%スキムミルクで常温、1時間ブロッキング後、1/1000抗Flag抗体M2 (Sigma)とインキュベーション(4°C、一晩)した。TBSTで洗浄後、Horse radish peroxidase結合抗マウスIgG抗体(1/1000、常温、1時間)とインキュベーションし、Chemi lumi one (Nacalai Tesque)を用いて検出した。

Pull down実験には以下のオリゴDNAを用いた。配列(下線は置換した塩基を示す)。

T/RBPjk-Binding Site wild type:

ACTTCTAGGTGTGGGAAAAGGTTGTAG

T/RBPjk-Binding Site mutation:

ACTTCTAGGTTTTAAACAAGGTTGTAG

T-box site1:

AGGGGCGGCCCCACACCCGGGTGCAAA

T-box site2:

CCTGCTGGGACCACACATCTGTGCTTC

Ets-binding site:

AAAACCCTCTCAGGATGTGGAGGGCCT

結果

分節化時計における Notch シグナルの貢献

Notch シグナルによって制御される分節化時計の構成因子である *Hes7* と *Lfng* の体節形成における役割を再検討するために *Hes7* 欠損マウスと *Lfng* 欠損マウスにおける体節の形態形成、および体節の発生器官である脊椎の形態を観察した。*Hes7* 欠損マウスにおける体節は不規則な分節が見られ、体節同士の融合も観察された (Fig. 6B)。脊椎形成にも異常が観察され、肋骨の癒合、湾曲が観察された (Fig. 6E)。*Lfng* 欠損マウスにおいて *Hes7* 欠損マウスと類似した体節形成の異常が観察された (Fig. 6C, F)。しかし、不完全ながら体節と脊椎の繰り返し構造は形成されている。不完全な体節が形成される *Hes7* 欠損マウスと *Lfng* 欠損マウスにおいて体節形成の周期性を制御する *Lfng* と *Hes7* の振動発現にどのような影響が見られるかをそれぞれ染色して観察した。*Lfng* 欠損マウスにおける *Hes7* の発現は周期性が維持されていた。また *Hes7* 欠損マウスにおける *Lfng* の振動パターンは見られないが発現は維持されていた (Fig. 6I, L)。さらに *Lfng*, *Hes7* 遺伝子の発現を誘導する Notch 細胞内ドメインの活性も維持されていた (Fig. 6N, M)。*Hes7* 欠損マウスと *Lfng* 欠損マウスにおいて Notch シグナルが維持されていることから、分節化時計が完全に損なわれずに機能してそれら二つの遺伝子の非存在下においても体節が形成されるのではないかと考えた。そこで各欠損マウスにおいて遺伝子の振動発現が残存するかどうかを調べた。Wnt シグナルと FGF シグナルの構成因子であり未分節中胚葉で振動発現する *Axin2* と *Snail1* は *Hes7* 欠損マウスにおいて個体ごとに異なるパターンを示した (Fig. 7D, E, J, K)。さらに未分節中胚葉を神経管に沿って二分し、固定までの時間を変えることで *Axin2* と *Snail1* の発現が変化する、すなわち、発現が振動しているかを確かめた。培養 0 分と比較して培養 60 分は異なるパターンを示した (Fig. 7F, L)。その結果、*Hes7* を欠損したマウスでも *Axin2* と *Snail1* mRNA は周期的に発現変動することが明らかになった。また *Lfng* 欠損マウスにおいても *Hes7* の転写領域、タンパク質の局在は振動発現パターンを示した (Fig. 7N-O)。これらの結果は、*Hes7* もしくは *Lfng* を欠失しただけでは、分節化時計を完全に破壊することはできないことを示している。

残存する Notch 活性がそれらの振動発現を誘導している可能性を評価するた

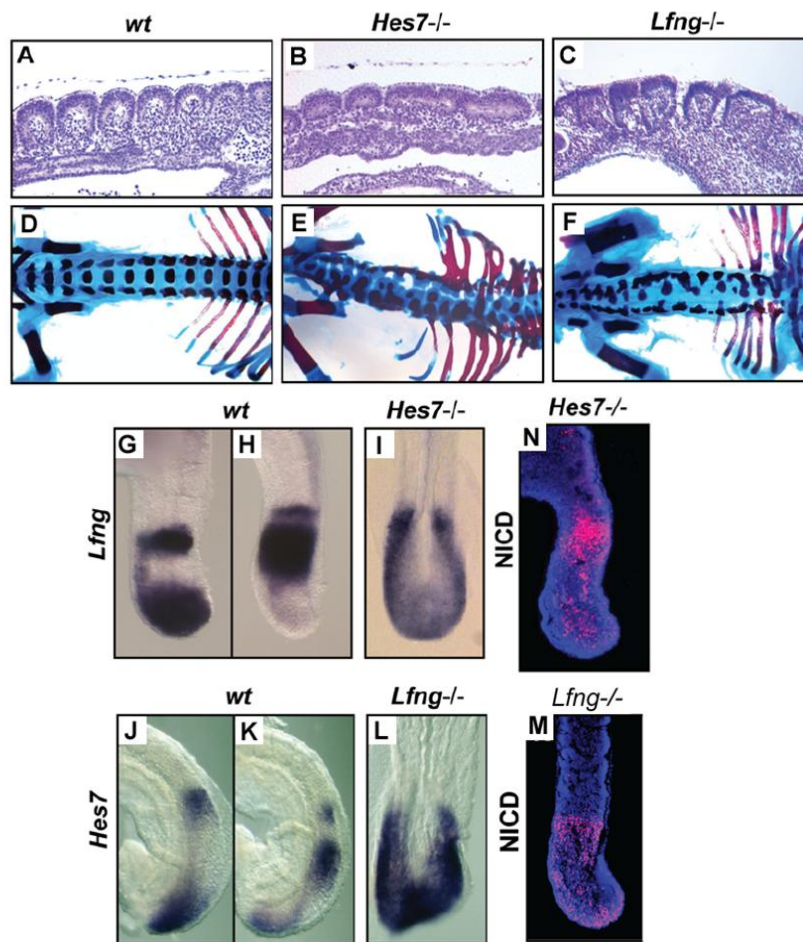


Figure 6. Hes7欠損マウスとLfng欠損マウスは不完全な分節化体軸を形成する。(A-C)マウス体幹後部における切片。野生型(A)、Hes7欠損マウス(B)、Lfng欠損マウス(C)。Hes7欠損マウスとLfng欠損マウスは不規則な体節構造を示す。(D-F) E18.5マウス胚のAlcian Blue/alizarin red 染色。野生型(D)、Hes7欠損マウス(E)、Lfng欠損マウス(F)。Hes7欠損マウスとLfng欠損マウスは骨格形成の異常を示す。(G-L) Hes7とLfngに対するin situ hybridisation染色像。野生型(G,H)とHes7欠損マウス(I)におけるLfng染色。野生型(J,K)とLfng欠損マウス(L)におけるHes7染色。(N)Hes7欠損マウスにおける活性化Notchに対する免疫染色。(M)Lfng欠損マウスにおける活性化Notchに対する免疫染色。Hes7欠損マウスにおいてNotch活性は維持されているが振動パターンは見られない。

めに *Presenilin (Psen) 1* と *Psen2* のダブルノックアウトマウスを用いて解析した (Herreman et al. 1999)。 *Psen1* と *Psen2* は Notch 受容体を切断して活性化型 Notch 細胞内ドメインを遊離させる γ -secretase のサブユニットであり、ヌルミュータントでは Notch の活性が完全に失われ、 *Psen1/2* 欠損マウスでは体節形成が完全に損なわれ、分節化が見られなかった (Fig. 8B, Herreman et al. 1999)。 *Lfng* 欠損マウスで振動の残っていた *Hes7* と *Hes7* 欠損マウスで振動の残っていた *Axin2*、*Snail1* の発現パターンを *Psen1/2* 欠損条件で観察した結果、未分節中胚葉後端では *Hes7* のシグナルが確認できたが振動パターンは見られなかった。 *Axin2* と *Snail1* も同様にシグナルは確認できたが振動パターンは見られなかった (Fig. 8H, I)。以上の結果より、 *Psen1/2* 欠損マ

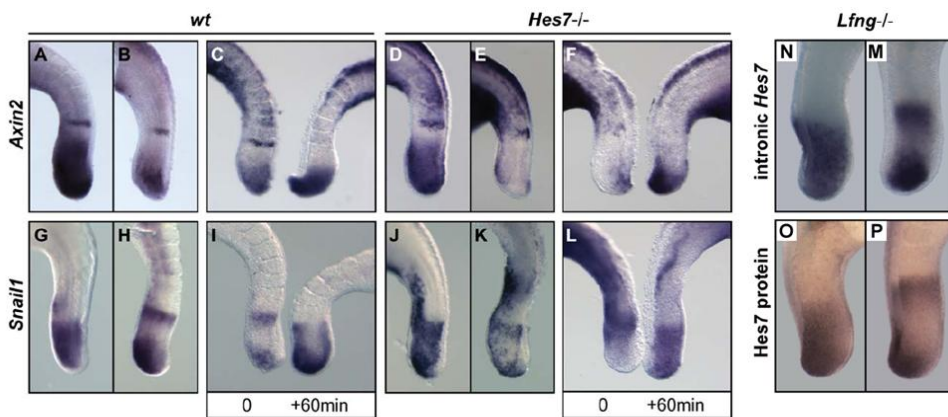


Figure 7. Hes7欠損マウスとLfng欠損マウスにおいて時計遺伝子の振動発現は維持されている E9.5-E10.5の野生型マウス(A-C,G-I)とHes7欠損マウス(D-F,J-L)のAxin2染色像(A-F)とSnail1染色像(G-L)。Hes7欠損マウスにおいてAxin2とSnail1は個体毎に異なるパターンを示す。(F,L)Hes7keltusonnmausu において培養60分後の未分節中胚葉は培養前と異なるパターンを示す。(N,M)Lfng欠損マウスにおいて Hes7イントロンに対するin situ hybridization。(O,P)Lfng欠損マウスにおいてHes7に対する免疫染色。Lfng欠損マウスにおいてHes7イントロンとHes7タンパク質は個体毎に異なるパターンを示す。

ウスにおいて時計遺伝子の発現は維持されているが、振動パターンは失われていることを明らかにした。

*Hes7*は FGF シグナルに制御されることが知られている (Niwa et al. 2007) ためため、Notch シグナルが完全に阻害された条件においても残存する *Hes7* のシグナルが FGF シグナルに依存するものかどうか、阻害剤存在下での組織

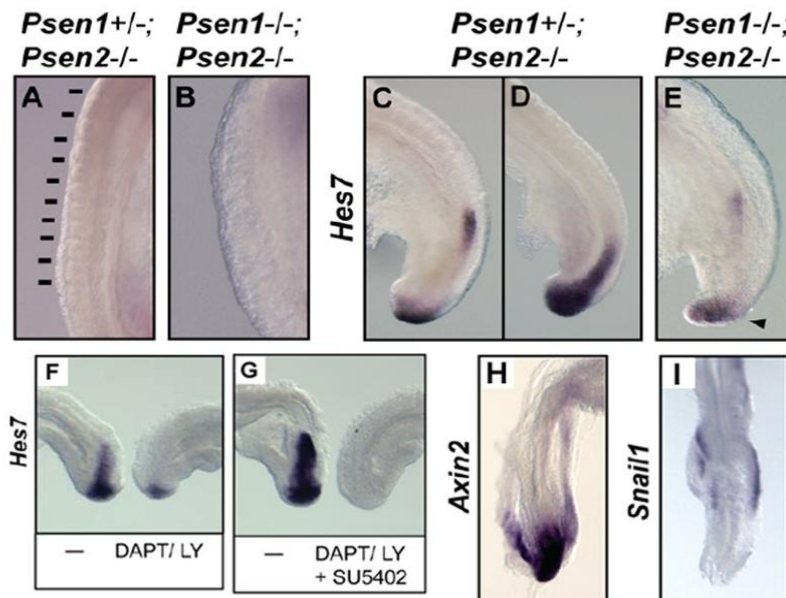


Figure 8. Psen1/Psen2欠損マウスにおいて振動遺伝子の発現は維持されるが振動は失われる (A,B)コントロールと比較してPsen1/2欠損マウスにおいて分節は起こらない。(C-E)E9.5胚のHes7に対する in situ hybridization。Psen1^{+/-}; Psen2^{-/-}マウスにおいてHes7の振動は維持されるがPsen1^{-/-}; Psen2^{-/-}マウスでは未分節中胚葉尾部末端にシグナルが局限し、異なる発現パターンは見られない。SU5402非存在下(F)、あるいは存在下(G)においてDAPT/LY処理したE9.5胚のHes7染色。DAPT/LY処理した未分節中胚葉では尾部末端にHes7のシグナルが残存するがSU5402存在下ではシグナルは消失する。(H,I)Psen1/2欠損マウスにおけるAxin2とSnail1の染色。Psen1/2欠損マウスにおいて振動パターンは見られない。

培養によって確認した。γ-secretase の阻害剤である DAPT (100 mM) と LY411575 (100 nM) を FGF シグナルの阻害剤である SU5402 (50 mM) と組み合わせて培養した。DAPT と LY411575 の同時投与条件では未分節中胚葉中域における *Hes7* の発現は失われたが、未分節中胚葉尾部末端における遺伝子発現の開始は維持されていた (Fig. 8F)。SU5402、DAPT と LY411575 の同時投与では未分節中胚葉中域だけではなく、未分節中胚葉尾部末端におけるシグナルも消失した (Fig. 8G)。これらの結果から分節化時計を担う遺伝子の振動発現には Notch シグナルが必須であると考えられる。また Notch シグナルによって制御される時計遺伝子 *Hes7* の発現には FGF シグナルも寄与していることが示唆された。

振動遺伝子 *Hes7* の転写制御

Hes7 の 1.5kb 上流は遺伝子発現に必要なである

Hes7 は振動遺伝子 *Lfng* と *Nkd1* の周期性を制御しているため *Hes7* の転写制御は遺伝子振動の時間的空間的なパターンの基礎であり、振動遺伝子間のネットワークを解明する上で解き明かさなければいけない問題である。速やかな転写開始と抑制を必要とする振動遺伝子 *Hes7* の転写はプロモーターの上の配列を介して転写活性化因子と転写抑制因子の両方に複雑に制御される機構が想定される。

未分節中胚葉における *Hes7* の遺伝子発現に必要な上流域を特定するために異なる長さの *Hes7* 上流領域によって制御される *LacZ* レポーターを発現するトランスジェニックマウスを作製した。その結果、5.3kb のレポーターを持つトランスジェニックマウスにおいてシグナルが観察された (Fig. 10A, n = 3/3)。また、2.4kb、および 1.5kb のレポーターを持つトランスジェニックマウスでも未分節中胚葉でレポーターが発現に十分できた (Fig. 10B, C, n = 2/2, n =

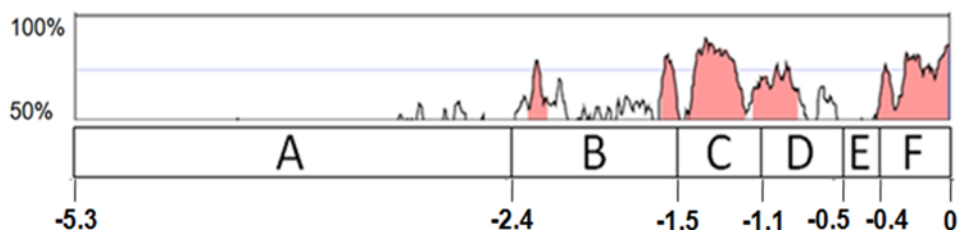


Figure 9. ヒトHES7とマウスHes7のプロモーター領域における相同性

本研究ではそれぞれの領域をA(-5.3kb to -2.4kb), B(-2.4kb to -1.5kb), C(-1.5kb to -1.1kb), D(-1.1kb to -0.5kb), E(-0.5kb to -0.4kb), F(-0.4kb to 0kb)に分割して解析した。-2.4kbから転写開始点までは高い相同性を示すが-2.4kbよりも遠位では相同性は低い。近位にある二つのRBPjk binding siteはE領域にあり、遠位にあるRBPjk binding siteはC領域にある。

8/12) が、1.1kb 以下ではシグナルは見られなかった(Fig. 10E, F, 1.1 kb: n = 0/10, 0.5 kb: n = 0/4)。これらの結果から 1.5kb が未分節中胚葉における *Hes7* の遺伝子の発現に重要であることがわかった。

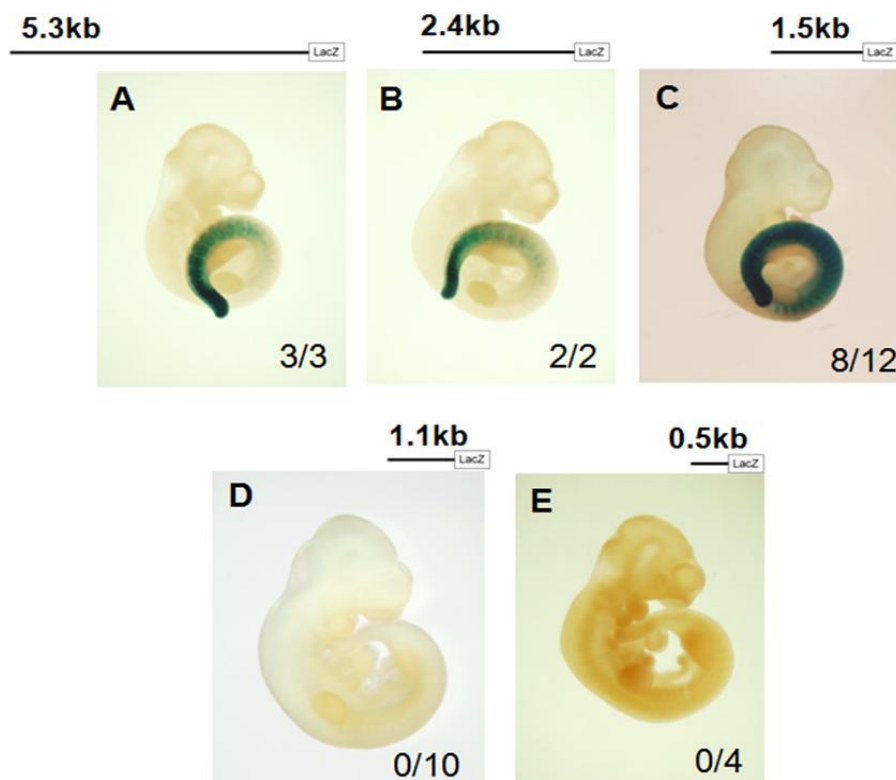


Figure 10. 5.3kbから0.5kbまでの*Hes7*上流制御下におけるレポーターの発現
A, 5.3kb制御下のLacZレポーターはE10.5マウス胚の未分節中胚葉においてシグナルが観察された。2.4kb (B)、1.5kb (C)レポーターも5.3kbレポーターと同様にシグナルが観察された。1.1kb以下(D, E)では未分節中胚葉におけるシグナルは検出できなかった。未分節中胚葉にのみ限局される内在性の*Hes7*タンパク質と異なり、5.3kbから1.5kbのレポーターのシグナルはより広域で観察された。そのシグナルは体節、神経管、中間中胚葉、腸管、上皮細胞においても見られた。パネル下部の数字はシグナルポジティブサンプル数/トータルサンプル数を示す。

上流の 434bp は *Hes7* の遺伝子発現におけるエンハンサーとして機能する

Hes7 の発現に必要な領域をさらに限定するために一部の上流領域を欠失させたレポーターを用いて発現解析を行った。*Hes7* の上流領域を便宜上 A から F の領域に分けて解析を行った (Fig. 9)。単独では発現に不十分な human *beta-globin* のミニマルプロモーターを持って各領域のエンハンサー活性を調べた(Yee et al. 1993, Chandler et al. 2009)。-2.4 kb から-1.5 kb までの領域を B 領域のレポーターとして解析を行ったが未分節中胚葉においてシグナルは検出されなかった(Fig. 11A, n = 0/8)。-1.5kb から-1.1kb における 434bp の配列を持つ C 領域レポーターは未分節中胚葉、神経管と頸部体節に広がる最も広域のシグナルが観察された(Fig.11B, n = 3/5)。この C 領域には遠位の RBPjk-binding site と二つの T-box sites、Ets-binding site が存在している

(Fig. 15)。次に発現に不十分な Hes7 プロモーター1.1kb の領域にある RBPjk-binding site が転写抑制領域の非存在下で機能するかどうかを調べるために DE レポーターを用いた。この DE レポーターは E 領域に Notch シグナルの制御を受ける近位の RBPjk-binding site (Bessho et al. 2001a) が二つ存在し、抑制性転写因子が結合する N-box (Chen et al. 2005)を含む F 領域は欠失しているためにこのサイトを介した自己抑制は受けないと考えられる。しかし、F 領域を欠失しても DE レポーターのシグナルは観察されなかった(Fig. 11C, 0/3)。その結果から発現に必要な領域を欠いているためにそれらの RBPjk-binding site の寄与を検出できなかったのではないかと考えた。そのため、未分節中胚葉で発現が見られる 2.4kb から RBPjk-binding site を含む E 領域を欠失させたレポーター (BCDF レポーター) を用いて発現を調べたが、近位にある二つの RBPjk-binding site を失っても未分節中胚葉においてレポーターの発現が見られた(Fig. 11D, n = 2/4)。結果を合わせて考えると C 領域を含んでいる全てのレポーター(5.3 kb, 2.4 kb, 1.5kb, C region and BCDF region)は未分節中胚葉におけるシグナルが見られたが、C 領域を含まない全てのレポーター(1.1 kb, 0.5 kb, 0.4 kb, B region and DE region)では発現が見られなかった(Fig.14)。従って、C 領域は Hes7 の発現に重要な役割を担っていると考えられる。しかし、5.3kb、2.4kb、1.5kb のレポーターと C 領域レポーターは未分節中胚葉においてシグナルが見られたが、レポータータンパク質の発現パターンは内在性の Hes7 タンパク質の発現パターンと異なり、より広い領域でシグナルが観察されている。それらのシグナルが見られる領域は体節由来の皮筋節、硬節だけではなく、上皮細胞、腸管、中間中胚葉においても見られた。

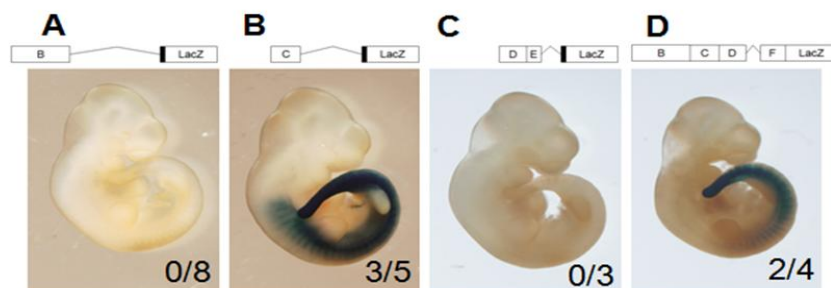


Figure 11. Hes7上流における各領域のエンハンサー活性

A, Hes7 B領域制御下のLacZレポーターマウス、E10.5胚のLacZ染色。未分節中胚葉におけるシグナルは観察されなかった。B, Hes7 C領域レポーターマウスは未分節中胚葉から頸部体節にかけてシグナルが観察された。C, 1.1kbから抑制性転写因子の結合サイトN-boxを含むF領域を欠失させたDEレポーターマウスにおいてシグナルは観察されなかった。D, 発現に十分な2.4kbから二つのRBPjk binding siteを含むE領域を欠失させたレポーターを持つマウスにおいてもLacZのシグナルは観察された。各領域のエンハンサー活性を調べるために、単独では発現に不十分なbeta-globinのミニマルプロモーターを用いて転写開始を保障した(black box)。

Hes7 のエンハンサーエレメントは未分節中胚葉特異性を担う

1.5kb 以上のレポーターと C 領域レポーターにおける広域の発現パターンの原因が上流領域を制限したことによって引き起こされた異所的な転写によるのか、beta-galactose タンパク質の高い安定性によるのかを調べるために mRNA の局在を *in situ hybridization* 法によって調べた。C 領域のレポーターを持つトランスジェニックマウス胚を *LacZ* mRNA に対するプローブで染色し、比較対象として 5.3kb のレポーターマウスも同様に染色した。その結果、散在したシグナルが見られ、周期的なパターンは見られなかったが C 領域のレポーターの発現は未分節中胚葉に限局していた (Fig. 12D, n = 4/7)。5.3kb のレポーターも C レポーターと類似したパターンを示した (Fig. 12B, n = 2/3) ことから、C 領域は *Hes7* の未分節中胚葉特異的な発現に寄与していると考えられる。また未分節中胚葉を超えて広域に広がるシグナルは beta-galactosidase タンパク質の安定性の高さによると考えられる。これまでに beta-galactosidase を用いたレポーター実験は酵素反応によってシグナルの検出を容易にする反面、その安定性の高さから内在性のタンパク質が消失した後も残存することが報告されている (Cole et al. 2002, Morales et al. 2002, Wittler et al. 2007, Wang et al. 2007) が *Hes7* のレポーターにおいてもそれらの報告と類似している。しかし、レポーターコンストラクトとは異なってヘテロ接合体の

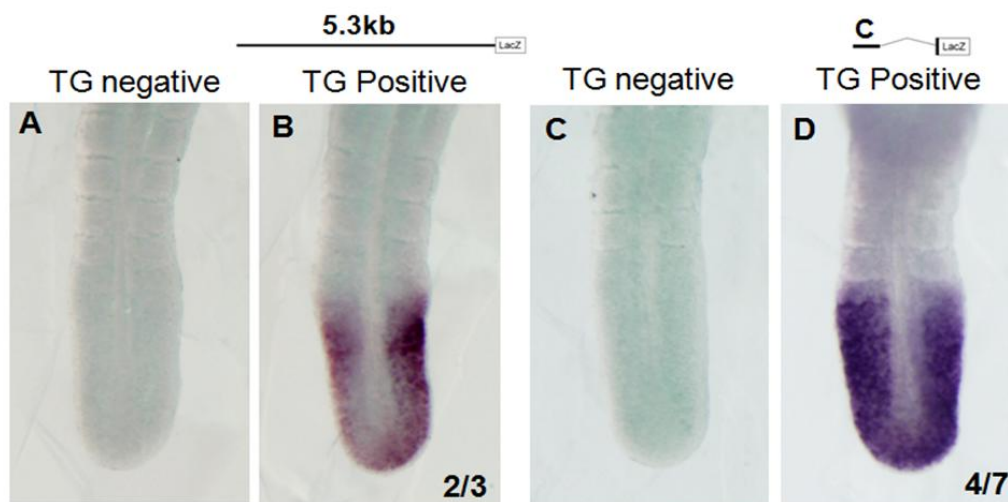


Figure 12. Hes7における5.3kbとC領域レポーターの*in situ hybridization*

LacZ mRNAを用いてE10.5のTGマウスを染色した。A, コントロール胚。TGマウスと同腹でレポーターコンストラクトが挿入されなかった胚。B, 5.3kbレポーターを持つTGマウス。シグナルは未分節中胚葉に限局されている。内在性のHes7 mRNAと比較してシグナルが広域に散在している。C, 同腹のコントロール胚。D, Hes7 C領域のレポーターを持つTGマウスの染色。5.3kbレポーターと同様に未分節中胚葉に限局されるがシグナルが広域に散在している。5.3kbレポーター、C領域レポーターは共に周期的な発現パターンは見られなかった。

*Hes7*欠損 (*LacZ* knockin) マウスにおいて 5' と 3' untranslated region (UTR) を持つ *LacZ* mRNA は未分節中胚葉に限局されるだけでなく、発現パターンはストライプ状の位相、すなわち *LacZ* mRNA が振動発現していることを示している (Fig. 13)。これは *Hes7* の発現パターンにおいて UTR が関与していることを示している。

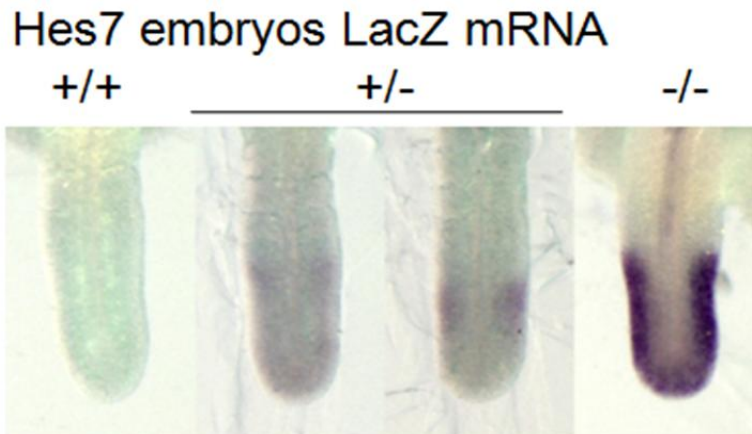


Figure 13. *Hes7*欠損(*LacZ* knockin)マウスにおけるレポーターのin situ hybridization
Hes7^{LacZ/+}マウスにおいてレポーターの発現は個体毎に異なるフェイズを示す。*Hes7*^{-/-}マウスにおいて *LacZ* mRNAは未分節中胚葉全域に分布し、異なるフェイズは見られなかった。*Hes7*^{+/+}マウスではシグナルが観察されない。

これまでの結果から *Hes7* 上流の C 領域が未分節中胚葉特異的な発現に重要であることがわかったが、その領域がどのような転写制御を受けているかをは明らかになっていない。そこで 2006 年の Yasuhiko らの報告を参照し、TF search (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>) を用いて *Hes7* C 領域における推定の転写因子結合サイトを探した。*Hes7* C 領域には Notch シグナルのエフェクターである RBPjk のターゲットサイトと T-box 転写因子のターゲットサイトである二つの T-box site、FGF シグナルのエフェクターである Ets のターゲットサイトが存在した (Fig. 15)。また RBPjk-binding site には逆向きの T-box site が重複している。Notch シグナルと FGF シグナルは *Hes7* の発現に関与していることが既に報告されている (Kageyama et al. 2007, Niwa et al. 2007, Ferjentsik et al. 2009, Nikaido et al. 2002, Brend et al. 2009) が分子レベルでの *Hes7* 転写制御機構は分かっていない。そこで C 領域における転写因子の相互作用と *Hes7* の転写制御における寄与を調べることにした。

RBPjk と Tbx6 は *Hes7* C 領域と相互作用する

Hes7 を制御する Notch シグナルは DNA 結合タンパク質である RBPjk に収

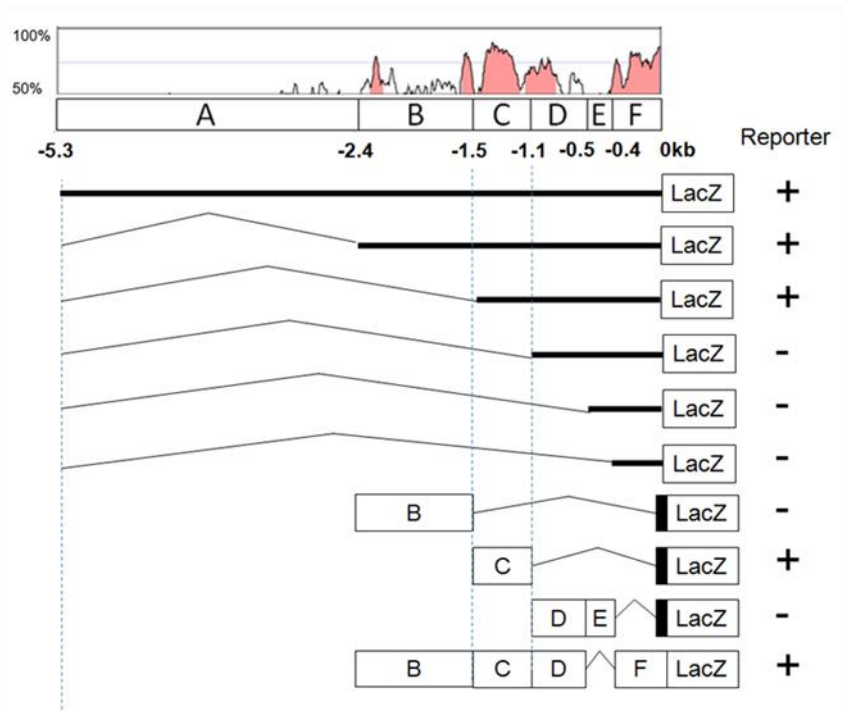


Figure 14. 各レポーターコンストラクトによる未分節中胚葉におけるシグナル
Hes7上流5.3kbから1.5kbのレポーターマウスにおいて未分節中胚葉のシグナルが見られた。しかし、1.1kb以下ではシグナルが見られなかった。Hes7 CレポーターとBCDFレポーターではシグナルが観察されたがC領域を含まないBレポーターとDEレポーターではシグナルが見られなかった。C領域を含むレポーターのみシグナルが観察された。

束する (Borggreffe et al. 2009)。そのため、RBPjk が *Hes7* C 領域に結合するのではないかと考えて pull down 実験を行った。Cos7 細胞に発現ベクターをトランスフェクションし、細胞溶解液をビオチン化オリゴ DNA とインキュベーションして遠心したサンプルを得た。*Hes7* C 領域の RBPjk-binding site を含むオリゴ DNA とインキュベーションした結果、上清からは RBPjk のシグナルが見られなかったが、沈殿サンプルにおいてシグナルが見られた (Fig. 18)。これは RBPjk の濃度はウェスタンブロットで検出するには不十分だが、RBPjk-binding site と結合して濃縮されたため、沈殿サンプルのみで検出されたと考えられる。さらに C 領域には T-box site が 2 か所存在し、未分節中胚葉で発現する T-box 転写因子は T (brachyury) と Tbx6 の二つの遺伝子がある (Fig. 16, Naiche et al. 2005)。ゼブラフィッシュでは Tbx6 のホモログである *tbx24* が振動遺伝子 *her1* を制御していることが明らかにされている (Brend et al. 2009)。しかし、マウスにおいて Tbx 転写因子と *Hes7* の相互作用は不明である。そのため、未分節中胚葉に発現する T-box 転写因子 T と Tbx6 が *Hes7* C 領域の T-box site と結合できるかどうかを検討した。結果、Tbx6 は T-box site1 と強く結合し、T-box site2 と弱く結合した (Fig. 17)。また RBPjk-binding site

T-box site/
RBPjk-binding site

-1504 ATGTGAACTTCTCAGAGGCAGATCCAATCCTACTTCTAGGTGTGGGAAAAGTTGTAGAG

-1444 AATCATTGAGGTGGGTGGAGCGTCAGGCCATTTTTTCTCTCCGTTGGATCCGGCCACCG

T-box site1

-1384 GGCCATAAAGTCATTCCATATGGCCAGGGCGGCCCCACACCCGGGTGCAAACCTGCCTCA

-1324 GGCCCCGAGCCTCACGTGCAGGTGAGAAAACTCAACCCCAATCCTGGTTCCAAGGAGG

T-box site2

-1264 GGGGCGGTGGGCCTGCTGGGACACACATCTGTGCTTCCATTGGCTGAAGTAGGGGAA

-1204 GGTGGGATGTACTGAGGGCCCTAACCCCAAATGGGTGCCTCCTTCTCAAGTACCGGGCC

Ets-binding site

-1144 CCTCCTGCTCTGCCTTTGGCAAGGCAGCCTCTTGCCAGAAAACCTCTCAGGATGTGGAG

-1084 GGCCTCTGGGAAGG

Figure 15. Hes7 C領域における推定の転写因子結合サイト

Hes7 C領域は転写開始点から-1504から-1071までの434bpの領域である。

RBPjk binding siteは-1463に位置し、-1348にT-box site1が存在し、-1241にT-box site2がある。

-1465からRBPjk binding siteと重複してT-box siteが存在する。-1097にはEtsのbinding siteがある。

塩基の左の数字は転写開始点からの塩基数を示す。

は逆向きの T-box site が重複 (T/RBPjk-binding site) しているため、pull down 実験に用いた結果、他のサイト同様 Tbx6 の結合が確認された (Fig. 17)。しかし、T はどのオリゴ DNA とも結合が見られなかった (Fig. 17)。さらに RBPjk と Tbx6 の結合を詳細に調べるために T/RBPjk-binding site の変異オリゴ DNA を用いた結果、結合によるシグナルは低下した (Fig. 18)。そして二つの転写因子を共発現させて同時に検出した結果、共に T/RBPjk-binding site との結合が確認された (Fig. 18)。Hes7 C 領域と T の結合が確認できなかったが T-box 転写因子は制御ドメインを介して受ける制御によってターゲットに対する特異性に影響を与える (Roy-Chowdhuri et al. 2006, Conlon et al. 2001) ため、制御ドメインを欠失させ、T の DNA binding domain のみの DNA 結合ポテンシャルを調べた。その結果、T box-site1、2 との結合は見られなかったが、T/RBPjk-binding site との弱い結合が観察された (Fig. 19)。そのため、T は潜在的に Hes7 C 領域における T/RBPjk-binding site と結合する能力を持つことが示唆された。Hes7 C 領域は推定の Ets binding site を持つため、FGF シグナルに制御され、未分節中胚葉に発現する Ets2、Etv4、Etv5 を用いて、同様に Ets binding site を含むオリゴ DNA との pull down 実験を行ったが、そ

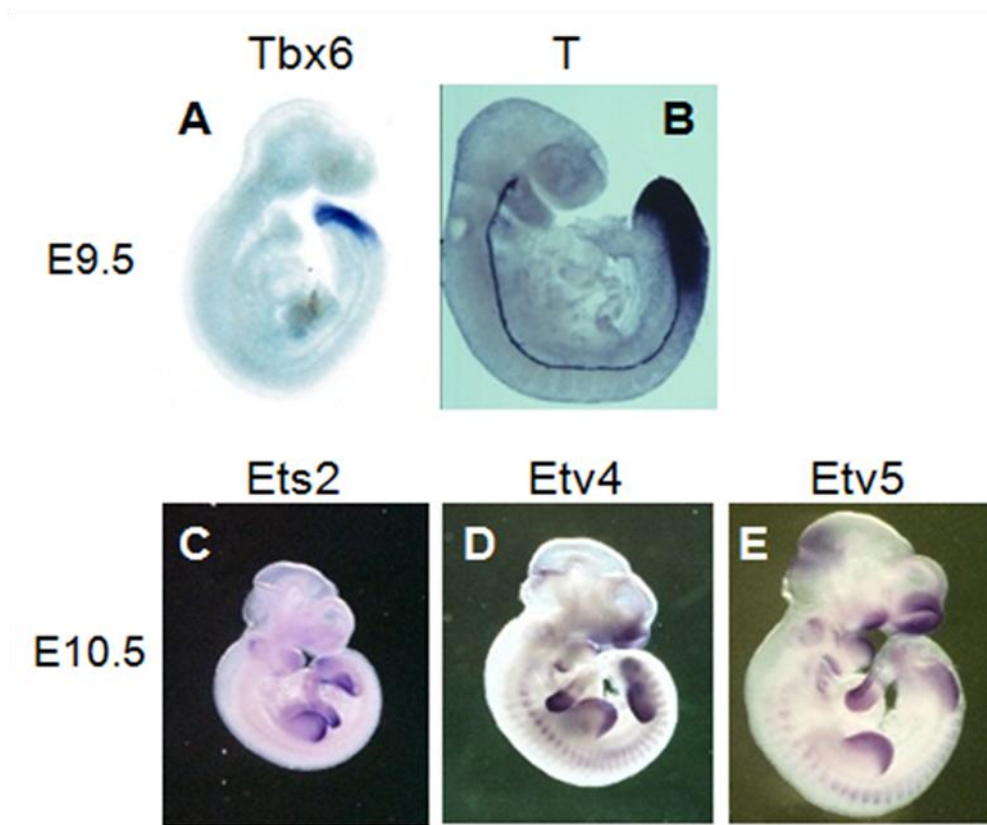


Figure 16. 未分節中胚葉に発現する転写因子
 Tbx6は体節形成以前から発現し、体節形成期には未分節中胚葉のみに限局される。Tは未分節中胚葉と軸索に発現し、中胚葉の遺伝子を制御する。Ets2、Etv4、Etv5はFGF8によって制御され類似した発現パターンを示す。鼻芽、鰓弓、肢芽、体節と未分節中胚葉で発現する。
 参照EMAGE (<http://www.emouseatlas.org/>)

れらに関して結合は確認できていない。

Notch シグナルと T-box 転写因子は協調して Hes7 の転写を活性化する

Pull down 実験によって結合が確認できた転写因子が実際に *Hes7* の転写に影響を与えるかどうかを調べた。そのため、ルシフェラーゼアッセイを行い、*Hes7* 上流領域の制御下でレポーターの発現量を測定した (Fig. 20, 21)。培養細胞にはマウス中胚葉由来の株化細胞 C3H10T1/2 を用いて *Hes7* C 領域制御下のルシフェラーゼと転写因子の発現ベクターを共発現させた。C 領域レポータールシフェラーゼ活性は T によって 3 倍に、Tbx6 によって 1.7 倍に増加した。Ets2 と Etv4 によって *Hes7* C レポーターの活性は 2 倍に増加したが Etv5 では増加は見られなかった。Notch シグナルを伝達するエフェクターである RBPjk を発現させてもルシフェラーゼ活性に変化は見られなかった。RBPjk は DNA 結合能を持つが単独では転写活性を持たず、コアクチベーター、コリ

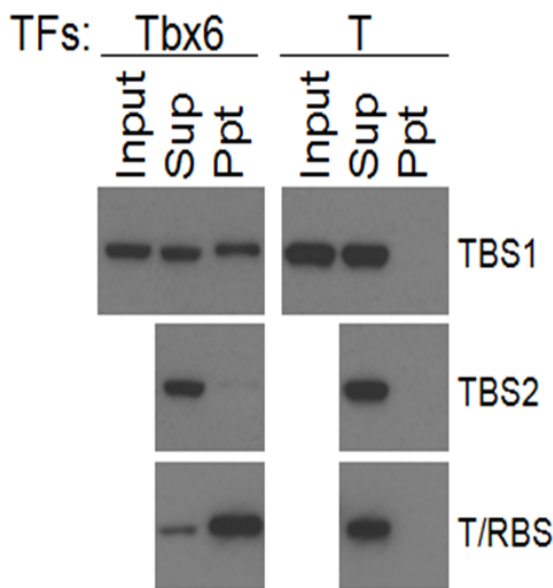


Figure 17. Hes7 C領域におけるターゲットサイトと転写因子の結合

転写因子を過剰発現したCos7細胞のライゼートとHes7 C領域におけるT-box siteの配列を持つビオチン化オリゴDNA、ストレプトアビジンビーズをインキュベーションしてpull down実験を行った。Tbx6はT-box site1とT/RBPjk binding siteに結合し、弱くT-box site2と結合することが示された。しかし、Tはどの配列とも結合しなかった。TBS: T-box site、T/RBS: T-box site and RBPjk binding site、Sup: Supernatant(上清)、Ppt: Precipitation(沈澱)、TFs: transcription factors。

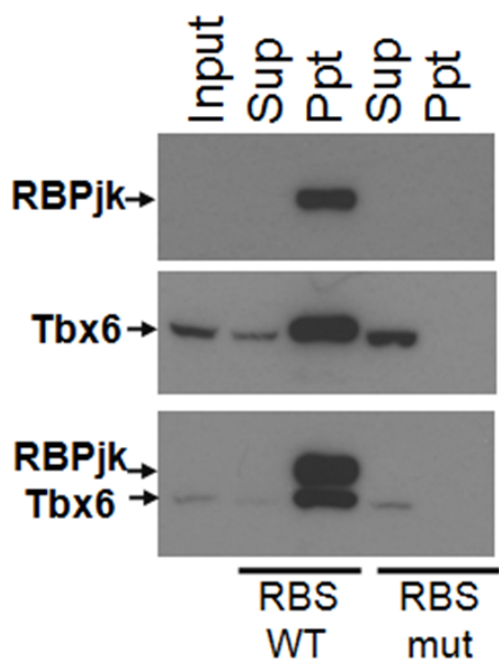


Figure 18. RBPjkとTbx6は同時にHes7 C領域のT/RBPjk binding siteに結合する

RBPjkとTbx6の発現ベクターを個々に、あるいは同時にCos7細胞にリポフェクションした後、細胞のライゼートはWTのT/RBPjk binding site(RBS WT)、あるいは変異した配列を持つT/RBPjk binding site(RBS mut)と共にインキュベーションしてpull down実験に用いた。RBPjkはRBS WTオリゴDNAとの結合が観察されたが、RBS mutオリゴDNAとは結合しなかった。InputにおいてもRBPjkのシグナルが検出できないタンパク質濃度の低さに起因すると考えられる。Tbx6はinput、上清共にシグナルが見られたがPptサンプルに強いシグナルが見られた。またRBS WTオリゴDNAとTbx6に見られた結合はRBS mutオリゴDNAでは損なわれた。RBPjkとTbx6を共発現させ、インキュベーションした結果、両転写因子は同時にRBS WTに結合し、RBS mutに対してはどちらもシグナルが消失した。

プレッサーを必要とすることから転写因子間の相互作用が必要であると考えてNotchシグナルを伝達するNICD、もしくはRBPjkとT-box転写因子、Ets転写因子を共発現させてルシフェラーゼ活性を測定した(Fig. 22)。

その結果、対照ベクターと比較してNICD、あるいはRBPjk存在下でTbx6、Tによる転写の活性化は増加した。しかし、それらとは異なり、Ets2は単独でHes7 Cレポーターの発現を増加させた。これらの結果からT-box転写因子はNotchシグナルとの相乗効果によって、またEts2は独立してHes7の発現を

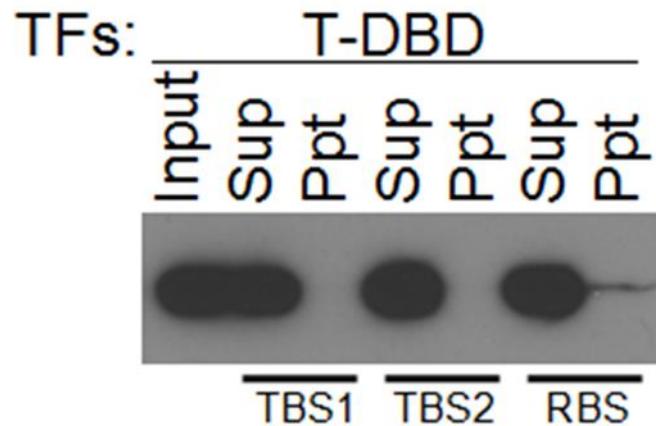


Figure 19. Tは潜在的にHes7 C領域のT/RBPjk binding siteと結合する能力がある。T-box転写因子のターゲット特異性はその制御ドメインを介したタンパク質相互作用によって制御されるため、制御ドメイン非存在下においてDBDドメイン(Tドメイン)のHes7 C領域のT-box siteとの結合を調べた。T-DBDはT-box site1、T-box site2と結合が見られなかったがT/RBPjk binding siteとの結合が観察された。T-DBD: T DNA binding domain。

誘導していると考えられる。次に pull down 実験によって確認された結合サイトと T-box 転写因子による発現誘導に相関性が見られるかを確認するために T/RBPjk-binding site と二つの T-box site に変異を加えたレポーターを用いてレポーター活性を測定した (Fig. 23)。WT のレポーターでは NICD 以外の

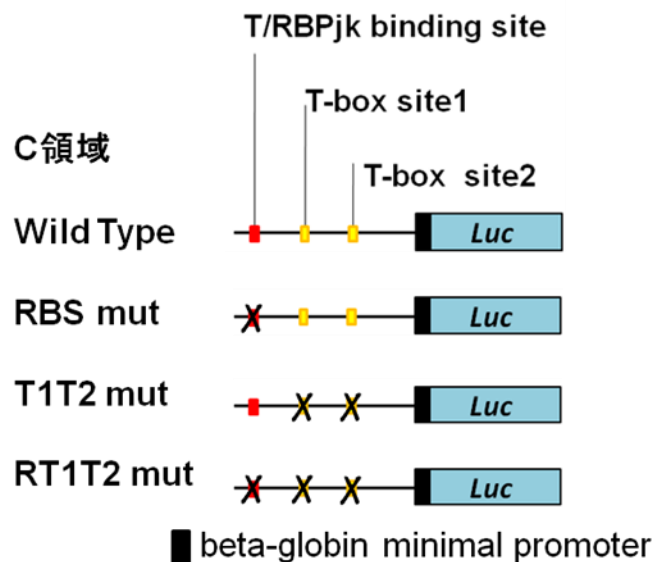


Figure 20. Hes7ルシフェラーゼレポーター
Hes7上流-1504から-1071bpまでクローニングしてルシフェラーゼレポーターpGL3basicに組み込んだ。(Wild type)単独では発現に不十分なbeta-globinのミニマルプロモーターはエンハンサー存在時のプロモーター活性を保障するために用いた。塩基置換によって各結合サイトに変異を加えた。RBS mut、T1T2 mutはそれぞれT/RBPjk結合サイト、T-box site1とT-box site2の変異レポーターで、RT1T2 mutは3つのサイト全ての変異レポーター。

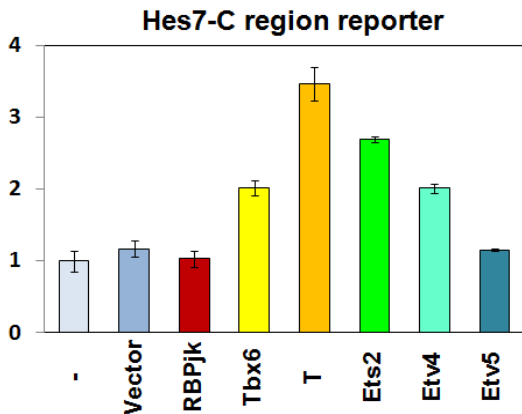


Figure 21. T-box転写因子とEts因子はHes7のルシフェラーゼレポーターの活性を増加させる。10T1/2細胞にC領域レポーターと転写因子の発現ベクターを共発現させた。コントロールとしてSV40プロモーター制御下のウミシイタケルシフェラーゼを用いた。T-box転写因子とEts因子はレポーター活性を増加させた。

RBPjk、Tbx6、Tによって活性が上昇したが T/RBPjk-binding site の変異レポーターと二つの T-box site の変異レポーターでは活性が低下した。さらに三つのサイト全てを変異させたレポーターも転写因子による発現誘導は低下した。これらの結果から、Notch シグナルと T-box 転写因子は直接、あるいは間接的にこれらのサイトを介して *Hes7* の発現を誘導していると考えられる。

分節化時計から位置決定機構への伝達

分節化時計の周期性がどのように分節化の位置決定を担う FGF に伝達されるかを調べるためにシグナルクロストークを担う因子のスクリーニングを行った。時間的周期性を担うためには振動発現パターンを持つと考えられるた

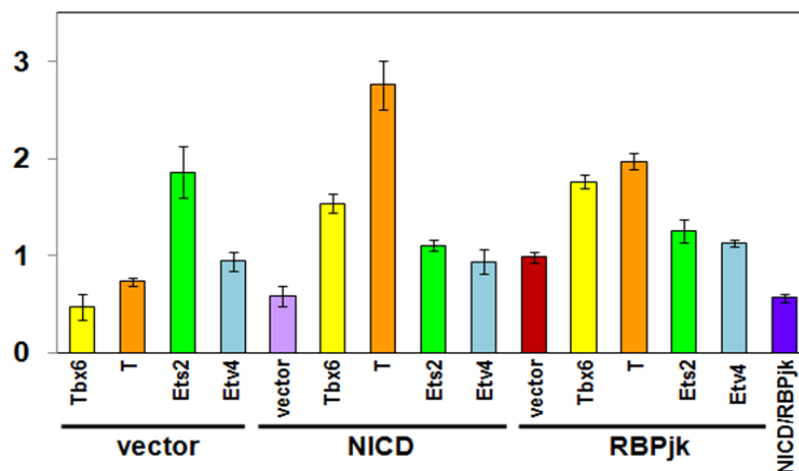


Figure 22. NotchシグナルとT-box遺伝子の相乗効果

10T1/2細胞はHes7 C領域のルシフェラーゼレポーターと転写因子の発現ベクター、さらにNotchシグナルの構成因子NICD(Notch1 intracellular domain)、あるいはRBPjkの発現ベクターをリポフェクションした。単独の効果と比較してTbx6、TはNICD、あるいはRBPjk存在下ではHes7レポーターに対する発現誘導効果が増加した。Ets2はNICD、RBPjk存在下において発現誘導の増加は示さなかった。また単独のNICD、RBPjk、あるいはNICDとRBPjkの共発現においてもHes7の顕著な増加は見られなかった。

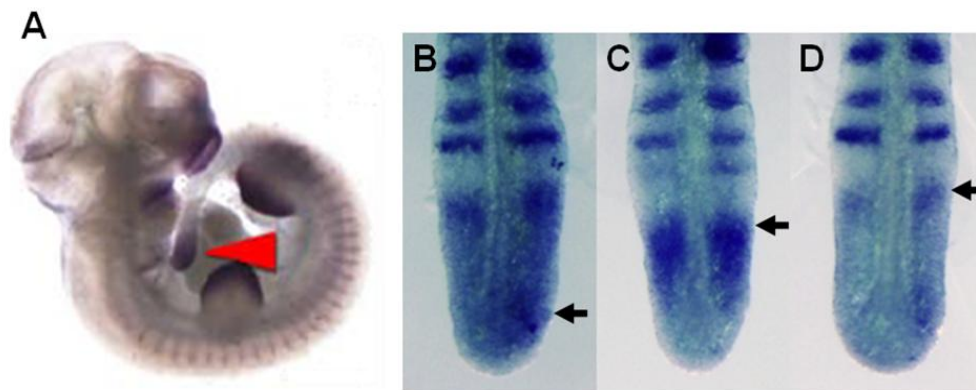


Figure 24. マウス未分節中胚葉におけるSprouty4の振動発現

(A) E10.5マウス胚におけるSprouty4の発現パターン。Sprouty4 mRNAは未分節中胚葉(矢頭)と体節の尾部側、肢芽、鼻板に発現する。(B-D) E10.5胚の未分節中胚葉におけるSprouty4の発現パターン。体節のマーカとしてUncx4.1を共に染色した。Sprouty4の発現は個体毎に未分節中胚葉で異なるパターンが観察される。矢印は発現領域の進行端を示す。

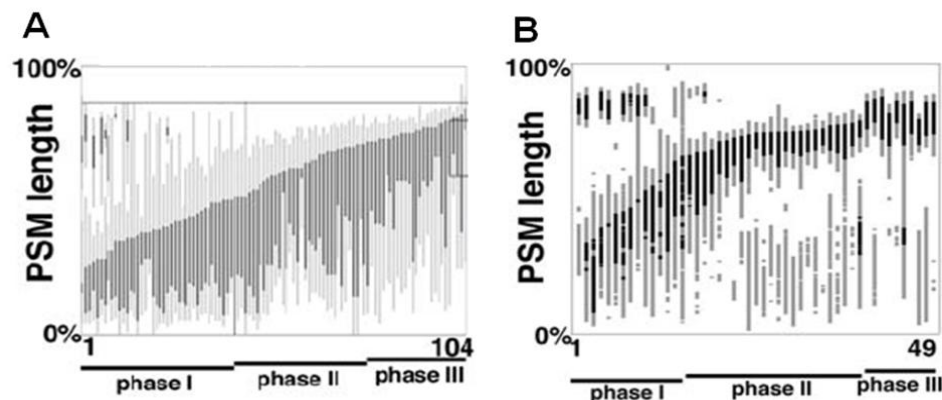


Figure 25. ラインスキャンによるSprouty4の発現領域の測定

マウス未分節中胚葉におけるSprouty4とLfngの発現を測定した。Sprouty4 (A)、Lfng (B)。未分節中胚葉の尾部先端を0、最も新しく形成された体節の分節境界を100とした。縦軸のバーは一個体におけるSprouty4、Lfngの発現領域を示す。黒線は相対的な強いシグナルを示し、灰色線は弱いシグナルを示す。Sprouty4: フェーズI (Fig9B,C, n = 42/104), フェーズII (Fig9D, n = 36/104), フェーズIII (Fig9E, n = 26/104, phase III) トータル(n=104); Lfng (n=49)。

め、FGFシグナルの制御因子で未分節中胚葉に発現し、かつネガティブフィードバックを形成するSef、Dusp、Sproutyファミリーの因子の未分節中胚葉における発現パターンを調べた。その結果、Sprouty4がその候補として挙げられた。Embryonic Day(E) 10.5マウス胚におけるSprouty4の発現は未分節中胚葉、体節、肢芽、鼻板においてシグナルが見られた (Fig. 24A)。E10.5マウス胚の未分節中胚葉においては個体毎に異なるSprouty4の発現パターンが見られた (Fig. 24B-D)。それらの異なるSprouty4の発現パターンを3つのグループに分けた。Phase I (Fig. 25A, n = 42/104)は最も尾部側の領域にシグナルが見られるパターンであり、Phase II (Fig. 25A, n = 36/104)は未分節中胚葉中

域にシグナルが見られる。Phase III(Fig. 25A, n = 26/104, phase III)は未分節中胚葉頭部側にシグナルが見られるパターンである。より詳細に発現プロフィールを決定するためにシグナル強度に対するラインスキャンを行った。*Sprouty4*のシグナルの進行端は未分節中胚葉を通して均等に分配され、*Lfng*の振動パターンと類似していた (Fig. 26B)。*Sprouty4*の異なる発現パターンが振動発現であるかどうかを調べるために未分節中胚葉を神経管に沿って二分し、*Sprouty4*の発現パターンと*Lfng*の発現パターンを比較した。*Lfng*とは異なって未分節中胚葉の最も頭部側の領域には*Sprouty4*の発現は見られないが、未分節中胚葉中域と尾部末側では*Sprouty4*と*Lfng*は同じ位相で発現が見

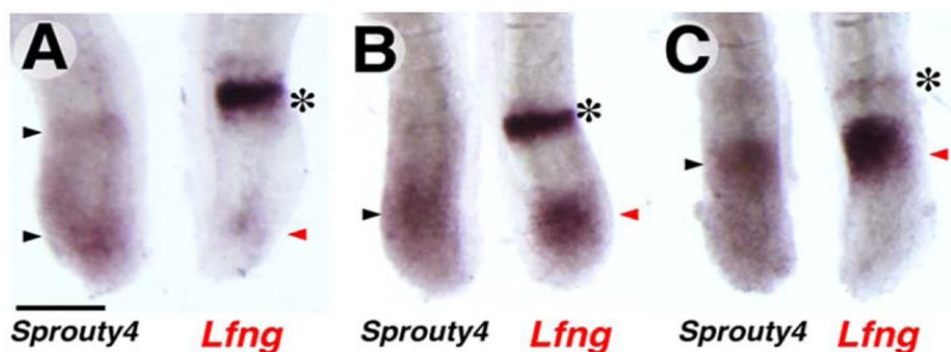


Figure 26. *Sprouty4*の発現は*Lfng*のフェーズと一致する (A–C) E10.5マウス胚の二分された未分節中胚葉における*Sprouty4*(左)と*Lfng*(右)の発現。発現パターンは3つのカテゴリに分類した: フェーズI (A), フェーズII (B), フェーズ III (C)。*Lfng*は未分節中胚葉において2時間周期で振動発現するため、比較に用いた。最も後端のバンドに関して*Sprouty4*と*Lfng*は類似した発現パターンを示す。*Lfng*における未分節中胚葉の最頭部側のバンド状発現は*Sprouty4*では見られない(asterisk)。Scale bar: A, 200 μm.

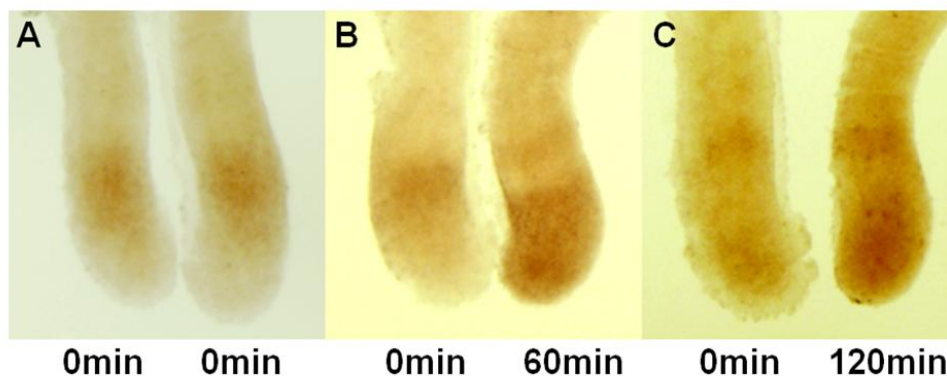


Figure 27. *Sprouty4*の発現は周期的に繰り返される。(A)二分した未分節中胚葉の培養後における*Sprouty4*の発現パターン。組織の左片はすぐに固定(図左側)し、右片(図右側)は60分(B)、120分(C)培養後に固定した。培養60分後の*Sprouty4*の発現パターンは培養0分と比較して異なる。培養前の*Sprouty4*の発現は未分節中胚葉の中域に一つのバンドが見られるが培養後の組織では後端から中域までのバンドと前端側にもう一つのバンドが見られる。しかし、120分培養後はコントロールと同じパターンを示し、共に未分節中胚葉の後端と前端に二つのバンドが見られる(F)。

られた(n = 23, Fig. 26B, C)。*Sprouty4*が振動発現しているかどうかをさらに

確かめるために組織培養を行って、位相の変化を調べた。培養後60分の未分節中胚葉は培養0分のものと比較して異なるパターンを示したが(Fig. 27B n = 10)、培養後120分のものとは同じパターンを示した(Fig. 27C, n = 4)。これらの結果から *Sprouty4* は約2時間の振動発現していることが示唆された。

Hes7 はその転写抑制を介して、ターゲット遺伝子である *Hes7* 自身や *Lfng*、*Nkd1* を周期的に抑制することでターゲット遺伝子の振動パターンを生み出している。そのため、*Sprouty4* が *Hes7* によって制御されているかを調べるために *Hes7* 欠損マウスにおける *Sprouty4* の発現パターンを観察した。*Sprouty4* の

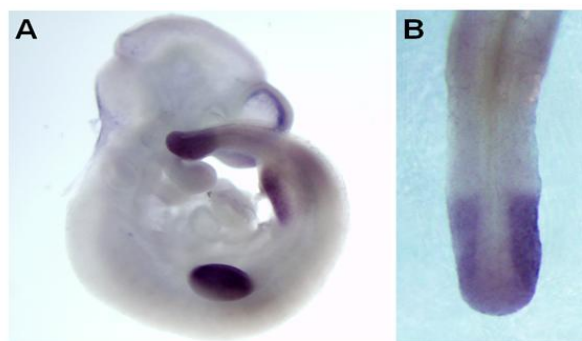


Figure 28. Hes7欠損マウスにおける*Sprouty4*の発現

Hes7欠損マウスにおける*Sprouty4*の発現(A)。E10.5のHes7欠損マウスの鼻板、肢芽において、野生型と同様の発現パターンを示す。Hes7欠損マウスでは体節が正常に形成されないため、体節における*Sprouty4*の発現は不鮮明である。(B)Hes7欠損マウスの未分節中胚葉では全域で*Sprouty4*のシグナルが見られ、ストライプパターンは見られない(n = 24)。

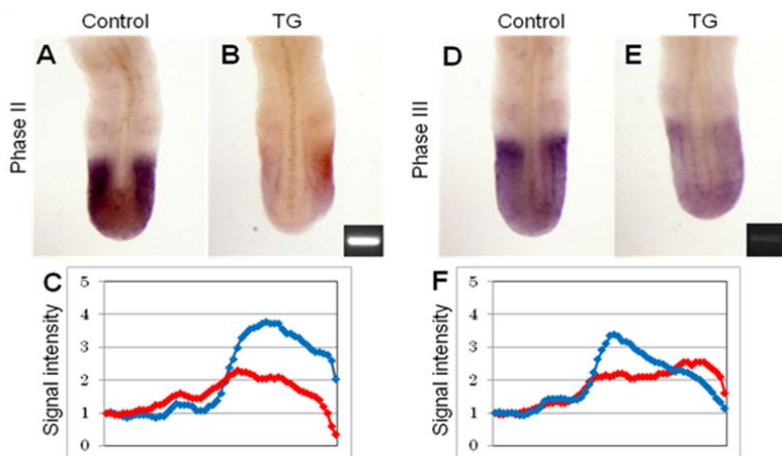


Figure 29. Hes7過剰発現マウスにおける*Sprouty4*の発現

Hes7プロモーター下流にHes7のコーディング領域を組み込んだコンストラクトをマウスに導入した(B)Hes7過剰発現マウスの未分節中胚葉における*Sprouty4*の発現。同じフェイズIIの野生型マウス(A)と比較してシグナルの低下が見られた。フェイズIIIにおいてもフェイズIIと同様にHes7過剰発現マウスの未分節中胚葉においてシグナルの低下が見られた(D, E)。パネル下部のインセットはLacZに対するジェノタイピングPCRの結果。(C, F)野生型とHes7過剰発現マウスにおける未分節中胚葉の*Sprouty4*の発現シグナルの計測。フェイズII(C)、フェイズIII(F) 青; 野生型、赤; Hes7過剰発現マウス

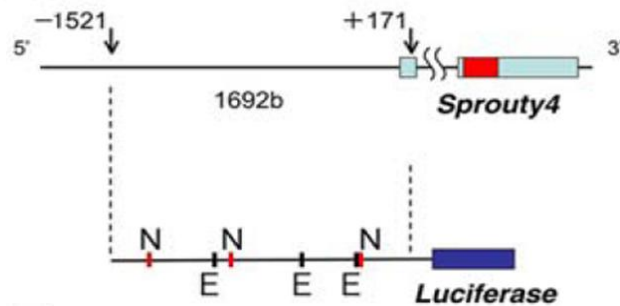


Figure 30. *Sprouty4*の振動発現はHes7に依存する
*Sprouty4*のプロモーター解析。転写開始点を0として-1521から+171までをクローニングし、この*Sprouty4*上流領域をpGL3basicのルシフェラーゼ遺伝子の5'に挿入した。この領域は3つのN-boxとE-boxのコンセンサス配列を含む。位置はそれぞれ、N-box1: -1297, E-box1: -997, N-box2: -909, E-box2: -272, E-box3: 68, N-box3: 66。

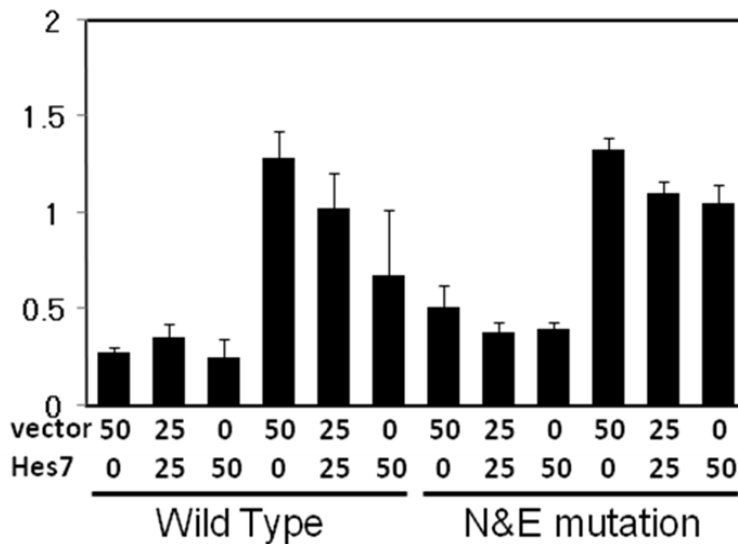


Figure 31. FGF依存的な*Sprouty4*の発現はHes7によって抑制される
Hes7発現ベクターをNIH3T3細胞にトランスフェクションし、*Sprouty4*プロモーター制御下のルシフェラーゼ活性を測定した。bFGF非存在下ではHes7による影響は見られない(レーン2,3)。ルシフェラーゼ活性はbasic FGFによって増加(レーン4)し、FGF依存的なluciferase活性はHes7発現ベクターの濃度依存的に低下(レーン5,6)した。N-boxとE-boxに変異を加えた*Sprouty4*レポーターではFGF依存的なルシフェラーゼ活性に対するHes7による抑制効果が軽減した(レーン11,12)。

発現は鼻板、肢芽では影響は見られなかったが、*Hes7*と発現領域が重複する未分節中胚葉においては野生型で見られるストライプ状の発現パターンは見られなくなり、未分節中胚葉全域でシグナルが見られた(Fig. 28A, n = 24)。次にマウスに未分節中胚葉でHes7を過剰発現させて*Sprouty4*の発現に対する影響を調べた。同腹の野生型マウスと比較してHes7過剰発現マウスにおいて

*Sprouty4*のシグナルは低下した (Fig. 29B, n = 11; E, n = 6/10)。そのため、*Sprouty4*の振動発現は*Hes7*に依存していると考えられる。次に*Hes*転写因子はE-boxとN-boxを介して機能する転写因子である (Ikeda et al. 1993, Takebayashi et al. 2004) ため、*Sprouty4*プロモーターに対する制御機構を調べた。*Sprouty4*の上流領域-1521から+171までをクローニングし、luciferaseレポーターを用いて解析した (Fig. 30)。Basic FGFによって*Sprouty4*のレポーター活性は上昇し、FGF依存的なレポーター活性は*Hes7*の共トランスフェクションによって濃度依存的に低下した (Fig. 31左)。*Sprouty4*のプロモーター上にあるE-boxとN-boxの変異レポーターでは野生型レポーターと同様にbasic FGFによって発現が上昇したが、*Hes7*による抑制効果は減少した (Fig. 31右)。

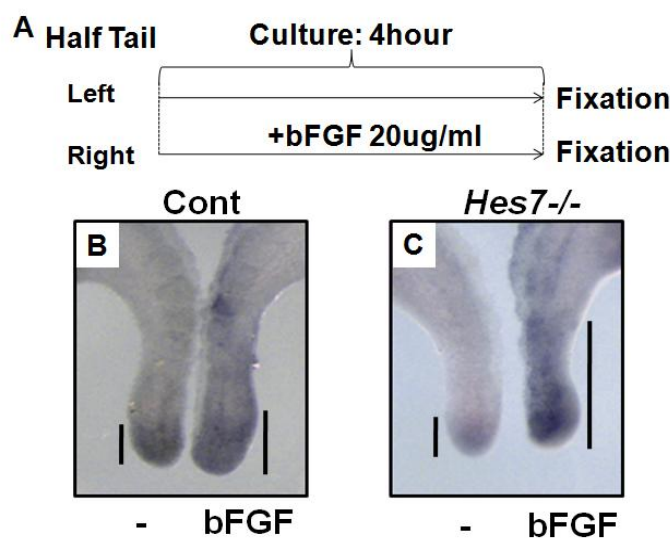


Figure 32. *Hes7*は未分節中胚葉においてFGF依存的な*Sprouty4*の発現を阻害する (A) 未分節中胚葉は神経管に沿って二分され、bFGFの存在下、あるいは非存在下で培養された。(B, C)マウス未分節中胚葉の組織培養。(B)コントロールマウス未分節中胚葉の*Sprouty4*の発現はbasic FGFの4時間投与によって軽微に増加した。(C) *Hes7*欠損マウス未分節中胚葉においてbasic FGFの4時間投与は野生型と比較して*Sprouty4*の発現を強く誘導した。

この結果から*Hes7*はFGF依存的な*Sprouty4*のプロモーター活性を抑制していると考えられる。個体内でもFGF依存的な*Sprouty4*の発現が*Hes7*により抑制されるかを検証するために、*Hes7*欠損マウスの未分節中胚葉を神経管に沿って二分し、basic FGFの存在下、非存在下における*Hes7*の*Sprouty4*発現への影響を調べた (Fig. 32A)。コントロールではbasic FGFによる*Sprouty4*の軽微なシグナルの増加が見られた (Fig. 32B, n = 10)が野生型におけるFGF応答と比較して*Hes7*欠損マウスにおけるFGF依存的な*Sprouty4*のシグナルは強く増加した (Fig. 32C, n = 3)。それらの結果は生体内においても*Hes7*が*Sprouty4*の発現を抑制することを強く示唆する。

マウスにおける振動発現が脊椎動物間で保存されているかを検討するために zebrafish における *Sprouty4* の発現パターンを調べた結果、*Sprouty4* の zebrafish ホモログでは振動発現は観察されなかった (Fig. 33, n = 12)。そのため、*Sprouty4* の振動発現機構は保存されていないと考えられる。

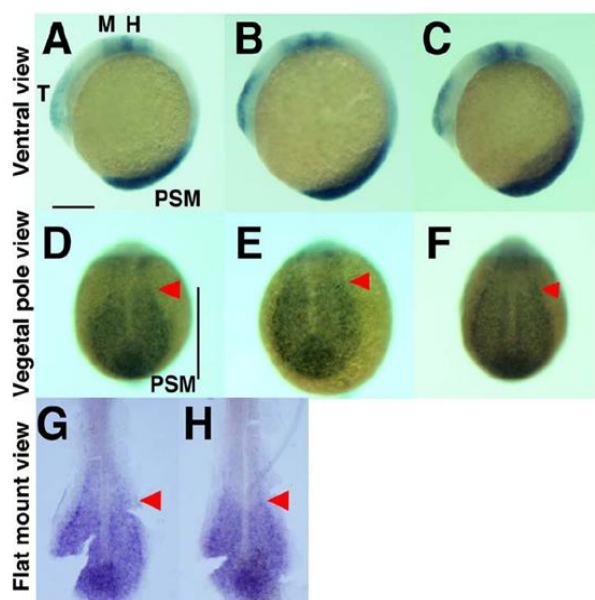


Figure 33. Zebrafishの未分節中胚葉において*Sprouty4*は発現するが振動しない (A–C) zebrafish 6体節期における*Sprouty4*発現。終脳、中脳後脳境界線、心臓、鰓弓においてシグナルが見られる。(D–F) 未分節中胚葉における*Sprouty4*の発現パターンは一定で、異なるパターンは観察されない。(G,H)未分節中胚葉のフラットマウント。赤矢頭は*Sprouty4*のシグナルの頭部側境界線 Scale bars: A, G, 200 μm.

考察

胚発生期における体節形成は時間的周期性と空間的周期性の正確さによって均等な繰り返し構造が形成される。脊椎動物の体節形成は **Notch** シグナルによる振動遺伝子の発現とその同調化によって時間的周期性が制御され、分泌性因子である **FGF** と **Wnt** の放出と濃度勾配の形成によって体節の分節化の位置が決定されている。しかし、それらのシグナル経路がどのように統合されて体節形成に働くか不明な点も多く、**Notch** シグナルによる分節化と振動遺伝子発現の制御、および時間的周期性から空間的周期性へのシグナル伝達を解き明かす必要がある。本研究では **Notch** シグナルが体節の分節化に必須であること、**Notch** シグナル下流の振動遺伝子 *Hes7* の発現制御と *Hes7* による **FGF** シグナル阻害因子である *Sprouty4* の振動発現制御機構を明らかにした。

Notch シグナルは遺伝子の分節化と振動発現に必須である

Hes7 の非存在下では *Lfng* の振動発現が失われて Notch シグナルに対するネガティブフィードバックは働かないため、NICD の振動は失われる。そのため、*Hes7* 欠損マウスでは周期的な Notch シグナルは損なわれ、非周期的なパターンを示す。しかし、*Hes7*、*Lfng* の欠損マウスにおいても不完全ながら体節は形成される (Fig. 6B,C, Bessho et al. 2001b, Evrard et al. 1998, Zhang et al. 1998)。*Hes7* 欠損マウスにおいて FGF と Wnt シグナルの構成因子の振動発現は維持され、*Lfng* 欠損マウスにおいても *Hes7* の振動発現が維持されていた (Fig. 7N-P)。そのため、Notch シグナル非依存的な振動遺伝子の働きによって分節化が起こされている可能性と非周期的な Notch シグナルが分節化に十分である可能性の二つが考えられた。しかし、Notch シグナルが完全に消失する *Psen1/2* 欠損マウス (Wong et al. 1997, Herreman et al. 1999) では Notch、FGF、Wnt シグナルのそれぞれの下流遺伝子も振動発現は損なわれ、体節形成も完全に失われた (Fig. 8)。この結果から、Notch シグナルは時計遺伝子の振動発現と分節化の両方に必須であると考えられる。

ゼブラフィッシュの *Hes* 関連遺伝子 *her1* のノックダウンによって振動発現が損なわれた場合、不完全ではあっても分節化が起こる (Holley et al. 2002)。しかし、未分節中胚葉の最前部 (anteriormost) では Notch シグナルが維持され、振動発現が損なわれても残存する Notch シグナルによって体節の分節化が起こると考えられている。またマウスにおいて非周期的な Notch シグナルが体節形成にどのような影響を与えるかが既に報告されている (Feller et al. 2009)。Notch 受容体の活性化型細胞内ドメインを T プロモーター制御下で発現させて未分節中胚葉で非周期的な Notch 活性を受ける T-NICD トランスジェニックマウスは 18 体節まで形成される。非周期的 Notch シグナルの制御化では *Hes7*、*Lfng* は振動しないが Wnt 下流の *Axin2* は振動発現が維持されている。T-NICD マウスと似て *Hes7* 欠損マウスでは NICD の周期的な発現は見られず、*Axin2* の振動発現も維持されている。しかし、今回の結果から Notch シグナルは周期性が失われ、その活性化が非周期的であっても分節化と Wnt 依存的な *Axin2* の振動発現を誘導するため、Notch シグナルそのものが分節化に必要であると考えられる。また *Psen1/2* 欠損マウスにおいて Notch 活性が完全に断たれると *Axin2* も振動しないため、非周期的な Notch シグナルが Wnt 下流遺伝子の振動発現にも必要であると考えられる。*Hes7* の欠損したマウスや周期的な Notch シグナルが損なわれた状態においても、非周期的な Notch シグナルによって FGF/Wnt シグナル下流の *Axin2*、*Snail1* も振動発現が維持される。そのため、それらの振動遺伝子は Notch シグナルに依存していても周期性の獲得は独立しており、周期的 Notch 制御下の時計遺伝子 *Hes7* や *Lfng* には異なる

メカニズムで分節化時計に貢献し、堅固さを与えていると考えられる。

これらの結果から Notch シグナルは体節形成に必須であり、Notch 下流の振動遺伝子の発現と同調化、FGF/Wnt 下流遺伝子の振動発現の維持、体節の分節化と複数の側面から体節形成を制御していると考えられる (Fig. 34)。

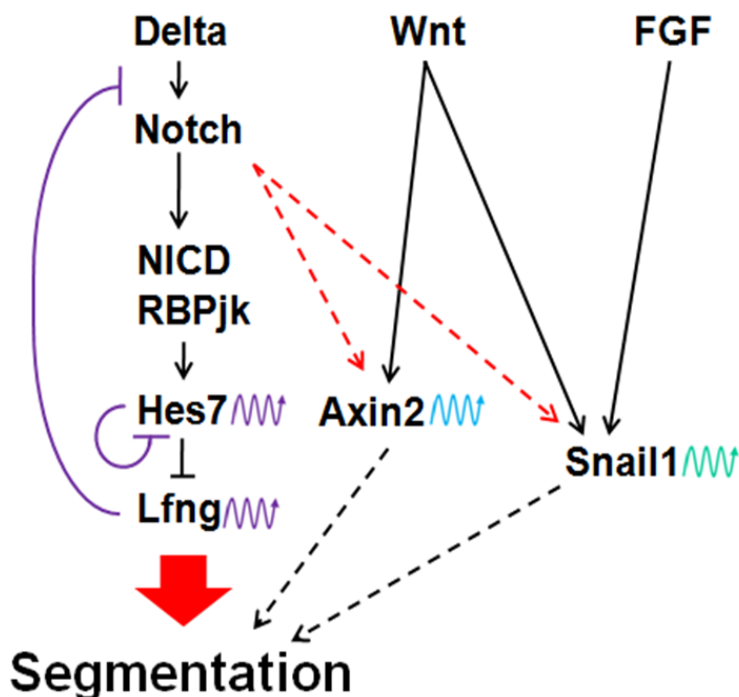


Figure 34. 体節形成におけるNotchシグナルの役割

Notchシグナルはマウス胚の体節形成において、体節形成に欠かせない役割を担っている。振動遺伝子による周期性はNotchシグナルによって制御され、また分節化においてもNotchシグナルは必須である。Notchシグナル制御下の振動遺伝子のみではなく、Wnt、FGFシグナル制御下の遺伝子に対しても振動パターン制御に働く。Notchシグナルは周期性と分節化の両方に働いて体節形成に寄与していると考えられる。

プロモーター活性が *Hes7* の未分節中胚葉特異的発現を規定する。

Notch シグナル、FGF シグナルにおける振動遺伝子の発現パターンを制御する *Hes7* の転写制御機構を調べた本研究の結果から *Hes7* 上流の-1.5kb から-1.1kbにおける 434bp の領域が未分節中胚葉における *Hes7* の発現に必須であり、この領域を介して Notch シグナルと T-box 転写因子が協調して *Hes7* の発現を誘導していると考えられる。しかし、*LacZ* を用いたレポーターのタンパク質局在は内在性の *Hes7* タンパク質とは異なり、体節、上皮細胞、腸管と神経管の広域で見られた。それは beta-galactosidase タンパク質の高い安定性に起因すると考えられる。beta-galactosidase はシグナルの検出を容易にするが内在性のタンパク質が消失した後でも残存して予期しない酵素反応によって本来の発現パターンよりも広域のシグナルを示す例が知られている (Cole et

al. 2002, Morales et al. 2002, Wittler et al. 2007, Wang et al. 2007)。本研究において 5.3kb と C 領域、両方の制御下で *LacZ* の mRNA は未分節中胚葉にのみ限局している (Fig. 12) ため、広域に見られるレポータータンパク質のシグナルは beta-galactosidase の安定性によるものであり、*Hes7* タンパク質の周期的な発現パターンを覆い隠していると考えられる。*Hes7* タンパク質のストライプ状の振動発現はユビキチンプロテアソームの機構による速やかな分解によって維持されている (Hirata et al. 2004)。*Hes7* タンパク質の分解半減期が長い変異マウスではその安定性のために *Hes7* の振動発現は挫かれる。そのため、*Hes7* の振動発現には適切なタンパク質の不安定性が求められる。

さらに 3'UTR は mRNA の不安定の制御を介して、発現領域の制限に関与するため、遺伝子の発現パターンには重要である。*Xenopus hairy2* の 3' UTR は自身の mRNA を不安定化し、ストライプ状の発現領域に限局させる (Davis et al. 2001)。3' UTR の欠失や置換はレポーター mRNA の不安定性や発現領域の限局に影響を与えると考えられる。*Lfng* のプロモーター解析では *SV40* 3' UTR を持つか、あるいは 3' UTR を持たない *LacZ* mRNA を用いても周期的な発現パターンを検出できている (Morales et al. 2002, Cole et al. 2002) が、本研究で用いた *SV40* の 3' UTR を持つ *Hes7* レポーターでは *Hes7* の周期的な振動パターンは見られなかった。従って *Hes7* の 3' UTR は限局した発現パターンを維持するために重要であると考えられる。適切な mRNA とタンパク質の分解は振動発現に求められるが振動発現という特殊な発現パターンの基礎となっているのはプロモーター領域による制御である。振動発現を引き起こすネガティブフィードバックには促進と抑制の両方のシグナルが求められ、転写レベルでの二方向制御が *Hes7* におけるネガティブフィードバックの起源となっている。従って、プロモーターの活性が *Hes7* の特徴的な発現メカニズムの基礎となっている。

本研究では *Hes7* の発現に重要なシスエレメントを特定したが、さらに *Hes7* のプロモーターに対するトランスエレメントの解析を行った。*Hes7* C 領域は RBPjk-binding site、T-box site1、2 と Ets-binding site を含み、対応する転写因子が結合することが予想された。Pull down 実験の結果、RBPjk、Tbx6 が対応するターゲットサイトと結合することがわかった。Notch シグナルは RBPjk に収束して、可逆的な転写因子複合体を形成 (Borggreffe et al. 2009) する。その標的遺伝子は RBPjk 複合体による転写の活性化と抑制の両方の制御を受ける。レポーターマウスの解析結果から E 領域にある近位の二つの RBPjk binding site は *Hes7* の発現に必須ではないことが示されたが、C 領域にある RBPjk-binding site は T-box site と重複し、RBPjk、Tbx6 と結合して *Hes7* の発現を亢進することがわかった (Fig. 18, 22)。この結果から C 領域にある RBPjk

を介したNotchシグナルは*Hes7*の発現に必要であると考えられる。

体節形成においてFGFシグナルは分節化の位置決定だけではなく*Sprouty4*などの振動遺伝子の発現にも働いている。そして*Hes7*の尾部先端における発現の開始も誘導する(Niwa et al. 2007, Ferjentsik et al. 2009)ことが報告されている。FGFシグナルが活性化されるとそのシグナルはERKによるリン酸化を経てEts因子に伝達される(Wasylyk et al. 1993)。そのため、*Hes7* C領域に行ける推定のEts binding siteと未分節中胚葉に発現するEts因子との相互作用を調べたが、Ets2により*Hes7*の転写は亢進されるがEts2とEts binding siteとの結合は検出できなかった。Ets2による*Hes7*の発現亢進は他の因子を介して間接的に引き起こされているか、*Hes7* C領域の保存性の低いターゲットサイトを介して直接結合している可能性が考えられる。Ets因子のコンセンサス配列はRRSMGGAWVWR (R=A/G, W=A/T, M=A/C, S=C/G, V=A/C/G)であり、核となるトリヌクレオチドGGAは高度に保存されているが両脇の配列は揺らぎを持つ。*Hes7* C領域には10箇所GGAが存在するため、Ets因子は*Hes7*プロモーターに対して保存性の低いターゲットサイトを介している可能性がある。ゼブラフィッシュではFGFシグナルとHes関連遺伝子の直接の相互作用が報告されている。FGFシグナルに依存するher13.2は振動遺伝子her1とヘテロ二量体を形成して分節化の制御に働く(Kondoh et al. 2005, Sieger et al. 2006)。her13.2の機能的ホモログはマウスでは知られていない(kageyama et al. 2007)が、FGFシグナルとHesファミリーの遺伝子の振動発現は深く関係している。Hes1の振動発現はFGFシグナルによって誘導される(Nakayama et al. 2008)。また*Hes7*の尾部先端における発現開始はFGFシグナルに依存し、*Hes7*の振動はDusp4(Niwa et al. 2007)や*Sprouty4*を介してFGFシグナルと再びクロストークする。

本研究では FGF シグナルと *Hes7* プロモーターの直接的な関与は示せなかったが、これまでの研究から FGF シグナルと Hes 関連遺伝子の相互作用は脊椎動物で高度に保存されているということは確かだと考えられる。

T-box 転写因子、Tbx6 と T は体節形成における分節化遺伝子の制御に重要な役割を担っている。しかし、T-box 転写因子による振動遺伝子の直接的な制御はゼブラフィッシュでは知られているがマウスにおいてもその関係性が保存されているかどうかは分かっていない。本研究の結果は Tbx6 が *Hes7* のプロモーターに結合し、Notch シグナルと共に発現を促進するというを示した。この結果から T-box 転写因子による直接的な Hes ファミリーの振動遺伝子に対する制御が脊椎動物間で維持されていると考えられる。今回の結果から T は *Hes7* レポーターの発現を上昇させることがわかったが全長の配列を持つ T が *Hes7* プロモーターに結合する証拠は得られていない。しかし、T は *Tbx6*

と *Dll1* の上流であり (White et al. 2005)、Tbx6 と Notch シグナルを介して *Hes7* の遺伝子発現を制御していると考えられる。また制御ドメインを欠失した T の DNA 結合ドメインは T/RBPjk binding site と結合する (Fig. 19) ため、T は潜在的に *Hes7* プロモーターに結合する可能性がある。従ってマウス T-box 転写因子、Tbx6 と T は振動遺伝子発現の直接的な制御、あるいは Notch シグナルの構成因子の制御を介して分節化時計を制御していると考えられる (Fig. 35)。

T-box 転写因子は *Hes7*、*her1* 以外の分節化に関与する遺伝子もコアモチーフである CACAC の認識配列を介して制御している (Brend et al. 2009, Garnett et al. 2009, Conlon et al. 2001)。マウスの Tbx6 は Notch シグナルとの相乗効果を伴って *Mesp2* の発現を制御している (Morimoto et al. 2005, Yasuhiko et al. 2006, Yasuhiko et al. 2008)。*Mesp2* の制御とは異なり、*Dll1* に対しては Wnt と協調して働き、*Dll1* プロモーター上で ARGTYNANWWR (R=A/G, Y=C/T, W=A/T, N=A/C/G/T) というコンセンサス配列とは異なる配列を認識する (Hofmann et al. 2004)。ゼブラフィッシュでは Tbx6/16 サブファミリーの *notail*、*spadetail* が *deltaD* の T-box site に結合しその発現を上昇させる (Garnett et al. 2009)。これらの報告と本研究の結果から T-box 転写因子が Notch シグナルと Notch シグナルに関わる振動遺伝子に密接に関係していると考えられる。

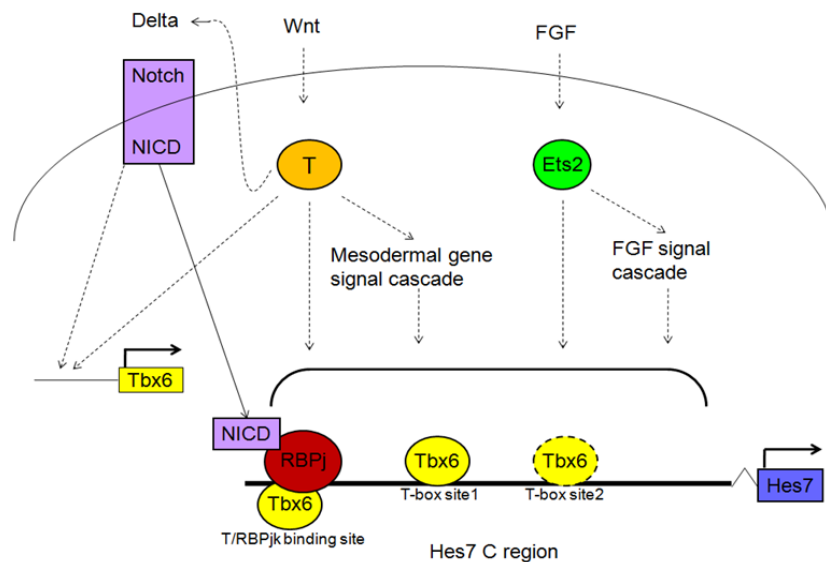


Figure 35. Hes7プロモーターにおける転写因子の制御模式図

Hes7はシスエレメントC領域によって未分節中胚葉特異的な遺伝子発現が誘導される。NotchシグナルはNICDを介して、この領域のターゲットサイトと結合するRBPjkへ伝達される。Tbx6はT-box site1、T-box site2に加えて、RBPjkと同じ配列に結合する。Tは直接、あるいはTbx6とDeltaの発現誘導を介して間接的にHes7の発現に貢献する。T-box転写因子とNotchシグナルは協調してHes7に対する発現誘導担う。Ets2は独立してHes7の転写を促進する。

分子時計から分節化位置決定へのシグナルの伝達機構

次に Notch 制御下の分節化時計と分節化の位置決定に重要な FGF 濃度勾配がどのようにクロストークしているかを検討した。FGF シグナルの制御因子である *Sprouty4* の発現は FGF によって引き起こされ、*Hes7* の周期的な抑制によって *Sprouty4* の振動発現パターンが引き起こされている (Fig. 36A)。この結果は *Sprouty4* が分節化時計と位置決定機構の仲介因子の一つであることを示している。既に FGF の阻害因子である *Dusp4* が *Hes7* の制御を受け、FGF シグナルとクロストークすることが知られており (Niwa et al. 2007)、*Sprouty2*, *4* と *Dusp4* を含めた複数のシグナル仲介因子が分節化時計と位置決定機構をリンクさせていると考えられる (Fig. 36B)。これまでの研究から FGF シグナルと同様に Wnt シグナルも体節形成に重要であることが示されている (Aulehla et al. 2003)。*Hes7* は Wnt シグナルのアンタゴニストである *Nkd1* の振動発現を制御し、Wnt シグナルへのクロストーク経路が存在する (Ishikawa et al. 2004)。従って Notch シグナルと FGF/Wnt シグナルは複雑に協調して体節形成に働くと考えられる。また FGF は体節の位置決定だけではなく、振動遺伝子 *Hes7* の振動開始領域の発現に貢献していることから分節化時計においても重要である。

未分節中胚葉において *Sprouty4* は体節周期と一致した 2 時間周期で振動する特徴的なパターンを示すが、体節形成における役割は分かっていない。*Sprouty4* の欠損マウスは下顎と前肢における形成不全が見られる (taniguchi et al. 2007) が体節形成における表現系は知られていない。FGF シグナルにおけるネガティブフィードバックを形成する因子は *Sef*, *Dusp*, *Sprouty* と複数存在し、*Dusp4*, *Sprouty2* は未分節中胚葉で振動発現しているため、機能的な重複が存在していると考えられる。

FGF と Wnt の構成因子はマウスでは振動発現しているがゼブラフィッシュでは振動していない (Holley et al. 2007)。また Notch 経路の振動遺伝子である *lfng* も未分節中胚葉に発現するが振動発現は見られない (Prince et al. 2001, Qiu et al. 2004)。マウスにおいて振動発現する *Sprouty4* のゼブラフィッシュホモログにおいても振動発現は見られなかった (Fig. 33)。しかし、マウスと異なってゼブラフィッシュでは Notch リガンドである *deltaC* が振動発現し、また *Hes* のホモログである *her* ファミリーの因子は *her1*, *her7*, *her11*, *her12*, *her15* と複数の遺伝子が振動している (Holley et al. 2007)。そのため各シグナルの構成要素における分節化時計への寄与は生物種によって異なると考えられる。またマウスにおいて振動発現が見られる Wnt 経路の振動遺伝子 *Axin2* や *Lef1*, *Dact1* はニワトリ胚において振動発現が見られない (Gibb et al. 2009) が、*Lfng* の振動発現の周期を制御しているため、Notch シグナル間

の相互作用は異なる種においても維持されていると考えられる。

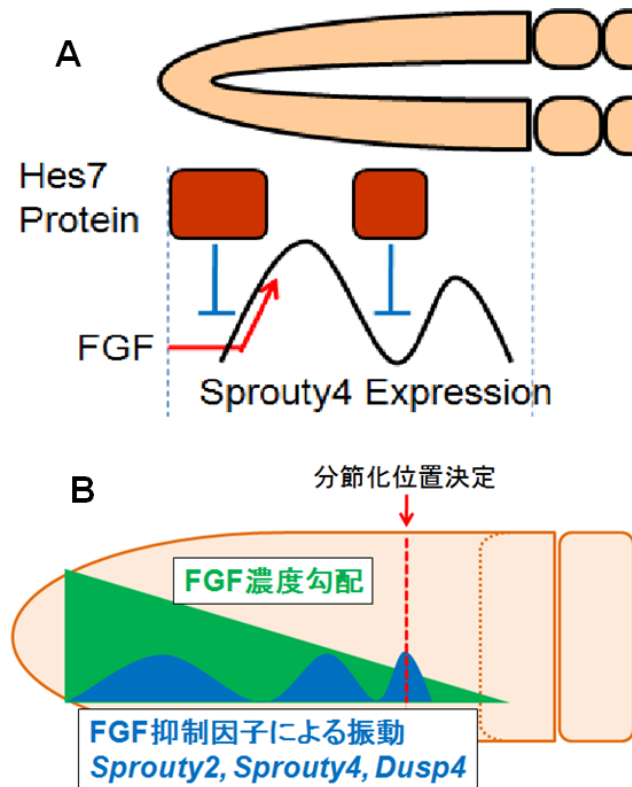


Figure 36. Hes7によるSprouty4の制御模式図

(A)マウスの未分節中胚葉においてFGFシグナルによってSprouty4の発現は増加する。しかし周期的な振動発現をするHes7が局所的にSprouty4の発現を抑制するためにSprouty4の発現領域は限定される。この機構によってSprouty4の周期的な発現パターンが生じる。Hes7非存在下では局所的な転写抑制を受けず、FGFシグナルによる転写の促進のみを受けるためにSprouty4は未分節中胚葉全体で発現する。Hes7が過剰に存在すると広域で抑制効果を受けるため、Sprouty4の発現は低下する。(B)周期性から位置決定へのシグナル伝達想定図。FGFシグナルの制御因子Sprouty2, 4とDusp4は振動パターンを持ち、FGFシグナルによる位置決定に周期性を伝える。

脊椎動物の体節形成は Notch、FGF、Wnt シグナルによる複雑な遺伝子発現のネットワークによって構成されている。それらのシグナルだけではなく T-box 転写因子による中胚葉誘導遺伝子の制御やレチノイン酸による FGF シグナルとの拮抗作用も正確な体節形成に寄与している。それらのシグナルを構成する因子のうち、時計遺伝子による振動発現が時間的周期性を生み、分泌因子の放出による濃度勾配が分節化の位置決定を担っている。正確な繰り返し構造として体節が適切に形成されるためには複雑な遺伝子ネットワークが統合され、協調して働く必要がある。しかし、体節の周期性に関与する遺伝子は数多く新たに発見され(Deque'ant et al. 2006)、さらに包括的な研究が求められる。本研究はその一端の解明に役立つと考えられる。

謝辞

本研究を行うに当たり、指導して頂いた別所康全教授、松井貴輝助教、中畑泰和助教に深く感謝致します。Prof. Miguel Maroto, Dr. Zoltan Ferjentsik には共同研究に参加する機会を与えて頂き、指導と助言を頂いたことを感謝致します。また同室を供給している神経分化制御学講座のメンバーに実験計画と実験技術に関してご指導頂いたことを感謝致します。そして研究に協力してくれた遺伝子発現制御学講座の学生メンバーと技官スタッフ、研究に関する事務等で協力して下さった秘書スタッフにこの場を借りてお礼申し上げます。

参考文献

Appel, B., Marasco, P., McClung, L. E. and Latimer, A. J. (2003). lunatic fringe regulates Delta-Notch induction of hypochord in zebrafish. *Dev. Dyn.* 228, 281-286.

Aulehla, A., Wehrle, C., Brand-Saberi, B., Kemler, R., Gossler, A., Kanzler, B. and Herrmann, B. (2003). *Wnt3a* plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev. Cell* 4, 395–406

Aulehla, A., Wiegraebe, W., Baubet, V., Wahl, M., Deng, C., Taketo, M., Lewandoski, M. and Pourquié, O. (2008). A β -catenin gradient links the clock and wavefront systems in mouse embryo segmentation. *Nat. Cell Biol.* 10, 186-193

Beckers, J., Carona, A., Hrabe de Angelis, M., Hans, S., Campos-Ortega, J. A. and Gossler, A. (2000). Distinct regulatory elements direct Delta1 expression in the nervous system and paraxial mesoderm of transgenic mice. *Mech. Dev.* 95, 23-34.

Bessho, Y., Miyoshi, G., Sakata, R. and Kageyama, R. (2001a). *Hes7*: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes to Cells* 6, 175-185

Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S. and Kageyama, R. (2001b). Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes Dev.* 15, 2642–2647

Bessho, Y., Hirata, H., Masamizu, Y. and Kageyama, R. (2003). Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock. *Genes Dev.* 17, 1451-1456

Borggrefe, T. and Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1631 – 1646

Brend, T. and Holley, S. A. (2009). Expression of the oscillating gene *her1* is directly regulated by Hairy/Enhancer of Split, T-Box, and Suppressor of Hairless proteins in the zebrafish segmentation clock. *Dev. Dyn.* 238, 2745–2759.

Chandler, K. J., Chandler, R. L. and Mortlock, D. P. (2009). Identification of an ancient Bmp4 mesoderm enhancer located 46 kb from the promoter. *Dev. Biol.* 327, 590–602.

Chapman, D. L. and Papaioannou, V. E. (1998). Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene *Tbx6*. *Nature* 391, 695-697.

Chen, J., Kang, L. and Zhang, N. (2005). Negative feedback loop formed by *Lunatic fringe* and Hes7 controls their oscillatory expression during somitogenesis. *Genesis* 43, 196-204.

Christ, B., Huang R. and Wilting J. (2000). The development of the avian vertebral column. *Anat. Embryol.* 202, 179–194.

Cole, S. E., Levorse, J. M., Tilghman, S. M. and Vogt, T. F. (2002). Clock regulatory elements control cyclic expression of *Lunatic fringe* during

somitogenesis. *Dev. Cell* 3, 75–84.

Conlon, R. A., Reaume, A. G. and Rossant, J. (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* 121, 1533-1545

Conlon, F. L., Fairclough, L., Price, B. M., Casey, E. S. and Smith, J. C. (2001). Determinants of T box protein specificity. *Development* 128, 3749-3758.

Dale, J. K., Maroto, M., Dequeant, M.-L., Malapert, P., McGrew, M. and Pourquie, O. (2003). Periodic Notch inhibition by Lunatic Fringe underlies the chick segmentation clock. *Nature* 421, 275-278

Dale, J. K., Malapert, P., Chal, J., Vilhais-Neto, G., Maroto, M., Johnson, T., Jayasinghe, S., Trainor, P., Herrmann, B. and Pourquie, O. (2006). Oscillations of the Snail genes in the presomitic mesoderm coordinate segmental patterning and morphogenesis in vertebrate somitogenesis. *Dev. Cell* 10, 355–366

Davis, R. L., Turner, D. L., Evans, L. M. and Kirschner, M. W. (2001). Molecular targets of vertebrate segmentation: two mechanisms control segmental expression of *Xenopus hairy2* during somite formation. *Dev. Cell* 1, 553-65.

de la Pompa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J. and Conlon, R. A. (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* 124, 1139-1148.

Delfini, M. C., Dubrulle, J., Malapert, P., Chal, J. and Pourquie, O. (2005). Control of the segmentation process by graded MAPK_ERK activation in the chick embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 11343–11348.

Dequeant, M. L., Glynn, E., Gaudenz, K. W., Matthias, C. J., Mushegian, A. and Pourquie, O. (2006). A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock. *Science* 314, 1595-1598

Dequéant, M. L. and Pourquié, O. (2008). Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nature* 9, 370-382.

De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Rayk, W. J., Goatek, A. and Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent g-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.

Dubrulle, J., McGrew, M. J. and Pourquié, O. (2001). FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal *Hox* gene activation. *Cell* 106, 219–232.

Dubrulle, J. and Pourquié, O. (2004). *fgf8* mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature* 427, 419-422.

Dunwoodie, S. L., Clements, M., Sparrow, D. B., Sa, X., Conlon R. A. and Beddington R. S. P. (2002). Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene *Dll3* are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm. *Development* 129, 1795-1806.

Ekerot, M., Stavridis, M. P., Delavaine, L., Mitchell, M. P., Staples, C., Owens, D. M., Keenan, I. D., Dickinson, R. J., Storey, K. G. and Keyse, S. M. (2008). Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *Biochem. J.* 412, 287–298.

Evrard, Y. A., Lun, Y., Aulehla, A., Gan L. and Johnson, R. L., (1998). *lunatic fringe* is an essential mediator of somite segmentation and patterning. *Nature* 394, 377–381

Feller, J., Schneider, A., Schuster-Gossler, K. and Gossler A. (2008).

Noncyclic Notch activity in the presomitic mesoderm demonstrates uncoupling of somite compartmentalization and boundary formation. *Genes Dev.* 22, 2166–2171

Fischer, A. and Gessler, M. (2007). Delta–Notch—and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nuc. Acids Res.* 35, 4583–4596.

Forsberg, H., Crozet, F. and Brown, N. A. (1998). Waves of mouse *Lunatic fringe* expression, in four-hour cycles at two-hour intervals, precede somite boundary formation. *Cur. Biol.* 8, 1027–1030.

Garnett, A. T., Han, T. M., Gilchrist, M. J., Smith, J. C., Eisen, M. B., Wardle, F. C. and Amacher, S. L. (2009). Identification of direct T-box target genes in the developing zebrafish mesoderm. *Development* 136, 749–760.

Gibb, S., Zagorska, A., Melton, K., Tenin, G., Vacca, I., Trainor, P., Maroto, M. and Dale, J. K. (2009). Interfering with Wnt signalling alters the periodicity of the segmentation clock. *Dev. Biol.* 330, 21–31.

Herreman, A., Hartmann, D., Annaert, W., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., Umans, L., Schrijvers, V., Checler, F., Vanderstichele, H., Baekelandt, V., Dressel, R., Cupers, P., Huylebroeck, D., Zwijsen, A., Van Leuven, F. and De Strooper, B. (1999). Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 11872–11877.

Hirata, H., Bessho, Y., Kokubu, H., Masamizu, Y., Yamada, S., Lewis, J. and Kageyama, R. (2004). Instability of Hes7 protein is crucial for the somite segmentation clock. *Nat. Genet.* 36, 750–754.

Hofmann, M., Schuster-Gossler, K., Watabe-Rudolph, M., Aulehla, A. B., Herrmann, G. and Gossler, A. (2004). WNT signaling, in synergy with T/TBX6, controls Notch signaling by regulating *Dll1* expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos. *Genes Dev.* 18, 2712–2717.

Holley, S. A., Jülich, D., Rauch, G., Geisler, R. and Nüsslein-Volhard, C. (2002). *her1* and the notch pathway function within the oscillator mechanism that regulates zebrafish somitogenesis. *Development* 129, 1175-1183.

Holley, S. A. (2007). The Genetics and Embryology of Zebrafish Metamerism. *Dev. Dyn.* 236, 1422–1449.

Horikawa, K., Ishimatsu, K., Yoshimoto, E., Kondo, S. and Takeda, H. (2006). Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. *Nature* 441, 719-723.

Hrabě de Angelis, M., McIntyre, J. 2nd. and Gossler, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DII1. *Nature* 387, 717-21.

Ikeda, K., Nagano, K. and Kawakami, K. (1993). Anomalous interaction of Spl and specific binding of an E-box-binding protein with the regulatory elements of the Na, K-ATPase $\alpha 2$ subunit gene promoter. *Eur. J. Biochem.* 218, 195-204

Ishikawa, A., Kitajima, S., Takahashi, Y., Kokubo, H., Kanno, J., Inoue, T. and Saga, Y. (2004). Mouse *Nkd1*, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mech. Dev.* 121, 1443-53.

Itoh, N. and Ornitz, D. M. (2008). Functional Evolutionary history of the mouse *Fgf* Gene Family. *Dev. Dyn.* 237, 18–27.

Kageyama, R., Ohtsuka, T. and Kobayashi, T. (2007). The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* 134, 1243-1251.

Kawamura, A., Koshida, S., Hijikata, H., Sakaguchi, T., Kondoh, H. and Takada, S. (2005). Zebrafish Hairy/Enhancer of split protein links FGF

signaling to cyclic gene expression in the periodic segmentation of somites. *Genes Dev.* 19, 1156–1161.

Kusumi, K., Mimoto, M. S., Covello, K. L., Beddington, R. S. P., Krumlauf, R. and Dunwoodie, S. L. (2004). *Dll3* pudgy mutation differentially disrupts dynamic expression of somite genes. *genesis* 39, 115–121.

Masamizu, Y., Ohtsuka, T., Takashima, Y., Nagahara, H., Takenaka, Y., Yoshikawa, K., Okamura, H. and Kageyama, R. Real-time imaging of the somite segmentation clock: Revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells. (2006). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 1313–1318.

Morales, A. V., Yasuda, Y. and Ish-Horowicz, D. (2002). Periodic *Lunatic fringe* expression is controlled during segmentation by a cyclic transcriptional enhancer responsive to Notch signaling. *Dev. Cell* 3, 63–74

Morimoto, M., Takahashi, Y., Endo, M. and Saga, Y. (2005). The *Mesp2* transcription factor establishes segmental borders by suppressing Notch activity. *Nature* 435, 354-359

Naiche, L. A., Harrelson, Z. R., Kelly, G. and Papaioannou, V. E. (2005). T-Box genes in vertebrate development. *Annu. Rev. Genet.* 39, 219–239.

Nakayama, K., Satoh, T., Igari, A., Kageyama, R. and Nishida, E. (2008). FGF induces oscillations of *Hes1* expression and Ras/ERK activation. *Curr Biol.* 18, R332-4.

Nikaido, M., Kawakami, A., Sawada, A., Furutani-Seiki, M., Takeda, H. and Araki, K. (2002). *Tbx24*, encoding a T-box protein, is mutated in the zebrafish somite-segmentation mutant *fused somites*. *Nat. Genet.* 31, 195-199.

Niwa, Y., Masamizu, Y., Liu, T., Nakayama, R., Deng, C. X. and Kageyama, R. (2007). The Initiation and propagation of *Hes7* oscillation are cooperatively regulated by Fgf and Notch signaling in the somite

segmentation Clock. *Dev. Cell* 13, 298–304

Ong, C., Cheng, H., Chang, L., Ohtsuka, T., Kageyama, R., Stormo, G. D. and Kopan, R. (2006). Target selectivity of vertebrate notch proteins. Collaboration between discrete domains and CSL-binding site architecture determines activation probability. *J. Biol. Chem.* 281, 5106-5119

Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D. and Pourquie, O. (1997) Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 91, 639–648.

Qiu, X., Xu, H., Haddon, C., Lewis, J. and Jiang, Y. J. (2004). Sequence and Embryonic Expression of Three Zebrafish *fringe* genes: *lunatic fringe*, *radical fringe*, and *manic fringe*. *Dev. Dyn.* 231, 621–630.

Roy-Chowdhuri, S., Crum, T., Woollard, A., Aslam, S. and Okkema, P. G. (2006). The T-box factor TBX-2 and the SUMO conjugating enzyme UBC-9 are required for ABA-derived pharyngeal muscle in *C. elegans*. *Dev. Biol.* 295, 664-77.

Saga, Y., Hata, N., Koseki, H. and Taketo, M. M. (1997). *Mesp2*: a novel mouse gene expressed in the presegmented mesoderm and essential for segmentation initiation. *Genes Dev.* 11, 1827-1839.

Sawada, A., Shinya, M., Jiang, Y. J., Kawakami, A., Kuroiwa, A. and Takeda, H. (2001). Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation. *Development* 128, 4873-80.

Sawano, A. and Miyawaki, A. (2000). Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nuc. Acids Res.* 28, E78.

Scaal, M. and Wiegreffe, C. (2006). Somite compartments in anamniotes. *Anat. Embryol.* 211, S9–S19.

Sieger, D., Ackermann, B., Winkler, C., Tautz, D. and Gajewski, M. (2006). *her1* and *her13.2* are jointly required for somitic border specification along the entire axis of the fish embryo. *Dev. Biol.* 293, 242–251.

Swiatek, P. J., Lindsell, C. E., Franco del Amo, F., Weinmaster, G. and Gridley, T. (1994). *Notch1* is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev.* 8, 707-719.

Takebayashi, K., Sasai, Y., Sakai, Y., Watanabe, T., Nakanishi, S. and Kageyama, R. (1994). Structure, chromosomal locus, and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-1. Negative autoregulation through the multiple N box elements. *J. Biol. Chem.* 269, 5150-5156.

Taniguchi, K., Ayada, T., Ichiyama, K., Kohno, R., Yonemitsu, Y., Minami, Y., Kikuchi, A., Maehara, Y. and Yoshimura, A. (2007). *Sprouty2* and *Sprouty4* are essential for embryonic morphogenesis and regulation of FGF signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 896–902.

Tsang, M. and Dawid, I. B. (2004). Promotion and Attenuation of FGF Signaling Through the Ras-MAPK Pathway. *Sci. STKE*, 2004. pe17.

Wahl, M. B. Deng, C. Lewandoski, M. Pourquié, O. (2007). FGF signaling acts upstream of the NOTCH and WNT signaling pathways to control segmentation clock oscillations in mouse somitogenesis. *Development* 134, 4033-4041

Wang, W. C. H. and Shashikant, C. S. (2007). Evidence for Positive and Negative Regulation of the Mouse *Cdx2* Gene. *J. Eexp. Zoo.* 308B. 308–321.

Wasylyk, B. Hahn, S. L. and Giovane, A. (1993). The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 211, 7-18.

Watanabe, T., Sato, Y., Saito, D., Tadokoro, R. and Takahashi, Y. (2009). *EphrinB2* coordinates the formation of a morphological boundary and cell epithelialization during somite segmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 7467–7472.

White, P. H., Farkas, D. R. and Chapman, D. L. (2005). Regulation of Tbx6 Expression by Notch Signalinggenesis. *Genesis* 42, 61–70.

Wittler, L., Shin, E., Grote, P., Kispert, A., Beckers, A., Gossler, A., Werber, M. and Herrmann, B. G. (2007). Expression of *Msgn1* in the presomitic mesoderm is controlled by synergism of WNT signalling and Tbx6. *EMBO reports*. 8, 784–789.

Wong, P. C. , Zheng, H., Chen, H., Becher, M. W., Sirinathsinghji, D. J., Trumbauer, M. E., Chen, H. Y., Price, D. L., Van der Ploeg, L. H. and Sisodia, S. S. (1997). Presenilin 1 is required for Notch1 and DII1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 387, 288-292.

Yamaguchi, T. P., Takada, S., Yoshikawa, Y., Wu, N. and McMahon, A. P., (1999). *T(Brachyury)* is a direct target of *Wnt3a* during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev.* 13, 3185–3190.

Yang, S., Sharrocks, A. D. and Whitmarsh, A. J. (2003). Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320, 3 –21.

Yasuhiko, Y., Haraguchi, S., Kitajima, S., Takahashi, Y., Kanno, J. and Saga, Y., (2006). Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific *Mesp2* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 3651–3656.

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

Yee, S. and Rigby, P. J. (1992). The regulation of myogenin gene expression duringthe embryonic development of tile mouse. *Genes Dev.* 7A, 1277-89.

Yusuf, F. and Brand-Saberi, B. (2006). The eventful somite: patterning, fate determination and cell division in the somite. *Anat. Embryol.* 211, S21–S30.

Zhang, N. and Gridley, T. (1998). Defects in somite formation in lunatic fringe-deficient mice. *Nature* 394, 374–377