

体節形成における Notch シグナルの役割

金 雄

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 24 年 2 月 28 日提出

所属 (主指導教員)	遺伝子発現制御学講座 (別所 康全)		
氏名	金 雄	提出	平成 24年 1月 24日
題目	体節形成における Notch シグナルの役割		
<p>体節は胎生中期に未分節中胚葉の前方が周期的にくびれ切れることでつくられる。マウスの未分節中胚葉において <i>Hes7</i>(Hairy/Enhancer of Split genes7) や <i>Lfng</i>(Lunatic Fringe) など Notch シグナル伝達系を構成する遺伝子が周期的に発現していることが知られており、これらの遺伝子の発現振動が体節形成の周期性と体節の等間隔パターンの形成に必須であると考えられている。しかしこれまでの解析では、Notch シグナル伝達が破綻し発現振動および体節形成が非常に乱れてしまうために、Notch シグナルがいかに体節形成を制御するのかについては十分に理解されていない。本研究では Notch シグナルによって誘導される遺伝子発現振動において、その周期制御のメカニズムを探ることを目的とする。具体的には、Notch 細胞内ドメイン (Notch intracellular domain, NICD) を分解促進し Notch シグナルを負に制御する因子である <i>Nrarp</i>(Notch-regulated ankyrin repeat protein) を遺伝学的に欠失させ(ノックアウトマウス, <i>Nrarp</i>^{-/-})、Notch シグナル変化と体節形成の様子を観察する。さらに、Notch シグナル阻害剤を投与して、体節形成の変化を比較する。また、遺伝子発現振動を作り出すために必須な細胞間の振動同調メカニズムにおいて Notch シグナルの役割を探る。</p> <p>Notch シグナルが増強した条件で分子振動の振舞いを観察するために <i>Nrarp</i> ノックアウトマウス (<i>Nrarp</i>^{-/-}) を作製した。<i>Nrarp</i>^{-/-} では <i>Hes7</i>^{-/-} と類似して尻尾が屈曲していた。この異常を詳細に観察するために椎骨形成を調べたところ、腰椎と肋骨で奇形が認められた。また <i>Nrarp</i>^{-/-} では腰椎と尾椎が減少しており、椎骨全体では約 2 本少ないことが観察された。椎骨は胎生中期から後期にかけて体節ひとつに相当する部分から分化形成される。したがって <i>Nrarp</i>^{-/-} でみられる椎骨数の減少は体節数の減少が原因と考えられる。そこで、胎生中期の体節数を比較すると、体節形成の初期には同数あるが、発生が進むと <i>Nrarp</i>^{-/-} では体節数が有意に減少していた。即ち、<i>Nrarp</i>^{-/-} では体節ひとつを形成するのに要する時間 (体節形成の周期) が長くなっているために、発生が進むにつれて体節数が減少するものと考えられる。野生型と <i>Nrarp</i>^{-/-} 間の周期の差は約 5 分と予測された。</p> <p>一方、この体節形成期の <i>Nrarp</i>^{-/-} の未分節中胚葉では、NICD 量が野生型 (WT) に比べ約 2 倍増加しており、Notch シグナルの標的遺伝子の発現も上昇していた。<i>Nrarp</i>^{-/-} の未分節中胚葉では FGF (fibroblast growth factor) と Wnt シグナルに変化は認められず、Notch</p>			

シグナルのみが特異的に上昇していることがマイクロアレイ解析と定量 PCR 解析により明らかになった。しかし、未分節中胚葉で発現振動している遺伝子の振動パターンには変化が見られなかった。次に、周期の伸びと Notch シグナルの関連性を証明するために、野生型マウスに Notch 阻害剤を投与し Notch シグナルの減衰を試みた。結果、阻害剤の投与量に比例して NICD の量が減少し、同時に体節数の増加が認められた。阻害剤を投与した *Nrarp*^{-/-}では体節形成の周期が回復（延長）したために体節数が増えたものと考えられる。しかし、阻害剤の投与により、体節形成がわずかに乱れ、*Nrarp*^{-/-}ではより顕著な奇形が認められた。

これまでに、Hes7 のネガティブフィードバックによって作り出される分子振動は Lewis らによって数理的に再現されている。バイオサイエンス研究科の作村准教授グループとの共同研究により、Lewis の数理モデルにおいて Notch シグナルと振動周期の相関を検討した。結果、数理モデルにおいても振動周期が Notch シグナルに依存しており、Notch 活性の増減に従い振動周期が延長あるいは短縮されることを見出した。

Nrarp^{-/-}では腰椎、肋骨、尻尾に異常形成がみられる。しかしながら 未分節中胚葉細胞ではこの異常を説明できる遺伝子発現の変化は見つかっていない。一方で、生体内の遺伝子発現は確率的に起こるために、様々な要因（ノイズ）により発現が影響を受け、かく乱される。未分節中胚葉細胞においても細胞移動、分裂、温度変化などがノイズとして働くことが知られている。そこで、*Hes7*^{-/-}と *Nrarp*^{-/-}から得られた二重変異体を解析することと薬理学的方法で遺伝子発現をかく乱させることで体節形成時のノイズの影響を調べた。HDAC 阻害剤として知られるホウ酸やバルプロ酸は、遺伝子発現を無作為に変化させると考えられる。これらの試薬を投与した後、発現振動を観察するために *Lfng* の mRNA の細胞内局在を可視化した。*Lfng* や *Hes7*、*Nrarp* は未分節中胚葉全体では後方から前方にかけて波状に移動する波状の発現パターンを示しており、波状の発現パターンをつくるためには隣同士の細胞間で発現の位相が一致（同調）する必要がある。即ち、各細胞で安定な振動が起こっている場合、未分節中胚葉全体では波状の発現パターンがみられる。しかし、*Nrarp*^{-/-}と二重変異体など、かく乱が大きい状況での未分節中胚葉細胞では振動の位相が揃っていない（同調しない）細胞が多く現れる。その結果、体節形成および椎骨形成にも乱れが生じるものと考えられる。この細胞間の位相のズレは *Nrarp*^{-/-}に比べて *Nrarp*^{-/-} *Hes7*^{-/-}の二重変異体において多く観察される。これまでに、ゼブラフィッシュでは発現振動の同調性が Delta と Notch によって作り出されていることが明らかになっており、マウスにおいても Notch シグナルは同調性維持に働く分子の候補として考えられている。本研究で得られた知見は、*Nrarp* や *Hes7* など Notch シグナルの標的遺伝子が形成するネガティブフィードバックが細胞間の振動同調の誘導と維持に関与していることを示唆している。

今後、PSM 全体の細胞において非同調細胞を定量し、様々なノイズ存在下での遺伝子発現振動の振動同調性を比較し評価する。未分節中胚葉で分子振動を可視化するために、赤色蛍光タンパク質 (RFP) と *Nrarp* タンパク質を融合させた変異体 (*Nrarp* ノックインマウス) 作製する。これにより、内在性の *Nrarp* タンパク質の局在と振動パターンを可視化し、振動周期の容易な計測、タンパク質の機能解析に役立つと期待している。

序論

脊椎動物の繰り返し構造と体節

脊椎動物のからだは頭尾軸にそって椎骨や肋骨が繰り返し構造を成している。この繰り返し構造は胚発生中期に一過的に形成される体節に由来する。体節は胚の正中に位置する神経管・脊索の両側において頭部から尾部に沿って左右対称に並んだ球状の細胞塊である。一对の体節から脊椎骨一個分に相当するからだの部分が増加するために、体節を単位としてからだの繰り返し構造が作り出される。

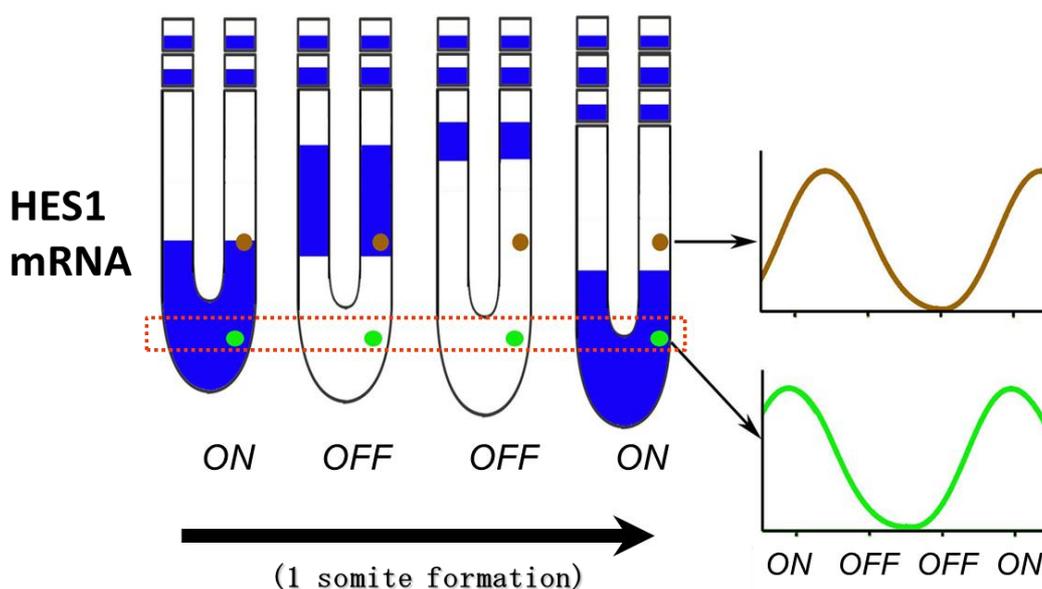
体節は胚の最も尾部にある中胚葉由来の間充織である未分節中胚葉 (presomitic mesoderm, 未分節中胚葉)の頭側端が括れ切れることで形成され、この分節化が繰り返されることで胚の頭尾軸にそって等間隔に並んだ体節ができる。一对の体節ができるまでの時間、すなわち分節化周期は種によって異なっており、ニワトリでは 90 分、ゼブラフィッシュでは 20~30 分、マウスでは 120 分、ヒトでは 4~5 時間である。そして発生段階の一定期間の間に、定められた数の体節が形成される。体節の数も種ごとに固有なものであり、魚では約 30 個、ヘビでは数百個もの体節が形成される (Richardson et al., 1998)。

体節形成の周期性を制御する分節時計

未分節中胚葉の分節化は胚の頭側から尾側にかけて周期的に起こり、均等な大きさの体節が形成される。そのため、古くから何らかのメカニズムによって体節形成が時間的かつ空間的に制御されていると考えられてきたが、その正体は長く不明だった。体節形成における時間制御と空間制御の相関を説明するために Cooke らは Clock and wavefront model を提唱した(1976)。未分節中胚葉のそれぞれの細胞内に振動子 (Clock)を、また未分節中胚葉の前方から後方に移動する 'Wavefront'をそれぞれ仮定し、Wavefront に達した細胞はその時点での位相の情報を持ったまま振動が停止して体節に分化する。すなわち、振動子が 1 回振動する間に Wavefront が通過した領域が 1 体節分に相当し、振動の位相が体節の前後極性に変換されることになる。これは体節の前方と後方で性質が異なる事実と一致している。

ショウジョウバエのペア-ルール遺伝子 *hairy* のホモログである *c-hairy1* の発

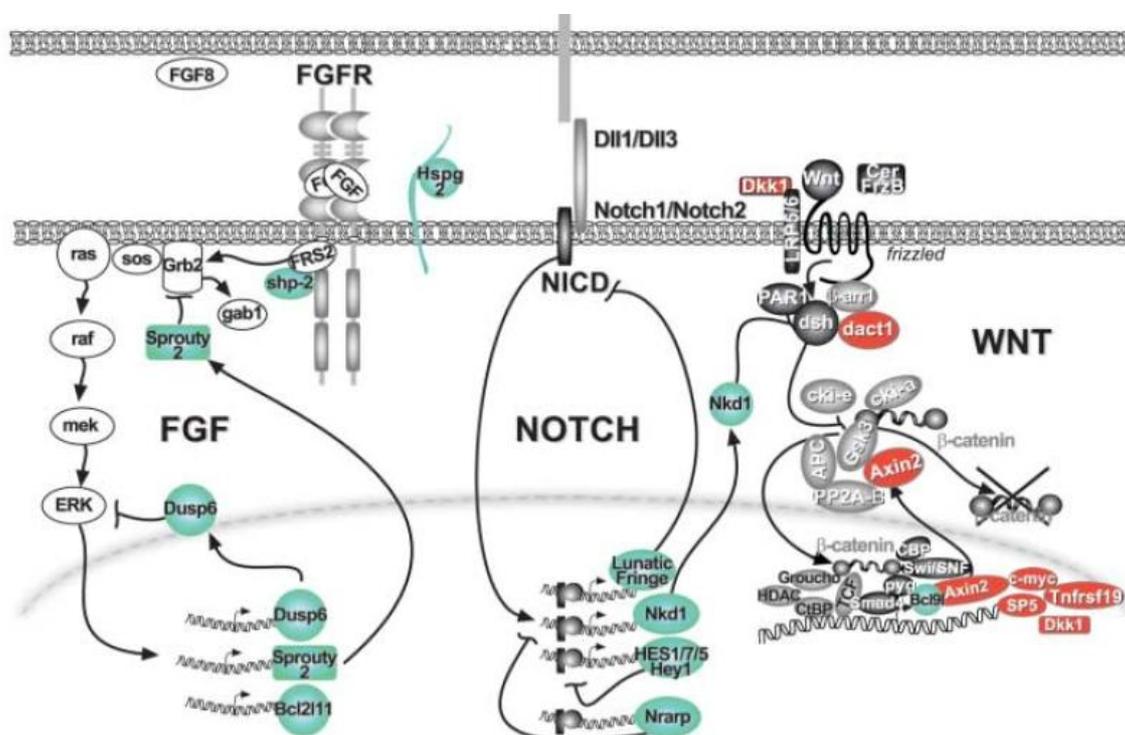
現が未分節中胚葉の分節化周期に一致して振動していることがニワトリ胚の未分節中胚葉で発見され (Palmeirim et al., 1997)、分子の周期的な振舞いが分節化に関与していることが初めて示唆された。ニワトリ未分節中胚葉では、*HES1* の発現が未分節中胚葉の後方から前方に移動している波のように変化する。そしてこの波が未分節中胚葉の後方から前方へ一度通過するたびに前方未分節中胚葉で分節化が起こり、体節が作られる。このような *HES1* 遺伝子の周期的な転写が分節化の周期性を時間制御する「分節時計」として働いていると考えられるようになった。その後、魚やマウスでも遺伝子の周期的な発現が発見され、種の間で保存されている分節時計の存在が明らかになった。その後、周期的な発現を示す遺伝子はサイクリックジーン (Cyclic gene) と呼ばれており、その多くは Notch, Wnt, FGF シグナル伝達系を構成する遺伝子であることが明らかになってきた。



図。 ニワトリ未分節中胚葉における *HES1* 遺伝子の周期的な転写と波状の発現パターン。青で示された mRNA の発現が、時間経過にそって PSM の後方から前方に移動している。緑点と茶色点は異なる細胞を示す。

Notch、FGF、Wnt シグナルと分節時計

脊椎動物で最初に発見された「Cyclic gene」である *HES1* は Notch シグナル伝達系を構成している。ニワトリを始め、ゼブラフィッシュ、マウスにおいても *Hes* 相同遺伝子の発現振動が観察され、Notch シグナル伝達系の因子は分節時計の重要なコンポーネントとして考えられてきた。ゼブラフィッシュにおいて、Notch1、*DeladC*、*DelatD*、*Mindbomb*、*Her* など Notch シグナル伝達系の構成因子の変異体では体節形成の破たんが観察され、未分節中胚葉では *Her* 遺伝子の「salt-and-pepper 状：ある遺伝子が発現している細胞としていない細胞が隣接して混じっている状態」の発現がみられる (Holly et al., 2000; Julich et al., 2005; Itoh et al., 2003)。特に *Her1* と *Her7* によるネガティブフィードバックは分節時計の中心メカニズムとして知られている (Lewis et al., 2003)。マウス未分節中胚葉では bHLH(basic helix loop helix) 転写因子 *Hes7* (hairy and enhancer of split 7) の発現が振動しており、体節形成の周期性の制御に重要であることが明らかになった (Bessho et al., 2001)。これは未分節中胚葉の細胞で遺伝子発現振動と分節化に Notch シグナルが必須であることを示している。



図。 マウス未分節中胚葉における Notch, Wnt, FGF シグナル伝達系と下流の振動遺伝子のネットワーク。多数の振動遺伝子がネガティブフィードバックループを形成している。(Dequeant et al., 2006)

マウスにおいてはさらにいくつかのシグナル伝達系が分節時計の制御に関わっていることが知られている。マウス未分節中胚葉での *Axin2* の発現振動、*Wnt3a* 変異体での *Axin2* と *Lfng* の振動パターンの破たんは Wnt シグナルが分節時計に関与していることを示唆している (Aulehla et al., 2003)。また、Wnt シグナルの下流遺伝子である *DKK1*、*Sp5*、*Myc* の変異体において分節化に異常がみられることから、Wnt シグナルが体節形成に深く関わっていることが分かる。

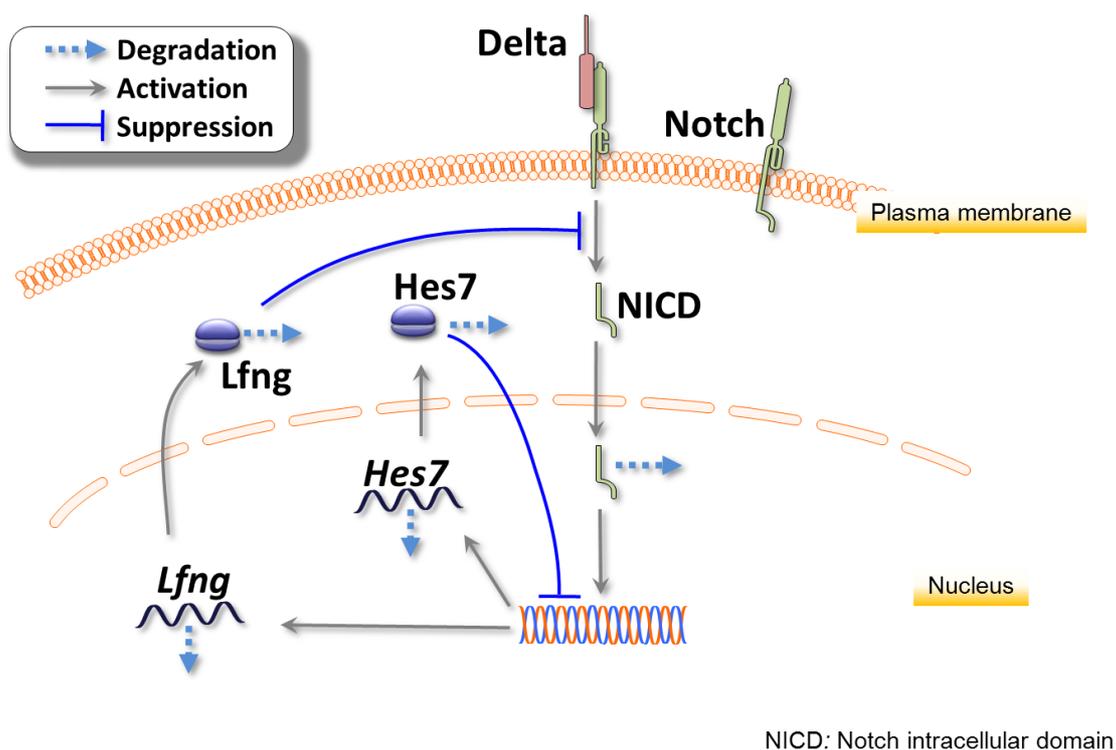
近年、FGF シグナル伝達系の制御因子である *Spry2*、*Dusp6* の発現が Notch シグナル伝達系の構成因子と同調して振動していることがマイクロレイ解析により明らかになった (Dequeant et al., 2006)。*Spry2*、*Dusp6* の発現振動は Notch シグナルに非依存的なものではあるが、変異体を用いた *Fgfr1* (Fgf receptor 1) の機能抑制実験によると、変異体では FGF、Notch、Wnt のダイナミックな発現が損なわれることが報告されている (Niwa et al., 2007; Wahl et al., 2007)。

Notch シグナル伝達系による分子振動

Notch レセプターは昆虫から哺乳類まで様々な生物種において保存されており、細胞間の信号伝達系を構成する重要な因子である。Notch は発生段階を通して *HES*(Hairy/Enhancer of Split genes)などの標的遺伝子の発現誘導により、細胞の運命決定や胚発生を制御する(Kopan and turner 1996)。細胞膜タンパクである Notch が隣接する細胞の Delta、serrate、lag-2 などのリガンドと結合すると、Notch は γセクレターゼによるタンパク分解を受けて細胞内ドメイン (Notch intracellular domain, NICD) が細胞内に放出され、核内に移行する。核内に移行した NICD は、DNA 結合タンパクの一種である CSL (CBF1/Su(H)/Lag-1) ファミリーと複合体を形成する。Notch シグナルがないとき CSL は様々な遺伝子の転写調節 DNA 配列に結合し (Hsieh and Hayward 1995)、SMRT/NcoR/HDAC1 そして CIR/HDAC2/SAP30 などの転写抑制性タンパク複合体と結合して転写を抑制している (Zhou et al., 2000)。しかし Notch がリガンドと結合すると NICD が核内に移行して CSL と複合体を形成する。この複合体形成によって転写抑制性タンパク複合体が解離され、co-activator が結合して転写を活性化する (Petcherski et al., 2000a; Mumm and Kopan 2000)。

マウス未分節中胚葉では Notch のリガンドである *Dll1* (Delta like 1) と

Notch1 が未分節中胚葉全体に発現しているために、Notch シグナルが常にオンになっていると考えられる。bHLH(basic helix loop helix)型転写因子である *Hes7* は、胎生中期の未分節中胚葉において Notch によって発現誘導される標的遺伝子のひとつである(Bessho et al., 2001)。Hes7 タンパクは、*Hes7* 自身や他の遺伝子のプロモーター上の E-box(CANNTG)や N-box(CACNAG)の塩基配列に特異的に結合することで転写を制御する。しかし、*Hes7* タンパク質はユビキチン化を受けてプロテアソームで速やかに分解されるために、Hes7 による抑制はすぐに解除され、再び転写が始まる。*Hes7* によるネガティブフィードバックループによって、マウス未分節中胚葉での遺伝子発現の振動には必須であることが *Hes7* の機能喪失実験などにより明らかになった(Bessho et al., 2003)。



図。 マウス未分節中胚葉の細胞における Notch シグナル伝達系と標的遺伝子 *Hes7* と *Lfng* のフィードバック制御の模式図。

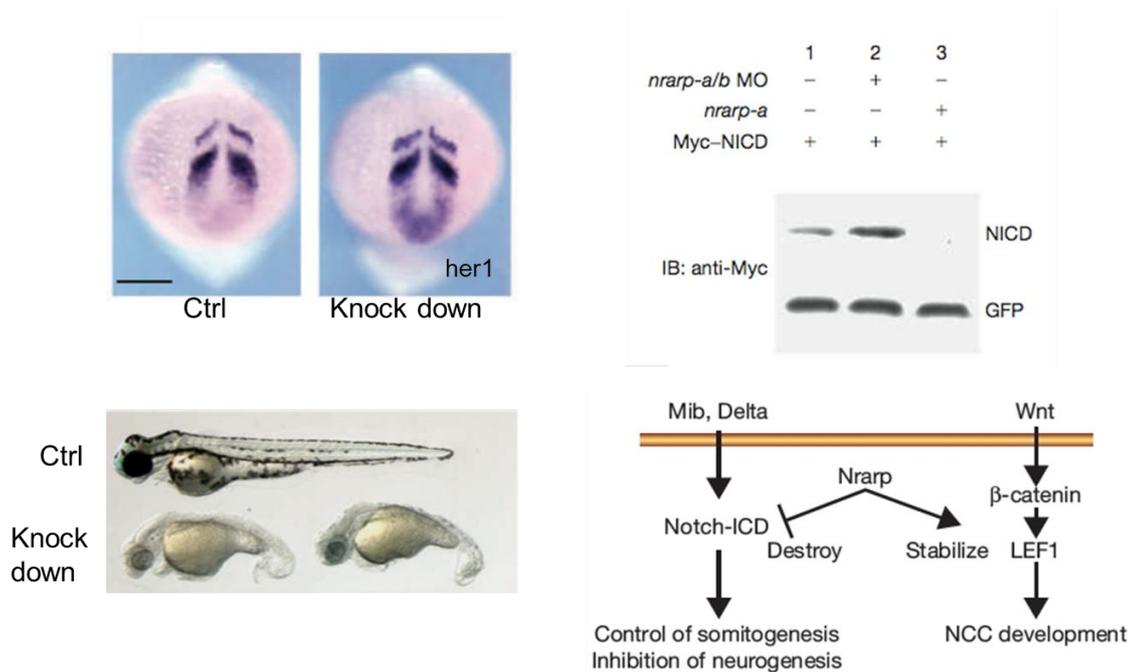
Notch シグナル伝達系におけるリガンドとレセプターの親和性は、糖鎖修飾因子である *Lfng*(Lunatic Fringe)によって細胞膜外ドメインが修飾されることでも変化する。*Lfng* はこれまで知られている哺乳類の3つの Fringe ホモログのなかでも唯一、未分節中胚葉で発現している遺伝子である。*Lfng* は *Hes7* と同様に Notch シグナルにより発現が誘導されて *Hes7* タンパクがプロモーター上に結合すると転写が抑制されるため、*Hes7* と同位相で振動している (Morales et al., 2002)。未分節中胚葉の前方においては、分節予定体節の尾側で *Lfng* の発現が局在しており、体節の分節面決定および体節形成の周期性制御に *Lfng* の周期的発現と転写産物の体節後方での局在が必須である (Evrard et al., 1998; Zhang and Gridley., 1998)。

隣接した細胞間の情報伝達と分子振動の同調

ゼブラフィッシュの Notch 変異体である *mindbomb* と *after eight* では *Her1* と *DeltaC* のダイナミックな発現パターンが失われる (van Eden et al., 1998; Jiang et al., 2000)。しかしながら未分節中胚葉の前方ではこれらの遺伝子が隣接している細胞間でいれっこ状態を表す「Salt and pepper 状」に広い範囲で発現している。Jiang らはこのようにダイナミックでない発現パターンが個々の細胞での *DeltaC* の動的な発現パターンの喪失によるものではなく、細胞間の同調性が失われたために起きていると仮説を立てた (2000)。また彼らは Notch シグナルが分子振動の誘導よりは細胞間の振動を協調させる働きをしていると仮定している。実際、ゼブラフィッシュとマウスの Notch 変異体において初期の体節形成は正常に行われるが、後期では体節形成が破たんする。体節形成は Notch シグナル非依存的であるために最初は正常だが、同調性が保たれないために、徐々に PSM 全体の分節リズムが乱れると主張している。ゼブラフィッシュの未分節中胚葉においては *DeltaC* の周期的な発現が細胞間の遺伝子発現同調を生み出していること (Mara et al. 2007)、Notch シグナルが同様な機能を果たしていることがゼブラフィッシュの研究により明らかになった (Horikawa et al., 2006)。しかし、情報伝達を担っている分子の同定やマウスにおける細胞間情報伝達の分子機構はまだ解明されていない。いずれも、Notch シグナル伝達系が細胞間情報伝達および分子振動の同調性維持に関わっている有力な候補として考えられている。

Notchシグナルの標的遺伝子 *Nrarp*

Nrarp (Notch regulated ankyrin repeat protein) は114アミノ残基からなり、二つのankyrin反復ドメインをもつタンパク質をコードしている。*Nrarp*はNotchシグナルのターゲット遺伝子としてアフリカツメガエル胚で初めてその機能が明らかになった(Lamar et al. 2001)。アフリカツメガエルの初期胚において、NotchシグナルがCSLファミリーを介して*Nrarp*の発現を誘導すること、*Nrarp*を過剰発現させた胚ではNICDを分解促進しNotchシグナルの標的遺伝子の発現が減少することが報告された。*Nrarp*はプロモーター上でNICD、Xsu(H)、Mastermindと複合体を作り、これにより細胞内のNICDの量が減少することから、*Nrarp*が活性化Notchシグナルを修飾しており、これによりNotchシグナルのターゲット遺伝子の転写を制御していると考えられる(Lamar et al. 2001; Pirot et al., 2004)。*Nrarp*の持つAnkyrinドメインはタンパク間相互作用に働くことが知られており、*Nrarp*がNotchシグナルを制御する際に、このAnkyrinドメインを介してNICDと結合し分解を促進することでNotchシグナルを制御していると考えられている(Mosavi et al., 2002)。



図。ゼブラフィッシュ *Nrarp* の機能解析。*Nrarp* をノックダウンした胚では体軸伸長不全(左下)と *her1* 遺伝子発現の上昇(左上)が見られる。*Nrarp* はNICDを分解促進することによりNotchシグナルを負に制御している(右)。(Ishitani et al., 2005)

ゼブラフィッシュ胚での機能解析によると、ゼブラフィッシュには*Nrarp-a*と*Nrarp-b*が存在し、*Nrarp-a*が主に体節形成に関わっていると考えられている (Topczewska et al., 2003)。*Nrarp-a*は未分節中胚葉、中枢神経系で発現しており、*Nrarp-a*に対するモルフォリノを用いたノックダウン実験では体節の分節境界が不規則になり、尾部の伸長が阻害される。未分節中胚葉では*her1*の発現が増強されるが、これは*Nrarp-a*をノックダウンしたことにより活性化Notchシグナルが上昇したことが原因とみられる。*Nrarp-a*はNotchシグナルの制御に加えて、Wntシグナルを制御していることが報告されている (Ishitani et al., 2005)。*Nrarp-a*ノックダウンにより色素細胞が減少するが、これはLEF1の活性化が弱まり、神経堤細胞の分化誘導が阻害されたことが原因であると考えられる。Wntシグナル構成因子であるLEF1のユビキチン化が*Nrarp-a*によって阻害されて安定化すると考えられ、*Nrarp*をノックダウンするとLEF1のノックダウンとよく似た表現型が観察される。さらに、LEF1の活性化はNotchの活性化に影響を与えないことから、ゼブラフィッシュで*Nrarp*はWntシグナルとNotchシグナルをお互い非依存的に制御していると考えられている。

一方、発生中期のマウス胚で*Nrarp*は、神経管や後脳などの中枢神経系と未分節中胚葉で発現しており、アフリカツメガエルの研究と同様Notchシグナルを制御していることが明らかになった (Krebs et al., 2001)。また、マイクロアレイを用いた発現解析から、未分節中胚葉では*Nrarp*の発現が振動していること

(Dequeant et al., 2006)、*Nrarp*の発現振動は*Lfng*と同調して振動していること (Sewell et al., 2009) が知られている。Notchシグナル伝達系因子の変異体では異常な体節形成が観察され、このとき波状の*Nrarp* mRNAの発現パターンが破綻していること、*Nrarp*はネガティブフィードバックによりNotchシグナルを修飾していることなどから、*Nrarp*が体節形成制御に関わっていると考えられる。

本研究ではNotchの負の制御因子として知られている*Nrarp*の役割に着目し、体節形成においてNotchシグナルの役割を正確に理解することを目的とする。*Nrarp*の機能喪失実験を通してNotchシグナルの増強を計らい、Notchシグナルおよび標的遺伝子の発現パターンや発現量、分節化への影響を評価する。さらにNotchシグナルの阻害剤投与によりNotchシグナルに対する機能回復実験を試みる。遺伝子発現の同調性が保たれる仕組みを調べるために、遺伝学的或い

は薬理学的手法を用いて未分節中胚葉の個々の細胞における遺伝子発現振動を観察し同調性を評価する。

材料と方法

In situ hybridization

脱水した胚を 100%メタノール、75%メタノール/PBS、50%メタノール/PBS、25%メタノール/PBS、PBS の順に 5 分間隔に入れ換え再水和する。5 分間 PBST に置換し、6% H_2O_2 /PBST を加えて室温で 15 分間漂白する。PBST を加えて室温で 10 分間置換し、これを 3 回行う。PBST を除き、 $10\mu\text{g/ml}$ の Protease K(Roche)/PBST で処理する(妊娠 10 日目の胚は 10 分、尾断片は 8 分)。Protease K(Roche)/PBST を除き、グリシン/PBST を加え、10 分間氷上に静置する。PBST で 3 回洗浄する。4%PFA0.2%glutaraldehyde/PBST で置換し 20 分間室温に静置する。PBST に置換し 5 分間室温に静置する。これを 2 回繰り返す。PBST を除き、hybridization buffer (50%ホルムアミド、 $5\times\text{SSC}[\text{pH}4.5]$ 、 $50\mu\text{g/ml}$ tRNA、1% SDS、 $50\mu\text{g/ml}$ Heparin) を加えて 70°C で 1 時間振とう (HYBRIDIZATION INCUBATOR,TAITEC) する。DIG 標識 RNA プローブを 85°C で 20 分間変性させ、氷冷する。 70°C に保温した hybridization buffer に変性したプローブを 300ng/ml になるよう加える。胚の入っている hybridization buffer を除き、直ちにプローブを添加した hybridization buffer を加える。 70°C で一晩 (16 時間以上) 振とうする。プローブを回収し、 -20°C で保存する。十分量の Solution1 (50%ホルムアミド、 $5\times\text{SSC}[\text{pH}4.5]$ 、1% SDS) を加え 70°C で 30 分間振とうする。これを 3 回繰り返す。Solution1 を除き、十分量の Solution3 (50%ホルムアミド、 $5\times\text{SSC}[\text{pH}4.5]$) を加え 65°C で 30 分間振とうする。これを 2 回繰り返す。Solution3 を除き、十分量の TBST を加え 5 分間静置する。これを 3 回繰り返す。TBST を除き、十分量の 10%sheep serum/TBST を加え、1 時間静置する。10%sheep serum/TBST を除き、 $1/2000$ 倍量の抗 DIG 抗体 (Roche) 入りの 1%sheep serum/TBST を加える。 4°C で一晩振とうする。抗体を除き、十分量の TBST を加え、室温で 5-10 分間振とうする。これを 10 回繰り返す。

TBST を除き、NTMT を加え室温で 5 分間振とうする。これを 2 回繰り返す。NTMT を除き、発色液を加えて 30 分-数時間室温で遮光した状態で静置する。このとき 10 分間隔で発色具合を実体顕微鏡で確認する。発色したら染色液を除き、PBT で洗浄し、4%PFA/PBT を加える。写真撮影後、 4°C で遮光保存する

サザンブロッティング

マウスの組織または細胞をマイクロチューブに入れ、500 μ l の Lysis buffer(50mM Tris-HCl[pH8.0]、0.2M NaCl、5mM EDTA、1% SDS)と 50 μ g の Protease K を加え、55°Cで一晩振とうする。500 μ l のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールを加え、30 秒間攪拌する。5 分間遠心分離(室温、15000rpm)し、上清を新しいマイクロチューブに回収する。0.1 倍量の 3M NaOAc、2 倍量の 100%エタノールを加え軽く混ぜてから 5 分間遠心分離(4°C、15000rpm)する。上清を除き、同量の 75%エタノールを加え 5 分間遠心分離(4°C、15000rpm)する。エタノールを除き、マイクロチューブに残っているエタノールが乾いたら 50 μ l の dH₂O または TE buffer(10mM Tris[pH8.0]、10mM EDTA)を入れて溶かす。

抽出した 2 μ g のゲノム DNA を 15 μ l の反応系で、制限酵素を一晩消化させる。0.8%アガロースゲルで反応液を 12mA 20V で 16 時間泳動する。泳動が終わったら、アルカリ変性させた後、アガロースゲルのウェルを下に向けてメンブレンと背合わせになるようにし、10 \times SSC でメンブレンに一晩トランスファーする。鉛筆でサンプルを流した位置をマークし 5 \times SSC で 10 分間中和し、ゴミがつかないように乾かす。90 秒間 UV リンカー処理し、よく乾かす。5 \times SSC に入れハイブリバックにいれる。Hybridization buffer (50%ホルムアミド、5 \times SSC、50mM リン酸ナトリウム、2%ブロッキング試薬、0.1%N-ラウロイルサルコシン・ナトリウム、7%SDS) を 42°Cで熱しハイブリバックに入れる。メンブレンを 42°Cで 1 時間振とうし、Hybridization buffer をなじませる。作製した DIG 標識プローブを 5 分間熱変性させ、すぐに氷上で 5 分間急冷する。プローブの入った Hybridization buffer を用意し、ハイブリバックに入れる。42°Cで一晩振とうする。プローブを回収し、-20°Cで保存する。十分量の 2 \times SSC 0.1%SDS のなかで室温、5 分間振とうして洗う。これを 2 回繰り返す。十分量の 0.2 \times SSC 0.1%SDS を加え 60°Cで 30 分間振とうする。マレイン酸バッファー(0.1M マレイン酸、0.15M NaCl)で軽く洗う。2%Blocking Reagent/マレイン酸バッファーで室温、30 分間振とうする。2%Blocking Reagent/マレイン酸バッファーに 1/10000 の濃度になるよう抗 DIG 抗体 AP を添加し、メンブレンを入れて 1 時間以上振とうする。マレイン酸バッファーで 20 分間激しく振とうしながら洗う。これを 3 回繰り返す。Assay buffer (Roche) と CDP star (Roche) を順に入れて 5 分間室温で振とうする。残存する液を切り落とし、サラシラッ

ブに包み泡を除きメンブレンが乾かないようにする。フィルムカセットにメンブレンのプロット面が上になるようにセットし、暗室でフィルムを挟み、カセットを閉じる。1時間経過したらフィルムを現像する。

X-gal 染色

妊娠マウスを頸椎脱臼し安楽死させる。帝王切開して子宮ごと取り出し、冷1×PBS中で胚を取り出す。子宮と薄膜を取り除き、脳、心臓、耳胞に穴をあけた後、前肢を切り取ってゲノムDNA抽出に用いる。4%PFA/PBSに入れて4℃で30分間固定する。PBSで洗浄し、X-gal solution (5mM フェロシアン化カリウム、5mM フェリシアン化カリウム、2mM MgCl₂、0.02% Nonidet P-40、0.01% 1mg/ml X-gal) に置換し、37℃で遮光しながら3~5時間振とうする。胚が染まっていることを確認されたらPBSで2回洗浄し、4%PFA/PBSに入れて固定する。長期保存する場合は遮光し4℃で保存する。

骨格二重染色

マウスを70℃のお湯につけながら皮、内臓、筋肉を剥ぐ。99.99%エタノールに入れて一晩固定する。エタノールを除き、アセトンを入れ一晩静置する。アセトンを除き、染色液 (70%エタノール、0.015% Alcian Blue、0.015% Alizarin Red、5% Acetic Acid) を加え3日間静置する。染色液を除き、水で洗浄する。洗浄を3回行う。1% KOHを入れて24時間から5日間静置し、透明化する。液に色がついてきたら新しい液に入れ換える。Moll solution (20% グリセリン、1% KOH) を入れて写真撮影する。撮影後の標本は20%~50%グリセリンで保存する。

X線 CT 撮影

6~8週齢のマウスを用いたX線CT撮影は、LaTheta LCT-100シリーズ (アロカ株式会社) により行われた。

免疫ブロットティング

E10.5胚から未分節中胚葉を切除し、1% NP-40, 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, and 5 mM EDTAを含むbufferに入れて溶解させる。SDS-PAGEにより展開し、ゲルをHybond-P(Amersham)膜と重ね合わせて転写させる。メ

ンブレンへの非特異的な吸着を防ぐためにブロッキングを行ったのち、抗Notch1抗体(Cell Signaling)あるいは抗 β -actin抗体と4°Cで一晩反応させる。それぞれの一次抗体に特異的な二次抗体と反応させ、chemiluminescence detection system (Amersham)を用いてタンパク質を検出する。タンパク質の定量はNIH image programを用いて行う。このとき、 β -actinを内部コントロールとし、NICDの量を補正する。

免疫染色

E10.5胚を摘出し、4% paraformaldehydeを用いて4°Cで1時間固定する。6% H₂O₂ 2% Triton X-100に10分間入れたのち、抗Notch1抗体(Cell Signaling)あるいは抗phospho-histone H3抗体(Cell Signaling)と反応させる。それぞれの一次抗体に特異的な二次抗体(peroxidase結合型)と反応させ、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma)あるいはTSA検出キット(Invitrogen, T20912)を用いて検出する。細胞核は1000倍に希釈したPIにより染色する。

マイクロアレイおよび定量RT-PCR

E10.5胚から未分節中胚葉を切除し、さらに神経管を取り除く。SV Total RNA Isolation System (Promega)を用いてRNAを抽出および精製する。マイクロアレイ解析はKota Tamadaにより行われた(Watanabe et al., 2009)。解析結果はNCBI Gene Expression Omnibusで公開されている(GSE18419)。

逆転写反応はSuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen)を用いて行われた。oligo dT12-18 0.5 μ l、2.5mM dNTP 2 μ l、DEPC水を9 μ lになるように加える。70°C、10min、インキュベートし5x buffer 2.5 μ l、RNase inhibitor 0.5 μ l、SuperScript II RT 0.5 μ lを加え42°Cで90分間反応させる。定量PCR反応はKAPA SYBR FAST Universal qPCR (Kapa Biosystems)および用いて行われた。内部コントロールとしてG3PDHが用いられており、それぞれの遺伝子に対するプライマーの配列は次の通りである。

G3pdh; G3pdh-S, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', and

G3pdh-AS, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3';

Nrarp; Nrarp-S, 5'-CTCGCACTTAGGAAGGGAAG-3', and

Nrarp-AS, 5'-ACCACGCACAATATTTCCAA-3';

Hes5; Hes5-S, 5'-GCAGCATAGAGCAGCTGAAG-3', and

Hes5-AS, 5'-GAAGGCTTTGCTGTGTTTCA-3';

Car4: Car4-S, 5'-GTCAAATGGGAATGACAACG-3', and
Car4-AS, 5'-TTGTCCTTCGAGTCCTCCTT-3';
Gpr133: Gpr133-S, 5'-TCATTACTGGCCATTGGAAA-3', and
Gpr133-AS, 5'-GAGAGGCACAGTGAGGTTGA-3';
Rhox5: Rhox5-S, 5'-CAGGTATGGAAGCTGAGGGT-3', and
Rhox5-AS, 5'-GCTGTTCTTCCGAGTCTTCC-3';
Hes7: Hes7-S, 5'-TAGAAGAGCTGAGGCTGCTG-3', and
Hes7-AS, 5'-CTTTCTCCAGCTTCGGGTT-3';
Lfng: Lfng-S, 5'-TGTTTGAGAACAAGCGGAAC-3', and
Lfng-AS, 5'-CAGGGTGTGTCTGGGTACAG-3';
Dusp6: Dusp6-S, 5'-GGAATGAGAACACTGGTGA-3', and
Dusp6-AS, 5'-GAAGCCACCTTCCAGGTAGA-3';
Spry2: Spry2-S, 5'-GAAGAGGATTCAAGGGAGAGG-3', and
Spry2-AS, 5'-GTCTTGGCAGTGTGTTCCACC-3';
Axin2: Axin2-S, 5'-CTGGCTCCAGAAGATCACAA-3', and
Axin2-AS, 5'-TCAGCATCCTCCTGTATGGA-3';
Nkd1: Nkd1-S, 5'-CGTGGCTGGGAGAAGAAGC-3', and
Nkd1-AS, 5'-CAGGTCTAGGTAGTGGTTTCTCC-3'.

体節の計数

体節を数えるために、それぞれのステージの胚において *Uncx4.1* のプローブを用いて *in situ hybridization* を行った。前肢芽と後肢芽の間に位置する体節の数を側面から観察することで確認した。遺伝子型ごとの体節数を調べるために、一匹の妊娠マウスから得られた複数の同腹仔の体節数を遺伝子型ごとに数え、その平均値を求めた。これを一つの母集団とし、複数の妊娠マウスから同様な計測を行い、遺伝子型間の体節数の計算および有意差の検証を *paired t-test* により行った。

マウスの飼育およびGamma-secretase阻害剤、ホウ酸の投与

Nrarp 変異マウスは、キメラマウスを野生型のCD1(ICR)系統と3回以上かけ合わせ、8-12週齢に達したヘテロ接合体マウス同士を交配させて胚の摘出を行

った。実験動物の飼育および動物実験は本学の定める動物実験等の実施に関する規程に従い適正に行われた。

LY411,575はdimethyl sulfoxideを用いて30 mg/mlになるよう調整し、さらに5% エタノールを含むヒマワリ種油を適量混ぜて投与された。マウスの体重を計測し、0.1mg/kg/.3mg/kg/1.0mg/kgの阻害剤を200ulの5% エタノールを含むヒマワリ種油とともに投与した。投与の前に12時間断食・断水させたマウスを用い、24時間ごとに投与を行った。胚の摘出は最後の投与から24時間後に行っている。

ホウ酸 (Boric acid、WAKO) とバルプロ酸 (Valproic acid、SIGMA) はPBSを用いてそれぞれ200mg/mlと50mg/mlになるよう調整し、妊娠9.5日目のマウスに1000mg/kgの量を腹腔投与した。ホウ酸は溶けにくいので、PBSを予め40°Cに温めておいた。

分子振動の数理解析—モデルの基本方程式

Hes7 発現周期の Notch 活性依存性を数理モデルで検証した。モデルは Lewis による先行研究を用いた (Lewis, 2003)。

Hes7 タンパク質の量を $p(t)$ 、mRNA の量を $m(t)$ とすると、

- $p(t)$ は $m(t)$ に依存して増加し、 $p(t)$ 自身の量に応じて分解する
 - $m(t)$ は $p(t)$ に依存して増加が抑えられ、 $m(t)$ 自身の量に応じて分解する
- である。これらを微分方程式で表現すると以下のようなになる。

$$\frac{dp(t)}{dt} = am(t - T_p) - bp(t) \quad (1)$$

$$\frac{dm(t)}{dt} = \frac{k}{1 + p^2(t - T_m)/p_0^2} - cm(t) \quad (2)$$

ここで、 a と k は mRNA のタンパク質合成(翻訳)速度係数、および mRNA 最大転写速度係数である。Notch による転写促進は k で表現される。 b と c は分解速度、 p_0 は Hes7 による転写抑制の度合を表す定数(小さいほど抑制効果が大きい)、 T_p と T_m はそれぞれタンパク質と mRNA 産生にかかる時間の遅れを意味する。本論文におけるシミュレーションは、上記方程式を用いて行った。以下にパタメーターを示す。

表。 シミュレーションに用いたパラメーター。これ以外のパラメーター値に対しても安定した振動を再現し、ここで用いた値は、周期が実験データに合う組み合わせの1つである。

パラメーター	値(単位)	意味
a	0.5 (molecules/min)	タンパク質合成速度係数
b, c	0.11 (1/min)	NICD、mRNA、タンパク質の分解速度
p_0	13 (min)	mRNA の転写抑制定数
T_p	15 (min)	mRNA の核外輸送と翻訳における時間遅れ
T_m	20 (min)	Hes7 タンパクの核内移行における時間遅れ

同調細胞の計数

未分節中胚葉細胞の核を標識 (PI染色) し、*Lfng*のpre-mRNAを蛍光標識した (fluorescence *in situ* hybridization)。非同調細胞とは、*Lfng*発現の波の境界外に位置し、mRNAが核内に存在する細胞 (核) を意味する。発現の波の境界外とは発現細胞群から離れた (隣接していない) 場所を意味する。境界外において群れ (二つ以上) を成して発現している細胞の場合、その数を比較し、少ない集団を非同調細胞と見なす。この定義に従ってmRNAが存在する細胞 (核) を全て数えた後、非同調細胞 (核) を数えてその比率を求めた。

結果

Nrarp ノックアウトマウスは椎骨及び肋骨の奇形と椎骨数の減少を示す

Nrarp は体節が形成される時期の未分節中胚葉で強く発現している (Sewell et al., 2009; Wright et al., 2009)。未分節中胚葉は体節の原基であり、形成された体節は椎骨と肋骨へと分化するために、これらの骨格形成に *Nrarp* が影響していると考えられる。我々は体節形成における *Nrarp* の機能を調べるために ES 細胞における相同組み換えを利用して *Nrarp* 遺伝子を欠失させ (図 1)、体節形成への影響を検討した。

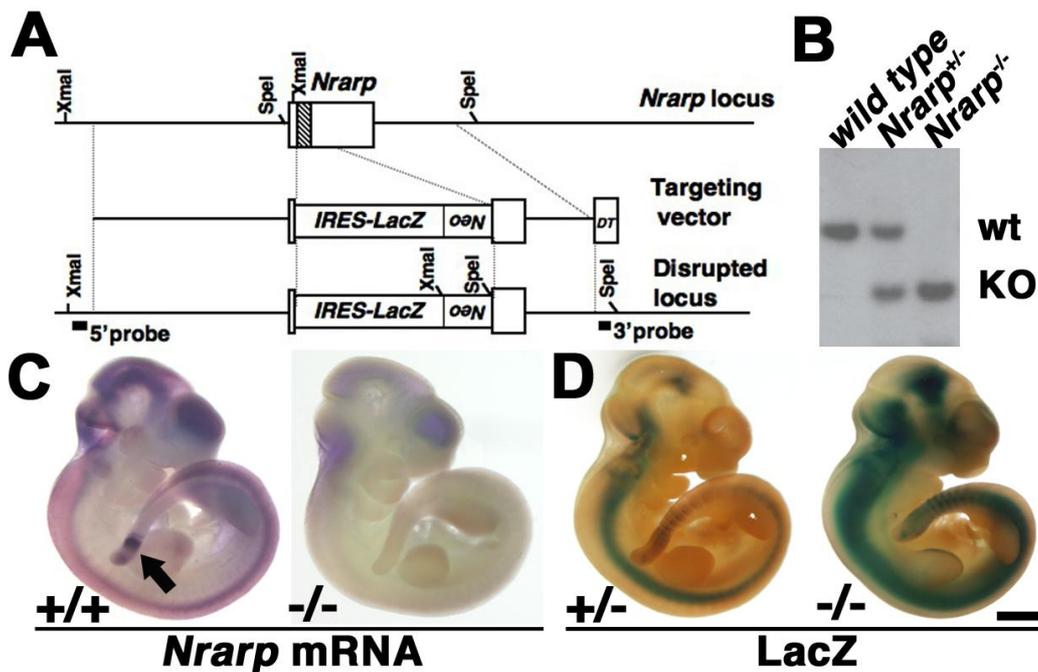


図 1。(A)ターゲッティングベクターの概略。野生型(C57BL/6)の *Nrarp* アリル (上)、ターゲッティングベクター (中)、そして組換わった後のミュータントアリル (下) を表している。ターゲッティングベクターは約 10kbp の 5'long arm、IRES-*LacZ*ネオマイシン耐性遺伝子、4kbp の 3'short arm、そしてジフテリアトキシン(DT)から構成される。*Nrarp* のコーディング領域が IRES-*LacZ*ネオマイシン耐性遺伝子に置き換わる。(B)サザンブロット法を用いて遺伝子型を調べた。Wt,野生型;KO,変異アリル(C) *Nrarp* mRNA の局在を *in situ* hybridization を用いて調べた。野生型神経管と後脳、未分節中胚葉(矢印)などの部位で発現している。ホモ接合体の変異体において *Nrarp* の発現部位である未分節中胚葉、神経管、後脳で mRNA が存在しないことが示された。(D)X-gal 染色。*Nrarp*^{+/-}と *Nrarp*^{-/-}において *LacZ* の発現を調べた。*Nrarp* の発現部位と一致した染色パターンが見られる。スケールバー,1mm。

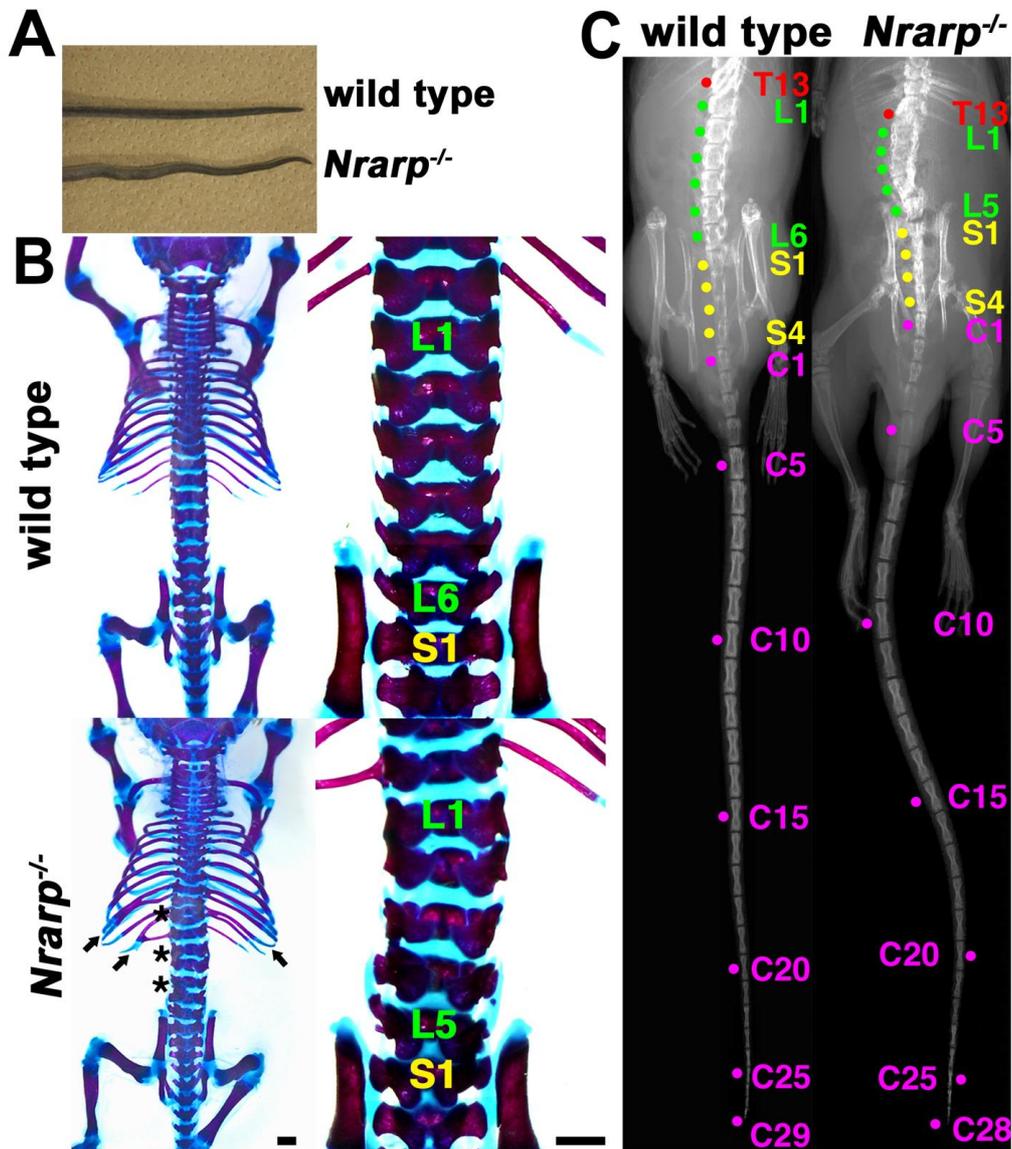


図2. *Nrarp*^{-/-}の椎骨形成異常。(A)成体マウスにおける尻尾の伸長方向異常。(B)肋骨が異常な方向に伸び(矢印)、椎体の癒合がみられる(星印)。(B,C)野生型の腰椎が6本あるのに対し、*Nrarp*^{-/-}では5本の腰椎が認められた。(C)X線CT撮影画像による骨格観察。*Nrarp*^{-/-}の胴体が短く、体軸が蛇行している。尾椎の数は、正常のマウス30本に対し(n=7)、*Nrarp*^{-/-}では28~29本の尾椎が認められた(n=9)。腰椎の減少も確認された。正常マウスで6本、*Nrarp*^{-/-}で5本の腰椎が認められる。T,胸椎; L,腰椎; S,仙椎 C,尾椎。スケールバー,1mm。

表1。 X線 CTによる椎骨数の計測。X線 CT撮影後、椎骨の分類と計数を行った。*Nrarp*^{+/+}マウスで腰椎と仙椎数にばらつきはあるが、同腹仔の野生型に比べてその数は減少している。

遺伝子型 (<i>Nrarp</i>)	頸椎	胸椎	腰椎	仙椎	尾椎	腰椎+ 仙椎	合計
+/+	7	13	6	4	29	10	59
+/+	7	13	6	4	29	10	59
+/+	7	13	6	4	29	10	59
+/+	7	13	6	4	29	10	59
+/+	7	13	6	4	29	10	59
+/+	7	13	6	4	29	10	59
+/+	7	13	6	4	29	10	59
+/+	7	13	6	4	29	10	59
+/-	7	13	5	5	29	10	59
+/-	7	13	6	4	29	10	59
+/-	7	13	6	4	29	10	59
+/-	7	13	6	4	29	10	59
+/-	7	13	6	4	29	10	59
+/-	7	13	6	4	30	10	60
-/-	7	13	5	5	28	10	58
-/-	7	13	5	5	27	10	57
-/-	7	13	5	4	29	9	58
-/-	7	13	5	4	29	9	58
-/-	7	13	5	5	28	10	58
-/-	7	13	5	4	28	9	57
-/-	7	13	6	4	28	10	58
-/-	7	13	5	4	28	9	57
-/-	7	13	5	4	27	9	56

Nrarp ノックアウトマウス (*Nrarp*^{-/-}) では、尻尾が屈曲している (図 2A; n=22/57)。これと類似した尾骨形成異常の表現型は *Hes7* ヘテロ変異体でもみられている (Bessho et al., 2001b)。この表現型を詳細に調べるために、骨格染色を行い椎骨の形と数を調べた (図 2B)。*Nrarp*^{+/+} は野生型に比べて形態的に差がみられなかったが、*Nrarp*^{-/-} においては肋骨の伸長方向異常、癒合、椎弓と椎体の縮小が認められた。X 線 CT を用いて撮影した結果においても同様な異常が認められた (図 2C)。従って、*Nrarp* は正常な椎骨形成に必須である。

次に、頸椎から尾椎まで全ての椎骨数を数えたところ、野生型では 59 本 (n=7)、*Nrarp*^{-/-} では 57.4 ± 0.2 本 (n=9) が確認された。*Nrarp*^{-/-} マウスでは腰椎と尾椎がそれぞれ約 1 本ずつ減少したが (図 2B-C, 表 1)、椎骨同士の重度な癒合はみられなかった。従って、*Nrarp* は椎骨形成において適切な数を維持するために必須であると考えられる。

***Nrarp*^{-/-} の椎骨数の減少は体節数の減少に起因する**

椎骨は体節に由来するため、胎生期に形成される体節の数は椎骨の数に反映される (Gossler and Hrabe de Angelis 1998)。*Nrarp*^{-/-} でみられる椎骨の減少原因を調べるために、胎生中期の体節形成期にある胚において体節の数を比較した。分節後、頭部側の体節から骨格や筋肉へ一過的に分化するために、全体節数を確認することは容易ではない。そこでまず、前肢芽と後肢芽の間に位置する体節数を比べたところ、野生型と *Nrarp*^{-/-} の間で差が見られた (図 3A)。野生型では肢芽間に 18 個の体節が位置することに対し、*Nrarp*^{-/-} では 17 体節が確認され、椎骨数が減少する表現型と一致していた。*Uncx4.1* の発現パターンにより、*Nrarp*^{-/-} では体節形成、すなわち大きさや形、前後極性は概ね正常であると考えられ、一度形成された体節同士が癒合することで体節数が減少する可能性も少ないとみられる (図 4)。

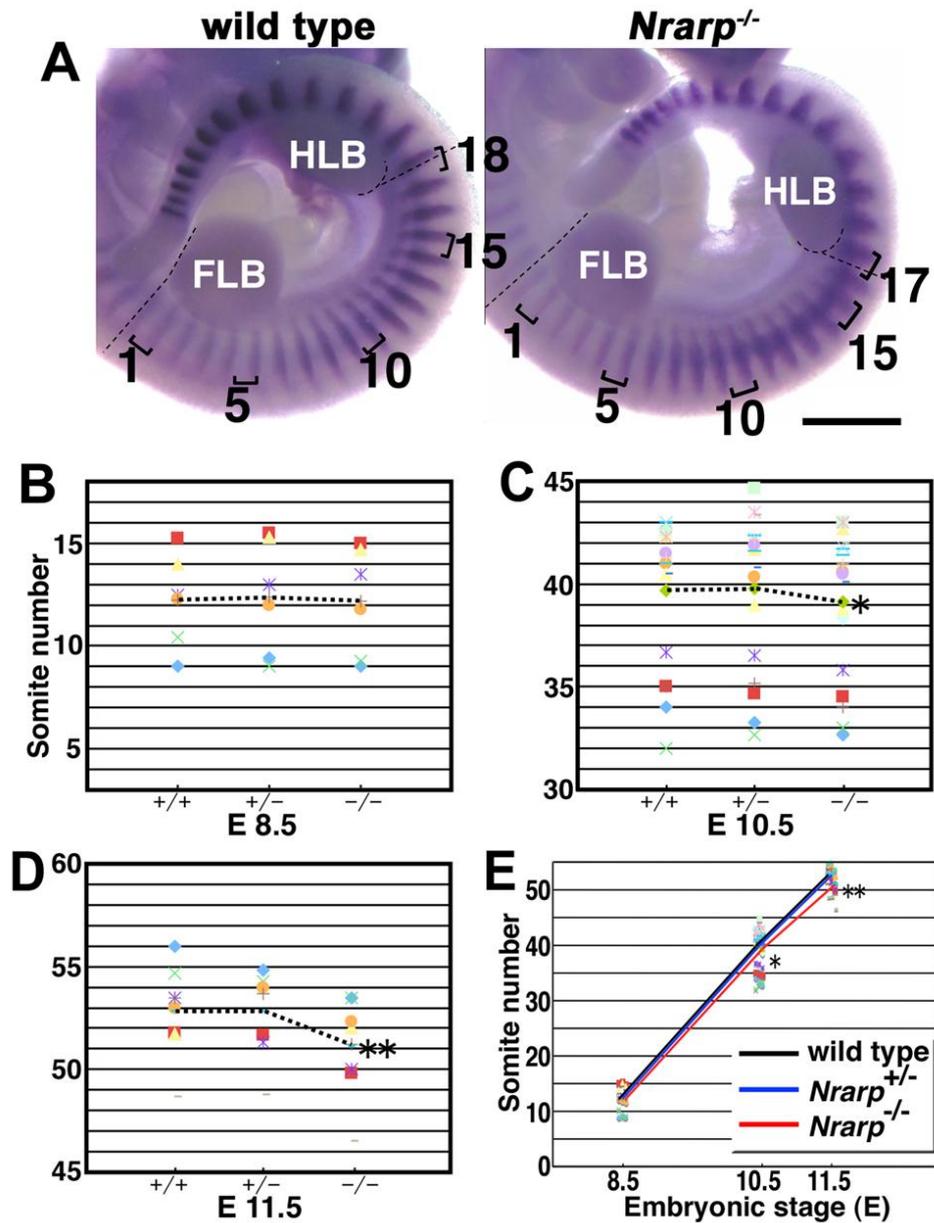


図3。 (A) *Uncx4.1* の *in situ* hybridization。10日目の胚で前肢芽(FLB, forelimb bud)と後肢芽(HLB, hindlimb bud)の間に位置する体節を数えた。点線は肢芽の前方の位置を示す。スケールバー, 1mm。(B-D) 8日目(E8.5)、10日目(E10.5)、11日目(E11.5)の胚における全体節数を遺伝子型毎に数えた。同じ図柄は同腹仔の平均体節数を示す。平均値の差の検定(paired *t*-test)を行い、平均体節数を点線で表した。(B)野生型と *Nrarp*^{+/-}間で有意差は検出されなかった(n=6)。(C)10日目の胚では、 *Nrarp*^{+/-}で約0.5体節少ない(n=18, *P<0.02)。(D)11日目の胚では、 *Nrarp*^{+/-}で約1.7体節少ない(n=8, **P<0.01)。(E)B-Dのまとめ。

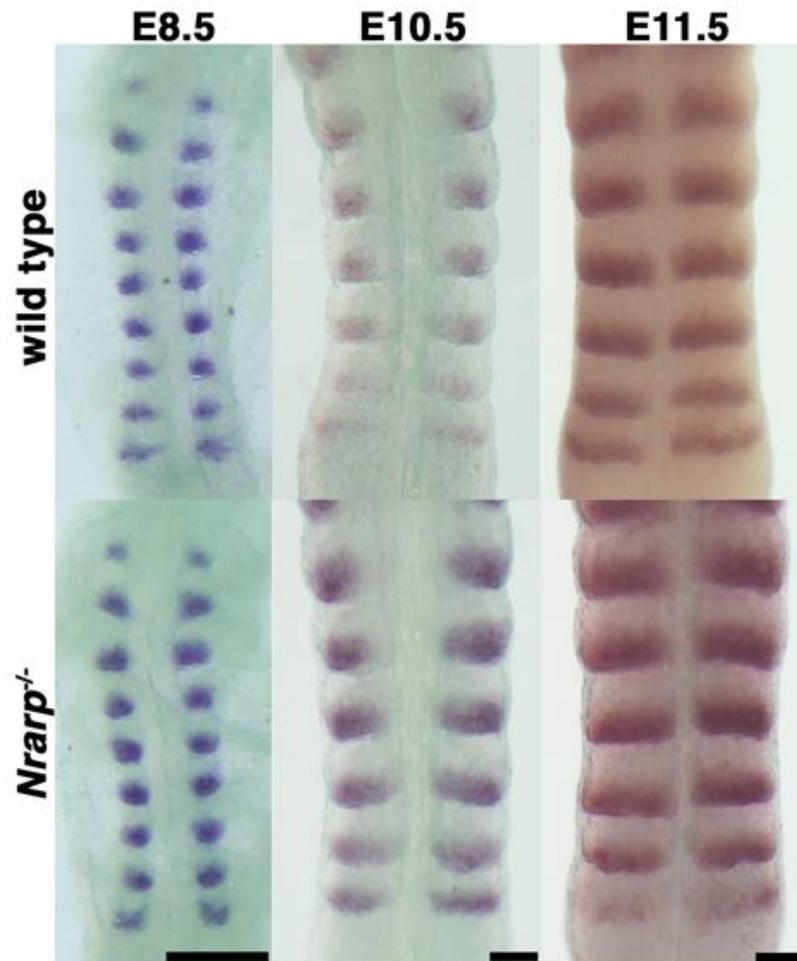


図 4。 *Nrarp*^{-/-}で体節の形と大きさに異常はみられない。表記されている発生段階で *Uncx4.1* の *in situ* hybridization を行った。胚の後方にある体節の背側図。野生型、*Nrarp*^{-/-}ともに左右体節は対象であり、*Uncx4.1* の発現パターンにも差はみられない。上方向が頭側。スケールバー、500 μ m。

***Nrarp*^{-/-}では分節時計の周期が長くなっている**

Nrarp^{-/-}では椎骨と肢芽間の体節数が減少していた。体節形成は胚発生の一定期間に行われる。そのため、体節形成の周期によって総体節数が決まる。マウスでは約 120 分毎に未分節中胚葉の前方が一回括れ切れることで一对の体節が形成される。*Nrarp*^{-/-}でみられる肢芽間の体節数の減少の原因は、体節形成の周期が長くなっているために起こると予想される。我々は体節の分節周期を測定するために、発生時期の異なる胚の体節数を計測し、野生型と *Nrarp*^{-/-}を比較した（比較と計測方法は材料と方法を参照）。胎生 8 日目の胚では、野生型(12.24 ± 0.93)と *Nrarp*^{-/-}(12.36 ± 1.14)で有意な差は認められなかった。しかし、10 日目の胚において野生型(39.69 ± 0.83)に比べ *Nrarp*^{-/-} (39.16 ± 0.84)で有意に減少しており、11 日目の胚でも野生型(52.85 ± 0.78)より *Nrarp*^{-/-}(51.11 ± 0.95)で体節数が有意に減少していた（図 3B-D）。8 日目から 11 日目の間の 72 時間に形成される体節は、野生型で 40.6 個と *Nrarp*^{-/-}で 38.9 個である。この差は椎骨数の差とほぼ一致している（野生型 59 個、*Nrarp*^{-/-}57.4 個）。この結果より体節形成の周期を求めると、野生型では 106 分、*Nrarp*^{-/-}では 111 分ごとに一对の体節が形成されることになる。したがって、*Nrarp* の欠失により体節形成の周期が約 5 分延び、その結果、体節と椎骨数が減少する。

***Nrarp*^{-/-}の体節数の減少は発生遅延によるものではない**

体節は胚発生の一部として発生時期と発生が進む速度と歩調を同じくしていると考えられる。*Nrarp*^{-/-}でみられる全体節数の減少は胚発生全般が遅れているために起こっている可能性も考えられる。しかし、8 日目の胚において体節数で有意差がみられなかったことは、少なくともこの時期では発生が同一線上にあることが言える。しかしその後、胚全体の発生速度が遅れていることは否定できない。そこで、体節以外の組織で発生時期を判断することでこの疑問を明らかにした。10 日目の胚では胚全体を目視し、同程度に発生が進んでいることを確かめた(図 5A)。即ち、この時期の特徴である後肢芽の発芽、目の原基の形成が確認された。そして 11 日目の胚において、肢芽の形成度合いと肢芽の先端部で発現している *Fgf8* の発現パターンを比較した(図 5B)。この時期の肢芽の先端部には AER(apical ectodermal ridge)と呼ばれる細胞群が帯状に局在しており、*Fgf8* を発現している(Lu et al., 2006)。この AER は 10 日目の胚では肢芽の先端中央部にのみ局在するが、次第に先端を覆うように局在が変わる。

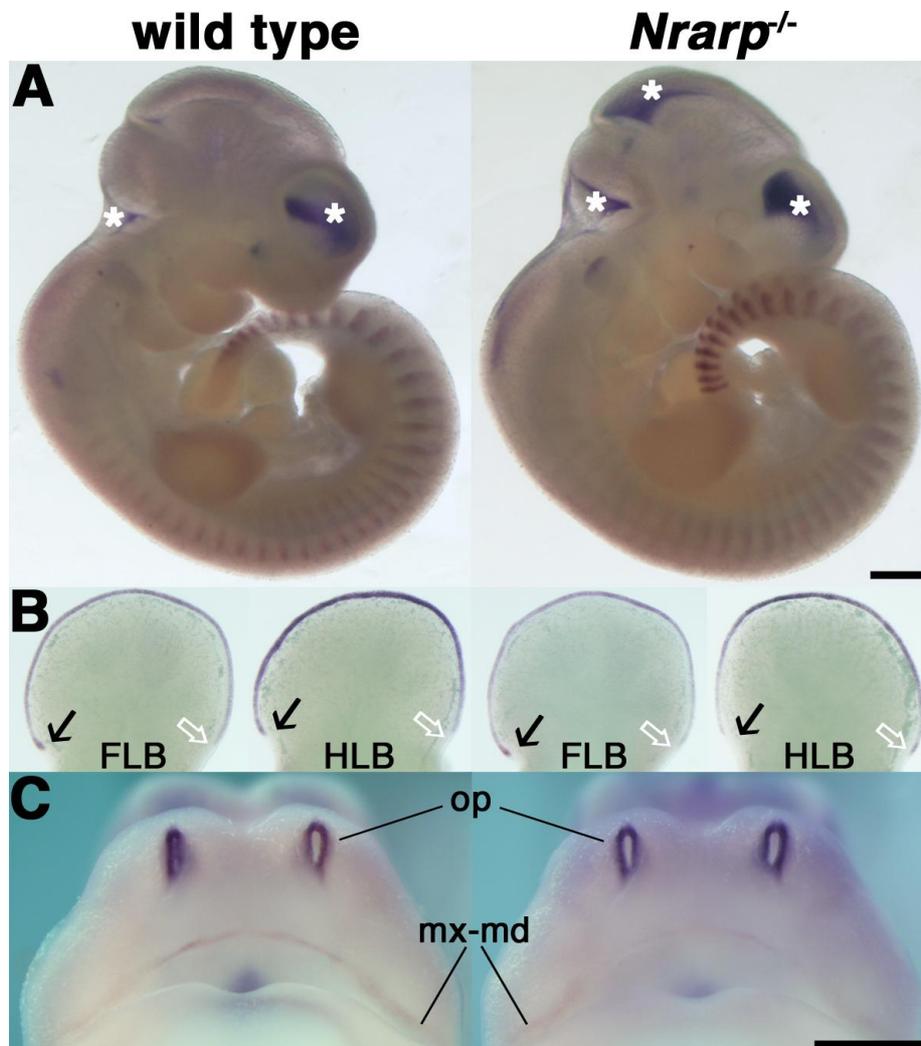


図5。(A) 10日目胚の *Uncx4.1* *in situ* hybridization。白矢印は非特異的な色素の沈着を示す。(B) 11日目胚の *Fgf8* *in situ* hybridization。矢印は肢芽の前方での発現境界、白矢印は肢芽の後方での発現境界を示す。FLB, fore limb bud; HLB, hind limb bud。(C) 11日目胚の *Fgf8* *in situ* hybridization。頭部の正面図。op, olfactory pits; mx, maxillary process; md, mandibular process。スケールバー, 500 μ m。

さらに胎生 12 日目になると AER は数が減少し、指になる部分にのみ存在し、肢芽の表面も指の形がつくられてくる。そのため肢芽の先端部に凹凸ができ、指の間に該当する細胞では細胞死が起こり、均一な肢芽の表面に指の輪郭ができる。この肢芽の変化を指標に *Nrarp*^{-/-}での胚全体での発生遅延が起こっているかを検討した。同腹仔の野生型の胚と比べ、ほぼ同一な形状と *Fgf8* の発現パターン、すなわち AER の局在が認められた。また、11 日目の胚では嗅覚器官の原基がつくられ、正面からみると小さい穴が 2 つ観察され、この穴の周りにも *Fgf8* が発現している(図 5C)。加えて、上顎と下顎の境界部位でも *Fgf8* が発現している。いずれの部位でも同程度の器官形成が進んでおり、*Nrarp*^{-/-}において胚全体の発生遅延は認められなかった(Mahmood et al., 1995)。

Nrarp^{-/-}の未分節中胚葉では Notch シグナルが増強している

Nrarp は活性化 Notch シグナルである NICD の分解を促進することで Notch シグナルを抑制しているために (Lamar et al., 2001)、*Nrarp* を欠失すると未分節中胚葉で Notch シグナルが増強されると予想できる。胎生 10 日目の胚の未分節中胚葉から NICD を定量すると、*Nrarp*^{-/-}では野生型に比べて約 1.9 倍増加していた (図 6A)。しかし NICD の波状の局在パターンに変化は見られなかった (図 6C)。Notch の標的遺伝子である *Hes5* は Notch シグナルの変化に直接的に影響されることから Notch エフェクターとも呼ばれる (Ohtsuka et al., 1999)。*Hes5* 発現は *Nrarp*^{-/-}の未分節中胚葉で著しく増加された (図 6B,7B)。NICD と同様、*Hes5*、*Hes7*、*Lfng* の波状の発現パターンに変化は見られなかった (図 6B,D,E)。*Nrarp* を欠失すると、Notch シグナルは増強されたが、その振動パターンと標的遺伝子の振動パターンに変化はなかった。

ゼブラフィッシュにおいて *Nrarp* は、Wnt シグナル構成因子である LEF1 のユビキチン化を阻害することで LEF1 タンパク質を安定化させ、Wnt シグナルを制御していることが報告されている (Ishitani et al., 2005)。マウス未分節中胚葉において *Axin2* 発現は、Wnt シグナルによって転写誘導され *Lfng* と逆の位相で振動し Wnt シグナルを負に制御している (Aulehla et al., 2003)。そこで、マウスにおいても *Nrarp* が Wnt シグナルを制御しているかを検討した。Wnt の標的遺伝子 *Axin2* は未分節中胚葉前方の分節予定体節で、細いストライプ状の発現および最尾端 (tail bud) の強い発現が後方未分節中胚葉で勾配を形成して発現する phase I、前方未分節中胚葉の 2 本のストライプ状の発現を示す

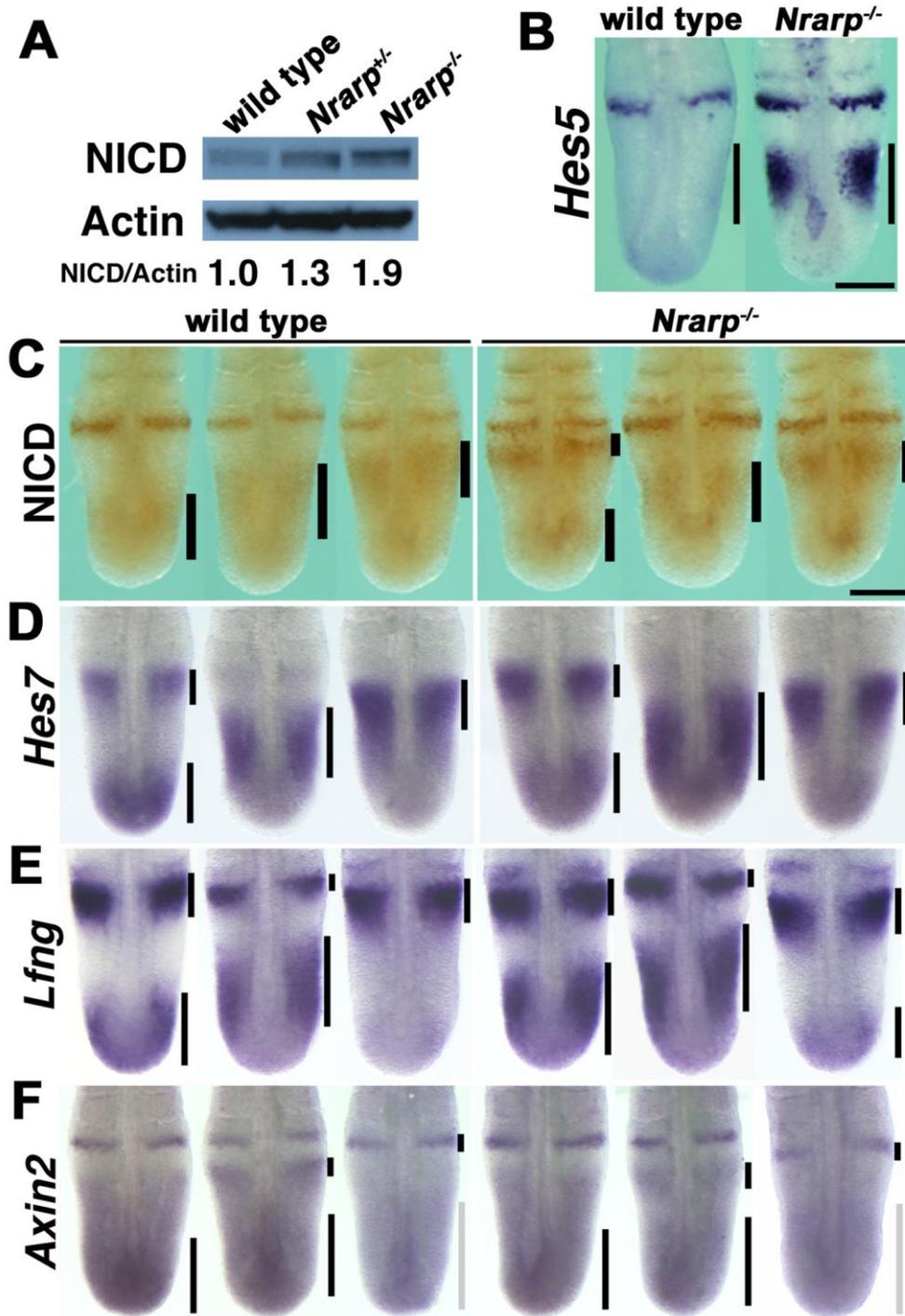


図6。(A)免疫ブロッティングによるNICDの定量(n=3)。β-actinに対するNICDの比を表した。(B,D-F) *Hes5*, *Hes7*, *Lfng*, *Axin2*の発現を *in situ* hybridization によって調べた。スケールバー, 200 μm。(B) *Hes5*の発現パターンに変化はないが、*Nrarp*^{-/-}で著しく発現量が増加した。(C)NICDの局在を示した。黒線はNICDの局在場所を示している。*Nrarp*^{-/-}で強いシグナルがみられるが、局在に差は見られなかった。(D-F)発現パターンが3つの相(Phase)に区分されている。*Nrarp*^{-/-}でそれぞれの遺伝子の発現パターンに変化は見られなかった。灰色線は弱い発現部位を表す。

phase II、最尾端と後方未分節中胚葉の弱い発現および分節予定体節の尾部で発現している phase III の 3 つの発現パターンを示すことが報告されている (Aulehla et al., 2003)。 *Nrarp*^{-/-}において *Axin2* の発現は野生型と同様、Phase I から Phase III まで様々な発現パターンを示しており、振動的な発現パターンと発現レベルに変化は見られなかった (図 6F,7B)。

未分節中胚葉では Notch、Wnt に加え FGF (Fibroblast Growth Factor) も体節形成を制御している。*Nrarp*^{-/-}で Notch シグナル以外にも影響が及んでいるかを検討するために、*Nrarp*^{-/-}の未分節中胚葉で遺伝子発現を網羅的に調べた。まず、未分節中胚葉から単離した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った (図 7A, 表 2)。*Hes5* の発現の著しい上昇がみられたが、*Hes7* や *Lfng* など、他の Notch 標的遺伝子の発現には有意な差が見られなかった。Wnt シグナルにおいては、*Axin2* や *Lef*、*Mesogenin* などの標的遺伝子の発現に変化は見られなかった。FGF シグナルの標的遺伝子である *Dusp* や *Sprouty* においても変化は見られなかった (図 7A,B; 表 2)。従って、*Nrarp*^{-/-}の未分節中胚葉では Notch シグナルが特異的に増強されていることが認められた。さらに、いくつかの遺伝子に対し定量 PCR を行い、マイクロアレイ解析の結果を検証した (図 7B)。いずれの遺伝子の発現量もマイクロアレイの結果と一致していた。

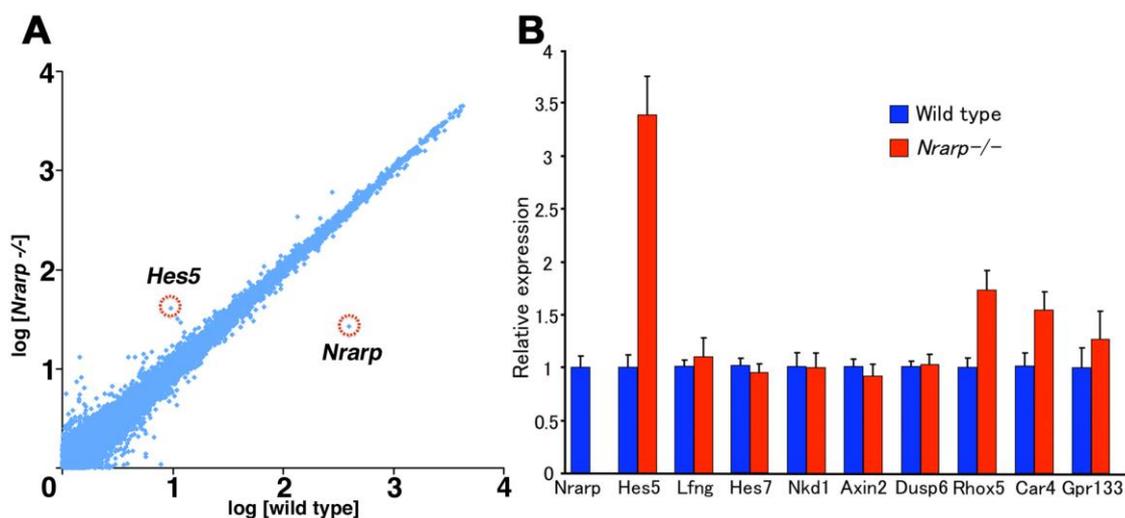


図 7. 未分節中胚葉における遺伝子発現を定量的に比較した。(A)マイクロアレイ解析の結果 (n=3)。個々の遺伝子のシグナル強度平均値を対比比較した。(B)Notch,Wnt,FGF シグナル伝達系の標的遺伝子の発現量を定量 PCR により検証した(n=3; 平均±標準偏差)。

表 2。 マイクロアレイ解析結果のまとめ(n=3)。Notch,Wnt,FGF シグナル伝達系の標的遺伝子の代表的なものを示した。シグナル比(ratio)は、標準化されたシグナル強度の野生型と *Nrarp*^{-/-} の比を意味する。*、いずれも 2 倍以上の差がみられたが、体節形成において機能が明らかになっていない遺伝子を示した。

Gene Symbol	Gene_Name	Probe ID	Cluster	Ratio1	Ratio2	Ratio3	Avg.
<i>Nrarp</i>	Notch-regulated ankyrin repeat protein	315756	Notch	0.04	0.10	0.05	0.06
<i>Hes5</i>	hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)	562022		4.56	4.77	3.51	4.20
<i>Lfng</i>	lunatic fringe gene homolog (Drosophila)	882835		1.37	1.43	1.10	1.28
<i>Hes7</i>	hairy and enhancer of split 7 (Drosophila)	558449		1.18	1.20	0.57	0.87
<i>Hes1</i>	hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	406680		1.20	0.91	0.53	0.79
<i>Hey1</i>	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	814590		1.55	1.13	1.32	1.31
<i>Nkd1</i>	naked cuticle 1 homolog (Drosophila)	394939		1.04	1.20	1.10	1.11
<i>Axin2</i>	axin2	357287	Wnt	1.19	1.19	0.62	0.91
<i>Lef1</i>	lymphoid enhancer binding factor 1	928212		1.18	1.20	1.05	1.14
<i>Msgn1</i>	mesogenin 1	733438		1.00	0.88	1.53	1.08
<i>T</i>	brachyury	661161		0.89	0.77	1.03	0.88
<i>Dusp1</i>	dual specificity phosphatase 1	303843	FGF	1.05	0.89	1.07	1.00
<i>Dusp4</i>	dual specificity phosphatase 4	672437		0.99	0.84	1.11	0.97
<i>Dusp6</i>	dual specificity phosphatase 6	932169		0.97	0.70	0.75	0.79
<i>Spry2</i>	sprouty homolog 2 (Drosophila)	872375		0.90	0.68	1.12	0.87
<i>Spry4</i>	sprouty homolog 4 (Drosophila)	529472		1.00	0.95	0.74	0.88
<i>Rhox5</i>	reproductive homeobox on X chromosome, 5	535766	*	3.60	2.50	2.15	2.63
<i>Car4</i>	carbonic anhydrase 4	349705		2.42	2.11	2.30	2.27
<i>Gpr133</i>	G protein-coupled receptor 133	716011		2.22	2.67	2.06	2.29

Notch シグナルを阻害すると体節形成周期が短縮される

Nrarp^{-/-}では体節形成の周期が延長されており、Notch シグナルが増強されている。我々は周期の延長が Notch シグナルに依存していることを確かめるために、Notch シグナルの阻害を試みた。すなわち、周期が Notch シグナルに依存しているならば、Notch シグナルを阻害すると周期が短縮されると予想される。そこで γ -secretase の阻害剤 LY411,575 を与え (Wong et al., 2004)、NICD を定量するとともに体節形成への影響を調べた。まず、野生型のマウスに異なる濃度の阻害剤を与え、NICD の定量を行った (図 8A 左)。NICD の量は阻害剤の濃度に比例して減少しており、0.1mg/kg の阻害剤を与えると NICD の量は約 10%減少し、肢芽間の体節数は約 1 個増加した (n=4/7; 図 8B,C)。椎骨の数においては体節数と同等な増加が見られた (図 8D,E)。即ち、野生型 (対照群) で 6 本の腰椎が形成されるのに対し、阻害剤を投与した個体では約 7 本の腰椎が形成されていた(n=4/11)。この結果は、*Nrarp*^{-/-}とは反対に、Notch シグナルが低下すると分節周期が短くなることを示唆している。

さらに、*Nrarp*^{-/-}において阻害剤を投与し、機能回復実験を試みた (図 8A 右,F-G)。肢芽間の体節数を比べると、同腹仔の野生型では 19 体節が形成され、対照群すなわち、阻害剤を与えていない野生型に比べて 1 体節分増えていた (図 8F,G)。阻害剤を与えた *Nrarp*^{-/-}胚では肢芽間に 18 体節が形成されており (n=6/11)、阻害剤を与えていない *Nrarp*^{-/-}胚より約一体節が増えている。*Nrarp*^{-/-}においても阻害剤により Notch シグナルが弱まると、延長されていた分節周期が回復、すなわち短縮されて肢芽間の体節数が増加することを示唆している。一方、阻害剤を投与すると Notch シグナルの減少に加えて、骨格形成に軽微な奇形がみられた (図 8D,E)。*Nrarp*^{-/-}においては、椎骨と肋骨でより顕著な奇形が認められた(未公開データ)。これは阻害剤を与えられたことによって、分節時計や体節の分化過程でかく乱が加わり、異常な骨格形成を引き起こしていると推測できる。

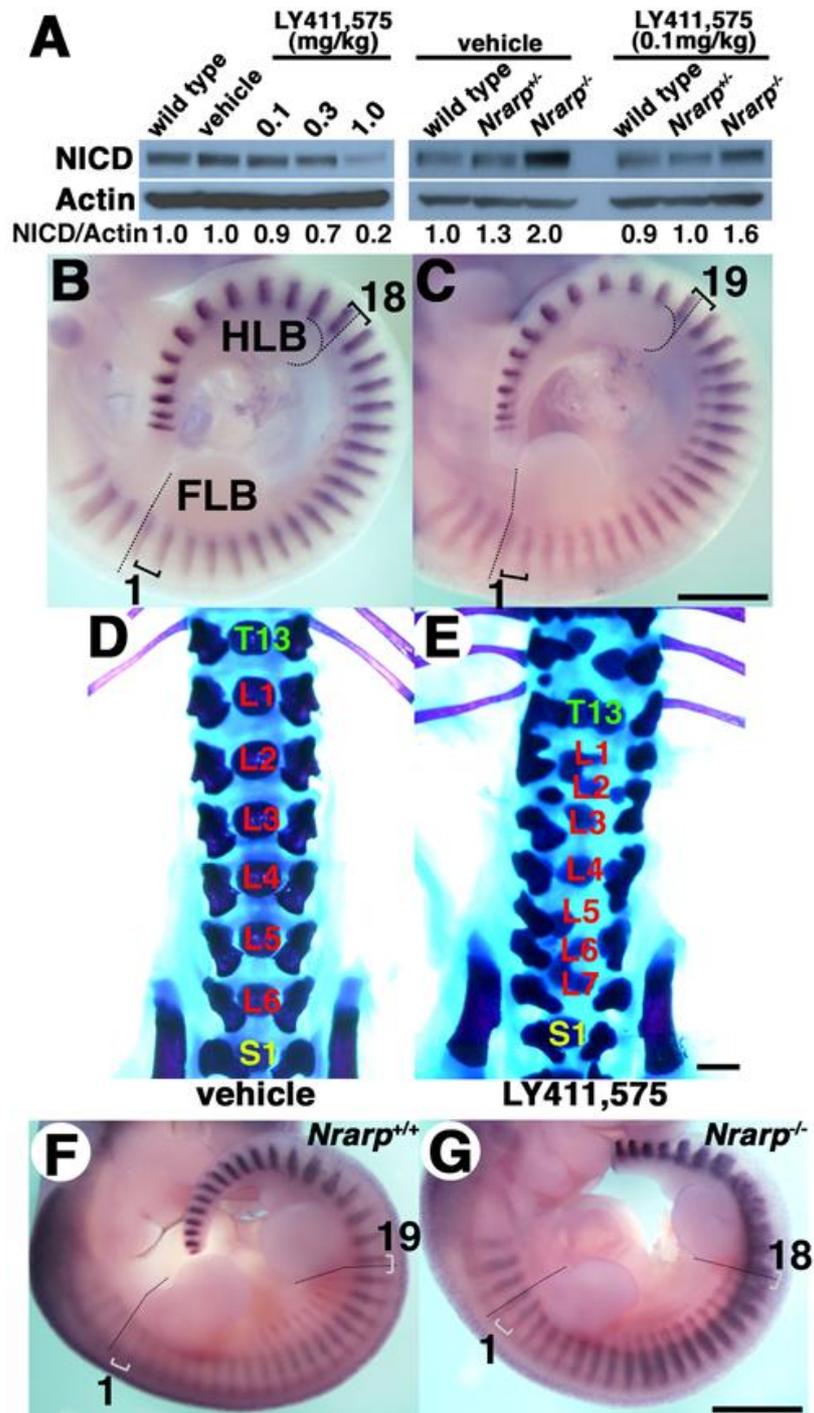


図8 Notch 阻害剤(LY411,575)の投与実験。(A) 免疫ブロッティングによる NICD の定量(n=3)。β actin に対する NICD の比を表した。(B,C) *Unx4.1* の *in situ* hybridization。10 日目の胚で前肢芽(FLB,forelimb bud)と後肢芽(HLB,hindlimb bud)の間に位置する体節を数えた。対照群(B)に比べ、阻害剤(0.1mg/kg)を投与した胚(C)で 1 体節増加していた。点線は肢芽の前方の境界線を示す。スケールバー,1mm。対照群の腰椎が 6 本(D)あるのに対し、阻害剤を投与したマウスでは 7 本の腰椎が認められた(E)。(F,G)阻害剤を投与(0.1mg/kg)した胚で体節数を確認した。野生型(F)と *Nrarp*^{-/-} (G)ともに、肢芽間の体節が非投与群(図 3A)に比べて増えていた。T,胸椎; L,腰椎; S;仙椎。スケールバー,1mm。点線は肢芽の前方の境界線を示す。

分節時計の振動周期は Notch 活性に依存している

これまでに体節形成（あるいは分節時計）の周期が Notch シグナルに依存していることを、*Nrarp* ノックアウトマウスの解析と薬理的な手法で検証した（図 9A）。未分節中胚葉では Notch シグナルが *Hes7* を転写誘導する。*Hes7* は *Lfng* と *Nrarp*、さらに他の 2 時間周期で発現振動する遺伝子の転写を抑制しており、*Hes7* による周期的な抑制が分節時計の周期性の制御に重要である。これまでに、*Hes7* のネガティブフィードバックループを中心とする周期的な分子振動を説明する数理モデルが構築され、未分節中胚葉での mRNA やタンパクの周期的な増減（振動）を数理計算により再現している（Lewis et al., 2003; Hirata et al., 2004）。今回、*Hes7* 発現振動周期の Notch 活性依存性を、Lewis による先行研究の数理モデルを用いて検証した（図 9–12）。

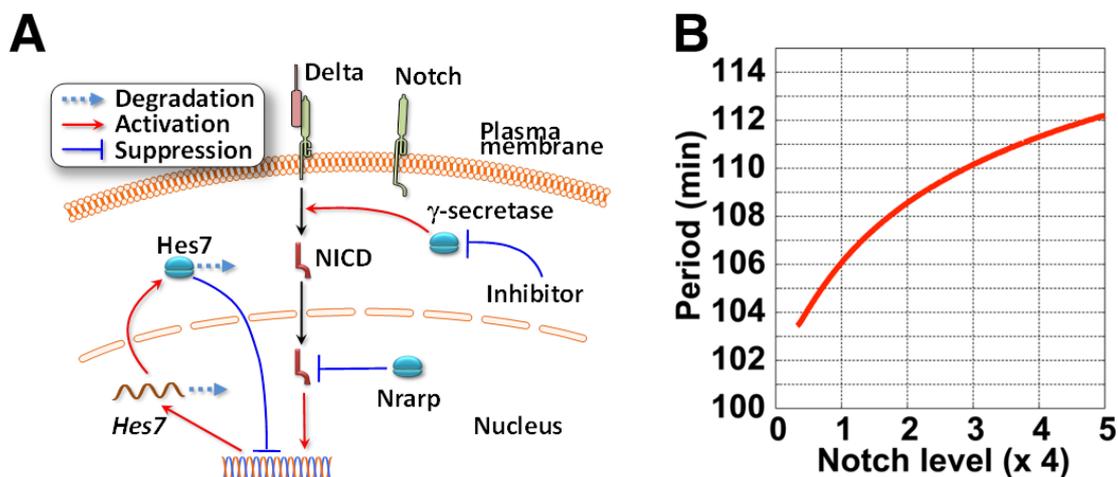


図 9 Notch 活性の周期への影響を調べた数理解析結果。(A) マウス未分節中胚葉において遺伝子発現振動が作られる分子メカニズム。Notch が活性化されると γ -secretase のタンパク分解を受けて NICD により *Hes7* を発現誘導する。翻訳された *Hes7* タンパク質は自身の転写を抑制する。このネガティブフィードバックループが遺伝子発現振動を引き起こすメカニズムである。*Nrarp* は NICD を分解促進することで Notch シグナルを抑制しており、 γ -secretase は NICD の産生を阻害することで Notch シグナルを抑制している。*Nrarp* を破壊することで Notch 活性を増加させ、反対に阻害剤を投与して Notch 活性を低下させた。(B) 振動周期の Notch シグナルへの依存。Hes7 のネガティブフィードバックループをもとに作られた数理モデルを用いている。振動周期は Notch 活性 (κ) と比例して変動する。このモデルのパラメーターは‘材料と方法’項の表に示した。

式 1,2 (材料と方法の項参照) は、周期特性を調べるためには少し複雑であるため式変換を行う。まず、「 $p(t)$ より T_p だけ前の時刻の $p(t)$ 」を意味する変数 $p_{adv}(t) = p(t+T_p)$ を導入する。例えば、 $t=0$ のときは $p_{adv}(0) = p(T_p)$ である。この変数を用いると上記 2 式は、

$$\frac{dp_{adv}(t)}{dt} = am(t) - bp_{adv}(t) \quad (3)$$

$$\frac{dm(t)}{dt} = \frac{k}{1 + p_{adv}^2(t-T)/p_0^2} - cm(t), \quad (4)$$

となる。ここで $T = T_m + T_p$ (定数) としている。更に見やすくするために、次のような変数(時間とともに変化する文字)とパラメーター(時間不変の定数)の変換を行う。

$$\tau = t/T, \quad \beta = bT, \quad \gamma = cT, \quad \kappa = a/k - b/p_0,$$

$$P(\tau) = bc p_{adv}(t)/ak, \quad M(\tau) = cm(t)/k,$$

左辺は全て新しく導入した変数($\tau, \kappa, P(\tau), M(\tau)$)とパラメーター(β, γ, κ)であり、右辺は全て式 3,4 に含まれる文字である。 τ は T で正規化された時間である。

この変換により、mRNA 産生(転写)速度に関わるパラメーター k (Notch による転写促進)と p_0 (Hes7 による転写抑制割合)を、1 つのパラメーター κ で表現することができる。これらの表記を用いると式 3, 4 は、

$$\frac{1}{\beta} \frac{dP(\tau)}{d\tau} = -\{P(\tau) - M(\tau)\} \quad (5)$$

$$\frac{1}{\gamma} \frac{dM(\tau)}{d\tau} = -\{M(\tau) - f(P(\tau-1))\} \quad (6)$$

$$f(x) = \frac{1}{1 + (\kappa x)^2}. \quad (7)$$

と簡素な形に変形される。 β と γ は Notch に依存しない定数であり、変数 $P(\tau)$ と $M(\tau)$ はそれぞれの産生速度係数 a と k で正規化(0 から 1 の範囲)されたタンパク質と mRNA レベルであることを表している。

Lewis モデルで述べられているように、 β と γ が大きな値であるとき、つまり、式 8 が素早く収束 ($P(\tau)$ が $M(\tau)$ に、 $M(\tau)$ が $P(\tau-1)$ にすぐに追従する；追従対象の時間に注意) かつ κ の値がほとんど変わらなければ、振動周期はほぼ $2(T+1/\beta+1/\gamma)$ となる。実験によって κ がコントロールと異なる値をもつ場合 (この研究では *Nrarp*^{+/−})、振動周期の κ への依存性を確かめる必要がある。

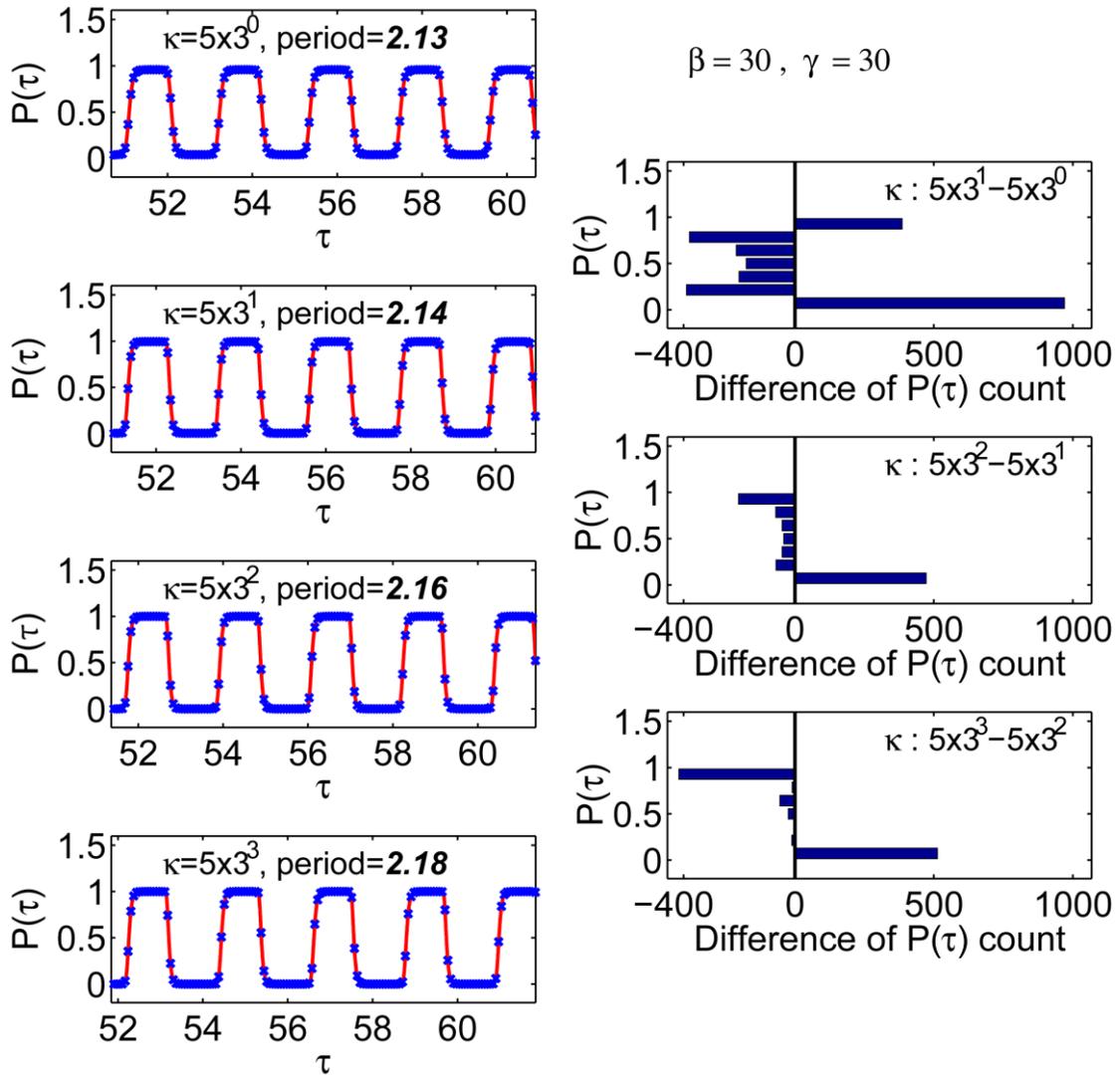


図 10 (左列) 時間経過に伴う $P(\tau)$ の時系列 (赤線)、および時間等間隔に設置したポイント (青×)。0 と 1 の状態であるときはゆっくり変化し、0 と 1 の間の遷移は早いことが分かる。(右列) 左列の青×の値を 7 分割してヒストグラムにし、異なる κ 値の間のヒストグラムの差を表示したもの。 κ 値が大きくなるにつれ、 $P(\tau)$ が 0 である割合が増加し、1 である状態が減っていることを示す。 κ 値と周期はそれぞれの図中に示している。

まず、式 5-7 を用いて κ が様々な値をとるときの時系列を計算し、 $P(\tau)$ の値の滞在率を比較した(図 10)。図 10 の左(青×印)は、 $P(\tau)$ 値の時間等間隔分布を示しており、右はその分布が κ の増加に対してどのように変化するかを示す。この図から、「 $P(\tau)$ が 0 付近の小さな値である状態の滞在時間の増加」が「周期の増加」の原因であることが示唆される。また、 β と γ は定数であるため、この計算では κ のみが $P(\tau)$ の振動周期の増加を制御していると言える。

κ が周期に対してどのような影響を与えるのかを調べるために、式7で定義された関数 $f(x)$ の特性に注目した。 $f(x)$ は x の増加に対して単調減衰し、 κ が大きければその減衰率を高める(図11)。ここで、Hes7の量に相当する x の減少に伴って $f(x)$ が増加しはじめる閾値 S を定義すると(図11の黒点線)、図10において $P(t)$ が十分小さいときの値は S 以下での x の値とみなすことができる。この図より、 κ が大きくなるにつれ、 $f(x)$ を抑えるための x がより小さい必要があることが分かる(抑えきるまで時間がかかる)。

これを式で示すために、 $f(x)$ が S のときの x の値を $f(x) = S$ として解くと、

$$x_{th} = \frac{1}{\kappa} \sqrt{\frac{1}{S} - 1}. \quad (8)$$

となる。ゆえに、 $P(t)$ と $M(t)$ の変化は次のようになる。

- (1) $P(\tau-1)$ が x_{th} より小さい、つまり $f(x)$ が S より大きいとき、 $M(t)$ が増加する(式6)。
- (2) $M(t)$ の増加に対して $P(t)$ が追従して増加する(式5)。
- (3) $P(\tau-1)$ の増加に対して $f(x)$ が減少し(式7)、 $M(\tau+1)$ が追従して減少する。
- (4) $M(\tau+1)$ の減少に対して $P(\tau+1)$ が追従して減少する(式5)。

ゆえに、図10の「 $P(t)$ が x_{th} より小さい時間」は「 $M(t)$ が x_{th} より小さい時間」および「 $P(\tau-1)$ が x_{th} より大きい時間」と同義である。そこで、 $P(\tau-1)$ が1から x_{th} まで減少するために必要な時間を考える。微分方程式は $dx/dt = -x$ の形であるため、 $P(\tau-1)$ の時間変化が常に指数関数的 ($e^{-t\alpha}$) であることを考慮して近似を行う。 $P(\tau-1)$ が1から x_{th} まで減少するために必要な時間差を D とすると(時間 D が経過して x_{th} となる)、時定数 α を用いて、

$$e^{-D/\alpha} \approx x_{th} = \frac{1}{\kappa} \left(\frac{1}{S} - 1 \right)^{1/2}, \quad (9)$$

となる。これを D について解くと、

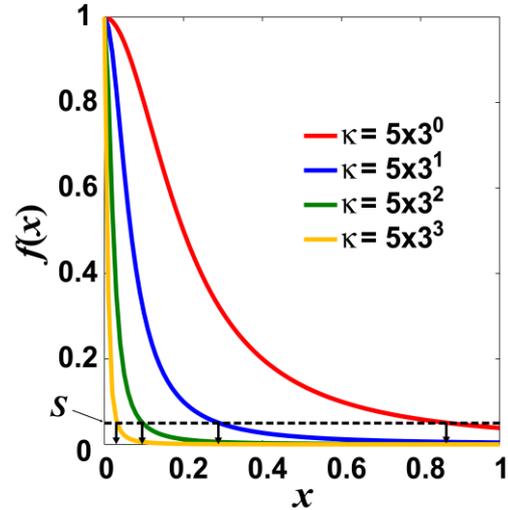


図11 異なる κ 値に対する $f(x)$ の比較。黒の点線は x (Hes7 の量) の減少に対して $f(x)$ が増加に転じるときの閾値 S を示す。 κ が2より大きいとき $P(t)$ は振動するので、上記のどの κ でも振動が表れる。

$$D \approx \alpha \ln \kappa - \frac{\alpha}{2} \ln \left(\frac{1}{S} - 1 \right), \quad (10)$$

となる。これは時間経過 D が κ の対数関数で増加することを意味する。この近似式は、図 12 に示す数値計算とよく一致する。

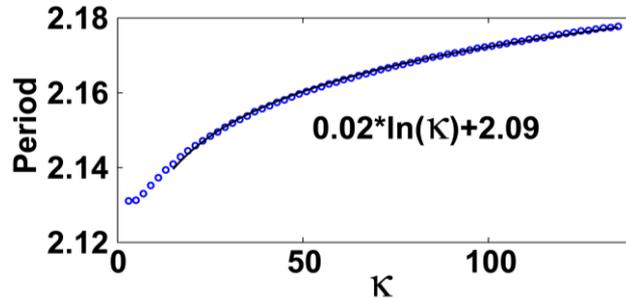


図 12 様々な κ 値における周期。青い円はモデルによって計算された周期であり、黒線は式 10 から対数関数でフィットしたものである。

Notch シグナル (κ) が増減すると振動の周期も延長あるいは短縮されることが数理シミュレーションにより予測された。この結果はこれまで *Nrarp*^{-/-} の解析と Gamma-secretase 阻害剤を用いた薬理実験から得られた結果とよく一致している。すなわち、Notch シグナルによって作り出された *Hes7* 発現振動の周期は、Notch シグナルの強弱変化に依存していると考えられる。

Nrarp^{-/-} では遺伝子発現の同調性が低下している

Nrarp^{-/-} 成体では胸椎から尾椎において奇形が観察された(図 2A-C)。この表現型はこれまでに知られている、体節形成に異常を示す変異体マウスの表現型に類似しているが、その程度は比較的軽微であると言える。この異常は、比較的未分化な組織である未分節中胚葉が体節へ分化する際、又は体節が骨格へ分化する際に生じる可能性がある。しかし *Nrarp* のように未分節中胚葉で特異的に発現して働く因子であれば、体節形成の段階で引き起こされた異常であることが容易に想像できる。*Nrarp* は Notch の下流遺伝子として体節形成期に未分節中胚葉で発現している因子であり、その発現は体節ではみられない。しかし *Nrarp*^{-/-} の未分節中胚葉では遺伝子発現の発現パターンは野生型に比べほとんど差がみられなかった。また、阻害剤の投与実験でみられる骨格形成異常は、*Nrarp* が周期の制御の他にも体節形成に何らかの機能をしていると考えられる。

上記の事項をもとに、骨格形成異常の原因を次のように調べた。これまでは未分節中胚葉全体で、主に波状のパターンに注目し評価してきたが、遺伝子発現振動の様子を未分節中胚葉の細胞ごとに観察した。周期的発現を示す遺伝子の波状の発現パターンは、未分節中胚葉の近隣細胞の間で振動の位相が一致しているために起こる。即ち、体節形成には遺伝子発現の振動が同調する必要がある。ゼブラフィッシュにおいては Notch シグナルが細胞間の遺伝子発現振動の同調性をもたらしていると考えられているが (Horikawa et al., 2006)、マウスではそのメカニズムについてほとんど理解されていない。

そこで、mRNA のイントロン領域に対する RNA アンチセンスプローブを用いて *in situ* を行い、振動遺伝子 (*Lfng*) の転写が始まっている細胞を選択的に観察した (図 13)。遺伝子発現の振動は、隣同士の細胞間で位相が一致し、未分節中胚葉全体では位相が微妙にずれているために、未分節中胚葉全体では波状に見える。しかし *Nrarp*^{-/-} では、同腹仔の野生型と比べて非同調細胞が有意に増加していた (図 13)。

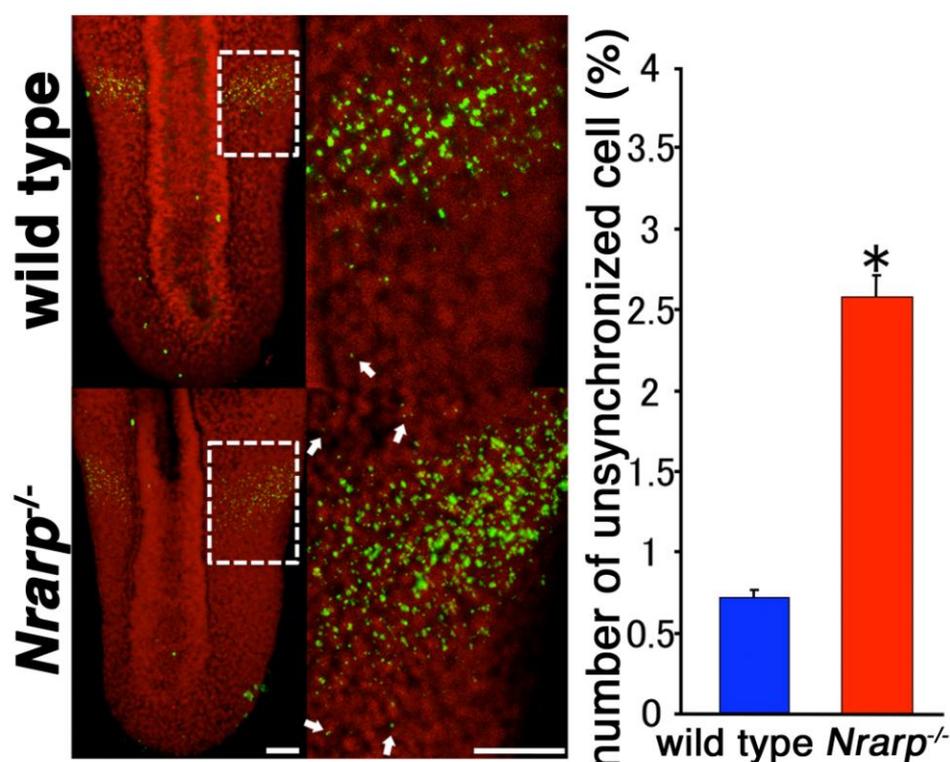


図 13 *Lfng* 発現パターンを示す未分節中胚葉の背側拡大図。上が前方、下が後方。*Lfng* mRNA (緑) と細胞核 (赤, PI 染色) を示した。野生型に比べて *Nrarp*^{-/-} では近隣の細胞と発現が同調していない細胞 (白矢印) が増加していた。右は非同調細胞の定量的結果を示している。*Lfng* の転写が起こっている細胞に対する非同調細胞 (白矢印) の比率を表した。(n=3; 平均±標準誤差)

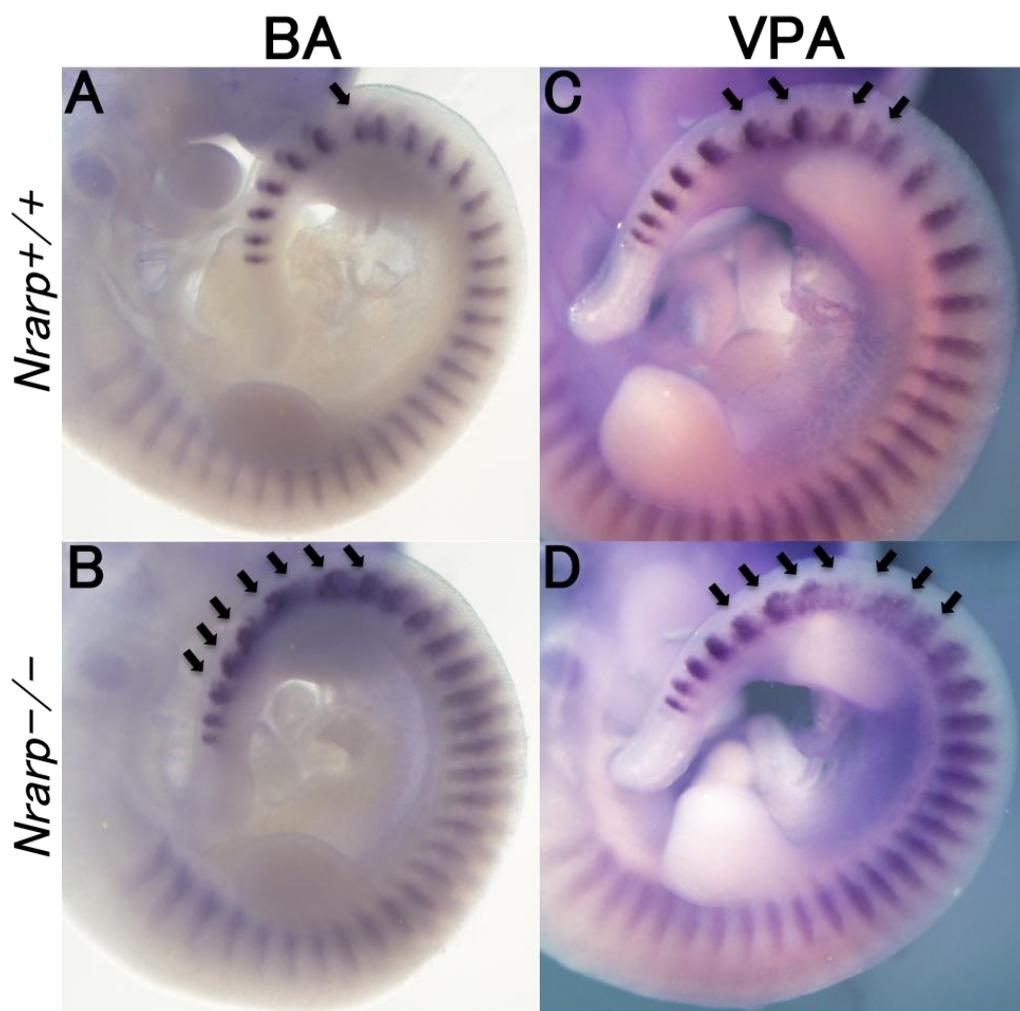


図 14 *Uncx4.1* の *in situ* hybridization。10 日目の胚で HDAC 阻害剤の投与による体節形成の異常を同腹仔間で調べた。投与後に形成された体節で乱れが観察され、*Nrarp*^{-/-}においてより広範囲にわたる乱れが観察された (B,D)。BA,Boric acid; VPA, Valproic acid。矢印は奇形な体節を示す。

未分節中胚葉の細胞はあらゆる方向に移動しており、これは遺伝子発現の同調を低下させる‘ノイズ’あるいは‘揺らぎ’として作用していると考えられる。また細胞分裂の際に起こる遺伝子発現の一時的休止も、遺伝子発現の振動と細胞間同調に影響する可能性が十分に考えられる。しかし未分節中胚葉の細胞ではこれらのノイズによる遺伝子発現の乱れに対して細胞間の遺伝子発現を‘協調’させて同調性を維持している (Horikawa et al., 2006)。一方、*Nrarp*^{-/-}では細胞間の同調がより脆弱になっているために非同調細胞が増加すると考えられる。そこで、遺伝子発現を無作為にかく乱させ、ノイズを与えた際の遺伝子発現の同調性について調べた。HDAC (Histone deacetylase) の阻害剤であるホウ酸(Boric acid、1000mg/kg)、バルプロ酸 (Valproic acid、400mg/kg)は、ヒストンの修飾状態を変えることにより遺伝子発現を網羅的にかく乱させられると考えられる(Di Renzo et al., 2007; Menegola et al., 2005)。これらの阻害剤は発生途中の胚において奇形を引き起こすことも知られている。

胎生9日目の胚に一過的にこれらの阻害剤を与え、24時間後に胚を採取して体節形成を観察した(図14A-D)。野生型では投与後から2~3体節分の乱れが見られるが(図14A,C)、*Nrarp*^{-/-}では野生型より重度な体節形成不全が長く(7~8体節分)起きていた(図14B,D)。野生型では、投与後6時間前後に形成された体節で回復がみられるが、*Nrarp*^{-/-}では依然と体節の奇形がみられるため(図14A,C)、この時期の未分節中胚葉細胞で遺伝子発現の振動パターンを詳しく調べた(図15A,B)。野生型と*Nrarp*^{-/-}共に非同調細胞が増加しているが、*Nrarp*^{-/-}ではより多く観察された。この結果は*Nrarp*^{-/-}の細胞で発現振動の同調性が崩れやすいためその分、回復にも長い時間を要することを示唆している。

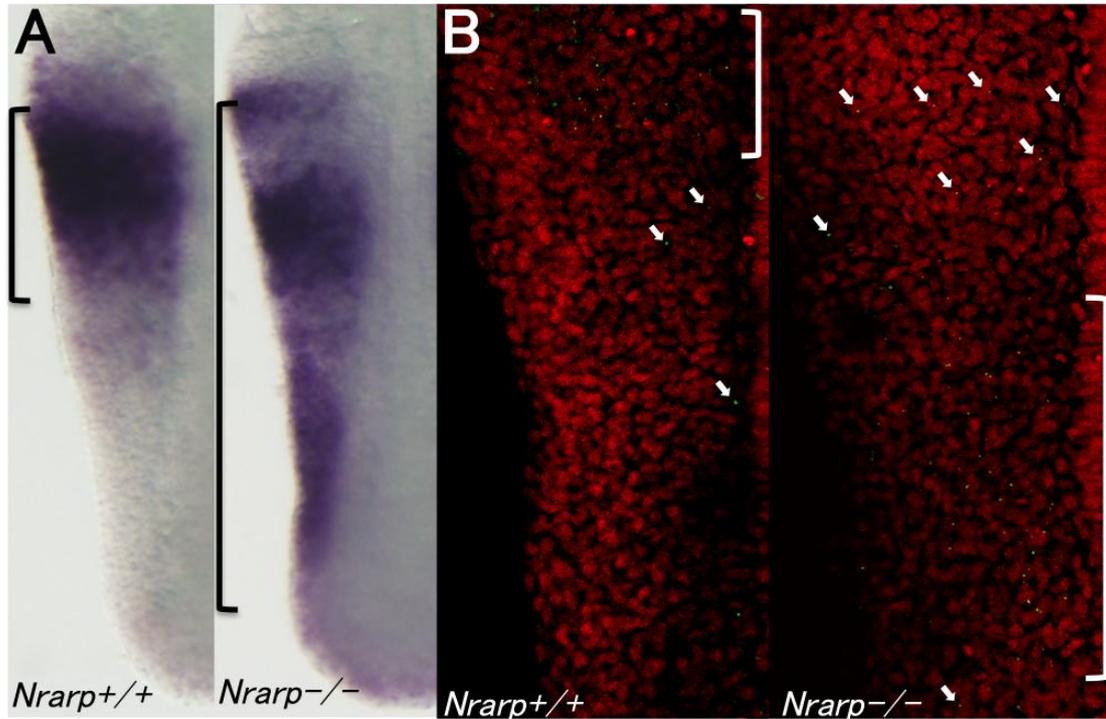


図15 ホウ酸投与7時間後の*Lfng*発現パターンを確認した未分節中胚葉の背側拡大図。上が前方、下が後方。*Lfng*のエキソンプローブ (A) とイントロンプローブ (B) を用いて転写が活発に起こっている領域と細胞を調べた。(A)野生型ではシグナルの境界がはっきり見えるのに対し、*Nrarp*^{-/-}では未分節中胚葉全体にかけて発現が認められる。黒線はmRNAが多く局在している領域を示している。(B)*Lfng* mRNA(緑)と細胞核(赤,PI染色)を示した。野生型に比べて*Nrarp*^{-/-}では近隣の細胞と同調してない細胞(白矢印)が増加していた。白線はmRNAが多く局在する領域を示している。

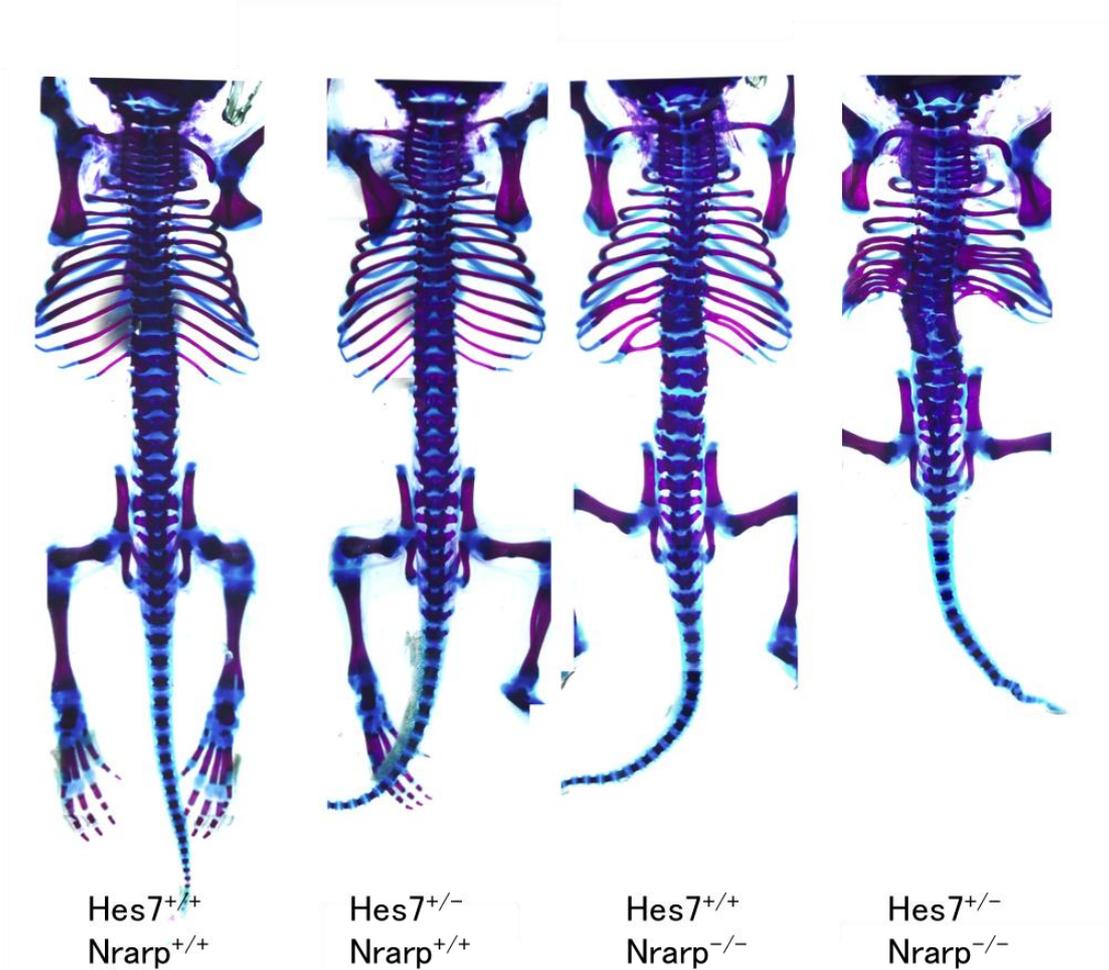


図16 *Nrarp*と*Hes7*の二重変異体における椎骨形成異常。生後7日目のマウスの骨格標本の背側図。*Hes7*^{+/+} (左) では頸椎から尾椎にかけて規則的な形の椎骨が等間隔に形成されている。*Nrarp*^{+/+}(中央)では前述のように肋骨が異常な方向に延び、椎体の癒合がみられる。*Hes7*^{+/+}*Nrarp*^{+/+}の二重変異体では、顕著な椎骨形成不全がみられる。頸椎から尾椎にかけて椎体の重度な縮小、癒合、減少がみられる。それに伴い、体長も著しく短くなっている。

*Hes7*と*Nrarp*による振動の同調性

*Hes7*は自らのネガティブフィードバックにより発現が振動し、その発現振動は分節化の周期性制御に欠かせない (Bessho et al., 2001b)。 *Hes7*ヘテロ変異体は尻尾の末端が屈曲する以外の異常は認められないが、 *Hes7*遺伝子座を一つしか持たない個体でさらに*Nrarp*を欠失させると、椎骨形成の異常が顕著に現れた (図16)。 *Hes7*ヘテロ変異体では、遺伝子発現の振動は正常と考えられている。そして*Hes7*ヘテロ変異体において、*Hes7*自身の転写量や転写抑制作用についても、正常な体節を形成するには十分であると考えられている。しかし、*Nrarp*の変異体マウスとの二重変異体では、それぞれの変異体でみられる表現型と比較してより顕著な異常が認められた (図16)。

二重変異体でみられる骨格形成異常の原因を探るために、未分節中胚葉において遺伝子発現の振動を詳しく観察した。 *Lfng*の転写状況を細胞毎に比較すると、二重変異体(*Hes7*^{+/-}*Nrarp*^{-/-})においてその同調性が大きく失われていた (図17A,B)。即ち、 *Lfng*の転写が起こっている細胞は未分節中胚葉全体に点在しており、転写が活発な領域は特定できず、波状の発現パターンはみられなかった。これは、個々の細胞間で同調性が低下したため、未分節中胚葉全体では遺伝子発現の振動が波状の発現パターンを失い、その後の体節形成と器官形成、特に骨格形成に影響を与えると考えられる。

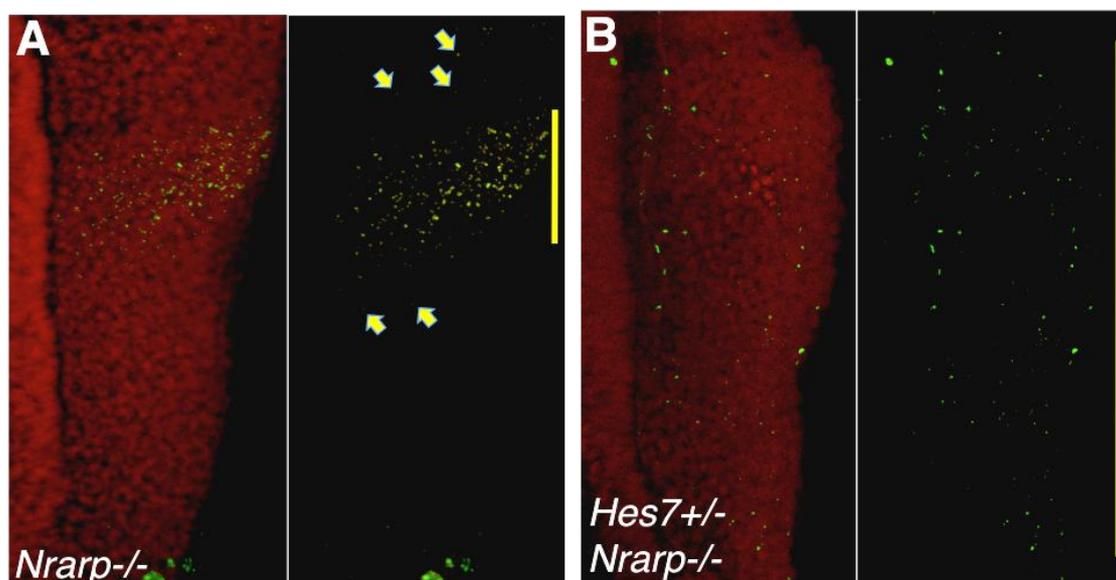


図 17 *Lfng* 発現パターンの確認。 *Lfng* mRNA(緑)と細胞核(赤,PI 染色)を示した。(A)*Nrarp*^{-/-}では転写が活発に起こっている領域以外にも離れた部位にある細胞で転写が確認された (矢印)。(B)二重変異体では未分節中胚葉全体にかけて *Lfng* の転写が確認された。黄線は mRNA が多く局在する領域を示している。

考察

Notch シグナルは細胞間情報伝達を担う分子として、様々な細胞種において細胞の増殖、分化、運命決定に重要な働きをしていることが知られている。胚の発生段階を通して *HES*(Hairy/Enhancer of Split genes)などの標的遺伝子の発現誘導により、胚発生における細胞の運命決定や胚発生を制御する(Kopan and Turner 1996)。未分節中胚葉では Notch のリガンド、下流遺伝子、Wnt シグナル伝達系等とともに分節化の周期性制御、体節の前後極性決定に必須な因子として知られている(Gossler et al., 1998; Dequeant et al., 2006; Evrard et al., 1998; Zhang and Gridley., 1998; Bessho et al., 2001; Ishitani et al., 2005)。これまでに Notch シグナル伝達系の下流遺伝子の発現振動は単なる分節時計のアウトプットではなく、時間制御そのものに必須であることも明らかになっている(Evrard et al., 1998; Zhang and Gridley., 1998; Bessho et al., 2001)。これらの因子を欠損すると体節形成リズム(分節時計)が破綻してしまうために、未分節中胚葉における 2 時間周期のリズム(mRNA、タンパク質の周期的な増減)においては、まだ不明な点が多く残されている。2 時間のリズム周期が規定される仕組み、予め決められた数の体節を正確に作り出す方法、未分節中胚葉の大きさや伸長速度と分節化の均衡のとり方など、これまでに観察によって見えてきた事実に対して、その原理を知るために明かすべき事項は多く残されているように思える。

振動の周期性と Notch シグナル

未分節中胚葉における体節形成には Wnt、FGF(Fibroblast growth factor)、RA(Retinoic Acid)のシグナルも関わっており、これまでに、Wnt や Retinoic Acid シグナル伝達系が分節周期を制御していることが報告されている(Kawakami et al., 2005; Vermot et al., 2005; Gibb et al., 2009)。Notch シグナルの強度が体節形成周期の制御と細胞間の遺伝子発現の同調性維持に関わっていることを示した今回の結果は、これまでの変異体解析(主に Notch シグナル伝達系の構成因子)では解析が困難であった Notch シグナルのリズム微調整機構の存在を示唆している。Nrarp による NICD の分解制御という‘Notch シグナルの修飾’によって周期の微調整を行い正確なリズムを刻んでいることが示さ

れたのは、分節時計による体節形成過程をより明確に理解するために大変有用な情報になる。

この研究では変異体の作製や阻害剤の投与により Notch シグナルの調節を試みた。分節周期を計るためには、体節数を統計的に比較する間接的な方法を用いた。今後、Notch 遺伝子座を増減させる等の方法で Notch の発現量を任意に制御できれば、分節周期と Notch シグナルの相関をより明確に示すことができると予想している。一方、振動周期の測定については、振動遺伝子を蛍光標識させた Tg マウス胚を用いて未分節中胚葉の発生と分節化を連続観察する方法や、培養細胞においてレポーター遺伝子の発現を可視化して測定する方法も考えられる。しかし、いずれの方法も、生体内の条件とは異なるために、実験誤差が含まれる可能性が高い。今回 *Nrarp*^{-/-} でみられる周期延長のように、数分の差（振動周期の数%に相当する時間差）を検出するためには、間接的ではあるが、体節数を数えることで生体内の情報を検出し、正確に読み取れたと評価できる。しかしながら、異なる母体における受精時間の差と発生時期の差は依然として解析に影響していた。我々は統計的解析を進めることで、この誤差を考慮した上で体節数の有意差を検定するよう努めた。

振動の安定性 (Robustness)

発生段階での適切かつ正確な形づくりは、その個体あるいはその種にとって環境に適応し、仲間同士の競争に競り勝ち、より多くの子孫を残すために根本的かつ重要な生命現象である。今回の研究結果は、生き物のなかに存在する生命活動(遺伝子発現)の揺らぎに対してシステムを安定的に持続させる仕組みが体節形成でも存在していることを示唆している。細胞間で直に情報交換を行っている因子は特定されていないが、*Hes7* や *Nrarp* の‘周期的な’フィードバック制御が細胞間で振動の位相を揃えるのに機能していることが考えられる。HDAC 阻害剤の投与実験において、体節形成と同調性の修復あるいは修正過程で野生型と *Nrarp*^{-/-} に差が見られたこと(図 9,10)もこの仮説を支持している。*Hes7* においても *Hes7*^{+/-} や二重変異体の表現型から同様な機能を持っていると考えている。一方、*Nrarp* と *Hes7* の二重変異体 (*Hes7*^{+/-} *Nrarp*^{-/-}) では、同調性が大きく損なわれたため、骨格形成異常が顕著になると考えられる(図 11,12)。抑制性の転写因子 *Hes7* が転写抑制機能を十分に果たすためには、片方の遺伝子座では不十分である可能性も考えられる。今後、*Hes7* ヘテロ変異体 (*Hes7*^{+/-})

において *Hes7* 自身の転写量、タンパク質の量、*Hes7*^{+/+}での転写因子としての抑制能を定量的、定性的に検討する必要がある。そして遺伝子発現振動における安定性、同調性との相関を検討することが求められる。

振動の同調性

ゼブラフィッシュの未分節中胚葉においては *deltaC* の周期的な発現が細胞間の遺伝子発現同調を生み出していること (Mara et al. 2007)、*her* による Notch シグナルのフィードバック制御が同様な機能を果たしている (Horikawa et al., 2006)。しかし、マウスでは細胞間情報伝達を担っている分子、すなわち同調のメカニズムはまだ明らかになっていない。これまで知られている Delta-Notch 相互作用を考慮し、隣接する細胞間で *Hes7* が同調する仕組みについて考察した。

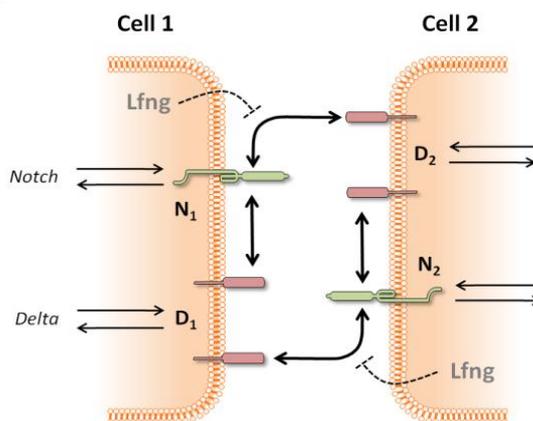


図 18: Delta-Notch 結合には異なる細胞間のトランス型と同じ細胞上のシス型がある。*Hes7* と同じ周期と位相を持つ *Lfng* はトランス型結合を抑制する。

細胞間の Delta-Notch 結合には 2 種類存在することが知られている (図 18)。1 つは異なる細胞間で行われるトランス型結合 (*trans*-interaction) であり、もう 1 つは同じ細胞膜上で行われるシス型結合である (*cis*-interaction)。シス型結合は、*Drosophila* (Heitzler and Simpson, 1991; de Celis et al., 1997; Goodyear and Richardson, 1997; Huppert et al., 1997; Jacobsen et al., 1998; Miller et al., 2009) や哺乳類 (Sprinzak et al., 2010) で報告されている。また、*Lfng* は Notch と結合してトランス型 Delta による Notch 切断を抑制する (Bruckner et al., 2000)。一方で *Lfng* は、*Hes7* と同じ位相と周期で振動する。これらの知見と図 18 を考慮すると、Cell 1 の *Hes7* 発現が高いときの過程は以下ようになる。

- (1) Cell 1 の *Hes7* が多い、つまり *Lfng* が多いとき、Delta(Cell 2)-Notch(Cell 1)のトランス型結合が抑えられる。
- (2) 相対的に Delta(Cell 1)-Notch(Cell 1)のシス型結合が増加し、Delta(Cell 1)-Notch(Cell 2)のトランス型結合も減少する。

(3) Cell 1 と Cell 2 の両方の Notch シグナルが減少する。

これは Cell 2 の Hes7 の増加の際も同様である。ゆえに単純化すると、

「Cell 1 の Hes7 が多いとき、自身と Cell 2 の Notch シグナルが減少する」

(A)

ことが言える。また Cell 1 の Hes7 発現が低いときの過程は以下のようなになる。

(1) Cell 1 の Hes7 が少ない、つまり Lfng が少ないとき、Delta(Cell 2)-Notch(Cell 1)のトランス型結合が促進される。

(2) 相対的に Delta(Cell 1)-Notch(Cell 1)のシス型結合が減少し、Delta(Cell 1)-Notch(Cell 2)のトランス型結合は増加する。

(3) Cell 1 と Cell 2 の両方の Notch シグナルが増加する。

先程と同様に単純化すると、

「Cell 1 の Hes7 が少ないとき、自身と Cell 2 の Notch シグナルが増加する」

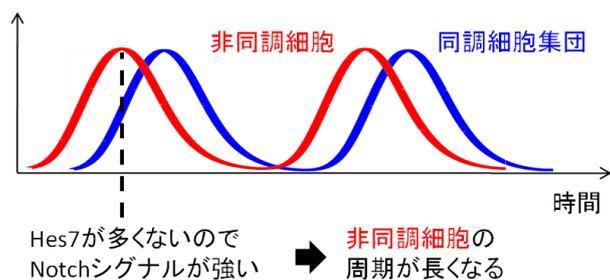
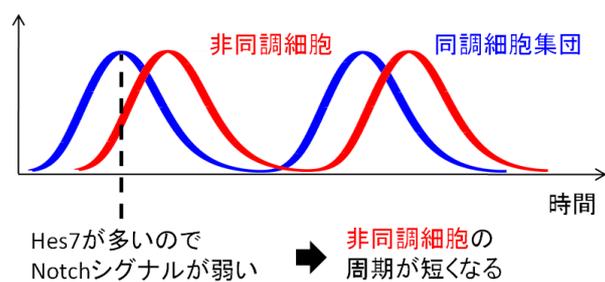
(B)

となる。

上記(A)と(B)の命題を細胞集団の挙動にあてはめて議論すると、細胞の Hes7 発現の同調メカニズムが説明できる。Hes7 発現が比較的同期している細胞集団(同期細胞)と、位相がずれている細胞(非同期細胞)を考える。大多数が同調しているとすれば、非同期細胞だけが同期細胞の影響を大きく受け、その逆はかなり小さいと考えられる。

まず、大多数の同期細胞(右図; 青)に対して非同期細胞(右図; 赤)の発現位相が遅い場合、つまり同調細胞集団の Hes7 発現がピークの際に非同期細胞の発現が増え始めているとき、上記(A)の命題より非同期細胞が受ける Notch シグナルは弱くなり、結果として周期が短くなる。これは非同期細胞が同調細胞集団と位相を合わせる方向に周期を変化させることを意味する。

次に大多数の同期細胞(右図;



青)に対して非同期細胞(右図；赤)の発現位相が早い場合、つまり同調細胞集団の *Hes7* 発現が低いときに非同調細胞の発現がピークを迎えているとき、上記(B)の命題より非同調細胞が受ける *Notch* シグナルは強くなり、結果として周期が長くなる。この場合にも非同調細胞が同調細胞集団と位相を合わせる方向に周期を変化させることを意味する。

以上により *Delta-Notch* の修飾を介した周期調節が細胞集団の *Hes7* 発現を同調させることが説明できる。本論文では割愛したが、上記の論理が成立することは数理モデルによって確認されている。

分子の動的振舞いにおけるノイズと同調性の維持

転写の活性と抑制を反対方向の動き（現象）と単純に考えると、ある遺伝子座がどの方向に動くかは、確率に基づく現象とみなせる(Raser et al., 2005)。マウス未分節中胚葉の細胞において、比較的少ない *Notch* 活性 (NICD) でも *Hes7* 転写が起こる、或いはその逆の現象が起こる可能性は十分に存在する。NICD 分子の減衰（分解）も細胞の確率論的な動きがもたらす現象(*Hes7* タンパク質の存在下でも NICD 分子数は0になるのではなく、0 に近づく)として捉えられる。さらに、細胞内の様々な場面—細胞集団（組織）の挙動は個々の細胞のもつ確率的な挙動の総和により決まる、又は、マウスの分節時計が 60 数回周る間に揺らぎが蓄積する—において確率に依存して起こっていると仮定すれば、数百の細胞集団の協調した動きが一定の周期を作り続けるために厳密な制御機構が存在しても不思議ではない。

今回の研究結果は、*Nrarp* が未分節中胚葉細胞間同調性維持に寄与していることを示唆しているが、同調性をもたらすメカニズムの詳細は明らかになっていない。上述のように転写の活性と抑制が確率の影響を受けるときに、*Nrarp* が *Notch* シグナル (NICD) の波、すなわち *Notch* シグナルの「活性状態」と「非活性状態」間の周期的かつ連続的な変化にコントラストをもたらしていると仮定すれば、生物に内在する‘ゆらぎ’やかく乱 (Horikawa et al., 2006 ; Li et al., 2009) を修正し、同調した細胞の動きをもたらしていると考えられる。

一方、同調性を失った細胞は、近隣の細胞と異なる位相のまま体節へと分化するために、骨格形成異常を起こしていると考えている。即ち、*Nrarp*^{-/-}マウスは必ず腰椎同士が癒合するのではなく、癒合しやすくなっていると捉えられ、*Nrarp*^{-/-}の尻尾形成異常の発生頻度が 100%ではないことも説明できる。組織が

形成される際に安定性が求められる証拠は他の生物種においても知られている。ショウジョウバエでは、ある種の microRNA(miR-7)の発現により奇形を抑え正常な胚発生(感覚器官の分化)を誘導することが明らかになっている (Li et al., 2009)。この microRNA は EGF と Notch シグナルに対してフィードバック制御することで細胞の正常な分化を促している。

Notch の制御因子 *Nrarp*

本研究では未分節中胚葉 Notch シグナルを定量するとともに、FGF や Wnt シグナル等、*Nrarp* の未分節中胚葉で起こっている変化を遺伝子発現の定量を中心に網羅的に比較した。結果、FGF や Wnt シグナルの標的遺伝子の発現に変化は見られなかった。これは、ゼブラフィッシュで *Nrarp-a* が Wnt シグナルを亢進していることを示す結果と異なっているが(Ishitani et al., 2005)、ゼブラフィッシュの *Nrarp-a* とマウス *Nrarp* の発現パターンと分節時計を構成する因子が異なっているために、相互作用が異なる可能性も考えられる。一方、Notch シグナルの標的遺伝子 *Hes5* の発現が増強している結果から、*Nrarp* の欠失により Notch シグナルが上昇していることが明らかになった。それにも関わらず、未分節中胚葉での振動遺伝子の発現パターンには維持されていた。これまでに知られている Notch 標的遺伝子とは異なって、*Nrarp* は Notch シグナルの活性化レベルを ‘fine-tuning’ する、つまり、より正確な体節形成を導くために Notch シグナルの活性化レベルを微調整するモジュレーターとして機能していると考えられる。Notch シグナルの活性は増加しているにもかかわらず、未分節中胚葉での分子振動は変化していないことは、Notch シグナル系の遺伝子発現振動を含む分節時計は、Notch シグナルの量的変化に堅牢であると考えられる。

一方、未分節中胚葉では *Nrarp* が *Lfng* と同調して振動している。さらに、*Hes7* のノックアウトマウスでは未分節中胚葉で一様に発現することから、*Nrarp* の振動は *Hes7* に依存していると考えられる。この結果は、未分節中胚葉で *Nrarp* が *Hes7* によって直接、転写制御されている可能性を示唆している。*Hes7* の転写制御は、プロモーター領域にある E-box と N-box に結合することによって行われる(Sasai et al., 1992; Bessho et al., 2001)。実際に 4.4kb の *Nrarp* プロモーター領域に、E-box と N-box が合わせて 7 カ所存在することもこの可能性を支持している。

生物の身体が正確な形で規則正しくつくられる過程は、遺伝子同士の複雑なネットワーク、分子のダイナミックな動態を伴っており、発生過程を通じて正確にコントロールされた結果である。この過程において自然界（生物の内部と外部環境）に存在し得る揺らぎやノイズを克服して細胞や組織が如何に動的な現象を制御して形づくりを行っているかを知ることは用意ではない。今回の研究結果が、生物のあらゆる時期と場所で安定性や恒常性の維持に機能している分子とそれらが作り出すネットワークを調べるにあたり、少しでも参考になれば幸いである。

謝辞

遺伝子発現制御学講座に配属してから5年余が経ちました。初めて講座に入った日から今日まで、この研究結果の報告ができるよう熱心に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。そして、アドバイザー委員として厳しくも暖かい助言を頂きました中島教授、高橋教授、稲垣准教授に御礼申し上げます。共同研究させて頂きました、本学のバイオサイエンス研究科の作村先生、京都大学の石橋先生、京都大学の太田先生、広島大学の内匠先生からは研究活動に多大なサポートを頂きました。数理解析では熱い議論とご指導を頂きました作村先生に深く感謝いたします。本学の動物実験施設のみなさま、ALOKA 株式会社等、本研究の遂行に必要な実験動物と機材をご提供頂いた方々にも感謝致します。朝鮮奨学会のみなさまから頂いた様々なご支援に感謝いたします。

遺伝子発現制御学講座のみなさまには大変励まされました。同期の岡本浩、高橋（増田）美和には細かい議論や実験のサポートはもちろん、大学院生活の楽しみ方、関西の素晴らしさを存分に教えて頂きました。秋山龍太郎くんには日頃の議論と論文作成等、多方面で支援を頂きました。佐野坂司博士からはデータの解析、実験方法の助言、研究生活の楽しみ方等、様々なところからサポートして頂きました。分子神経分化制御学講座のスタッフの方々と学生のみなさまからは大変有意義な議論とアドバイスを頂き、大変勇気づけられました。高橋教授をはじめ分子発生生物学講座のみなさまには V-CLUB を通じて研究に必要な忍耐力と体力を養わせて頂きました。本学の学生課留学生係のみなさまにも研究や留学生活をご支援頂き感謝いたします。

応援のメッセージを送り続けてくれた親友の정길,태환に感謝いたします。家族の大黒柱として心の支えになってくれました兄にも感謝いたします。そしてどんなときも冷静なアドバイスと暖かいエールを送ってくれました絵理子には躓いても立ち上がれる勇気と愛を頂きました。

最後に、身勝手な息子をここまで育ててくれた母に最大の感謝を送ります。

参考文献

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

Beatus, P., Lundkvist, J., Oberg, C., Pedersen, K., and Lendahl, U. (2001). The origin of the ankyrin repeat region in Notch intracellular domains is critical for regulation of HES promoter activity. *Mech Dev* 104, 3-20.

Beckers, J., Schlautmann, N., and Gossler, A. (2000). The mouse rib-vertebrae mutation disrupts anterior-posterior somite patterning and genetically interacts with a Delta1 null allele. *Mech Dev* 95, 35-46.

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.

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

Brückner K., Perez L., Clausen H., Cohen S., (2000) Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406 (6794) : 411-5.

de Celis J. F., Bray S., Garcia-Bellido A. (1997) Notch signalling regulates veinlet expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* 124, 1919

Dequeant, M. L., Glynn, E., Gaudenz, K., Wahl, M., Chen, J., Mushegian, A.,

and Pourquie, O. (2006). A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock. *Science* 314, 1595-1598.

Di Renzo, F., Cappelletti, G., Broccia, M. L., Giavini, E., & Menegola, E. (2007). Boric acid inhibits embryonic histone deacetylases: A suggested mechanism to explain boric acid-related teratogenicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 220(2), 178-185.

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.

Gawantka, V., Pollet, N., Delius, H., Vingron, M., Pfister, R., Nitsch, R., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1998). Gene expression screening in *Xenopus* identifies molecular pathways, predicts gene function and provides a global view of embryonic patterning. *Mech Dev* 77, 95-141.

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.

Gossler A, Hrabe de Angelis M. 1998. Somitogenesis. *Curr Top Dev Biol* 38: 225-287.

Heitzler P, Simpson P. 1991. The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila* *Cell* 64, 1083

Holley, S. A., Geisler, R., and Nusslein-Volhard, C. (2000). Control of her1 expression during zebrafish somitogenesis by a delta-dependent oscillator and an independent wave-front activity. *Genes Dev* 14, 1678-1690.

Hirata H, Bessho Y, Kokubu H, Masamizu Y, Yamada S, Lewis J, Kageyama R. 2004. Instability of Hes7 protein is crucial for the somite segmentation

clock. *Nat Genet* **36**: 750-754.

Holley SA, Geisler R, Nüsslein-Volhard C. (2000) Control of her1 expression during zebrafish somitogenesis by a delta-dependent oscillator and an independent wave-front activity. *Genes Dev.* Jul 1;14(13):1678-90.

Holley SA, Jülich D, Rauch GJ, Geisler R, Nüsslein-Volhard C. (2002) her1 and the notch pathway function within the oscillator mechanism that regulates zebrafish somitogenesis. *Development.* Mar;129(5):1175-83.

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.

Hsieh, J. J., and Hayward, S. D. (1995). Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* *268*, 560-563.

Huppert SS., Jacobsen TL., Muskavitch MA., (1997) Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. *Development* *124*, 3283

Ishitani, T., Matsumoto, K., Chitnis, A. B., and Itoh, M. (2005). Nrarp functions to modulate neural-crest-cell differentiation by regulating LEF1 protein stability. *Nat Cell Biol* *7*, 1106-1112.

Itoh M, Kim CH, Palardy G, Oda T, Jiang YJ, Maust D, Yeo SY, Lorick K, Wright GJ, Ariza-McNaughton L, Weissman AM, Lewis J, Chandrasekharappa SC, Chitnis AB. (2003) Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev. cell* Jan;4(1):67-82.

Jacobsen TL., Brennan K., Arias AM., Muskavitch MA., (1998)

Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila* *Development* 125, 4531

Johnston, S. H., Rauskolb, C., Wilson, R., Prabhakaran, B., Irvine, K. D., and Vogt, T. F. (1997). A family of mammalian Fringe genes implicated in boundary determination and the Notch pathway. *Development* 124, 2245-2254.

Jülich D, Hwee Lim C, Round J, Nicolaije C, Schroeder J, Davies A, Geisler R, Lewis J, Jiang YJ, Holley SA (2005) beamter/deltaC and the role of Notch ligands in the zebrafish somite segmentation, hindbrain neurogenesis and hypochord differentiation. *Dev Biol* Oct 15;286(2):391-404.

Kawakami, Y., Raya, A., Raya, R.M., Rodriguez-Esteban, C., and Belmonte, J.C. (2005). Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. *Nature* 435, 165-171.

Kopan, R., and Turner, D. L. (1996). The Notch pathway: democracy and aristocracy in the selection of cell fate. *Curr Opin Neurobiol* 6, 594-601.

Krebs, L. T., Deftos, M. L., Bevan, M. J., and Gridley, T. (2001). The Nrarp gene encodes an ankyrin-repeat protein that is transcriptionally regulated by the notch signaling pathway. *Dev Biol* 238, 110-119.

Lahaye, K., Kricha, S., and Bellefroid, E. J. (2002). XNAP, a conserved ankyrin repeat-containing protein with a role in the Notch pathway during *Xenopus* primary neurogenesis. *Mech Dev* 110, 113-124.

Lamar, E., Deblandre, G., Wettstein, D., Gawantka, V., Pollet, N., Niehrs, C., and Kintner, C. (2001). Nrarp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway. *Genes Dev* 15, 1885-1899.

Lewis J. 2003. Autoinhibition with transcriptional delay: a simple mechanism for the zebrafish somitogenesis oscillator. *Curr Biol* 13: 1398-1408.

Li, X., Cassidy, J.J., Reinke, C.A., Fischboeck, S. & Carthew, R.W. 2009, "A MicroRNA Imparts Robustness against Environmental Fluctuation during Development", *Cell*, vol. 137, no. 2, pp. 273-282.

Lin, W., Furthauer, M., Thisse, B., Thisse, C., Jing, N., and Ang, S. L. (2002). Cloning of the mouse *Sef* gene and comparative analysis of its expression with *Fgf8* and *Spry2* during embryogenesis. *Mech Dev* 113, 163-168.

Lu P, Minowada G, Martin GR. Increasing *Fgf4* expression in the mouse limb bud causes polysyndactyly and rescues the skeletal defects that result from loss of *Fgf8* function. (2006) *Development*.133:33–42

Mahmood R, et al. (1995) A role for FGF-8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb bud outgrowth. *Curr Biol*. 5:797–806

Mara, A., Schroeder. J., Chalouni. C., and Hollley. SA. (2007). Priming, initiation and synchronization of the segmentation clock by *deltaD* and *deltaC*. *Nat Cell Biol*. 9(5):523-30

Menegola, E., Di Renzo, F., Broccia, M.L., Prudenziati, M., Minucci, S., Massa, V. & Giavini, E. (2005). Inhibition of histone deacetylase activity on specific embryonic tissues as a new mechanism for teratogenicity. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, vol. 74, no. 5, pp. 392-398.

Miller AC., Lyons EL., Herman TG., (2009) cis-Inhibition of Notch by endogenous *Delta* biases the outcome of lateral inhibition. *Curr Biol* 19, 1378

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

Mosavi, L. K., Minor, D. L., Jr., and Peng, Z. Y. (2002). Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16029-16034.

Mumm, J. S., and Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* 228, 151-165.

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.

Raser J.M. and O'Shea E.K. (2005) Noise in Gene Expression: Origins, Consequences, and Control. *Science* 309, 5743, 2010-2013.

Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *Embo J* 18, 2196-2207.

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.

Petcherski, A. G., and Kimble, J. (2000). LAG-3 is a putative transcriptional

activator in the *C. elegans* Notch pathway. *Nature* 405, 364-368.

Pirot, P., van Grunsven, L. A., Marine, J. C., Huylebroeck, D., and Bellefroid, E. J. (2004). Direct regulation of the *Nrarp* gene promoter by the Notch signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 526-534.

Pourquié, O., and Tam, P. P. (2001). A nomenclature for prospective somites and phases of cyclic gene expression in the presomitic mesoderm. *Dev Cell* 1, 619-620.

Richardson, M.K., Allen, S.P., Wright, G.M., Raynaud, A., Hanken, J. (1998) Somite number and vertebrate evolution. *Development* Jan;125(2):151-60.

Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R., and Nakanishi, S. (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* 6, 2620-2634.

Sewell W, Sparrow DB, Smith AJ, Gonzalez DM, Rappaport EF, Dunwoodie SL, Kusumi K. 2009. Cyclical expression of the Notch/Wnt regulator *Nrarp* requires modulation by *Dll3* in somitogenesis. *Dev Biol* 329: 400-409.

Smithers, L., Haddon, C., Jiang, Y. J., and Lewis, J. (2000). Sequence and embryonic expression of *deltaC* in the zebrafish. *Mech Dev* 90, 119-123.

Sprinzak D., Lakhanpal A., LeBon L., Santat LA., Fontes ME., Anderson GA., Garcia-Ojalvo J., Elowitz MB., (2010) Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature* 465, 86

Topczewska, J. M., Topczewski, J., Szostak, A., Solnica-Krezel, L., and Hogan, B. L. (2003). Developmentally regulated expression of two members of the *Nrarp* family in zebrafish. *Gene Expr Patterns* 3, 169-171.

Vermot, J., Gallego Llamas, J., Fraulob, V., Niederreither, K., Chambon, P.,

and Dolle, P. (2005). Retinoic acid controls the bilateral symmetry of somite formation in the mouse embryo. *Science* 308, 563-566.

Wahl MB, 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*. Nov;134(22):4033-41.

Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T, Engstrom L, Pinzon-Ortiz M, Fine JS, Lee HJ et al. 2004. Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem* **279**: 12876-12882.

Wright D, Ferjentsik Z, Chong SW, Qiu X, Jiang YJ, Malapert P, Pourquie O, Van Hateren N, Wilson SA, Franco C et al. 2009. Cyclic Nrarp mRNA expression is regulated by the somitic oscillator but Nrarp protein levels do not oscillate. *Dev Dyn* **238**: 3043-3055.

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

Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L., Miyamoto, A., Weinmaster, G., and Hayward, S. D. (2000). SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function. *Mol Cell Biol* 20, 2400-2410.