

体節形成過程における遺伝子発現振動を利用した
パターン形成のメカニズム

二反田 康秀

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 遺伝子発現制御研究室

(別所康全 教授)

平成26年1月21日提出

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所属 (主指導教員)	遺伝子発現制御研究室 (別所康全 教授)		
氏名	二反田 康秀	提出	平成 25 年 12 月 17 日
題目	体節形成過程における遺伝子発現振動を利用した パターン形成のメカニズム		
<p>脊椎動物の発生中期、胚尾部の細胞集団は盛んに分裂し、胚は前後軸方向に伸長する。このとき、胚尾部の伸長に伴い頭側から順番に分化する体節と呼ばれる組織が中胚葉細胞集団 (未分節中胚葉) から形成される。体節は後に骨格筋や骨格などに分化するとともに、それらの前後軸方向の位置情報として機能する。形成された体節内部には前後極性が存在し、この極性に基づいて再分節化が行われるため、体節の前後極性の決定は正常な椎骨パターン形成に必須である。未分節中胚葉細胞内では分節時計遺伝子とよばれる一群の遺伝子発現が振動し、均質な細胞集団を振動位相の異なる二集団へ変化させ、前後極性を持つ体節を形成する。この遺伝子発現振動を生み出すのは、分節時計遺伝子とよばれる <i>Hes7</i> である。<i>Hes7</i> は bHLH 型の転写抑制因子で、Notch 活性化細胞内ドメイン (NICD) によって転写が活性化され、様々な遺伝子の転写を抑制するが、自身のプロモーターにも結合し転写を抑制する特徴がある。すなわち、<i>Hes7</i> の発現はフィードバック制御されており、転写、翻訳、<i>Hes7</i> による自身の転写抑制、タンパク質の分解・転写再開のプロセスが時間遅れを伴いながら繰り返し、<i>Hes7</i> の発現は振動すると考えられている。この遺伝子発現パターンの振動は一定の細胞集団で同調して起こり、その変化は非常に明瞭に観察されることから、隣接する細胞間で転写の振動を同調させる機構と、合成された mRNA を素早く分解する機構の存在が予想された。そこで本研究では、この遺伝子発現パターンの振動について、</p> <p>1. <i>Nrarp</i> を介した Notch 活性依存的な振動の細胞間同調機構</p> <p>2. 3'UTR を介した転写後調節による mRNA 分解制御機構</p> <p>の役割を明らかにした。</p>			

1. *Nrarp*を介したNotch活性依存的な振動の同調機構

これまで私たちの研究室では、Notch 活性抑制因子 *Nrarp* について、ノックアウトマウスを用いてその機能解析を進めてきた。*Nrarp* は未分節中胚葉で発現し NICD の分解を介して Notch 活性を抑制することが報告されていた。すでに、当研究室の金により *Nrarp* 欠損マウスが作成され、*Nrarp* 欠損マウスの未分節中胚葉では Notch 活性が上昇すること、それにより分節時計遺伝子の振動周期と体節の形成周期が延長することが明らかになった。これらの結果から、*Nrarp* は未分節中胚葉で Notch 活性を制御し、体節の形成周期を調節すると結論づけた (Kim et al. 2011)。この体節形成周期の変化に加えて、*Nrarp* 欠損マウスでは部分的な椎骨の癒合が観察されていた。*Nrarp* 欠損マウスで癒合を生じる椎骨の位置には個体差があることから、*Nrarp* 欠損マウスで椎骨の癒合はランダムに発生すると考えられた。これまでに、未分節中胚葉において、分節時計遺伝子の細胞間同調における Notch シグナルの必要性が報告されていたことから、*Nrarp* の欠損が Notch 活性による分節時計遺伝子の同調を妨げ、振動を利用した体節前後極性の形成を乱し、結果として椎骨の癒合を引き起こしたと予想した。

そこで、*Nrarp* 欠損マウスにおける椎骨癒合の原因を調べるため、*Nrarp* 欠損マウスで形成された体節内部の前後極性と、分節時計遺伝子の同調性を調べた。体節後半部の細胞で発現するマーカー遺伝子 *Uncx4.1* を用いて体節の前後極性を調べると、*Nrarp* 欠損マウスでは *Nrarp* ヘテロマウスと比較して、前後極性の異なる細胞の境界が曖昧であった。さらに、分節時計遺伝子 *Hes7* の転写を細胞レベルで可視化し、未分節中胚葉における振動の同調性を調べると、*Nrarp* 欠損マウスで *Hes7* 発現の発現同調が乱れていることが明らかとなった。さらに、*Nrarp* 欠損マウスで分節時計遺伝子の発現同調性が低下する現象を説明するため、数理モデルを構築し、コンピューターシミュレーションを用いて *Nrarp* 欠損条件における分節時計遺伝子の同調を再現した。その結果、*Nrarp* 欠損条件では、Notch 活性に依存した細胞間の振動周期の調節が弱まり、分節時計遺伝子の同調性が低下することが明らかとなった。これらの結果から、*Nrarp* 欠損マウスでは、Notch 活性の調節異常により、分節時計遺伝子の発現振動の同調性が低下し、その後形成される体節内部の前後極性が乱れることが示唆された。さらに、このことが正しければ、*Nrarp* 欠損マウスでは遺伝子発現振動の同調性が低下しているため、外部環境刺激に対して遺伝子発現が乱れやすく、体節形成が乱されやすいと予想した。そこで、外部環境刺激として催奇形性薬剤バルプロ酸を妊娠マウスに腹腔内注射し、胎仔の体節形成、骨格形成の異常を定量化し、*Nrarp* 欠損マウスと野生型と比較した。実験の結果、バルプロ酸投与による体節・椎骨形成の異常は、野生型（もしくは *Nrarp* ヘテロ）マウスと比較して *Nrarp* 欠損マウスで顕著であった。これらのことから、*Nrarp* による Notch 活性調節は、分節時計遺伝子の細胞間同調振動を助け、外部環境刺激に強いロバストな体節形成を維持するための機能と考えられる。

2. 3'UTR を介した転写後調節による mRNA の分解制御の影響

分節時計遺伝子である *Lfng* と *Hes7* は Notch シグナルと *Hes7* タンパク質による共通の転写制御を受けるにも関わらず、それら mRNA の発現パターンは異なり、*Hes7* は *Lfng* と比較して、より広い範囲で mRNA が発現することが報告されていた。本研究ではこれら 2 つの遺伝子の転写後調節の差異が、それぞれ固有の mRNA 発現パターンを生み出すと仮説を立てた。そこで、まず、マウス胚尾部の培養実験を行い、未分節中胚葉において *Hes7* mRNA は *Lfng* mRNA と比較して安定性が高いことを明らかにした。過去の報告から mRNA の安定性は、その 3'UTR 配列に影響を受けることが知られている。そこで Venus レポーター遺伝子 3'末端に *Hes7* 3'UTR または *Lfng* 3'UTR を挿入した遺伝子を作成し、HEK293T 細胞内で mRNA の安定性を比較した。その結果、*Lfng* 3'UTR は *Hes7* 3'UTR と比較して mRNA を不安定化することがわかった。このレポーター遺伝子を *Hes7* プロモーター下流に挿入した配列を用いてトランスジェニックマウスを作成し、マウス未分節中胚葉におけるレポーター遺伝子の発現パターンを比較した。その結果、*Hes7* 3'UTR を持つレポーターと比較して *Lfng* 3'UTR を持つレポーターは内在性の *Lfng* のように明瞭な発現パターンを示した。これらのことから、*Hes7* と *Lfng* 3'UTR 配列は mRNA の安定性に対する影響が異なり、その違いが共通の転写調節から固有の mRNA 発現パターンを生み出すことを明らかにした。

目次

ページ番号

緒言・研究の目的 ……6

第一章

***Nrarp* を介した NICD 量の調節は遺伝子発現振動の同調に必要である**

序論 ……12

実験材料と実験方法 ……13

結果

I. *Nrarp* 欠損マウスの解析 ……17

II. *Nrarp* 欠損 *hes7* ヘテロマウスの解析 ……22

III. 外的かく乱要因が *Nrarp* 欠損マウスに与える影響 ……27

考察 ……40

第二章

3'UTR を介した mRNA の分解制御は遺伝子発現振動パターンの微調整を行う

序論 ……44

実験材料と実験方法 ……46

結果 ……49

考察 ……65

結論 ……70

謝辞 ……71

引用文献 ……72

緒言

脊椎動物の体は繰り返し構造で構成される

脊椎動物の体は頭尾軸方向の繰り返し構造（セグメント）の積み重ねによって形作られている。地質年代によると、単細胞生物から多細胞生物への進化に 25 億年の歳月を要したと推測される。このことは生物の進化の過程で細胞が集合・役割分担し、協調して個体として働く仕組みを生み出すために長い年月を要したことを示している[1]。このような複雑な多細胞生物の体を構成するセグメント構造はその発生過程で形成される[2]。

体節は脊椎動物の前後軸方向のパターン形成に必要である

脊椎動物の発生中期、胚の背中側に正中線に沿って神経管が形成され、神経管の左右に体節と呼ばれる球状の組織が連続的に形成される(図 1) [3]。Hamburger と Hamilton はニワトリ胚の発生段階を詳細に観察した結果、発生の進行に伴って体節数が増加していくことを報告した[4]。また、体節構造は筋肉や骨格に分化する[5]とともに、骨格パターンの正常な形成にも必須である[1,6,7]。

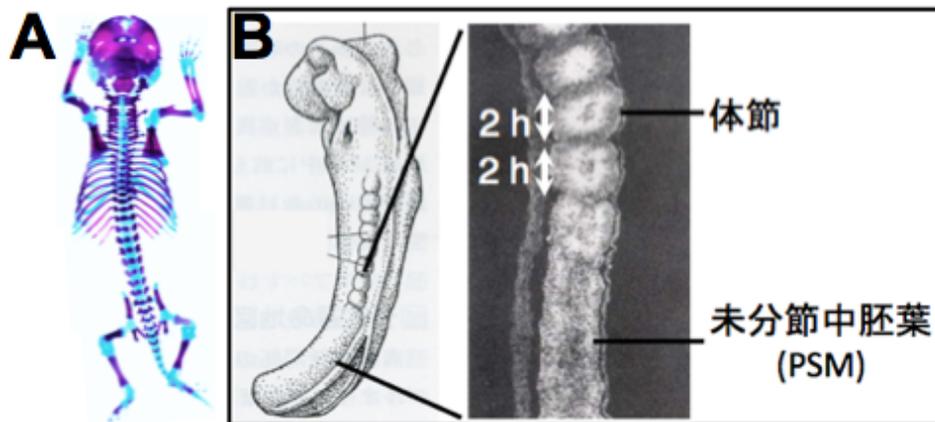


図 1 発生中期に形成される体節が椎骨の等間隔パターンを生み出す

(A)マウス新生仔の骨格標本。頭部から尾部にかけて等間隔に肋骨と椎骨が形成される。

(B)胎生 9.5 日齢マウス胚模式図と体節の写真。胚尾部に位置する未分節中胚葉の伸長に伴い、頭側から順番に体節が分化する。2 時間に 1 つずつマウスの体節は形成される。

体節形成のモデル化“Clock and wave front モデル”

体節は、胚尾部の中胚葉細胞（未分節中胚葉）から、連続的に形成されるため、未分節中胚葉から一定の周期で体節を分化させるペースメーカーとして働く分子“Clock”の存在が仮定された[8]。体節形成でいう Clock とは、未分節中胚葉で周期的に発現変化する一群の遺伝子（分節時計遺伝子）である[9]。この、体節形成のタイミングを決定する“Clock”に加えて、体節形成の位置を決めるモルフォゲンの濃度勾配 “Wave front”によって、一定のサイズの体節が一定の周期で形成されるとするモデル“Clock and Wave front モデル”が提唱された[10](図2)。体節形成の“Wave front”として機能するのは Fgf8 リガンドの濃度勾配である[11]。Fgf8 の転写は尾部末端の細胞でのみ起こるが、その mRNA は安定性が高く徐々に分解を受けるため、Fgf8 mRNA の発現量は尾部末端から頭側へ緩やかな濃度勾配を形成する[12]。つまり、Clock and Wave front モデルを用いると、分節時計遺伝子 (Clock) の周期的な発現変動による時間情報と、モルフォゲンの濃度勾配による空間情報により、体節の分化する位置と、体節の形成周期が決定されると説明できる[13,14]。

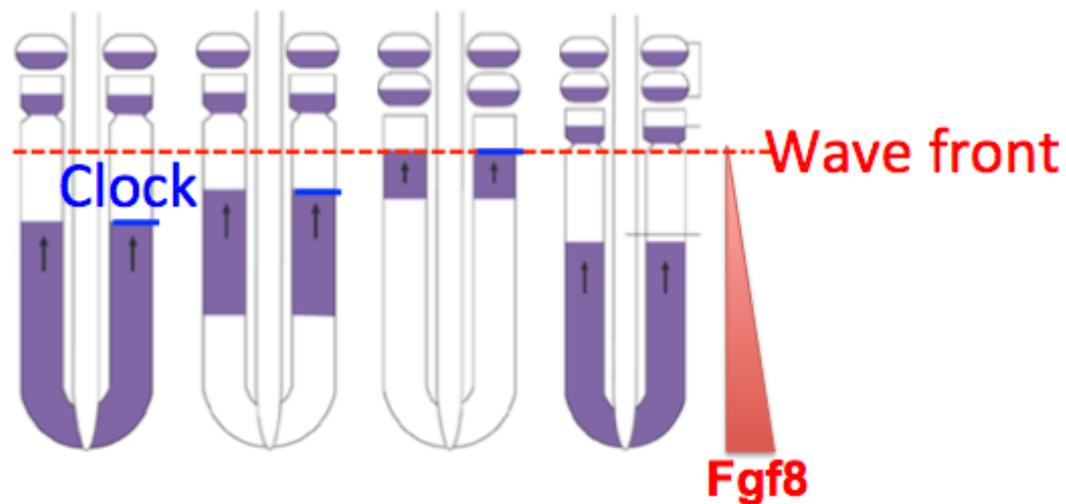


図2 Clock and wavefront モデル

体節は一定の周期で等間隔に形成される。この現象を説明するため、“Clock and Wave front モデル”が提唱された。このモデルでは、未分節中胚葉で周期的に発現する分子 “Clock” が体節の形成周期を決定し、尾部末端から頭側方向への Fgf8 の濃度勾配が体節の形成位置 “Wave front” を決定する。“Wave front” は尾部伸長とともに一定の速度で後方に移動する。このとき Clock の発現周期に合わせて、連続的に体節が形成されるために、一定周期で等間隔に体節が形成される。

分節時計遺伝子の実体 (*HES1*) の発見

“Clock and wave front モデル”で仮定された Clock (分節時計遺伝子) に相当する分子は、長い間見つからなかった。1997 年、Palmeirim らはニワトリ胚の培養実験を行い、ショウジョウバエのペアルール遺伝子 *hairy* のホモログ *c-hairy1A* (*HES1*) の発現は未分節中胚葉において時間変化し、その周期は未分節中胚葉の分節化が起こる周期と一致することを報告した[15]。この結果から、未分節中胚葉における遺伝子発現の変化が体節の形成周期を制御すると予想された。

ネガティブフィードバックモデル

2002 年、マウス培養細胞において、*Hes1* (*hairy and enhancer of split-1*) の発現は 2 時間周期で振動することが示された。このことから、*Hes1* の発現振動は細胞自律的に起こると考えられた。また、プロテアソーム阻害剤を用いて *Hes1* タンパク質の分解を阻害した場合、振動が一度しか起こらなくなること、*Hes1* は bHLH (*Basic Helix Loop Helix*) 領域を持つ転写抑制因子であることから、*Hes1* タンパク質が自身のプロモーターに結合し転写を抑制する可能性が予想された。未分節中胚葉において *Hes1* mRNA の発現領域と *Hes1* タンパク質の発現領域は相反することからも、*Hes1* タンパク質が自身の転写を抑制することが *Hes1* の転写振動に必要であると考えられた[16]。翌年、Lewis らは、ゼブラフィッシュの *Her1* (*hairy* のホモログ) 遺伝子が、時間遅れを伴いながら自己の転写を抑制する数理モデルを構築した[17,18](図 3)。

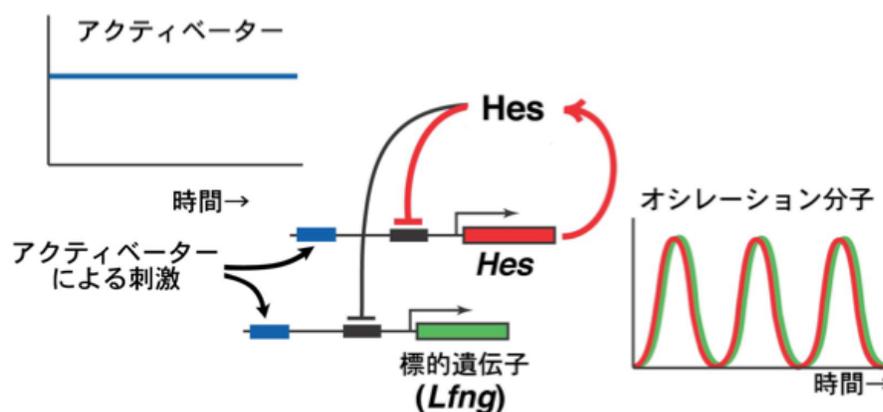


図 3 フィードバック制御が遺伝子発現を振動させる

転写抑制因子 (*Hes*) が時間遅れを伴って自身の転写を抑制するフィードバックで遺伝子発現の振動が生み出される。*Hes* の振動は下流の遺伝子 (*Lfg* など) の転写活性も制御するため、未分節中胚葉様では多くの遺伝子が周期的に発現する。

Hes7はマウスにおいて分節時計遺伝子として働く

*Hes7*は *Hes* (*Hairy / Enhancer of Split genes*) ファミリーに含まれる bHLH (basic helix loop helix) 型の転写抑制因子で、Notch シグナルにより転写が活性化される[19,20,21]。Hes7 タンパク質は自身のプロモーターに結合し、転写を抑制するため *Hes7* の発現はフィードバック回路を形成する。このフィードバックによって、*Hes7*は自身や *Lfng* (*Lunatic Fringe*) など下流の遺伝子の発現を未分節中胚葉細胞で周期的に変動（振動）させる[20,22]。この遺伝子発現振動の位相は未分節中胚葉の前後軸方向でわずかにずれているために、その発現領域は時間経過に伴い、未分節中胚葉の尾部側から頭側へ波のように移動する(図 4)[23]。

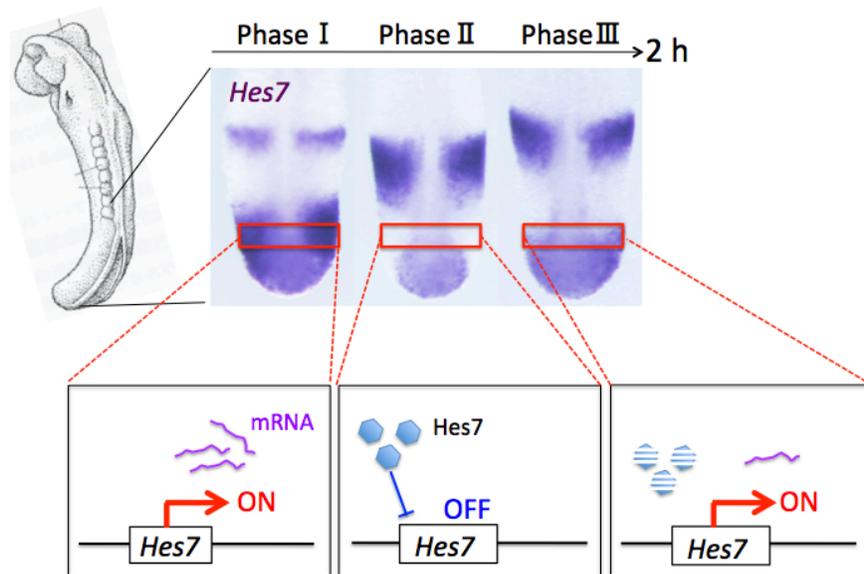


図 4 未分節中胚葉における分節時計遺伝子 (*Hes7*) の発現は 2 時間周期で変化する。

胎生 10.5 日齢胚、未分節中胚葉での *Hes7* 発現パターン。*Hes7* の発現は未分節中胚葉細胞において、2 時間周期で転写の on/off を繰り返し、振動する。未分節中胚葉の位置によって振動するタイミングが異なるため、*Hes7* の発現領域は波が動くように、未分節中胚葉の先端から頭側へ移動するように見える。この波は 2 時間に 1 回未分節中胚葉を通り、未分節中胚葉の上端に達したタイミングで 1 対の体節が形成される。

遺伝子発現の振動を利用して体節の前後極性が作られる

Hes7 の下流で発現振動する *Lfng* の発現領域はストライプ状の発現パターンをとりながら未分節中胚葉の尾部先端から頭側へ移動し、未分節中胚葉上端に達すると振動が停止し、その位置で体節が形成される[24]。この未分節中胚葉上端で停止した *Lfng* のストライプ状の発現領域が、体節の頭側となり、形成された体節内には頭尾軸方向の前後極性が形成される[25]。形成さ

れた体節の前半部と後半部では細胞の性質が異なり、体節後半部で発現するホメオボックス遺伝子 *Uncx4.1* や体節前半部で発現する *Tbx18* などの発現によって体節の極性が維持されている[26]。体節が成熟する際には体節の後半部の細胞と次の体節の前半部の細胞が融合し椎骨が形成される（再分節化）ため、体節の極性形成は正常な椎骨パターン形成に必須である(図5)[27-29]。

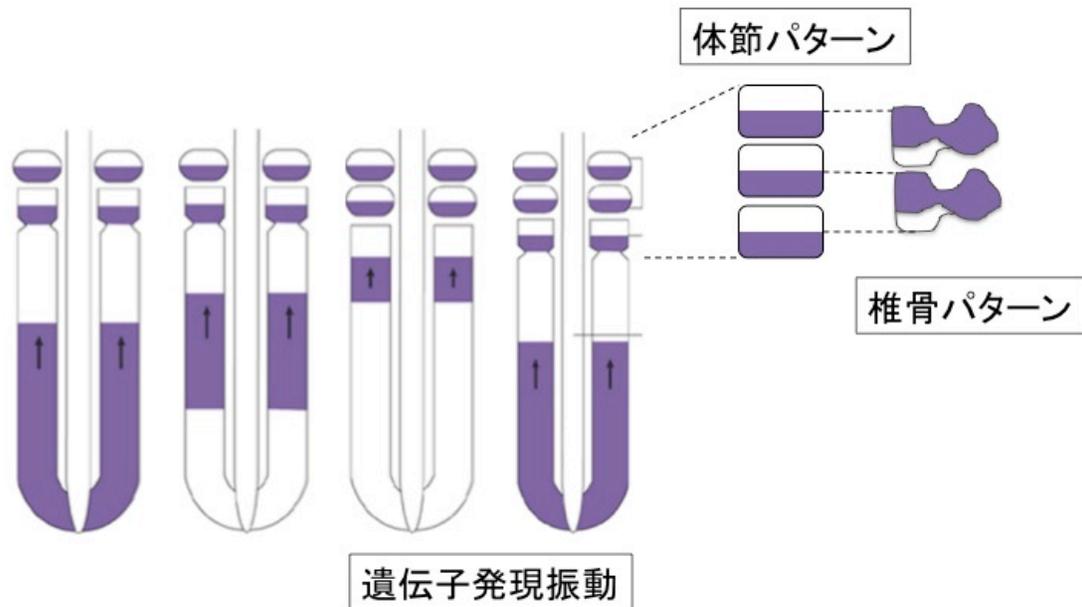


図5 遺伝子発現振動のパターンを利用して体節の内部極性が形成される

分節時計遺伝子の発現は未分節中胚葉で振動し、波のように移動するストライプパターンを作る。分節時計遺伝子の発現領域（ストライプパターン）は未分節中胚葉下端から移動し、上端に達すると振動が停止し、1 対の体節が形成される。その際、*Lfng* の発現領域が体節の前半となり、体節内部に前後軸方向の極性が形成される。体節が成熟する際は体節の内部極性を利用して再分節化（Re-segmentation）が起こり、椎骨が形成される。

本研究の目的

体節形成では、均質な細胞集団（未分節中胚葉）が、遺伝子発現振動により生じるストライプパターンを利用して体節に分化し、体節内部に前後極性を形成する。未分節中胚葉の個々の細胞中では分節時計遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子発現が振動している。近年、個々の細胞中において、転写抑制因子が自身の転写をフィードバック抑制することで遺伝子発現が振動することが明らかになってきた。しかし、未分節中胚葉に存在する多くの細胞間で遺伝子発現振動が同調し、明瞭なストライプパターンを生み出す機構については不明な点が多い。本研究は、遺伝子発現振動を利用したパターン形成において、遺伝子発現の同調機構と、 mRNA 安定性の制御が果たす役割を明らかにすることを目的とする。

第一章

Nrarp を介した NICD 量の調節は振動の同調に必要である

序論

分節時計遺伝子の振動は細胞間で同調する

体節形成における分節時計遺伝子の振動では転写の on/off が連続的に繰り返す必要がある。しかし、細胞分裂中の細胞ではほとんど全ての転写が停止し、転写途中の mRNA は分解される [30]。そのため、細胞分裂を起こした細胞では転写の一時的に停止により、振動位相が遅れ、周囲の細胞とずれる。このように周囲の細胞とは異なる位相で振動子が振動することを振動子の脱同調という。胚尾部を伸長させるため、未分節中胚葉細胞は盛んに分裂する必要があるが、細胞分裂は隣接する細胞間における遺伝子発現振動位相の差異を生じる。つまり、細胞分裂で生じる脱同調を再同調させることが、細胞分裂と遺伝子発現振動を両立させるために必要である。

Notch シグナルを介して分節時計遺伝子の発現は同調する

ゼブラフィッシュの *Notch* 遺伝子を遺伝学的に破壊した変異体では、体節形成異常を示すこと、分節時計遺伝子が Salt & pepper (遺伝子発現している細胞としていない細胞が混在した状態) と呼ばれる不均一な発現パターンを示すことが報告されていた[31]。さらに、ゼブラフィッシュ未分節中胚葉の細胞を別個体に移植する実験と *DeltaC* (*Notch* のリガンド) のノックダウン法を用いた研究結果から、隣接する細胞間で分節時計遺伝子の振動は *Notch* シグナルを介して同調することが明らかになった[32-35]。

Nrarp は未分節中胚葉で発現し *Notch* 活性を抑制する

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する。*Nrarp* は未分節中胚葉で、*Hes7* や *Lfng* と同様のパターンで周期的に発現する[36, 37]。*Nrarp* はアンキリン反復配列をもち、この配列を介して *Notch* の活性化細胞内ドメイン (NICD) と結合し、分解を促進することで、*Notch* シグナルを抑制すると考えられている[38]。これまでにノックアウトマウスの表現型として、未分節中胚葉における NICD 量が増加し、体節形成数が減少すること、椎骨の一部に癒合が生じることが報告されている ([39]、図 6, 7)。しかしながら、*Nrarp* の欠損がどのように椎骨の癒合を引き起こすのか

は明らかになっていない。

実験方法と実験材料

骨格 2 重染色

マウス新生仔を 60°Cのお湯の中で、皮膚、脂肪、内臓を取り除き、99% エタノールで一晩固定する。翌日、エタノールを除き、アセトンを入れ 2 日間静置する。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) を加えて 37°Cのオーブンで 3 日間静置する。染色液を除き、水で洗浄する。その後、1% KOHを加えて 1 日静置する。1% KOHを除き、1% KOH/ Moll solution (20% グリセリン、1% KOH) を加えて 2 ~5 日静置する。液に色がついてきたら、液を交換する。Moll solution に浸け、肉の透明化を進める。

in situ ハイブリダイゼーション

氷冷した PBS 中で解剖した胚を 4°Cの 4% パラフォルムアルデヒド (PFA)/PBS で一晩固定する。翌日、胚を PBS で 10 分間 3 回洗う。25% メタノール/PBS、50% メタノール/PBS、75% メタノール/PBS、100% メタノール、100% メタノールの順に 10 分ごとに液交換を行い、胚をメタノールで脱水する。脱水した胚は-30°Cで保存する。脱水した胚を 75% メタノール/PBS、50% メタノール/PBS、25% メタノール/PBS、PBST、PBST の順番で 10 分ごとに液交換し、再水和する。6% H₂O₂/PBST に液交換し、15 分間室温で静置する。PBST を 10 分ごとに 3 回液交換する。10µg/ml の Proteinase K (Roche) /PBST に液交換し、室温で静置 (妊娠 10 日目の胚は 10 分間、尾部のみのサンプルは 8 分間) する。氷冷した 2mg/ml のグリシン/PBST に液交換し、PBST で洗浄する。4% PFA,0.2% glutaldehyde/PBST に液交換し、20 分間室温で静置する。PBST を 5 分ごとに 3 回液交換する。70°Cの Hybridization buffer (50% ホルムアミド、5XSSC pH4.5、50µg/ml tRNA [Roche]、1% SDS、50µg/ml Heparin) を加えて、70°Cのハイブリオーブン (TAITEC) 中で 1 時間転倒混和する。70°Cのヒートブロック上で 300ng/ml のプローブを含む 70°Cの Hybridization buffer に置換する。DIG プローブは DIG RNA Labeling kit (Roche) を用いて作成し、エタノール沈殿精製の後、70°Cの Hybridization buffer を加えて溶解し、85°Cで 15 分間熱処理し、氷冷し変成させ、70°Cの Hybridization buffer に希釈した物を用いる。70°Cで一晩振盪する。プローブは回収し、-20°Cで保存する。70°Cの Solution1 (50% ホルムアミド、5XSSC pH4.5、1% SDS) に置換し、70°Cで 1 時間転倒混和する。この操作を計 3 回繰り返す。Solution1 を 65°Cの Solution3 (50% ホルムアミド、5XSSC pH4.5) に置換し、65°Cで 1 時間転倒混和する。この操作を計 2 回繰り返す。Solution3 を室温の TBST に置換し、5 分間静置する。

この操作を計 3 回繰り返す。TBST を 10% Sheep serum/TBST に置換し、1 時間静置する。10% Sheep serum/TBST を 1/2000 抗 DIG Sheep 抗体 (Roche) 入の 10% Sheep serum/TBST に置換し、4°C で一晩静置する。抗体を除き、TBST を加え、10 分転倒混和する。この操作を 10 回繰り返す。TBST を除き、NTMT (100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH9.5, 0.1% tween20) を加え、室温で 5 分転倒混和する。この操作を 2 回繰り返す。NTMT を Color solution (2.25μl NBT, 3.5μl BCIP, / NTMT) に置換する。遮光して常温で発色させ、10 分に 1 度発色の程度を観察しつつ、通常 1 時間程度発色を行う。発色完了後、発色液を除き、PBT で洗浄し、4% PFA/PBT を加え保存する。

免疫染色

氷冷した PBS 中で解剖した胚を 4°C の 4% パラフォルムアルデヒド (PFA) /PBS で 3 時間固定する。胚を PBS で 10 分間 3 回洗う。PBS を 6% H₂O₂、1% Triton/PBS に置換し常温で 20 分間静置する。MABT で 10 分間 3 回洗う。1% Blocking reagent/MABT : (55°C の MABT に w/v1% の Blocking reagent [invitrogen] を溶かす) で MABT を置換し、常温で 1 時間静置する。1% Blocking reagent/MABT を一次抗体入りの 1% Blocking reagent/MABT に置換し、4°C で一晩静置する。抗体を除き、MABT を加え、10 分間転倒混和する。この操作を 8 回繰り返す。MABT を二次抗体入りの 1% Blocking reagent /MABT に置換し、4°C で一晩静置する。抗体を除き、MABT を加え、10 分間転倒混和する。この操作を 8 回繰り返す。PBT で 5 分 3 回洗う。PBT を TSA solution (0.0015% H₂O₂, 1/100 Alexa488-tylamide/Amplibuffer) に置換し、4°C で 1 時間静置する。室温に戻し 2 時間反応させる。PBST で 10 分間 3 回洗う。、4% PFA/PBT を加え保存する。蛍光の撮影を行う際、あらかじめ沸騰させた後、60°C に冷ました 1% の低融点アガロースによりガラスボトムディッシュ (IWAKI) に包埋する。

バルプロ酸処理とバルプロ酸の血中・胚内濃度測定

胎生 9.5 日齢、もしくは 10 日齢のマウスの体重を測定し、濃度 400mg/Kg 体重に PBS で調整したバルプロ酸を腹腔内投与する。体節パターンの解析にはバルプロ投与 24 時間後のマウスを解剖し得られた 10.5 日齢胚を用いる。椎骨形成パターンの解析にはバルプロ酸投与約 10 日後に生まれる新生仔を用いる。バルプロ酸処理後の血中・胚内のバルプロ酸濃度測定のため、バルプロ酸投与後 0.5 時間、2 時間、4 時間、8 時間のマウスを解剖し、まず、腹部大動脈から全血を採取し、次に 4°C の PBS 中で胚を取り出し、液体窒素で直ちに凍らせる。採取した血液は 4°C で一晩静置し、3000rpm 4°C 20 分の遠心処理で分離した血清を測定に用いる。採取した 9 匹の胚に重量濃度で 3 倍量の RO 水を加え、シリンジでホモジナイズした後、15000rpm 4°C 20

分の遠心処理で分離した上清 300 μ l を測定に用いる。測定は株式会社 SRL に委託し、エミット 2000 バルプロ酸アッセイキット (SIEMENS) を用いる。

ヒートショック実験

胎生 9.5 日齢マウスの体重を測定し、濃度 50mg/Kg 体重になるよう PBS で調整したペントバルビタール (商品名:ソムノペンチル) を腹腔内投与し麻酔する。恒温槽に水を満たし 43°C もしくは 37°C にあたためる。マウスを肩まで恒温槽に入れ、20 分間保持する。20 分後、マウスを取り出し、キムタオルで十分に水気を拭き取る。体節パターンの解析にはヒートショック 24 時間後のマウスを解剖し得られる 10.5 日齢胚を用いる。椎骨形成パターンの解析にはヒートショック約 10 日後に生まれる新生仔を用いる。

ウエスタンブロッティング

胎生 10.5 日齢のマウス胚を、1% NP-40, 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA を含む buffer に入れて溶解させる。SDS ゲル (ATTO) を用いて 20mA で 70 分泳動し、ゲルを Hybond-P (Amersham) 膜と重ね合わせて 100mA で 1 時間転写させる。メンブレンへの非特異的な吸着を防ぐために 5% スキムミルク/TBST で 1 時間ブロッキングし、TBST で 1000 倍希釈した抗アセチル化ヒストン H3 抗体 (merck millipore, H06-599) あるいは、TBST で 5000 倍希釈した抗ヒストン H3 抗体 (abcam, #ab1791) と 4°C で一晩反応させる。翌日、TBST で 15 分間の洗浄を 3 回繰り返す。メンブレンを TBST で 1/10000 希釈した 2 次抗体 (ECL Rabbit IgG, #NA934V) (GE Healthcare Life Sciences) と 2 時間反応させ、その後、TBST で 15 分間の洗浄を 3 回繰り返す。chemiluminescence detection system (Amersham) を用いてシグナルを検出する。タンパク質の定量は NIH image program を用いて行う。このとき、ヒストン H3 量を内部コントロールとしてアセチル化ヒストン H3 量を補正する。

RNA 精製と定量的 PCR

未分節中胚葉からの RNA 抽出は Nucleo Spin RNA XS kit (Macherey-Nagel, Promega, Madison, WI, USA) を用いて行う。全 RNA は SuperScriptII Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて逆転写する。定量的 PCR マスターミックス KAPA SYBR FAST Universal (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) を用い、PCR 反応は Light Cycler 480 (Roche) を用いて、95°C 3 分熱変成後、(95°C 10 秒、60°C 20 秒、72°C 1 秒) の 3 ステップ条件で 40 サイクルの PCR を行う。PCR に用いるプライマーセットは以下のとおりである。

Primer list		
	Fw	Rv
<i>Gapdh</i>	5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'	5'-TTGTCATGGATGACCTTGGC-3'
<i>Nrarp</i>	5'-CTCGCACTTAGGAAGGGAAG-3'	5'-ACCACGCACAATATTTCCAA-3'
<i>Lfng</i>	5'-TGTTTGAGAACAAGCGGAAC-3'	5'-CAGGGTGTGTCTGGGTACAG-3'
<i>Hes7</i>	5'-TAGAAGAGCTGAGGCTGCTG-3'	5'-CTTTCTCCAGCTTCGGGT-3'
<i>Fgf8</i>	5'-GGGAAGCTAATTGCCAAGAG-3'	5'-TGTACCAGCCCTCGTACTTG-3'
<i>Dusp6</i>	5'-GGAATGAGAACACTGGTGGA-3'	5'-GAAGCCACCTTCCAGGTAGA-3'
<i>Rho5</i>	5'-CAGGTATGGAAGCTGAGGGT-3'	5'-GCTGTTCTTCCGAGTCTTCC-3'
<i>Spry2</i>	5'-GAAGAGGATTCAAGGGAGAGG-3'	5'-GTCTTGGCAGTGTGTTCCACC-3'
<i>Axin2</i>	5'-CTGGCTCCAGAAGATCACAA-3'	5'-TCAGCATCCTCCTGTATGGA-3'
<i>Nkd1</i>	5'-CGTGGCTGGGAGAAGAAGC-3'	5'-CAGGTCTAGGTAGTGTTTCTCC-3'

統計解析

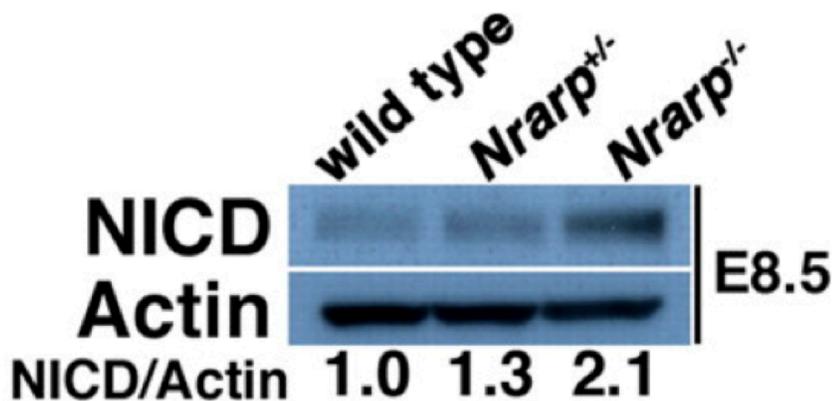
2 グループ間の有意差検定はスチューデントの t テストを用いて行う。結果には標本標準誤差のエラーバーをつけた。

実験結果

I . *Nrarp* 欠損マウスの解析

I -1. *Nrarp* 欠損マウスで一部の椎骨は癒合する

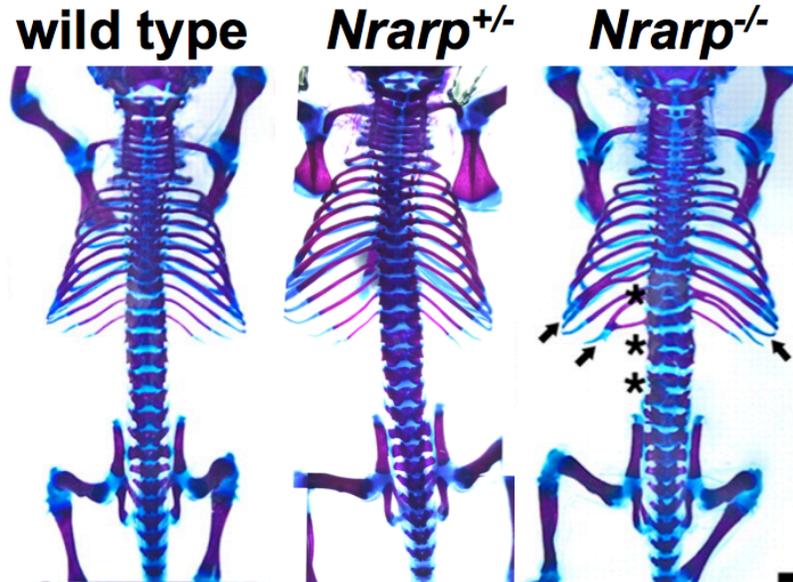
Nrarp は未分節中胚葉で発現し、NICD (Notch Intra Cellular Domain) に結合・分解し、Notch の抑制因子として働くことがすでに報告されている[38]。 *Nrarp* の機能解析を進めるため、当研究室の金は *Nrarp* 欠損マウスを作成、解析し、 *Nrarp* 欠損マウスでは未分節中胚葉における NICD 量が増加し、体節形成数が減少すること、椎骨の一部に癒合が生じることを報告した ([39]、図 6,7)。しかし、 *Nrarp* の欠損がどのように椎骨の癒合を引き起こすかは不明であった。 *Nrarp* 欠損マウスにおいて、椎骨の癒合が生じる位置を個体間で比較した結果、椎骨の癒合は胸椎から腰椎の一部の椎骨のみに生じ、また、癒合する椎骨の位置には個体差があった(図 8)。つまり、 *Nrarp* 欠損条件でも大部分の椎骨は正常に形成されることがわかる。このことから、 *Nrarp* 欠損条件でも椎骨のパターン形成は行われるが、椎骨パターンが乱れやすいと予想した。椎骨のパターンは体節内部の前後極性によって決定される [27]。そこで、 *Nrarp* 欠損マウスで生じる一部の椎骨の癒合は体節内部極性の乱れに由来すると予想し、 *Nrarp* 欠損マウス胚における体節内部の前後極性を調べた。



Kim *et al.* Mol. Biol. Cell September 15, 2011 vol. 22 no. 18 3541-3549

図 6 *Nrarp* 欠損マウスでは未分節中胚葉細胞内の NICD 量が増加する。

胎生 8.5 日齢、10.5 日齢のマウス未分節中胚葉において、 *Nrarp* 欠損マウスでは、野性型と比較して NICD (Notch Intra Cellular Domain) 量が 2 倍程度増加していた。



Kim *et al.* Mol. Biol. Cell September 15, 2011 vol. 22 no. 18 3541-3549

図 7 *Nrarp* 欠損マウスの椎骨は癒合する

新生仔の骨格二重染色の結果を示す。野性型マウスや *Nrarp* ヘテロマウスとは異なり、*Nrarp* 欠損マウスでは椎骨の癒合 (*) や、肋骨の癒合 (矢印) が生じる。

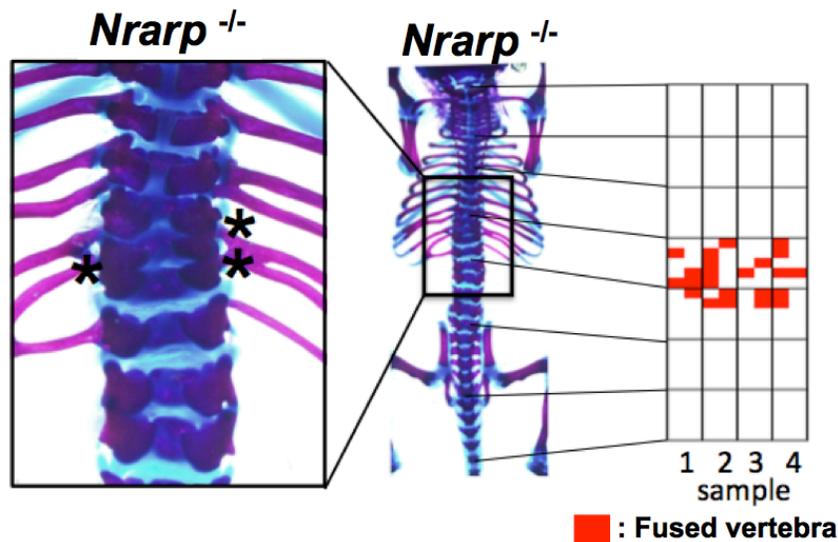


図 8 *Nrarp* 欠損マウスで一部の椎骨は癒合する

Nrarp 欠損マウスの新生仔を用いて、骨格二重染色法で硬骨を紫に、軟骨を青に染色した。*Nrarp* 欠損マウスでは、拡大図の * 印で示すように、前後に並ぶ椎骨で癒合が見られた。*Nrarp* 欠損マウス 4 個体について、椎骨の癒合が起こった箇所の頭側から尾部先端までの相対位置を赤い四角で示した。*Nrarp* 欠損マウスにおいて、椎骨の癒合は胸椎から腰椎にかけて起こっていたが、癒合の起こる椎骨の部位は個体ごとに異なっていた。

I -2. *Nrarp* 欠損マウス胚体節内部の前後極性はわずかに乱れる

ホメオボックス遺伝子 *Uncx4.1* は、体節後半部の細胞に限局して発現するため、*Uncx4.1* の発現を指標に体節内部の前後極性を調べることができる。そこで、*Uncx4.1* のイントロン配列を認識するプローブを用いて、高感度蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。遺伝子が転写されると、まずイントロン領域を含む RNA が合成され、その後イントロン除去、5'キャッピング、ポリ A 配列付加を経て成熟 mRNA となる。通常の *in situ* ハイブリダイゼーションでは、ターゲット遺伝子 mRNA 配列を認識する RNA プローブを使用し、成熟 mRNA を検出する。一方、ターゲット遺伝子のイントロン領域を認識するプローブを用いると、転写されて間もない RNA のみを検出できる[30,40]。そこで、体節において *Uncx4.1* を転写している細胞を定量化するため、*Uncx4.1* のイントロン配列を認識するプローブを使用し *Uncx4.1* の転写を一細胞レベルで可視化し、体節の前後極性の評価を試みた。

実験の結果、胎生 9.5 日齢のマウス胚において、*Uncx4.1* の転写アレルは Hoechst33258 で染色した核内にドット状のシグナルとして観察された。共焦点顕微鏡を用いて、胚側面から体軸方向へ深度の異なる複数の画像を取得し、体節内部のそれぞれの細胞について、上下の画像を観察して転写の有無を評価し、転写が起こればオレンジ色に、転写が起これなければ白色に着色した。

その結果、*Nrarp* ヘテロマウスでは、転写が起これている細胞（オレンジ）と転写が起これていない細胞（白）が体節の前後の境界を境にはっきりと分かれていることが確かめられた。一方で、*Nrarp* 欠損マウスでは、転写が起これている細胞（オレンジ）と転写が起これていない細胞（白）の境界で、2 種類の細胞が一部混在する様子が観察された。この結果から、胎生 9.5 日の *Nrarp* 欠損マウス胚では、体節内部の前後極性がわずかに乱れていることが明らかになった(図 9)。これらの結果と、*Nrarp* が主に未分節中胚葉で発現することも考え合わせて、未分節中胚葉で発現する *Nrarp* が体節内部極性の正常な形成に関与すると予想した。

I -3. *Nrarp* 欠損マウス未分節中胚葉で *Hes7* の転写パターンはわずかに乱れる

未分節中胚葉では *Hes7* や *Lfng* は NICD 依存的な転写活性化と、*Hes7* 依存的な転写抑制によって、周期的に発現を繰り返す、振動している。*Lfng* や *Hes7* の転写は未分節中胚葉のそれぞれの細胞中で振動し、その位相が頭尾軸方向の位置によって異なるため、*Lfng* や *Hes7* の発現領域は未分節中胚葉でストライプパターンとなり、未分節中胚葉の末端から上端へ時間経過とともに移動する。このストライプが未分節中胚葉上端に達したタイミングで新しい体節が 1 つ形成される。このとき、*Lfng* 発現領域（ストライプ）が新しい体節の前半となる。つまり、*Lfng* や *Hes7* の発現振動により生じる遺伝子発現のストライプパターンが、体節前後極性の決定に利用

される。*Nrarp* 欠損マウスでは体節の前後極性がわずかに乱れることから、未分節中胚葉における分節時計遺伝子の発現パターン（ストライプ）形成に異常があると予想した。そこで、未分節中胚葉における *Hes7* 転写の on/off を一細胞レベルで定量するため、*Hes7* のイントロン領域を認識する RNA プロブを用いて高感度 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

実験の結果、胎生 9.5 日齢のマウス胚において、*Hes7* の転写アリルは Hoechst33258 で染色した核内にドット状のシグナルとして観察された。*Nrarp* ヘテロマウスにおいて、*Hes7* の転写は未分節中胚葉で振動しているため、これまでの報告通り、未分節中胚葉の上端で転写が観察される場合、未分節中胚葉の中央で転写は見られなかった。一方、*Nrarp* 欠損マウス胚未分節中胚葉において、*Hes7* を転写している細胞は上端と同時に未分節中胚葉中央にも存在した（図 9、矢印）。このことから、*Nrarp* 欠損マウスでは *Nrarp* ヘテロマウスと比較して未分節中胚葉における *Hes7* の転写の on/off の境界があいまいになっていることがわかった。

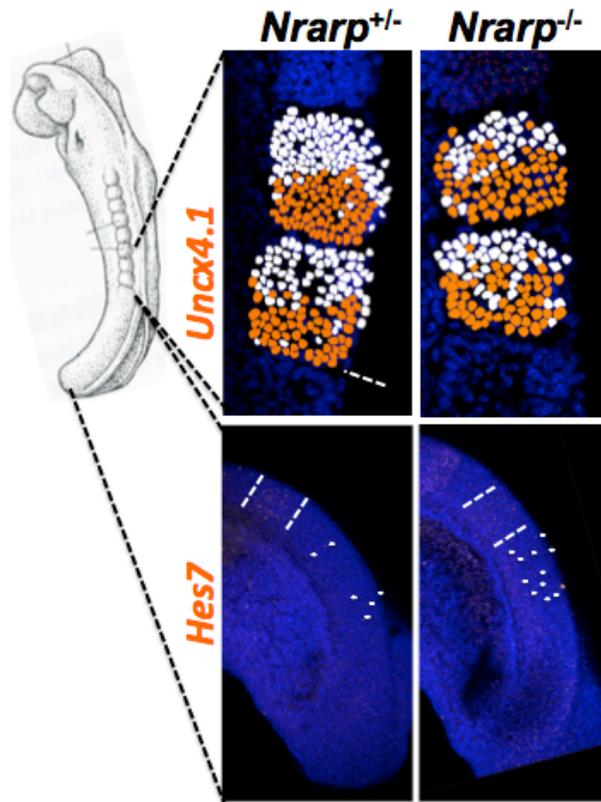


図 9 *Nrarp* 欠損マウス胚体節内部で体節の前後極性と、*Hes7* の発現パターンはわずかに乱れている

胎生 9.5 日齢の *Nrarp* 欠損マウスと *Nrarp* ヘテロマウスについて、*Uncx4.1* と *Hes7* のイントロン配列を認識するプロブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、共焦点レーザー顕微鏡を使用して蛍光像を取得した。それぞれの遺伝子のプレ mRNA はドット状の蛍光として、Hoechst3258 で染色された核内に観察された。*Uncx4.1* につい

て、転写している細胞としていない細胞を調べ、それぞれ疑似カラーでオレンジ色と白色に塗り分けた。*Nrarp* 欠損マウスでは、体節内部の前後の境界で *Uncx4.1* を転写している細胞としていない細胞が混ざっている様子が観察された。

結果 I の要旨

結果 I で明らかになったことをまとめると、*Nrarp* 欠損マウスでは、未分節中胚葉における振動遺伝子のストライプターンがわずかに乱れ、それが体節の前後極性の乱れを生み出し、一部の椎骨で癒合を起こす、つまり、*Nrarp* 欠損マウスの椎骨癒合の表現型は、未分節中胚葉における遺伝子発現振動の乱れに起因すると予想した。この予想が正しければ、*Nrarp* 欠損マウス未分節中胚葉における *Hes7* の発現パターンは外的かく乱因子によって乱れやすいはずである。

II . *Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウスの解析

II -1. *Hes7* のストライプ状の発現パターンを乱す要因

未分節中胚葉において *Hes7* の転写は個々の細胞内で自律的に振動している。そのため細胞分裂などにより一時的に転写が停止した細胞は、隣接する細胞と比較して分節時計遺伝子の振動位相が遅れる（脱同調する）ことが報告されている[41]。つまり、*Hes7* 転写の on/off が隣接する細胞で同時に変化することが、遺伝子発現振動の細胞間同調に必要である。遺伝子の転写は確率的に起こることが知られていることから、*Hes7* のアレルを片方欠損したマウス（*Hes7* ヘテロマウス）では、*Hes7* の転写同調性を低下できると考えた。そこでまず、*Hes7* ヘテロマウスで、*Hes7* の転写がどの程度同調しているかを調べた。転写の同調性を調べるためには転写活性化領域で、*Hes7* を転写している細胞の割合を定量すれば良い[42]。*Hes7* 欠損マウスは *Hes7* の第 2 エキソンより後ろの領域が *LacZ* 遺伝子に置き換わっている[21]。そこで、*Hes7* の野性型アレルから生じた転写産物のみを検出するため、*Hes7* の第 2 イントロンから第 4 エキソンまでの領域を認識する RNA プローブを作成し(図 10A)、胎生 10.5 日齢胚を用いて高感度 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

その結果、*Hes7* の転写産物は、Propidium iodide (PI) で染色した核内にドット状のシグナルとして検出できた。共焦点顕微鏡を用いて、胚側面から体軸方向へ深度の異なる複数の画像を取得し、体節内部のそれぞれの細胞について、上下の画像を観察し、それぞれの細胞で、いくつかのアレルで *Hes7* の転写が活性化されているか定量し、核内に *in situ* のシグナルが 0, 1, 2, 個存在する細胞をそれぞれ白色、水色、青色で着色した(図 10B)。その結果、未分節中胚葉の細胞を *Hes7* 転写活性がある細胞とない細胞に分けることができ、それぞれのサンプルの *Hes7* の転写活性化領域（黄緑色線の枠内）を区切り、この枠内のそれぞれの細胞について、転写活性化アレル数を定量した。その結果、野性型のマウス未分節中胚葉の *Hes7* 転写活性化領域において、*Hes7* の転写アレル数は、50% の細胞が 2 アレル（青色）、40% の細胞が 1 アレル（水色）、10% の細胞が 0（赤色）だった。一方、*Hes7* ヘテロマウスでは 1 細胞あたりの転写活性化アレル数は、80% の細胞が 1 アレル（水色）、20% の細胞が 0（赤色）だった(図 10C)。また、*Hes7* の転写活性化領域において、*Hes7* の転写活性化が見られない細胞の割合は *Hes7* ヘテロマウスで増加していた(図 10D)。これらの結果から、*Hes7* ヘテロマウスでは、*Hes7* の転写活性化領域において、*Hes7* の転写活性がない（脱同調している）細胞が増加することがわかった。

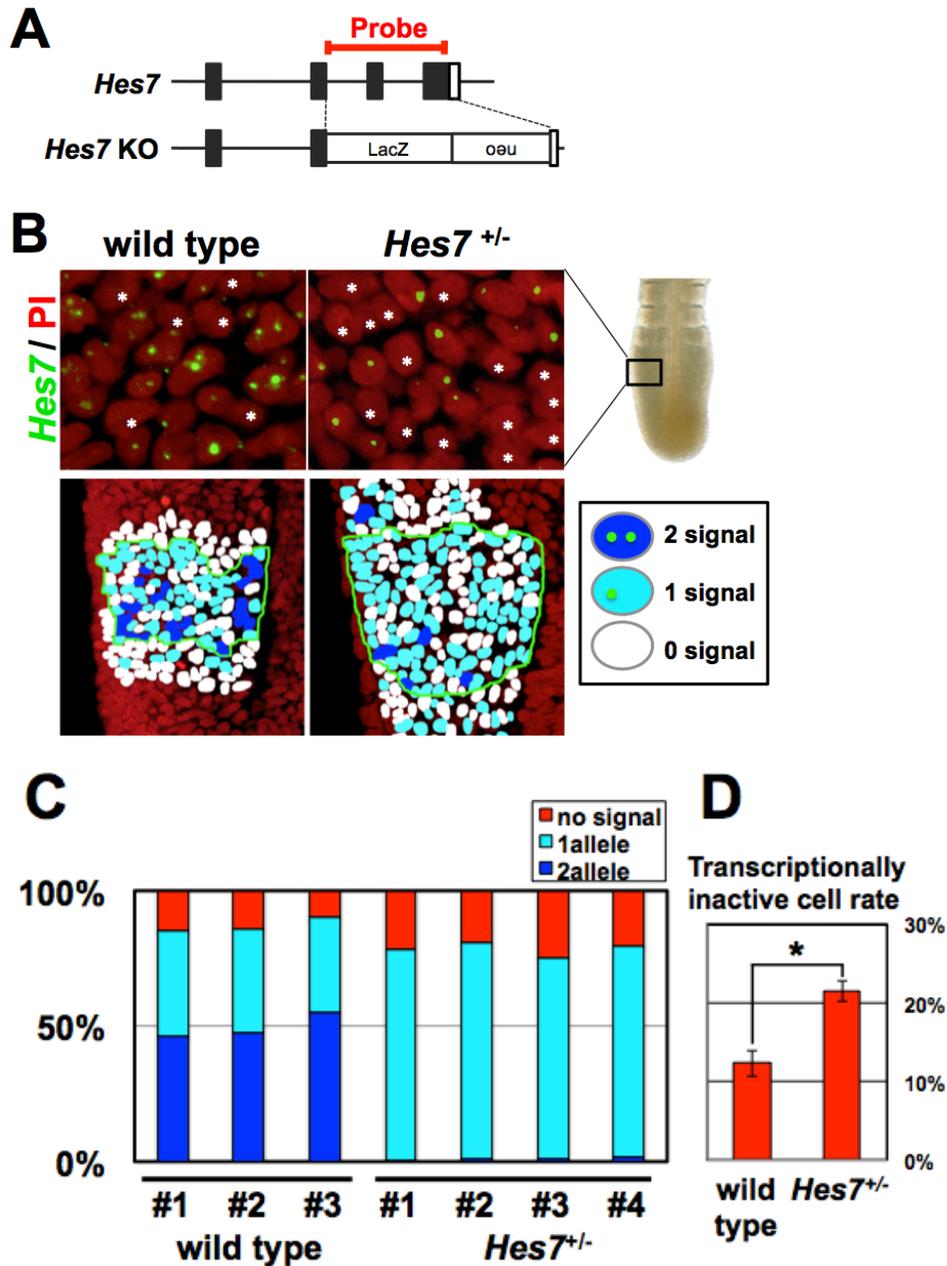


図 10 遺伝子座の欠損は遺伝子発現振動の同調性を低下させる

(A) *Hes7* の第三イントロン以降にプローブを設計し、*Hes7* 欠損アレルを認識しないプローブを作成した。

(B) *Hes7* の高感度 *in situ* ハイブリダイゼーションの結果。核内に *in situ* のシグナルが 0, 1, 2, 個存在する細胞をそれぞれ白色、水色、青色で着色した。

(C) *Hes7* の転写活性化領域 における 1 細胞当たりの *Hes7* の転写活性化アレル数を示した。

(D) *Hes7* の転写活性化領域 において *Hes7* を転写していない細胞の割合を比較すると *Hes7* ヘテロマウスで増加していた。*はスチューデントの t テストで $p < 0.05$ の有意差を示している。

II -2. *Nrarp* 欠損マウスにおける、*Hes7* アリル欠損の影響

結果 I から、*Nrarp* 欠損マウスでは *Hes7* のストライプ状の発現パターンが乱れやすいことが示唆された。また、結果 II-1 から、*Hes7* ヘテロ欠損が *Hes7* 転写振動の細胞間同調性を低下させることを確認できた。そこで、*Nrarp* 欠損マウスで、*Hes7* をヘテロ欠損させ、*Hes7* 転写振動の細胞間同調性を低下させることがどのように影響するか調べた。まず、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚未分節中胚葉で分節時計遺伝子の発現パターンを調べるため、*Lfng* mRNA を認識する RNA プロブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

その結果、9.5 日齢の *Nrarp* 欠損マウス胚未分節中胚葉で *Lfng* の発現はストライプ状の発現パターンを示す一方で、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚で *Lfng* は、未分節中胚葉全体で幅広く発現していた(図 11)。このことから、胎生 9.5 日齢の *Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚で *Lfng* の発現は通常より広がったストライプパターンを示すことがわかった。また、胎生 10.5 日胚でも、*Lfng* の発現パターンを比較した。胎生 10.5 日齢 *Nrarp* 欠損マウス未分節中胚葉において、*Lfng* はストライプ状の発現パターンを示す。一方、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウスでも *Lfng* の発現はストライプ状の発現パターンを示したが、未分節中胚葉全体で弱い発現がみられた(図 11)。これらの結果から、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚において、*Lfng* のストライプ状の発現パターンの on/off の境界が不明瞭になることがわかった。次に、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚における *Lfng* 発現パターンの異常が胚のパターン形成に及ぼす影響を明らかにするため、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚における体節形成パターンと、新生仔における骨格形成パターンを調べた。

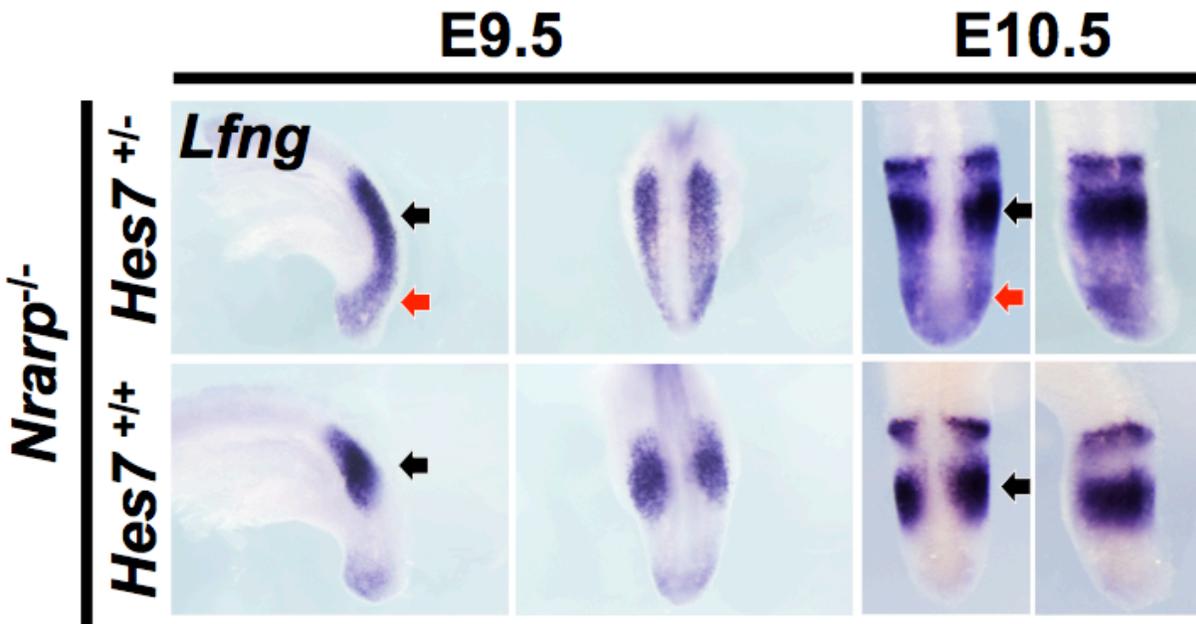


図 11 *Nrarp* 欠損 *hes7* ヘテロマウスで *Lfng* は異常な発現パターンを示す

胎生 9.5 日齢、10.5 日齢の *Nrarp* ヘテロ、*Nrarp* 欠損、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、*Lfng* の発現を調べた。*Nrarp* ヘテロや、*Nrarp* 欠損マウスで、*Lfng* の発現は未分節中胚葉でストライプパターンをとる（黒矢印）。一方、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウスでも、*Lfng* の発現は未分節中胚葉でストライプパターンをとる（黒矢印）が、未分節中胚葉全体で弱く発現が見られた（赤矢印）

II -3. *Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚は体節の内部極性異常を生じる

Nrarp 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚における体節形成パターンを調べるため、胎生 10.5 日齢胚について、体節後部のみで発現する転写因子 *Uncx4.1* を認識する RNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。*Hes7* ヘテロマウスや *Nrarp* 欠損マウスでは *Uncx4.1* は体節後半部のみで発現するため、*Uncx4.1* の発現領域は体節パターンに従い、頭尾軸方向に等間隔の横縞を形成する。一方、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚では、頭側の体節では、*Uncx4.1* は通常通り横縞の発現パターンを示していたが、前肢原基より後ろの部分では体節内部全体で発現し、横縞の発現パターンが乱れていた(図 12A)。この結果から、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚では、胚後半部の体節の内部極性が異常になることが明らかになった。

II -4. *Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス新生仔の椎骨は癒合する

さらに、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚における椎骨形成パターンを調べるため、新生仔の骨格二重染色を行った。野性型マウスでは、椎骨や肋骨の等間隔パターンに乱れは生じず、

Hes7 ヘテロマウスでも同様である。また、*Nrarp* 欠損マウスではこれまで報告したとおり、一部の椎骨で癒合が見られる。一方で、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウスでは胸椎から腰椎にかけて連続的に椎骨が癒合していた(図 12B)。これらの結果から、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウスでは、*Hes7* ヘテロマウスや *Nrarp* 欠損マウスと比較して、多くの椎骨で癒合が起こることが明らかになった。

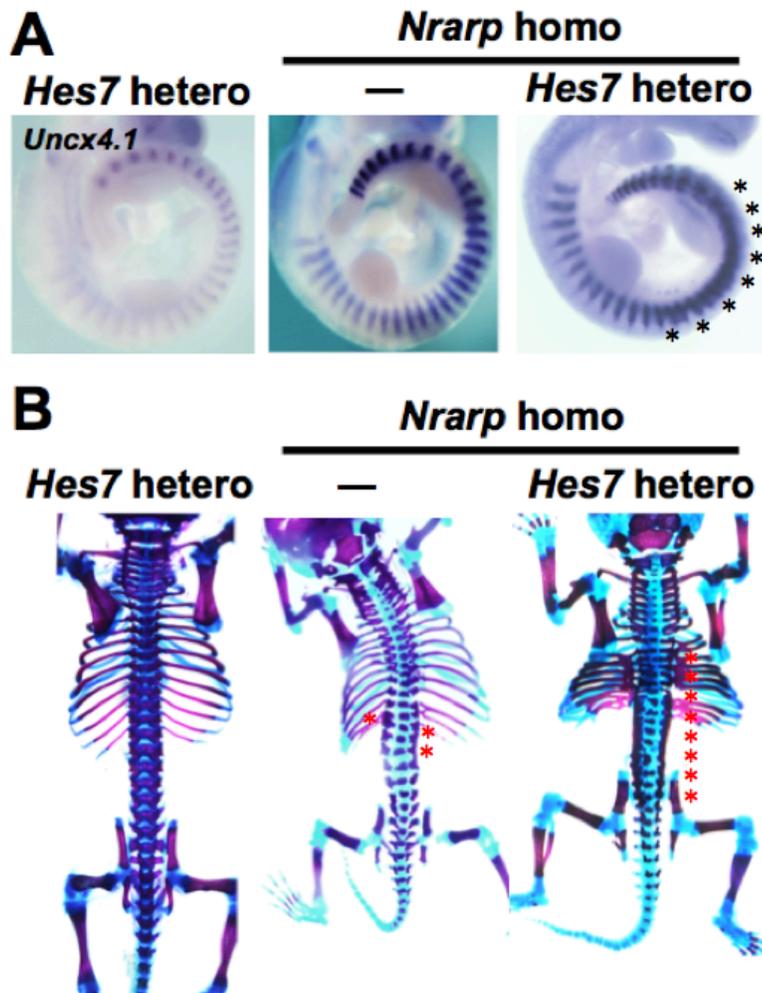


図 12 *Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚の表現型

(A) *Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚における体節形成パターンを調べるため、胎生 10.5 日齢胚について、体節後部のみで発現する転写因子 *Uncx4.1* を認識する RNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

Nrarp 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚では、前肢原基以降の体節で *Uncx4.1* の発現異常 [*] が観察された。

(B) *Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス胚における椎骨形成パターンを調べるため、新生仔の骨格二重染色を行った。

Hes7 ヘテロマウスでは、椎骨や肋骨の等間隔パターンは正常に形成される。*Nrarp* 欠損マウスでは一部の椎骨で癒合[*]が見られる。*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウスでは胸椎から腰椎にかけて連続的に椎骨が癒合する[*]。

結果 II の要旨

結果 II で明らかになったことをまとめると、*Hes7* ヘテロマウスでは、未分節中胚葉の *Hes7* 転写活性化領域において、*Hes7* の転写活性がない細胞（脱同調した細胞）が増加することから、*Hes7* ヘテロマウス未分節中胚葉で *Hes7* の遺伝子発現振動の細胞間同調性は低下することがわかった。*Nrarp* 欠損条件で *Hes7* をヘテロ欠損すると、未分節中胚葉における *Lfng* のストライプ状の発現パターンの on/off の境界が不明瞭になり、体節の極性異常と、椎骨の癒合を生じることが明らかになった。これらの結果と、結果 I から、*Nrarp* 欠損マウスでは、時計遺伝子発現のストライプパターンが乱れやすいことが示唆された。

これまでに、*Nrarp* は未分節中胚葉に発現し、Notch 活性を抑制することが報告されている [36,37]。また、Notch シグナルは未分節中胚葉における遺伝子発現振動の細胞間同調に必要だと報告されている [31]。これらの報告を考え合わせ、*Nrarp* 欠損マウスでは未分節中胚葉における Notch シグナルの調節異常により、分節時計遺伝子の同調性が低下し、*Hes7* のストライプ状の発現パターンが乱れたと予想した。

III. 外的かく乱要因が *Nrarp* 欠損マウスに与える影響

III-1. 催奇形性薬剤バルプロ酸は椎骨形成パターン異常を引き起こす

結果 I, II から、*Nrarp* 欠損マウスでは分節時計遺伝子発現振動の細胞間同調性が低下することが示唆された。分節時計遺伝子の同調性を評価するためには、分節時計遺伝子の発現振動が再同調する過程を観察すれば良い。過去の報告から、バルプロ酸やホウ酸など、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤はマウスの発生中期に投与すると新生仔の椎骨や体節の形成異常を引き起こすことが報告されている [43]。バルプロ酸はヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤として働き、この活性が奇形を誘発すると考えられている。それは、酵素活性を持たない類似化合物は催奇形性を示さないからである [44-46]。これらのことから、バルプロ酸はマウス腹腔内投与後、体内から排出される数時間の間、ヒストンアセチル化酵素の活性を阻害し、椎骨の癒合を引き起こすと考えられる。また、椎骨パターンの形成は体節パターンを利用することから、未分節中胚葉から体節が形成される際の遺伝子発現をバルプロ酸が攪乱すると予想した。

III-2. バルプロ酸投与後、マウス胚のヒストンアセチル化レベルは一過的に上昇する

まず、バルプロ酸の腹腔内投与後、バルプロ酸の血中濃度と、胎仔のヒストンアセチル化レベルの変化を調べた。胎生 10.5 日齢の ICR マウスに 400mg/Kg 体重のバルプロ酸を投与し、30 分、2 時間、4 時間、8 時間後に母親の全血と胎仔を回収し、バルプロ酸濃度とヒストン H3 のアセチル化レベルを調べた。その結果、バルプロ酸の母体血中濃度・胎仔内濃度は、投与 30 分後で上昇し、2 時間後、4 時間後では急激に低下した(図 13A,B)。これらの結果から、これまでの報告どおり、マウス体内に投与されたバルプロ酸は、数時間以内に母体の血中、胎仔内から排出されることが確認できた。また、バルプロ酸投与後のヒストン H3 のアセチル化レベルは投与 30 分後、2 時間後まで上昇し、投与 4 時間後、8 時間後では非投与と同程度に低下した(図 13C,D)。これらの結果から、これまでの報告どおり、バルプロ酸は腹腔内投与後、体内から数時間以内に排出されることが確かめられ、胚内のヒストン H3 のアセチル化レベルも投与後数時間以内に一過的に上昇することがわかった。

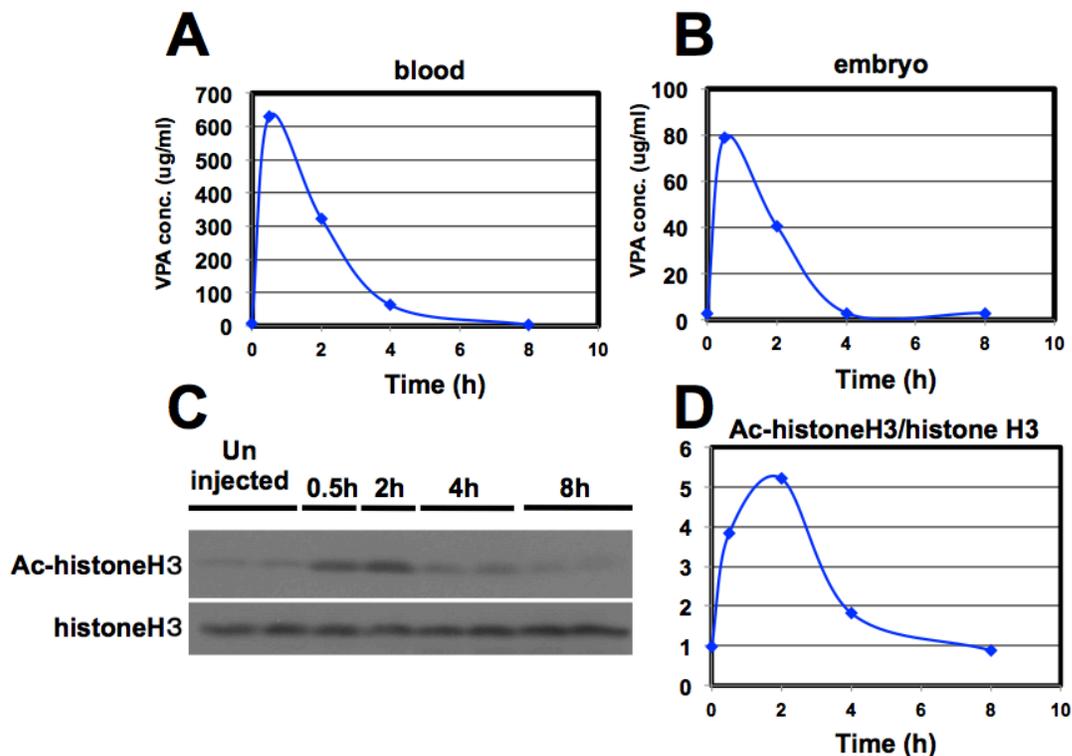


図 13 バルプロ酸投与後、マウス胚のヒストンアセチル化レベルは一過的に上昇する

(A, B)胎生 9.5 日齢のマウス腹腔内に 400mg/Kg 体重のバルプロ酸を投与し、0.5、2、4、8 時間後、胚と血液を採取し、サンプル中のバルプロ酸濃度を測定した。血中・胎仔中のバルプロ酸濃度は投与後 0.5 時間と比較して、投与後 2 時間では減少し、投与後 4 時間では殆ど検出されなかった。

(C)胎生 9.5 日のマウス腹腔内に 400mg/Kg 体重のバルプロ酸を投与し、0.5、2、4、8 時間後、胚を取り出し胎仔中アセチル化ヒストン H3 の割合をウエスタンブロッティングで測定した。コントロールとして、ヒストン H3 抗体を用いた。

(D)アセチル化ヒストン H3 のシグナルをヒストン H3 のシグナルで補正したものである。胎仔中のヒストン H3 のアセチル化レベルはバルプロ酸投与後 0.5 時間、2 時間で上昇していたが、4 時間、8 時間後には低下していた。

III -3. バルプロ酸投与後、未分節中胚葉で遺伝子発現の大きな変化はみられなかった

胎生中期に投与されたバルプロ酸がマウスの椎骨形成に異常を引き起こすことから、胎生中期の体節のパターン形成に関わる遺伝子の発現をバルプロ酸が乱すと推測した。そこで、体節パターンの形成に重要な分節時計遺伝子の発現へのバルプロ酸の影響を調べるため、胎生 9.5 日齢マウス胚にバルプロ酸を投与し、1、4、8 時間後に未分節中胚葉を回収し、定量的 PCR を行った。しかしながら、代表的な分節時計遺伝子 *Hes7*, *Lfng*, *Nrarp* の発現量に大きな変化は見られなかった。また *Wnt*, *Fgf* シグナル下流遺伝子の発現量も同様であった。(図 14)。

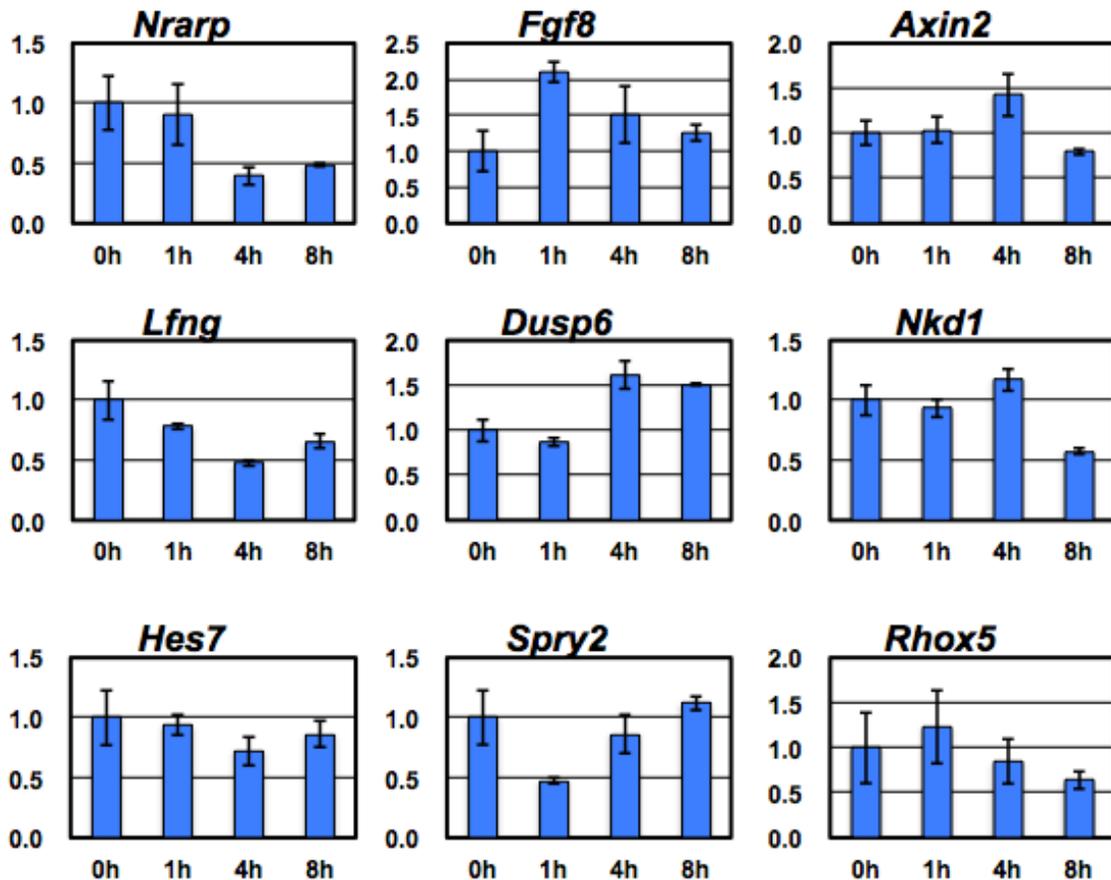


図 14 バルプロ酸投与後の未分節中胚葉における遺伝子発現の変化

胎生 10.5 日のマウス腹腔内に 400mg/Kg 体重のバルプロ酸を投与し、1、4、8 時間後、胚を取り出し、未分節中胚葉における遺伝子発現の変化を調べた。Notch 下流の分節時計遺伝子 (*Nrarp*, *Lfng*, *Hes7*)、Fgf リガンドと下流の遺伝子 (*Fgf8*, *Dusp6*, *Spry2*)、Wnt 下流の遺伝子 (*Axin2*, *Nkd1*, *Rhox5*) の発現を定量的リアルタイム逆転写 PCR で調べた。それぞれの遺伝子の発現量は、バルプロ酸を投与しない場合の発現量を 1 とした相対値で表した。

III -4. *Nrarp* 欠損マウスではバルプロ酸投与後の *Hes7* の発現異常が長く継続する

次に、バルプロ酸投与が未分節中胚葉の遺伝子発現振動パターンに与える影響を調べた。胎生 9.5 日齢のマウスに濃度 400mg/Kg 体重のバルプロ酸を投与し、4 時間後、8 時間後、12 時間後に胚を回収し、*Hes7* イントロン領域を認識するプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い *Hes7* 遺伝子転写パターンがバルプロ酸投与後どう変化するか調べた。

その結果、まず *Nrarp* ヘテロマウスでは、投与 4 時間後未分節中胚葉の広範囲で *Hes7* の転写がみられたが(図 15、黒矢印)、8 時間後以降では *Hes7* 転写活性化領域は正常なストライプパターンを形成していた。一方 *Nrarp* 欠損マウスでは、投与 4 時間、8 時間後ともに未分節中胚葉全体で *Hes7* の転写がみられ、投与 12 時間では、正常なストライプパターンに戻っていた(図 15)。これらの実験結果から、*Nrarp* 欠損マウス、ヘテロマウスともにバルプロ酸投与直後に *Hes7* 転写パターンは乱れ、その後回復することがわかった。また、*Nrarp* 欠損マウスは *Nrarp* ヘテロマウスと比較して、バルプロ酸投与後、*Hes7* が正常なストライプパターンを回復するために時間がかかることが示唆された。このことから、*Nrarp* 欠損マウスではバルプロ酸投与後の *Hes7* 発現パターンの異常が長時間継続し、バルプロ酸投与による遺伝子発現の乱れが長時間体節形成に影響を与えると予想した。

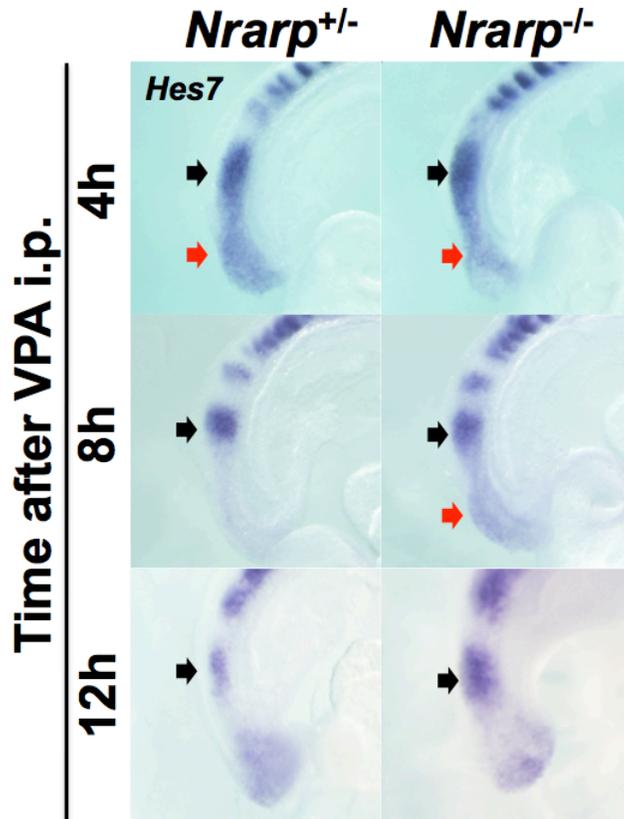


図 15 *Nrarp* 欠損マウス胚でバルプロ酸投与後一過的に *Hes7* の発現が乱れる

胎生 9.5 日齢でバルプロ酸を投与し、投与後 4 時間、8 時間、12 時間後に胚を取り出し *Hes7* 遺伝子の発現パターンを調べた。バルプロ酸投与 4 時間後、*Hes7* の発現は *Nrarp* ヘテロマウス、*Nrarp* 欠損マウスどちらも未分節中胚葉の広い範囲で見られた (黒矢印)。バルプロ酸投与から 8 時間後、*Hes7* の発現は *Nrarp* 欠損マウスの未分節中胚葉の広い範囲で見られた (黒矢印) が、*Nrarp* ヘテロマウスではそのような異常な発現パターンは観察されなかった。バルプロ酸投与から 12 時間後、*Hes7* の発現は *Nrarp* ヘテロマウス、*Nrarp* 欠損マウスどちらも正常であった。

III -5. *Nrarp* 欠損マウスではバルプロ酸投与による極性異常の体節数が増加する

胎生 9.5 日齢のマウス腹腔内にバルプロ酸を投与し、24 時間後の胚を取り出し、体節形成パターンを調べるために、体節後半部で発現する転写因子 *Uncx4.1* mRNA を認識する RNA プロローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。バルプロ酸を投与しない場合、*Uncx4.1* は体節後半部のみで発現し、その発現領域は体節パターンに従い、頭尾軸方向に等間隔の横縞を形成する (図 16)。一方、バルプロ酸を投与した *Nrarp* ヘテロ胚、*Nrarp* 欠損マウス胚では、連続するいくつかの体節において、体節内部全体で *Uncx4.1* の異常な発現がみられた。またそのような体節の数は *Nrarp* ヘテロで 3 個、*Nrarp* 欠損マウスでは 6 個であった (図 16B)。このこと

から、*Nrarp* 欠損マウスはヘテロマウスと比較してバルプロ酸投与により異常が生じる体節の数が増加することがわかった。

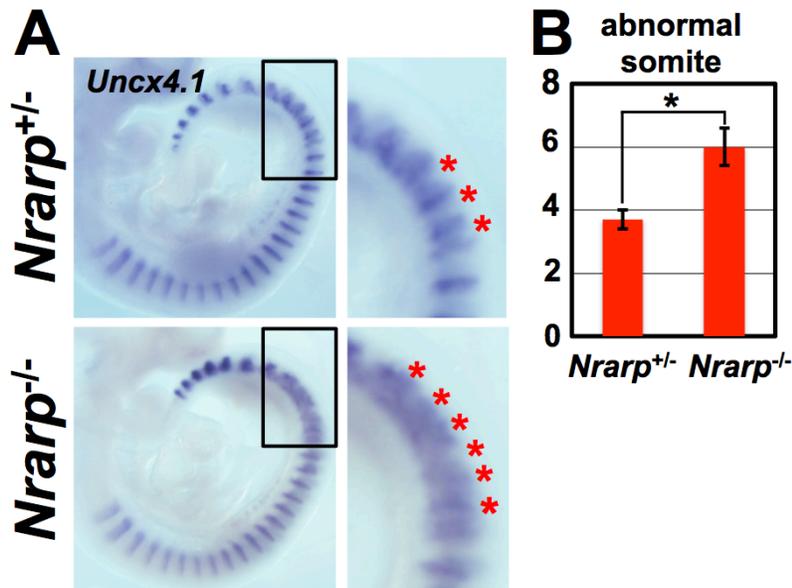


図 16 *Nrarp* 欠損マウスではバルプロ酸投与による極性異常の体節数が増加する

胎生 9.5 日齢のマウス腹腔内に 400mg/Kg 体重のバルプロ酸を投与し、24 時間後、胎生 10.5 日胚を取り出し、*in situ* ハイブリダイゼーション法で *Uncx4.1* 遺伝子の発現パターンを調べた。バルプロ酸の投与によって、拡大図に見られるように *Uncx4.1* の発現異常が観察された。*Nrarp* 欠損マウスと *Nrarp* ヘテロマウスにおいて、癒合を生じた体節の数を比較すると、*Nrarp* ヘテロマウスと比較して *Nrarp* 欠損マウスでは発現異常の生じる体節数が増加していた。誤差範囲は、*Nrarp* ヘテロ: n=6, *Nrarp* 欠損: n=3, での標準誤差であり、*はスチューデントの t テストで $p < 0.05$ の有意差を示している。

III -6. *Nrarp* 欠損マウスではバルプロ酸投与による椎骨癒合が増加する

バルプロ酸投与による、体節形成異常について、*Nrarp* ヘテロとホモのマウスで差があったので、次にバルプロ酸投与による椎骨形成異常を調べるため、胎生 9.5 日齢の妊娠マウスに濃度 400mg/Kg 体重のバルプロ酸を腹腔内投与し、新生仔の骨格 2 重染色を行い、骨格の形成パターンを調べた。その結果、バルプロ酸投与により椎骨の一部で連続的に椎骨の癒合が生じ、椎骨の癒合数は *Nrarp* ヘテロマウス 3 個に対して、*Nrarp* 欠損マウスで 7 個に増加した (図 17)。このことから、*Nrarp* 欠損マウスはバルプロ酸の投与による椎骨の癒合を生じやすいと考えられた。しかし、*Nrarp* 欠損マウスでは元々椎骨の一部に癒合が生じているため、*Nrarp* 欠損マウスではバルプロ酸による椎骨の癒合と元々生じている癒合が合算され、*Nrarp* ヘテロマウスより癒合の生じる椎骨数が増加している可能性が考えられた。

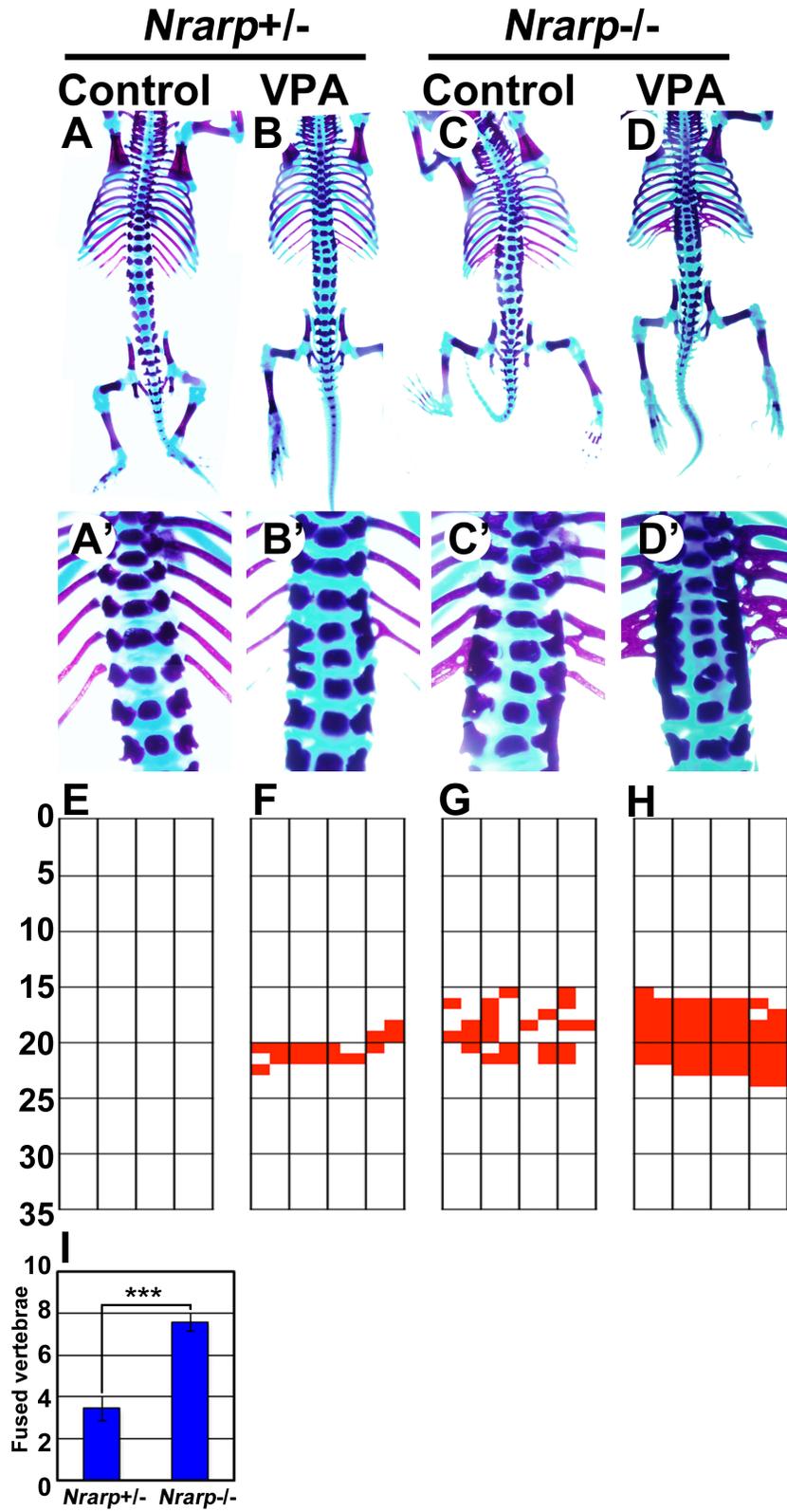


図 17 *Nrarp* 欠損マウスではバルプロ酸投与による椎骨癒合が増加する

(A-D)胎生 9.5 日齢のマウス腹腔内に 400mg/Kg 体重のバルプロ酸を投与し、約 10 日後生まれた新生仔について骨格二重染色を行い、軟骨を青色で硬骨を紫色で染色した。

(E-H)新生仔の椎骨について、前後の椎骨で癒合が見られた位置を調べ、赤色で示した。

(I)*Nrarp* 欠損マウスと *Nrarp* ヘテロマウスにおいて、癒合を生じた椎骨の数を比較すると、*Nrarp* ヘテロマウスと比較して *Nrarp* 欠損マウスでは癒合の生じる椎骨数が増加していた。誤差範囲は、*Nrarp* ヘテロ: n=7, *Nrarp* 欠損: n=5, での標準誤差であり、***はスチューデントの t テストでの $p < 0.001$ の有意差を示している。

そこで、バルプロ酸の投与時期を半日遅らし、胎生 10 日齢で投与する同様の実験を行った。その結果、胎生 9.5 日齢で投与した場合と比較して、体軸方向で後ろに位置する椎骨が癒合した(図 18)。このことから、バルプロ酸は胎生期のマウスに投与された時期に応じて異なる位置の椎骨に癒合を引き起こすことがわかった。また、このとき、*Nrarp* ヘテロマウスでは 1.5 個の椎骨で癒合が生じるのに対して *Nrarp* 欠損マウスでは 3.5 個の椎骨で癒合が生じた(図 18)。この実験からも、*Nrarp* 欠損マウスがバルプロ酸投与によって椎骨の癒合を生じやすいことが確認できた。さらに、*Nrarp* 欠損マウスでは通常この領域で椎骨の癒合はみられないことから、バルプロ酸投与により癒合する椎骨数が *Nrarp* 欠損マウスで増加したことは、元々の癒合が合算された結果ではないことが確かめられた。これらの結果から、*Nrarp* 欠損マウスはバルプロ酸投与による *Hes7* 遺伝子発現パターンの乱れが長時間継続し、体節形成異常が長時間続いたために、多くの体節・椎骨で異常が生じることが示唆された。

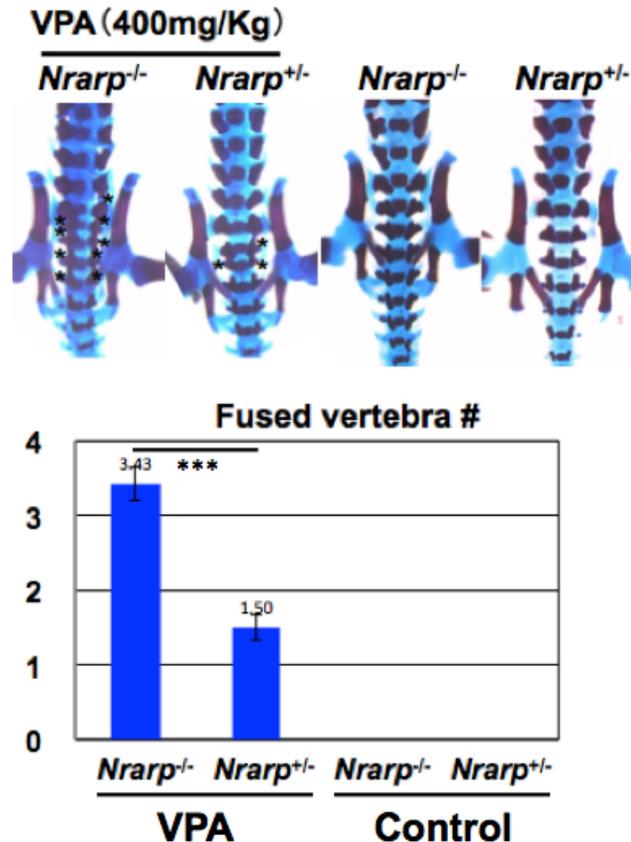


図 18 胎生 10 日目のバルプロ酸投与で生じた椎骨癒合の比較

胎生 10 日齢のマウス腹腔内に 400mg/Kg 体重のバルプロ酸を投与し、約 10 日後生まれた新生仔について骨格二重染色を行い、軟骨を青色で硬骨を紫色で染色した。新生仔の椎骨について、前後の椎骨の癒合を調べ *Nrap* 欠損マウスと *Nrap* ヘテロマウスにおいて、癒合を生じた椎骨の数を比較すると、野性型と比較して *Nrap* 欠損マウスでは癒合の生じる椎骨数が増加していた。誤差範囲は、*Nrap* ヘテロ: n=5, *Nrap* 欠損: n=7, での標準誤差であり、***はスチューデントの t テストでの $p < 0.001$ の有意差を示している。

III -7. *Nrap* 欠損マウス胚ではヒートショックによる椎骨癒合が増加する

マウス発生途中でヒートショックを受けることで新生仔の椎骨に形成異常を生じることから、ヒートショックは催奇形性がある[47]。胚発生中のヒートショックが *Nrap* ヘテロマウスと *Nrap* 欠損マウスの体節形成にどのような影響を与えるかを調べるため、妊娠 9.5 日齢のマウスをペントバルビタールで麻酔し、43°C の温水中で 20 分間保持するヒートショック実験を行った。対照実験として 37°C の温水で同じ実験を行った。ヒートショックの 24 時間後、胚を取り出し、形成された体節を調べるために *Uncx4.1* を認識するプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、*Nrap* ヘテロマウスでは 1 個の体節で *Uncx4.1* の発現が乱れていた。一方で、*Nrap* 欠損マウスでは、3 個の体節で *Uncx4.1* の発現異常が見られた(図 19)。これらのことから、

Nrarp 欠損マウスは *Nrarp* ヘテロマウスと比較して、ヒートショックによる体節形成異常を引き起こしやすいことが明らかとなった。

さらに、胚発生中のヒートショックが *Nrarp* ヘテロマウスと *Nrarp* 欠損マウスの椎骨形成にどのような影響を与えるかを調べるため、ヒートショックから約 10 日後、新生仔の骨格二重染色を行い、椎骨の形成パターン調べた。その結果、*Nrarp* ヘテロマウスでは 37°C、43°C どちらの処理でも椎骨の癒合は見られなかった。また、*Nrarp* 欠損マウスは 37°C 処理（コントロール）条件で、椎骨に個体あたり 1 箇所程度の癒合が生じたが、その頻度はこれまでに報告した *Nrarp* 欠損マウスの表現型と同程度であった。一方、43°C 処理条件で *Nrarp* 欠損マウスの椎骨は個体あたり 6 箇所程度癒合した。

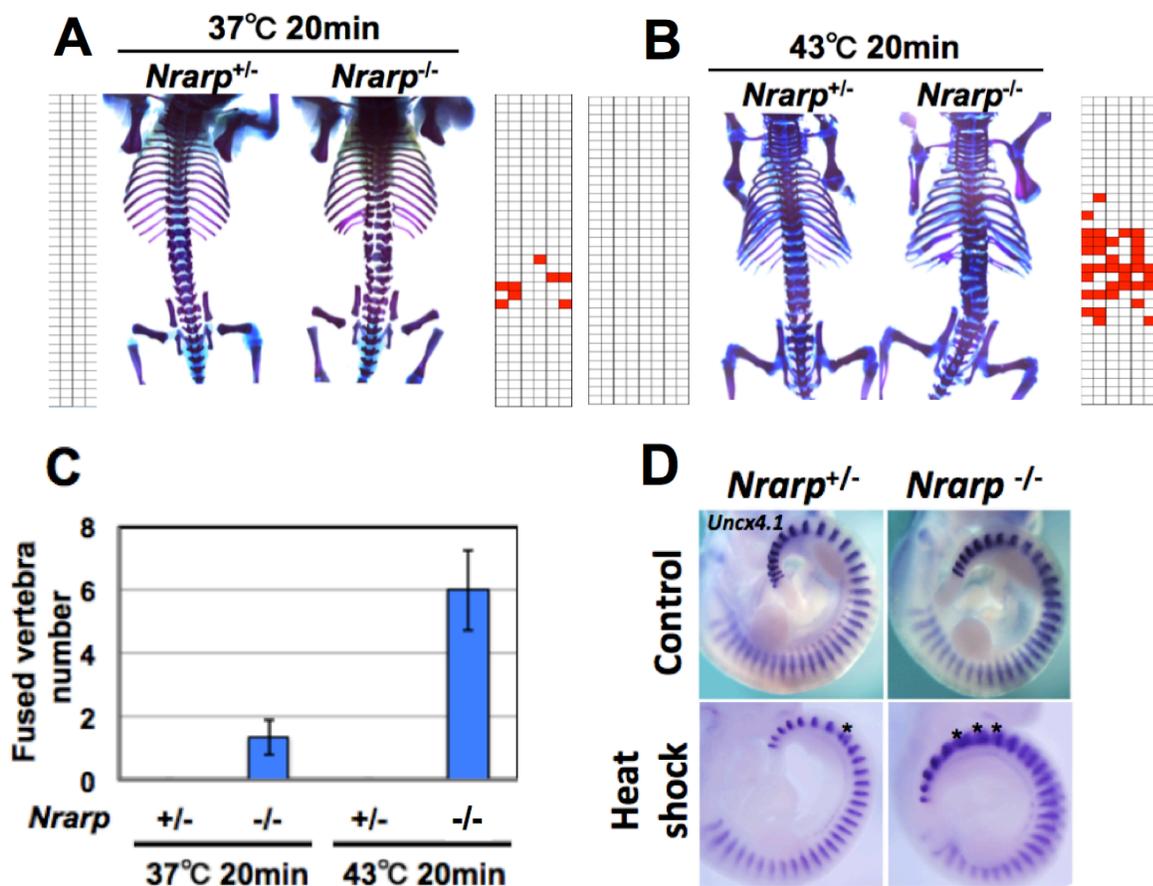


図 19 *Nrarp* 欠損マウス胚では熱刺激による椎骨癒合・体節形成異常が増加する

(A,B)ヒートショックの約 10 日後、新生仔の骨格二重染色を行い、新生仔の骨格パターンを調べた。癒合の見られた椎骨の位置をそれぞれの写真のとなりに赤く示した。

(C)*Nrarp* ヘテロマウスはヒートショック処理で椎骨の癒合は観察されなかったが、*Nrarp* 欠損マウスでは 37°C 処理のコントロールと比較して、癒合の生じる椎骨数が増加した。

(D)胎生 9.5 日齢のマウスに 43°C の恒温槽に 20 分浸ける方法でヒートショック処理を行い、24 時間後胚を取り出し、

Uncx4.1 の発現を指標に、形成された体節の極性を調べた。*Nrarp* 欠損マウスでは *Nrarp* ヘテロマウスと比較して異常の見られる体節 [*] の数が増加していた。

III-8. 振動子同調過程のシミュレーション

これまでの結果から、*Nrarp* が未分節中胚葉で *Notch* 活性を調節し、*Hes7* 遺伝子発現振動の同調性を維持することが示唆された。そこで、*Nrarp* 欠損条件で遺伝子発現振動の同調がどのような影響を受けるか調べるために *Notch* シグナル下流で、*Hes7*、*Lfng*、*Nrarp* の発現が振動する数理モデルを用いて遺伝子発現振動が同調する過程のシミュレーションを行った。具体的には Lewis モデル(図 20, [17])に従って遺伝子発現が振動する細胞を基盤の目に配置し、それぞれ周囲の 4 細胞と接する状況を仮定した。このモデルで中央の細胞 (赤) が周囲の細胞 (青) 4 つと逆位相で振動を開始するという条件でシミュレーションした(図 21A)。その結果、赤細胞と青細胞の間の振動位相のずれは時間経過とともに低下することを再現できた(図 21B、WT)。一方、*Nrarp* 欠損条件をシミュレーションに追加すると、分節時計遺伝子の同調が遅れた(図 21B、KO)。

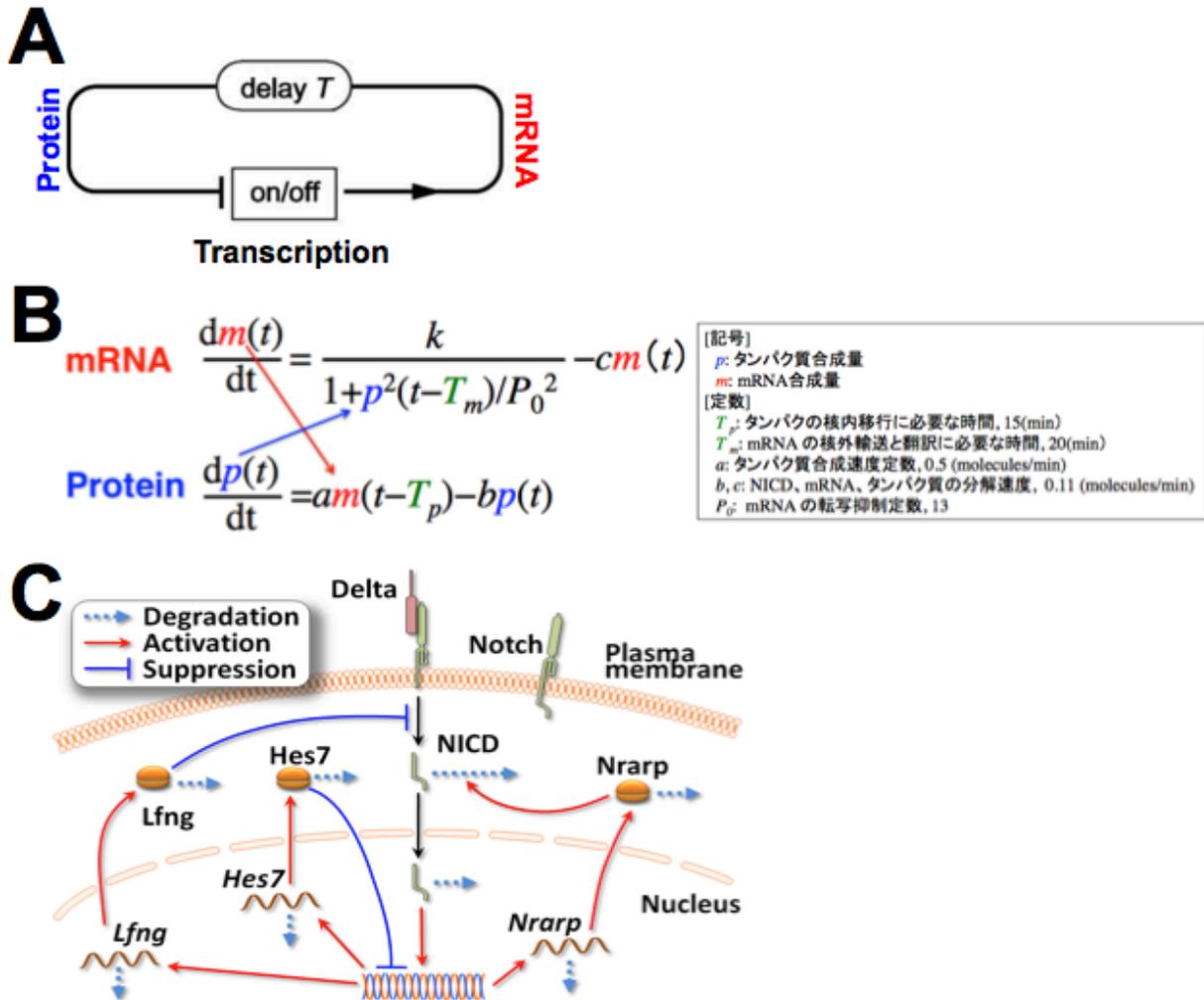


図 20 振動子同調のシミュレーション

(A) Lewisらが報告した[17]数理モデルを用いる。このモデルでは、転写抑制因子 Hes が時間遅れをともなって自身の転写を抑制するフィードバック経路を想定する。時間遅れとは、Hes7 遺伝子 mRNA が合成され、核外に移行し、翻訳され、合成されたタンパク質が転写を抑制するのに費やす時間である。

(B)フィードバック経路における mRNA 量とタンパク質量の関係は、このような反応速度式で表される。タンパク質の合成量は mRNA 存在量 m に応じて増加し、mRNA 合成量はタンパク質量 p に応じて減少する。これは、Hes7 タンパク質が転写抑制因子として自身の転写を抑制するためである。この経路をもとにシミュレーションを行い、細胞内部の遺伝子発現振動を再現する。

(C) Notch シグナル下流で発現振動する遺伝子群の模式図。Hes7 は転写のフィードバック制御により自ら振動するとともに、下流の遺伝子 (*Lfng* など) の発現を振動させる。Lfng は Notch 細胞外ドメインを糖鎖修飾し、活性を低下させるので、Notch の活性も振動する。

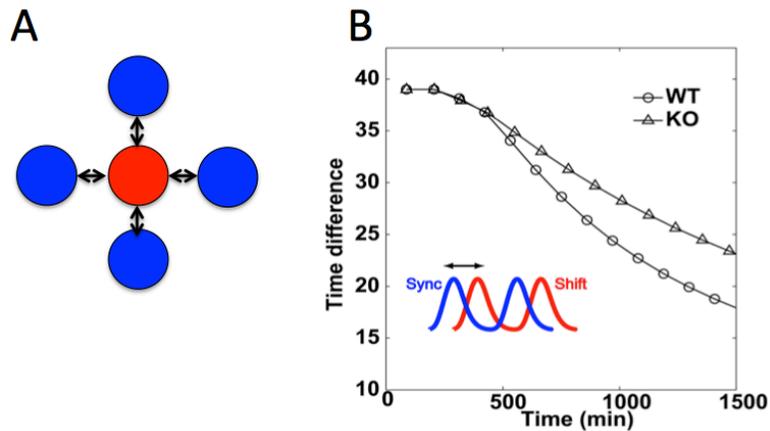


図 21 振動子同調のシミュレーション

(A) 未分節中胚葉における遺伝子発現振動をシミュレーションするため、遺伝子発現が振動する細胞を仮定し、それぞれの細胞は他の 4 細胞と接すると仮定した。このモデルで中央の細胞（赤）が周囲の細胞（青）4 つと逆位相で振動を開始するという条件でシミュレーションした。

(B) シミュレーションの結果、赤細胞と青細胞の間の振動位相のずれは時間経過とともに低下することを再現できた（図 B、WT、○）。一方、*Nrarp* 欠損条件をシミュレーションに追加すると、分節時計遺伝子の同調が遅れた（KO、△）。

結果 III の要旨

結果 III で明らかになったことをまとめると、バルプロ酸投与により *Hes7* のストライプパターンが乱されるが、*Nrarp* 欠損マウスではその発現パターンの乱れが長時間継続する。そのため、バルプロ酸投与により形成異常となる体節数、椎骨数は *Nrarp* ヘテロマウスと比較して *Nrarp* 欠損マウスで増加する。また *Nrarp* 欠損マウスはバルプロ酸だけではなく、ヒートショックによっても、体節・椎骨の形成異常を生じやすい。つまり、*Nrarp* は未分節中胚葉において、時計遺伝子の発現振動の同調性を保つことで外部環境刺激に対して安定的な体節・椎骨の形成機構を作っていると考えられた。

考察

Nrarp の役割と、欠損マウスの表現型について

これまでに、***Nrarp*** は未分節中胚葉で発現し、**Notch** 活性を抑制することが報告されている[36,48]。また、***Nrarp*** 欠損マウスでは、一部の椎骨の癒合が起こることが報告されていた。この表現型は、**Notch** シグナル制御下で遺伝子発現振動する他の遺伝子 (***Lfng***・***Hes7***) 欠損マウスの表現型と比較して軽微である[21,49]。未分節中胚葉では、**NICD** により転写活性化された***Hes7***がセルフフィードバックによって振動し、同時に***Lfng***の転写を振動させ、**Lfng**タンパク質はゴルジ体において**Notch** 受容体の細胞外ドメインを修飾し、**Notch** 受容体の感受性を調節し**Notch** 活性化ドメイン (**NICD**) の生成を抑制する[50-52]。つまり、**NICD**、***Hes7*** と ***Lfng*** は遺伝子発現振動において相互にフィードバックするため、これら遺伝子の欠損マウスでは、重篤な椎骨形成異常が生じると考えられる。一方、***Nrarp*** は細胞内の **NICD** 濃度を調整するため、***Nrarp*** が欠損しても、遺伝子発現振動の中心となる仕組みは残るために、***Nrarp*** 欠損マウスでは一部の椎骨のみで癒合が生じると考えられる。

Hes7 の転写振動の細胞間同調性について

野性型マウス未分節中胚葉において、***Hes7*** の転写活性化領域で、2 アリルから転写している細胞は 50%、1 アリルから転写している細胞は 40% だった。このことから、野性型マウスが持つ 2 つの ***Hes7*** アリルの転写は必ずしも同時に起こらないことがわかった。また、2 アリルから***Hes7***を転写している細胞において、2 つのアリルの ***Hes7*** の転写強度に差が見られる場合が多かった。このことから、野性型マウスにおいて、***Hes7*** の転写環境はアリルごとに異なり、必ずしも転写は同時に起こらないことがわかった。一方、***Hes7*** ヘテロマウスでは、***Hes7*** 転写活性化領域において 80% の細胞が 1 アリルから ***Hes7***を転写していた。つまり、***Hes7*** の転写活性化領域において、1 つのアリルからは 80% の確率で転写が起こると考えられる。このことから、***Hes7*** アリルが 2 つある場合に、両方のアリルから同時に転写が起こる確率は $80\% \times 80\% = 64\%$ だと計算できる。実際、野性型マウスでは 50% の細胞で 2 アリルから転写が観察され、計算結果と大きくは違わない。実測値は計算よりやや少ないが、この説明として ***Hes7*** ヘテロマウスで ***Hes7*** タンパク質量が減少しているために、***Hes7*** の転写活性が上昇した可能性が考えられる。

今回の研究結果では、未分節中胚葉の転写活性化領域において、野性型マウスでは 10% の細胞で遺伝子発現振動が脱同調していた一方で ***Hes7*** ヘテロマウスでは 20% の細胞が脱同調していた。それにもかかわらず、これまでの報告では ***Hes7*** ヘテロマウスにおいて ***Hes7*** や ***Lfng*** の発現パターンや、体節形成パターンに明確な異常はなく、表現型としても尾部先端の湾曲が

報告されるのみと、非常に軽微である[21]。このことから、*Hes7* ヘテロマウスでは *Hes7* の転写振動の細胞間同調性が低下するが、内在する同調機構によって、遺伝子発現の振動が同調するために、分節時計遺伝子の発現パターンや、骨格形成パターンに異常が見られないと考えられる。一方で、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス新生仔では、胸椎以降の椎骨で連続的に癒合が生じたことから(図 12B)、*Nrarp* が、*Hes7* の転写振動の同調機構に必要であると考えられる。

過去の報告から、*Notch* の変異体で遺伝子発現振動の同調性が低下すると、分節時計遺伝子の乱れが徐々に蓄積するため、胚発生の初期に比べ、胚発生の後期に形成される体節で異常が生じることが報告されている[53]。今回、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス新生仔では、胸椎の後半以降の椎骨が癒合しており、この表現型は、分節時計遺伝子の発現の乱れの蓄積により、椎骨癒合を生じた可能性を示唆している。ただし、*Nrarp* 欠損 *Hes7* ヘテロマウス新生仔では腰椎より後ろの椎骨で癒合は生じない(図 12B)。*Nrarp* 欠損マウスでもこの領域では椎骨の癒合は生じないことから、この領域の椎骨に相当する体節が形成される胎生 11 日齢以降の体節形成では、*Nrarp* 欠損条件下でも遺伝子発現振動が同調しやすい機構があると考えられる。

バルプロ酸投与後のバルプロ酸血中濃度とヒストンアセチル化レベルの変化について

今回、10.5 日齢マウスに濃度 400mg/Kg 体重でバルプロ酸を腹腔内投与し、30 分後、2 時間後、4 時間後、8 時間後に母親の全血と胎仔を回収し、血中・胎仔内バルプロ酸濃度と、胎仔内ヒストン H3 のアセチル化レベルを調べた。その結果、血中・胎仔内バルプロ酸濃度はともに、投与 2 時間後には 0 時間（非投与、対照実験）と同程度まで低下していた(図 13A,B)。このことから、腹膜から血中に吸収されたバルプロ酸は数時間以内に代謝され、母体血中濃度は急激に低下し、それに応じて胎仔内濃度も低下することが確認できた。一方で、胎仔中のヒストンアセチル化レベルは投与後 2 時間まで上昇し、その後低下した(図 13C,D)。胎仔中ヒストンアセチル化レベルの上昇が、バルプロ酸濃度の上昇に引き続き起こることから、投与したバルプロ酸がヒストンアセチル化レベルを亢進させたと考えられる。

バルプロ酸投与後の遺伝子発現の変化

バルプロ酸投与により、ヒストンのアセチル化が亢進する結果、非特異的に遺伝子の転写活性が上昇すると考えられたので、バルプロ酸投与 1 時間後、4 時間後、8 時間後の胚から未分節中胚葉を回収し、定量的 PCR で体節形成に関わる *Notch*、*Wnt*、*Fgf* に関係する遺伝子の発現量の変化を調べたが、バルプロ酸投与後、これらの遺伝子の発現量に大きな変化は見られなかった。その理由として、これら体節形成に関与する遺伝子の発現量が周期的に変化すること、またフィードバック制御を受けることが考えられる。

バルプロ酸投与による分節時計遺伝子の発現の乱れと体節の形成異常について

胎生 9.5 日齢のマウス腹腔内にバルプロ酸を投与する実験により、*Nrarp* 欠損マウスは *Nrarp* ヘテロマウスと比較して、バルプロ酸投与により生じた *Hes7* 発現パターンの異常が回復するために時間がかかることが明らかになった。このときバルプロ酸による *Hes7* 発現パターンの異常は、*Nrarp* ヘテロマウス、*Nrarp* 欠損マウスでそれぞれ、4 時間、8 時間観察された。この 4 時間ないし、8 時間で新たに 2 個ないし、4 個の体節が形成されたと予想され、バルプロ酸投与後、*Hes7* の発現パターン異常が継続した間に体節の形成異常が起きたと考えると、バルプロ酸投与により *Nrarp* ヘテロマウスと *Nrarp* 欠損マウスで、それぞれ 3、6 体節に異常が生じたことはおおむね説明できる。

バルプロ酸による体節形成異常数と、椎骨癒合数の関係

胎生 9.5 日齢のマウスに対してバルプロ酸を投与した結果、体節の異常は *Nrarp* ヘテロマウスと *Nrarp* 欠損マウスでそれぞれ、3 個、6 個生じ、椎骨の癒合はそれぞれ、3 箇所、7 箇所生じた。つまり、バルプロ酸投与により異常が生じる体節と椎骨の数は良く一致していた。また、胎生 9.5 日齢マウスへのバルプロ酸処理実験で異常が生じた体節の前後軸方向の位置は、将来胸椎に分化する位置であり、同じ時期にバルプロ酸を投与した新生仔で癒合が生じる椎骨の位置と良く一致する。これらのことから、バルプロ酸投与により体節の形成異常がおこり、それが椎骨の癒合を引き起こすと考えられる。

バルプロ酸の投与時期と椎骨の癒合位置の関係

バルプロ酸投与実験で、胎生 9.5 日齢でバルプロ酸を投与した場合、胸椎に癒合が生じ、胎生 10 日齢でバルプロ酸を投与した場合、腰椎に癒合が生じた。つまり、バルプロ酸を投与する時期を遅らせると、形成異常が生じる椎骨の位置が尾側に移動することがわかった。体節は発生過程で胚の頭側から連続的に形成されることを考え合わせると、胎生期に投与されたバルプロ酸は投与された時期に形成中の体節に異常を引き起こしたと考えられる。

ヒートショックによる体節・椎骨の形成異常について

Nrarp 欠損マウスは *Nrarp* ヘテロマウスの発生には影響しない程度の弱いヒートショックに影響を受けて体節と椎骨の形成異常を生じることがわかった。このことから、*Nrarp* 欠損マウスはバルプロ酸だけでなくヒートショックなど、他の外部環境刺激によって奇形を生じやすいと考えられる。体節や椎骨のパターンは、未分節中胚葉における遺伝子発現のストライプパターンを利用し

て形成されることから、*Nrarp* 欠損マウスでは外部環境刺激によって、このパターンが乱れやすいと考えられる。

***Nrarp* 欠損マウスの分節時計遺伝子同調シミュレーション**

未分節中胚葉細胞のそれぞれの細胞の中では **Notch** シグナル下流でいくつかの遺伝子の発現が振動している。転写抑制因子 **Hes7** は **Notch** シグナル下流で発現し、**Hes7** タンパク質が自身の転写を抑えるフィードバック機構により、その発現が振動する。**Hes7** は自分自身だけではなく **Lfng** など下流の遺伝子の発現も振動させる。**Lfng** は **Notch** の細胞外ドメインの修飾を介して **Notch** 活性を抑制するため、細胞内部の遺伝子発現の振動に合わせて細胞膜状の **Notch** 活性も振動する。つまり、細胞間での振動位相がずれた場合、隣接する細胞で **Notch** 活性に差が生じ、この差を認識して、遺伝子発現振動の同調が行われる。これまでに、**Notch** 活性の強弱が遺伝子発現振動の周期を調節することが報告されており、を *Nrarp* 欠損マウスでは細胞内の **NICD** 濃度が上昇しているために、隣接する細胞間での **Notch** 活性の振動が同調しても、その変化が内部の遺伝子発現振動に伝わりにくいため、隣りあった細胞間で遺伝子発現振動が同調しづらいと考えられる。。

第二章 3'UTR を介した転写後調節による mRNA の分解制御

序論

体節形成における遺伝子発現振動

脊椎動物の骨格に見られる規則正しい繰り返し構造は、発生中期に胚の尾部（未分節中胚葉）から繰り返し分化する体節と呼ばれる組織に由来する[3,53]。未分節中胚葉における体節形成の周期性は、分節時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群の周期的な発現変化（遺伝子発現振動）によって生み出される。この分節時計遺伝子の中で中心的な役割を果たすのが *Hes7* (*Hairy/Enhancer of Split genes-7*) と *Lfng* (*Lunatic fringe*) である。

Hes7 と *Lfng* を中心とした遺伝子発現振動

Hes7 は bHLH 型の転写抑制因子で、Notch 活性化細胞内ドメイン (NICD) によって転写が活性化され、様々な遺伝子の転写を抑制するが、自身のプロモーターにも結合し、転写を抑制する特徴がある。すなわち、*Hes7* の発現はフィードバック制御されており、転写、翻訳、*Hes7* タンパク質による自身の転写抑制、タンパク質の分解・転写再開のプロセスが時間遅れを伴いながら繰り返し、振動すると考えられている。

Lfng は *Hes7* と同様に NICD による転写活性化と *Hes7* による転写抑制により制御され、未分節中胚葉において 2 時間周期で振動する[20]。Lfng タンパク質は未分節中胚葉で Notch 細胞外ドメインの糖鎖修飾を介して Notch 活性を調節し、Notch 活性の振動を引き起こす[54]。つまり、*Hes7* はフィードバック制御により自身が振動すると同時に、*Lfng* の発現振動を介して、*Hes7* 上流の NICD 量を振動させる。*Hes7* と *Lfng* どちらの欠損マウスにおいても、分節時計遺伝子の発現振動は見られなくなり、体節形成異常を示すことから、*Hes7* と *Lfng* の協調した発現振動は分節時計遺伝子の振動と正常な体節形成に必須の機構である[21,49]。

mRNA の転写後調節

遺伝子の発現量や発現領域は mRNA の合成（転写調節）だけでなく、mRNA の分解や翻訳効率の調整など、転写後の mRNA においても調節されている。例えば、ショウジョウバエの胚発生において、組織や、細胞の種類ごとに異なる 3'UTR をもつ mRNA が合成され、遺伝子発現領域が調節されている[55,56]。その他、概日時計遺伝子 *Per2* や *Cry1*、*Clock* が 3'UTR を介した転写後調節を受けることが報告されている[57-60]。これらのことから、多くの遺伝子が転写後

調節によって、mRNA 発現量や発現範囲が調節されると考えられる。

mRNA の配列は大きく翻訳領域と非翻訳領域に分けられる。mRNA の翻訳領域は非翻訳領域に挟まれており、5'側末端と 3'末端の非翻訳領域はそれぞれ、5'側非翻訳領域と 3'側非翻訳領域と呼ばれている。mRNA が翻訳される際、mRNA の翻訳領域には多数のリボソームが結合し、ポリソームと呼ばれる構造を形成し、連続的にタンパク質合成を行う。そのため、mRNA の転写後調節を行う RNA 結合タンパク質や mi-RNA は mRNA の非翻訳領域のターゲット配列に結合し、mRNA の安定性や翻訳活性を調節することが多い。したがって、mRNA の転写後調節においては、3'側と 5'側の非翻訳領域が重要である。

分節時計遺伝子の転写後調節

分節時計遺伝子の mRNA は、マウス未分節中胚葉において 2 時間周期で合成・分解を繰り返す[9]。このように遺伝子発現が短時間に動的に変化するためには、mRNA の合成だけではなく mRNA の分解も素早く行われる必要がある [61]。実際にニワトリ胚未分節中胚葉では *Lfng* の転写活性化領域は mRNA の発現領域とほとんど同であることが報告されていた[40]。このことから、合成された *Lfng* mRNA は素早く分解されることが予想された。その後、ニワトリに転写阻害剤アクチノマイシン D を処理する実験から、*Fgf8* mRNA と比較して *Lfng* mRNA は素早く分解されることが報告された[12]。さらに、ニワトリ胚と Tet-OFF システムを用いた研究から、*Lfng* 3'UTR は *Fgf8* 3'UTR と比較して、レポーターmRNA を不安定化することが報告されている[62]。これらの結果から、*Lfng* mRNA は 3'UTR を介した転写後調節によって素早く分解される可能性が示唆されていた。

Lfng と *Hes7* の発現領域の違い

Lfng と *Hes7* は Notch シグナルと *Hes7* タンパク質による共通の転写制御を受けるにも関わらず、それら mRNA の発現パターンは異なり、*Hes7* は *Lfng* と比較して、より広い範囲で mRNA が発現することが報告されていた。本研究ではこれら 2 つの遺伝子の 3'UTR 配列の違いに注目し、これら遺伝子の転写後調節の差異が、共通の転写調節から、それぞれ固有の mRNA 発現パターンを生み出すという仮説を立てた。

実験方法と実験材料

in situ ハイブリダイゼーション

氷冷した PBS 中で解剖した胚を 4℃の 4% パラフォルムアルデヒド (PFA)/PBS で一晩固定する。翌日、胚を PBS で 10 分間 3 回洗う。25% メタノール/PBS、50% メタノール/PBS、75% メタノール/PBS、100% メタノール、100% メタノールの順に 10 分ごとに液交換を行い、胚をメタノールで脱水する。脱水した胚は -30℃で保存する。脱水した胚を 75% メタノール/PBS、50% メタノール/PBS、25% メタノール/PBS、PBST、PBST の順番で 10 分ごとに液交換し、再水和する。6% H₂O₂/PBST に液交換し、15 分間室温で静置する。PBST を 10 分ごとに 3 回液交換する。10μg/mL の Proteinase K (Roche) /PBST に液交換し、室温で静置 (妊娠 10 日目の胚は 10 分間、尾部のみのサンプルは 8 分間) する。氷冷した 2mg/mL のグリシン/PBST に液交換し、PBST で洗浄する。4% PFA 0.2% glutaldehyde/PBST に液交換し、20 分間室温で静置する。PBST を 5 分ごとに 3 回液交換する。70℃の Hybridization buffer (50% ホルムアミド、5XSSC pH4.5、50μg/mL tRNA [Roche]、1% SDS、50μg/mL Heparin) を加えて、70℃のハイブリオープン (TAITEC) 中で 1 時間転倒混和する。70℃のヒートブロック上で 300ng/mL のプローブを含む 70℃の Hybridization buffer に置換する。DIG プローブは DIG RNA Labeling kit (Roche) を用いて作成し、エタノール沈殿精製の後、70℃の Hybridization buffer を加えて溶解し、85℃で 15 分間熱処理し、氷冷し変成させ、70℃の Hybridization buffer に希釈した物を用いる。内在性 *Lfng* と *Hes7* の mRNA とプレ mRNA はそれぞれ、タンパク質コード領域とイントロン領域に対するプローブを用いて検出した。70℃で一晩振盪する。プローブは回収し、-20℃で保存する。70℃の Solution1 (50% ホルムアミド、5XSSC pH4.5、1% SDS) に置換し、70℃で 1 時間転倒混和する。この操作を計 3 回繰り返す。Solution1 を 65℃の Solution3 (50% ホルムアミド、5XSSC pH4.5) に置換し、65℃で 1 時間転倒混和する。この操作を計 2 回繰り返す。Solution3 を室温の TBST に置換し、5 分間静置する。この操作を計 3 回繰り返す。TBST を 10% Sheep serum/TBST に置換し、1 時間静置する。10% Sheep serum/TBST を 1/2000 抗 DIG Sheep 抗体 (Roche) 入の 10% Sheep serum/TBST に置換し、4℃で一晩静置する。抗体を除き、TBST を加え、10 分転倒混和する。この操作を 10 回繰り返す。TBST を除き、NTMT (100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH9.5, 0.1% tween20) を加え、室温で 5 分転倒混和する。この操作を 2 回繰り返す。NTMT を Color solution (2.25μl NBT, 3.5μl BCIP/NTMT) に置換する。遮光して常温で発色させ、10 分に 1 度発色の程度を観察しつつ、通常 1 時間程度発色を行う。発色完了後、発色液を除き、PBT で洗浄し、4% PFA/PBT を加え保存する。

Venus 発現ベクターの作成

トランスジェニックマウスを作成するため、プロモーター領域を含む *Hes7* 遺伝子転写開始点より上流 2.4kb をサブクローニングした。ヒトの β グロビンイントロンを pCI プラスミド (Promega) からサブクローニングし、pCS2-Venus (宮脇敦史先生, 理研から分与) の Venus 遺伝子上流に挿入した。Venus 配列の後には、pGL4.12 プラスミド (Promega) 由来の PEST 配列と、pEYFP-Nuc プラスミド (Clontech, Mountain View, CA, USA) 由来の核局在シグナルを挿入した。私は、*Lfng* もしくは *Hes7* の 3'UTR 配列を Venus-PEST-NLS の下流に挿入し、*Hes7p-Venus-Lfng 3'-UTR* と *Hes7p-Venus-Hes7 3'-UTR* をそれぞれ作成した。このプラスミドの概略図は(図 27A) に示す。培養細胞でこのレポーターを発現させるため、*Hes7* プロモーターは、pRL-TK (*Thymidine Kinase*) ベクター (Promega) 由来の TK プロモーターに置き換えられ *TK-Venus-Lfng 3'-UTR* と *TK-Venus-Hes7 3'-UTR* ベクターをそれぞれ作成した。このプラスミドの概略図は(図 26A) に示す。

マウス胚培養とアクチノマイシン D 処理

胚培養には、胎生 10.5 日齢の CD1 マウス胚を用いる。胚の後半部を神経管に沿って半分に切り分け、片方を直ちに 4% のパラホルムアルデヒドで固定し、他方を、10% のウシ胎仔血清を添加した DMEM 培地 (Nacalai, Kyoto, Japan) 中で 1 時間培養する。培養は、細胞培養器で湿度と温度 (37°C)、二酸化炭素濃度 (5%) をコントロールして行う。mRNA の安定性を調べる際、RNA ポリメラーゼ II を抑えて転写を止めるため、転写阻害剤アクチノマイシン D を濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で培地中に添加する。アクチノマイシン D を添加して 1 時間培養後、サンプルは 4% パラホルムアルデヒドで固定する。それぞれのサンプル中の mRNA の転写産物 (プレ mRNA、mRNA) は *in situ* ハイブリダイゼーションで検出する。mRNA の定量は、胚の後半部を神経管に沿って半分に切り分け、片方を液体窒素で直ちに冷凍し、他方をアクチノマイシン D を添加して 1 時間培養後、冷凍する。サンプルから RNA を抽出して、*Lfng* と *Hes7*、*Venus* の mRNA 量について *Gapdh* を内部標準として定量的 PCR 法で調べる。それぞれの半分切りした未分節中胚葉のうち培養したサンプル中の mRNA 量を培養していないもので割った値を相対的な mRNA 量とする。

RNA 精製と定量的 PCR

未分節中胚葉からの RNA 抽出は Nucleo Spin RNA XS kit (Macherey-Nagel, Promega, Madison, WI, USA) を用いて行う。培養細胞からの RNA 抽出はセパゾール RNA 精製キット (Wako, Osaka, Japan) を用いて行い、DNA の混入を防ぐため、RQ1 RNase-Free DNase (Promega) を用いて DNA を分解する。全 RNA は SuperScriptII Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて逆転写する。定量的 PCR マスターミックス KAPA SYBR FAST Universal (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) を用い、PCR 反応は Light Cycler 480 (Roche) を用いて、95°C で 3 分熱変成後、(95°C 10 秒、60°C 20 秒、72°C 1 秒) の 3 ステップ条件で 40 サイクルの PCR を行う。PCR に用いるプライマーセットは以下のとおりである。

	Fw	Rv
<i>Hes7</i>	5'-GACCAGGGACCAGAACCTC-3'	5'-GAAGCCGGACAAGTAGCAG-3'
<i>Lfng</i>	5'-AAGCTCACAGGCAATGTGGT-3'	5'-CCGGAGGTTGACGTAGTTGT-3'
<i>Venus</i>	5'-ACTGGGCAGGTGTCCACTC-3'	5'-GTTTACGTCGCCGTCCAG-3'
<i>Gapdh</i>	5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'	5'-TTGTCATGGATGACCTTGGC-3'
<i>Venus-Lfng</i> 3'UTR	5'-CCTCTGTACAAGGGATCTGGA-3'	5'-CCAGGGACAGAGTTTCAACC-3'
<i>Venus-Hes7</i> 3'UTR	5'-CCTCTGTACAAGGGATCTGGA-3'	5'-TCTCTACACCACCCCAATC-3'

細胞培養、遺伝子導入とアクチノマイシン D 処理

HEK293T 細胞は、マウス胚培養と同じ条件で培養する。HEK293T 細胞に TransitIT LT-1 (Mirus) を用いて *TK-Venus-Lfng* 3'-UTR と *TK-Venus-Hes7* 3'-UTR プラスミドを同時にトランスフェクションする。トランスフェクションの 48 時間後、転写阻害剤アクチノマイシン D を ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) の濃度で含む DMEM 培地に変更し、1 時間後を 0 時間として 30 分、60 分、120 分後に細胞を回収し、*Venus* mRNA 量を定量的 PCR で調べる。

トランスジェニックマウス作成法

トランスジェニックマウスは、*Hes7p-Venus-Hes7* 3'-UTR と *Hes7p-Venus-Lfng* 3'-UTR プラスミドをリニアライズし、前核期の CD1 マウス受精卵に微量注射して作成した。この受精卵から生まれたマウスを CD1 マウスと掛け合わせ、L3U-1、L3U-1、H3U-1、H3U-2 の 4 系統のトランスジェニックマウスが得られた。これらの実験は奈良先端科学技術大学院大学の動物実験施設の協力で行われ、日本学術会議の“動物実験の適正な実施に向けたガイドライン”にそ

って行った。

統計解析

3 グループ間の比較にはシェッフエのテストを用い、2 グループの比較にはスチューデントの t テストを用いる。結果には標本標準誤差のエラーバーをつけ、有意水準 0.05 以下を有意差とする。

実験結果

未分節中胚葉末端における *Hes7* と *Lfng* の転写活性化領域は同一である

これまでの報告から、*Lfng* と *Hes7* の発現振動は NICD による転写活性化と *Hes7* による転写抑制によることが報告されている。このことから、私は *Hes7* と *Lfng* は未分節中胚葉末端の同一領域で転写が活性化すると予想した。転写活性化領域にはスプライシングを受ける前の未成熟な mRNA が存在するため、イントロン配列に対するプローブを用いて未成熟な mRNA の発現を調べることで、遺伝子の転写活性化領域を調べることができる。そこで、*Hes7* と *Lfng* の転写パターンを比較するために、それぞれのイントロン領域に対する RNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。胎生 10.5 日齢マウス未分節中胚葉を用いて実験を行った結果、これまでの報告どおり *Lfng* と *Hes7* の転写活性化領域は胚ごとに異なり、未分節中胚葉の末端で転写が活性化されるパターン (Phase I)、中央で転写が活性化されるパターン (Phase II)、上端で転写が活性化されるパターン (Phase III) に分けられた (図 22A 写真)。

そこで、この転写活性の変動パターンを解析するため複数の胚 (*Lfng* n=20、*Hes7* n=24) について *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、未分節中胚葉の写真胚の側面から撮影し、写真をフェーズごとに順番に並べた (図 22E、F)。その結果、これまでの報告どおり、*Lfng* と *Hes7* の転写活性化領域は未分節中胚葉の体軸方向に連続的に変化する様子が観察された。このパターン変化を定量解析するため、*in situ* 写真をモノクロ画像に変換し、未分節中胚葉の黄色い四角で囲った領域について体軸方向で *in situ* シグナルの変化を定量した。この定量結果について、体節部分でのシグナルをバックグラウンド 0% (Min)、シグナルの最大値を 100% (Max) と定義し、MATLAB を使用して、シグナル強度の変化を表すヒートマップを作成した (図 22I)。このヒートマップを複数の胚 (*Lfng* n=20、*Hes7* n=24) について作成しフェーズの順番に並べた (図 22B)。その結果、*Hes7* と *Lfng* 転写活性化領域 (赤く示された領域) は未分節中胚

葉の末端から頭側へ明瞭に変動することが観察され、そのパターン変化は未分節中胚葉末端において *Hes7* と *Lfng* で同様の变化を示した。この実験では、*Lfng* と *Hes7* の転写活性化領域について、複数個体の結果をまとめて比較したが、*Lfng* と *Hes7* の転写活性化領域を正確に比較するためには、同一胚において *Lfng* と *Hes7* の転写活性化領域を比較する必要がある。そこで、未分節中胚葉を神経管に沿って 2 つに切り分け、左右のサンプルを別々のプローブで染め分けるバイセクション *in situ* ハイブリダイゼーションを行った(図 23A)。未分節中胚葉を含む胎生 10.5 日齢胚の尾部を神経管に沿って 2 つに切り分け、左側を *Lfng* プローブで、右側を *Hes7* プローブで、*in situ* ハイブリダイゼーションを行い、それぞれの転写パターンを比較した(図 23B)。その結果、未分節中胚葉の下側では、黒い縦線で示した *Hes7* と *Lfng* の転写活性化領域はフェーズ II、III ~ I のどちらでも同一であった。未分節中胚葉の上端では、矢印で示すように *Lfng* の転写は *Hes7* とは異なるパターンが見られた。

さらに、*Lfng* と *Hes7* の転写を正確に比較するためには、*Lfng* と *Hes7* の転写を同時に検出することが望ましい。そこで、高感度二重 *in situ* ハイブリダイゼーション法で、ビオチン標識した *Lfng* イントロン配列と、DIG 標識した *Hes7* イントロン配列のシグナルを同時に検出した。その結果、Hoechst33258 で染色した核(青色)上に、*Lfng* と *Hes7* の転写は緑と赤のドットとして可視化できた。未分節中胚葉下側において、それぞれの遺伝子を転写している細胞は、同一領域に存在していた(図 24)。

未分節中胚葉における *Hes7* と *Lfng* mRNA 発現パターンは異なる

これまでの報告から、*Lfng* と *Hes7* の mRNA の発現パターンはわずかに異なることが報告されていた。このことを確かめるため、胎生 10.5 日齢胚を用いて、*Lfng* と *Hes7* mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで比較した。その結果、*Lfng* mRNA は未分節中胚葉で明瞭な波状のパターンを示していた。*Hes7* mRNA も *Lfng* mRNA と同様に波状の発現変化を示すが、*Lfng* と比較して *Hes7* mRNA は未分節中胚葉のより広い領域で発現が見られ、特に、フェーズ III では、未分節中胚葉上端で強く見られるシグナルが下端まで尾を引くような発現パターンが観察された(図 22C)。また、*Lfng* mRNA と *Hes7* mRNA の未分節中胚葉におけるヒートマップを比較した結果においても、*Hes7* mRNA は *Lfng* mRNA より広い範囲で発現していることがわかった(図 22D)。さらに、*Hes7* と *Lfng* mRNA の発現パターンを比較するため、バイセクション *in situ* ハイブリダイゼーションを行った(図 23C)。その結果、黒い縦線で示すとおり、胚の左半分の *Lfng* mRNA の発現領域は右側の *Hes7* mRNA の発現領域と比較して、限局していることがわかった。

これらのことから、未分節中胚葉の下側で *Lfng* と *Hes7* の転写は同じ領域で起こるにも関わらず、

Hes7 mRNA は *Lfng* mRNA と比較して広い範囲で発現することが明らかとなった。

未分節中胚葉の個々の細胞の中では、*Lfng* と *Hes7* の転写は周期的に変動すると考えられている。また、その変化が未分節中胚葉の体軸方向でわずかにずれて生じるために、波状の発現パターンを示すと考えられる。両遺伝子のプレ mRNA (転写) の局在は未分節中胚葉の同一領域で見られることから、*Lfng* mRNA と *Hes7* mRNA の転写は同時に生じ、同時に停止することがわかる。にもかかわらず、*Hes7* mRNA は *Lfng* mRNA と比較して広い範囲で発現が見られた。以上のことから、転写停止後、*Lfng* mRNA と比較して *Hes7* mRNA は長い時間細胞内に存在し、より多くの細胞内に存在するため、*Hes7* mRNA の存在領域が広がっていると予想した。

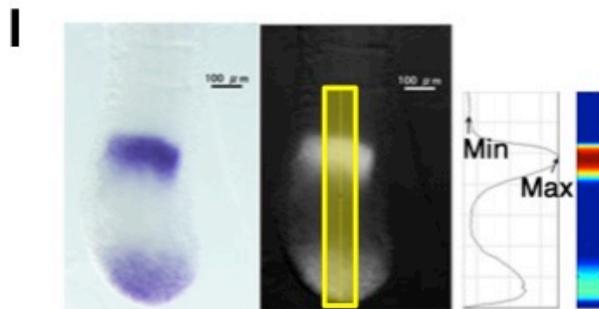
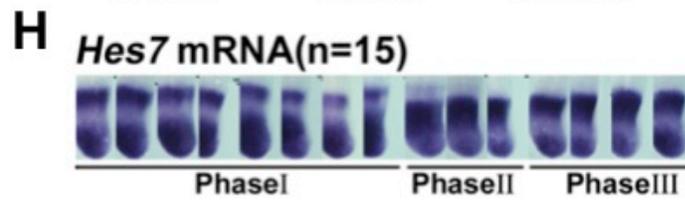
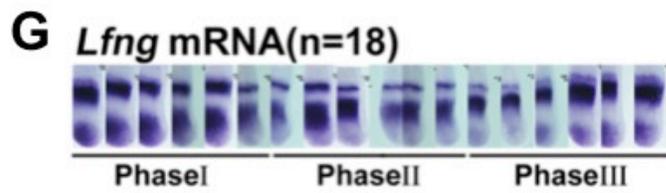
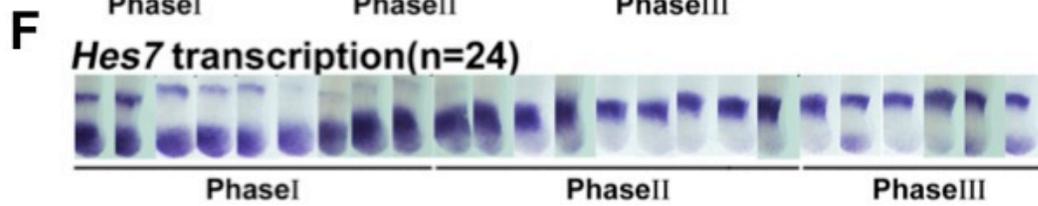
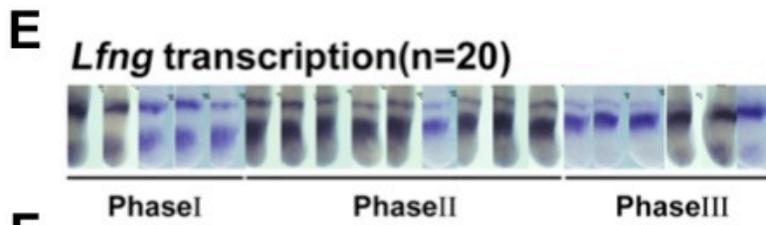
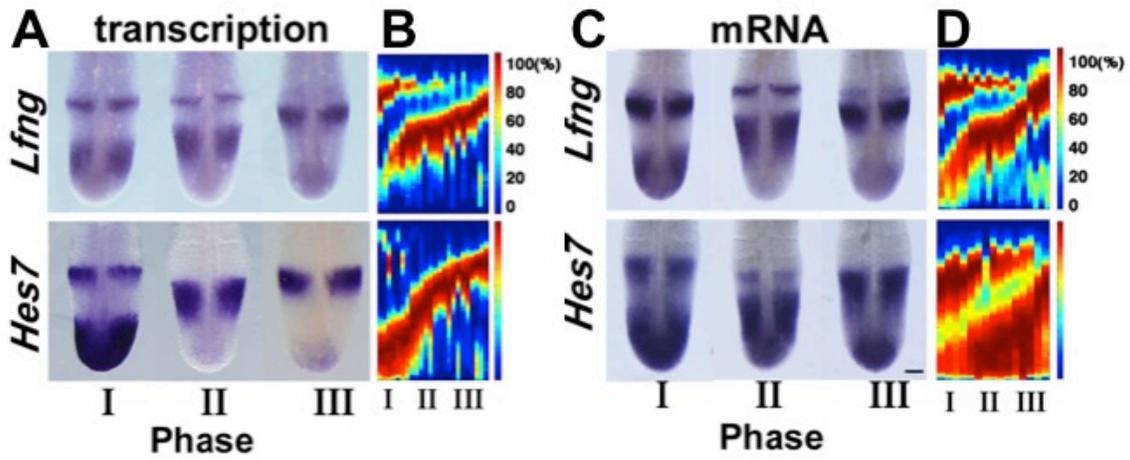


図 22 *Hes7* と *Lfng* の転写パターンの比較

(A)胎生 10.5 日胚の未分節中胚葉における *Lfng* (上) と *Hes7* (下) の転写活性変化。発現は 3 種類のパターンに分類できる。

(B)未分節中胚葉における *In situ* シグナル強度を未分節中胚葉の前方から体軸向きに測定し、それぞれの未分節中胚葉における最大の発現強度を 100%としてシュードカラーで右のパネルに表した。青色 : ~20 %, シアン : ~40 %, 黄色 : ~60 %, オレンジ : ~80 %, and 赤 : ~100 %。フェーズごとに横に並べられたカラムそれぞれは 1 個体の結果を示していて、個体数は *Lfng* (n=20), *Hes7* (n=24) を用いた。

(C)胎生 10.5 日胚の未分節中胚葉における *Lfng* (上) と *Hes7* (下) の mRNA 発現パターンの変化。発現パターンはフェーズ I ~ III の 3 種類に分類できる。

(D)未分節中胚葉における *In situ* シグナル強度を未分節中胚葉の前方から体軸向きに測定し、それぞれの未分節中胚葉における最大の発現強度を 100%としてシュードカラーで右のパネルに表した。青色 : ~20 %, シアン : ~40 %, 黄色 : ~60 %, オレンジ : ~80 %, and 赤 : ~100 %。フェーズごとに横に並べられたカラムそれぞれは 1 個体の結果を示していて、個体数は *Lfng* (n=18), *Hes7* (n=15) を用いた。

(E-H) *Lfng* と *Hes7* の転写活性化領域は、それぞれのイントロン領域に対する RNA プローブを用いて検出した。*Lfng*、*Hes7*、*Venus* mRNA の発現はエクソン領域に対するプローブを用いて検出した。

(I) *In situ* シグナルの写真 (左) を JPEG ファイルで取得し、Photoshop を使って白黒の画像へ変換し (中央)、未分節中胚葉の上端から下端まで一定の範囲 (黄色で示した範囲) のシグナル強度を ImageJ で定量し、シグナル強度を MATLAB で色温度に変換した。一番シグナルが強い位置を 100% (赤) としてシュードカラーで右のパネルに表した。青色 : ~20 %, シアン : ~40 %, 黄色 : ~60 %, オレンジ : ~80 %, and 赤 : ~100 %。

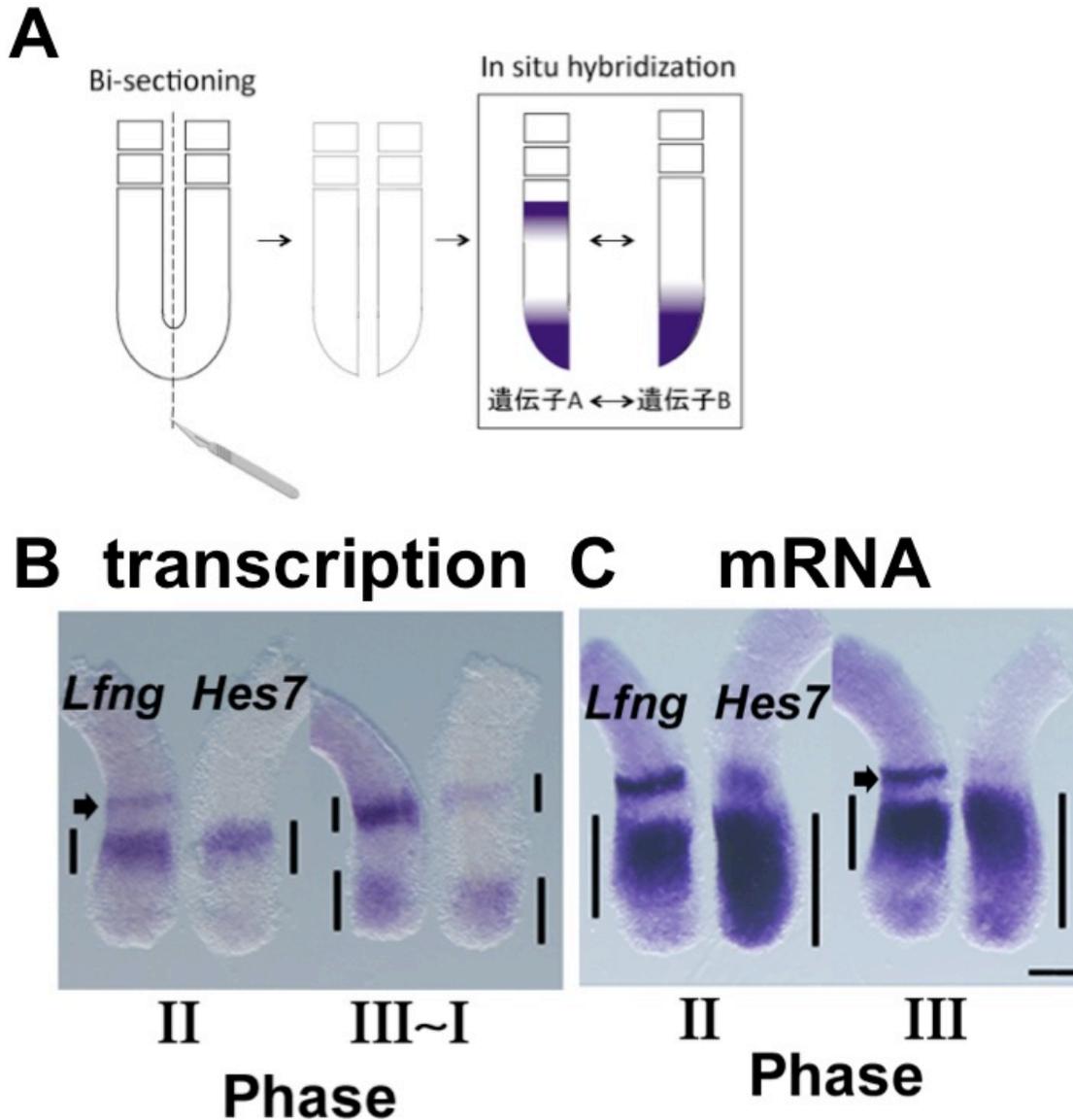


図 23 バイセクション *in situ* ハイブリダイゼーション法による *Lfng* と *Hes7* の転写領域、mRNA 発現領域の比較

(A) バイセクション *in situ* ハイブリダイゼーションは胎生 10.5 日齢のマウス胚尾部を正中線に沿って 2 つに切り分け、2 つの切片を異なるプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行う方法である。

(B) *Hes7* (左) と *Lfng* (右) の転写活性化領域の比較。胎生 10.5 日胚の後ろ半分を体軸方向に 2 分し、*in situ* ハイブリダイゼーション法で、両遺伝子の転写パターンを調べた。*Lfng* と *Hes7* の転写活性化領域は黒い線で示す通り、ほとんど同一であった。未分節中胚葉の最も頭側では *Lfng* では、*Hes7* でみられない発現が見られた (黒矢印)。

(C) *Hes7* (左) と *Lfng* (右) の mRNA 発現パターンの比較。胎生 10.5 日胚の後ろ半分を体軸方向に 2 分し、*in situ* ハイブリダイゼーション法で、両遺伝子の mRNA 発現パターンを調べた。*Hes7* mRNA の存在領域 (黒線、右) は *Lfng* mRNA の存在領域 (黒線、左) より広がっていた。*Lfng* mRNA は未分節中胚葉の最も頭側にもシグナル

が見られた（矢印）。スケールバー: 100 μ m。

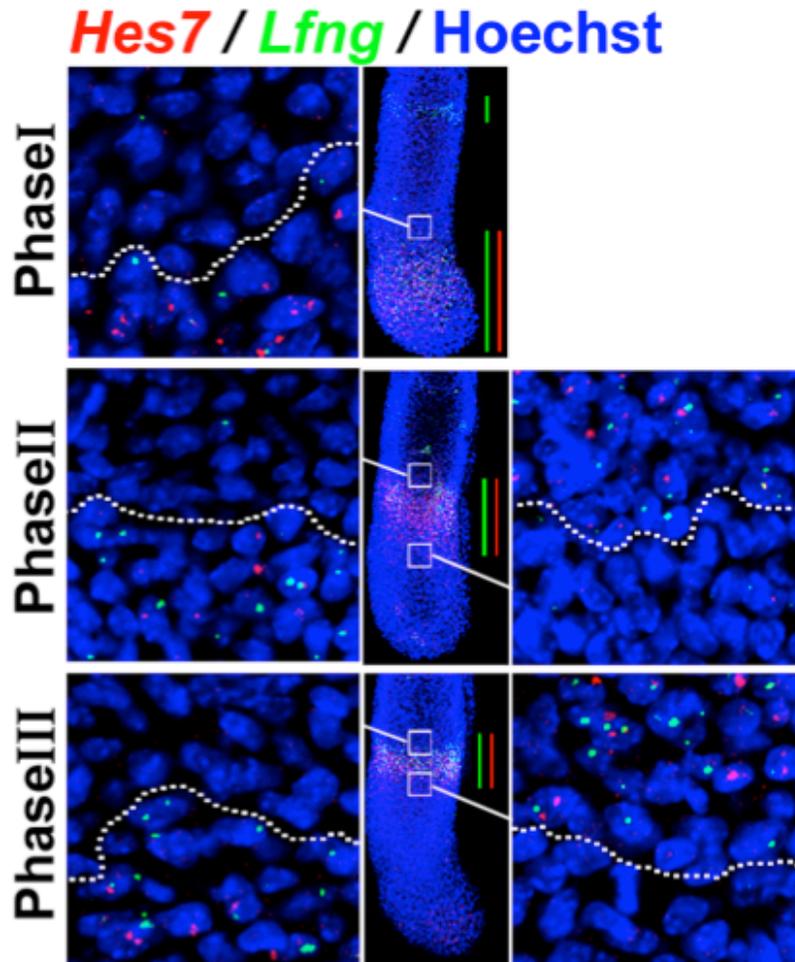


図 24 バイカラ-*in situ* による *Lfng* と *Hes7* の転写領域の比較

未分節中胚葉核内における *Hes7* と *Lfng* の転写の比較。マウス胚未分節中胚葉において未成熟な転写産物のシグナル *Lfng* と *Hes7* のイントロン配列に対するプローブを用いて、核上のドットとして検出された。 *Lfng* と *Hes7* の転写活性化領域はそれぞれ、緑と赤の線でそれぞれ示した (phase I: n=3, phase II: n=3, phase III: n=5) 。四角い領域の拡大図では、hoechst33258 で染色した核上に見えるシグナルによって、それぞれの遺伝子を転写している細胞を見分けた。転写している/していない細胞の境界は白い破線で示した。

未分節中胚葉において *Lfng* mRNA と比較して *Hes7* mRNA は安定である

これまでの結果から、未分節中胚葉において *Lfng* mRNA と比較して *Hes7* mRNA は長い時間細胞内に存在する、つまり mRNA が安定であると予想された。そこで、未分節中胚葉における *Lfng* mRNA と *Hes7* mRNA の安定性を比較するため、転写阻害剤を用いた実験を行

った。一般に、mRNAの安定性は転写阻害剤処理により新規の転写を抑えた条件で胚や細胞を培養し、mRNAの減少量を測定する方法が用いられる。そこでまず、バイセクションした胚の培養が可能か確認した。胎生 10.5 日齢のマウス胚を神経管に沿って2つに分け、左半分をすぐに固定し、右半分を通常の培地で 1 時間培養後に固定し、*in situ* ハイブリダイゼーションで *Lfng* と *Hes7* の転写パターンと mRNA 発現パターンの変化を比較した(図 25A、Control)。その結果、培養前 (0h) と比較して培養 1 時間後 (1h) では、*Lfng* の転写パターンはフェーズ II からフェーズ III へ、*Hes7* の転写パターンはフェーズ III からフェーズ I へ変化していた。つまり、*Lfng* と *Hes7* の転写活性化領域は 1 時間の培養中に、これまでの報告どおり、時間変化することが確認された。同様に、mRNA の発現パターンは *Lfng* と *Hes7* ともにフェーズ II からフェーズ III へ変化していた。これらのことから、バイセクションした胚の培養により、未分節中胚葉における *Lfng* と *Hes7* の転写活性化領域は変化し、それにともない、mRNA の発現パターンが変化することが確認できた。

次に、培地に濃度 10 μ g/mL のアクチノマイシン D を添加し、同様の培養実験を行った(図 25A:ActD)。その結果、通常培地での結果と異なり、*Lfng* と *Hes7* の転写活性は 1 時間の培養中に殆ど消失していた。このことから、アクチノマイシン D は培養中に、新規の mRNA 合成を阻害し、培養 1 時間後では *Lfng* と *Hes7* の mRNA 新生は、ほぼ完全に抑えられることが明らかとなった。一方、アクチノマイシン D 添加条件で 1 時間培養後、*Lfng* と *Hes7* mRNA は培養前と同じフェーズの発現パターンが観察された。すなわち、培養中にアクチノマイシン D によって新規の転写が阻害されたために、mRNA の発現パターンが変化しなかったと推察された。mRNA の安定性を比較するために、培養前後の mRNA のシグナル強度を比較すると、*Lfng* と *Hes7* どちらも減少していたが、*Lfng* は *Hes7* と比較してシグナルの低下が著しかった。これらの結果は、未分節中胚葉で *Lfng* mRNA は不安定であるのに対し、*Hes7* mRNA は比較的安定であることを示している。

さらに、アクチノマイシン D 処理実験で、mRNA の安定性を定量的に解析するため、定量的 PCR 法で培養前後の mRNA 量の変化を調べた。具体的には、胎生 10.5 日齢胚の後半分を神経管に沿って 2 つに切り分け、一方の未分節中胚葉はすぐに冷凍し、他方はアクチノマイシン D を含む培地で 1 時間培養後冷凍した。それぞれのサンプルから全 RNA を精製し、定量的 PCR 法で *Lfng* と *Hes7* の mRNA 量を調べた。培養前の mRNA 量を 1 として培養後の mRNA の相対値を計算し、培養前後での mRNA 量の減少割合を比較した(n=12)。その結果、*Lfng* mRNA は 1 時間の培養後 70% 減少した一方で、*Hes7* mRNA の減少は 30% で、未分節中胚葉での mRNA の安定性は *Hes7* と比較して *Lfng* が有意に低いことが明らかとなった(図 25B)。これらの結果から、未分節中胚葉において *Lfng* mRNA は *Hes7* mRNA と比較して不安定であ

ることが示された。

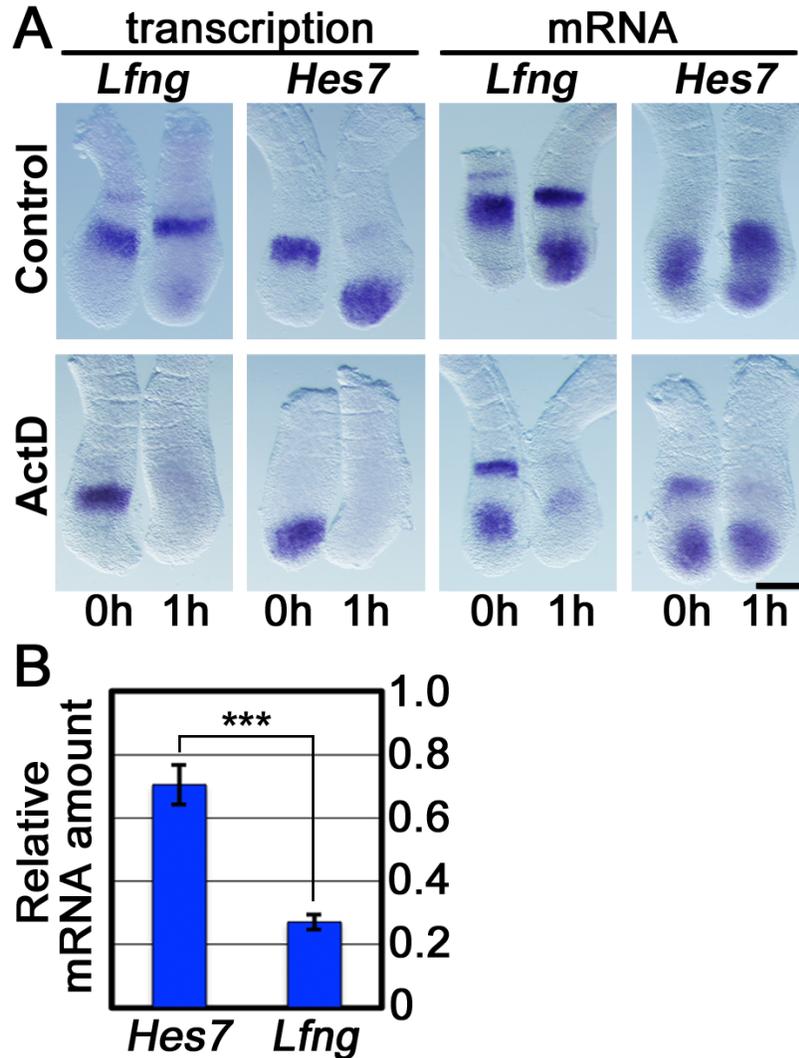


図 25 未分節中胚葉における *Lfng*、*Hes7* mRNA の安定性

(A)胎生 10.5 日齢胚の後半部を神経管に沿って半分に切り分け、左側をすぐに固定し (0h)、右側を転写阻害剤アクチノマイシン D (10 μ g/ml) を含む (ActD) /含まない (Control) 培地で 1 時間培養後に固定した。*Lfng* と *Hes7* それぞれの Pre-mRNA (transcription) と mRNA は *in situ* ハイブリダイゼーションによって検出された。スケールバー:100 μ m。

(B)胎生 10.5 日齢胚の後半部を神経管に沿って半分に切り分け、片側の未分節中胚葉をすぐに回収し、もう一方を転写阻害剤アクチノマイシン D (10 μ g/ml) を含む培地で 1 時間培養後に回収した。*Lfng* と *Hes7* mRNA の存在量は *Gapdh* を内部標準として定量的 PCR によって定量した。それぞれのサンプルで培養後の mRNA 量を培養前の mRNA 量で割ったものを相対的な mRNA 量とした。誤差範囲はサンプル数 12 での標準誤差であり、***はスチューデントの *t* テストでの $p < 0.001$ の有意差を示している。

***Lfng* 3'UTR は *Hes7* 3'UTR より強力に mRNA を不安定化する**

これまでの結果から、*Hes7* mRNA と比較して *Lfng* mRNA は安定性が低いことが示された。過去の報告から、mRNA の 3'UTR はタンパク質をコードしていないが、RNA 結合タンパク質や mi-RNA が結合し mRNA の安定性調節に重要な働きをもつことが知られている[63]。このことから、*Lfng* 3'UTR は *Hes7* 3'UTR と比較して mRNA の安定性を低下させると予想した。そこで、*Lfng* 3'UTR もしくは *Hes7* 3'UTR を 3'末端に挿入した *Venus* レポーターを作成し、チミジンキナーゼ (*TK*) プロモーターを用いてヒト胎児腎臓細胞 (HEK293T 細胞) で発現させ、mRNA の安定性を比較した。(図 26A)。HEK293T にプラスミド導入して 48 時間後、10 μ g/mL のアクチノマイシン D を含む培地に交換した。培地交換から 1 時間後を 0 時間として、30 分、60 分、120 分に細胞を回収し、*Gapdh* を内部標準として定量的 PCR を行い、*Venus* mRNA 量の変化を調べた (図 26B)。その結果、アクチノマイシン D 処理 1 時間で、*Venus-Lfng* 3'UTR mRNA 量は 40% 減少した一方で *Venus-Hes7* 3'UTR mRNA 量は 20% であった。また、0 時間を除く全ての時間で *Venus-Lfng* 3'UTR mRNA 量は *Venus-Hes7* 3'UTR mRNA 量より有意に低かった。すなわち、培養細胞を用いた実験で、*Venus-Lfng* 3'UTR mRNA は *Venus-Hes7* 3'UTR mRNA と比較して安定性が低く、*Lfng* 3'UTR は *Hes7* 3'UTR よりも mRNA の安定性を低下させることが示唆された。ここまでの結果から、*Lfng* 3'UTR は *Hes7* 3'UTR よりも mRNA の安定性を低下させるため、内在性 *Lfng* mRNA は *Hes7* mRNA より素早く分解され、*Hes7* より限局された mRNA の発現パターンを未分節中胚葉で示すと考えられた。

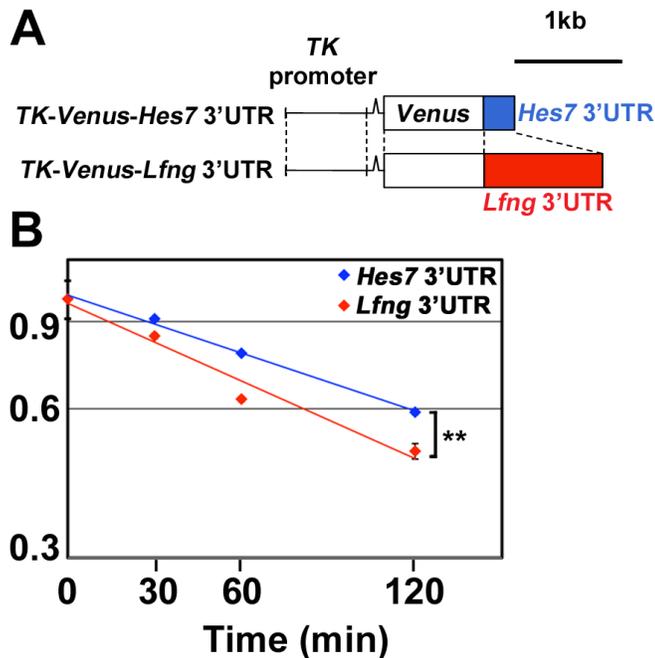


図26 *Lfng*と*Hes7*3'UTRによるmRNAの安定性への影響

(A)レポーター遺伝子のベクター配列。チミジンキナーゼ (*Tk*) プロモーターにより発現する *Venus* レポーター翻訳領域の直後に *Hes7* 3'UTR (青) もしくは *Lfng* 3'UTR (赤) を挿入し、(*TK-Venus-Hes7* 3'UTR) と (*TK-Venus-Lfng* 3'UTR) を作成した。

(B)HEK293 細胞に(A)のプラスミドを導入し、48 時間後に培養液をアクチノマイシン D (10 μ g/ml) を含む培地に交換した。アクチノマイシン D 処理開始後 1 時間後を 0 時間として 30 分、60 分、120 分において細胞を回収し、*Venus* mRNA 量について *Gapdh* を内部標準として用いて定量的 PCR で定量した。0 時間における mRNA 量に対する 30 分、60 分、120 分での mRNA の相対量について *TK-Venus-Hes7* 3'UTR は青色の四角で、*TK-Venus-Lfng* 3'UTR は赤色の四角で示し、それぞれの近似曲線を青と赤の線で示した。誤差範囲はサンプル数 3 での標準誤差であり、**はスチューデントの *t* テストでの $p < 0.01$ の有意差を示している。2 回の独立した実験によって結果の再現性を確認した。

トランスジェニックマウスの作成

3'UTR を介した mRNA 安定性制御が *Hes7* と *Lfng* の発現パターンの違いを生み出すか調べるため、*Venus-Lfng* 3'UTR もしくは *Venus-Hes7* 3'UTR を *Hes7* プロモーター制御下で発現するトランスジェニックマウスを作成した(図 27A)。それぞれのレポーター (*Venus-Lfng* 3'UTR/*Venus-Hes7* 3'UTR) から 2 クローンずつ (L3U-1, L3U-2/H3U-1, H3U-2) のトランスジェニック系統を確立した。これらのレポーターは *Hes7* プロモーター (2.4kb) による転写制御を受

けるため、未分節中胚葉で、内在性 *Hes7* と同様に転写が周期的に変化すると期待された。そこで、未分節中胚葉におけるレポーター遺伝子の転写パターンを内在性 *Hes7* の転写パターンと比較するため、高感度 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

まず、*Hes7* イントロンプローブを用いて、胎生 10.5 日齢の野性型マウスにおける *Hes7* の転写を黄緑色のシグナルとして検出した(図 27B、左端)。この写真中の四角で囲んだ領域を拡大すると、転写活性がある細胞と転写活性がない細胞の境界を白い点線で示したように区別できる(図 27B、拡大図左端)。このように、多くの細胞で転写が起こっている領域は白線で示し、比較的少ない細胞でのみ転写が起こっている領域を細い灰色の線で示した。その結果、これまでの報告どおり、内在性 *Hes7* の転写は、未分節中胚葉上端で観察される場合、未分節中胚葉の下端では転写が起こらない、つまり *Hes7* の転写は未分節中胚葉の一部の領域に局限していることが確かめられた。

次に、それぞれのトランスジェニックマウス未分節中胚葉における、レポーター遺伝子の転写パターンを調べた。レポーター遺伝子には発現量を高めるため、5'末端にイントロン配列(132bp)が挿入されているが、*in situ* プローブを設計するには短すぎるため、高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて転写を検出した(図 27B)。その結果、胎生 10.5 日齢の L3U-2、H3U-2 マウス胚では、未分節中胚葉上端の多くの細胞で *Venus* の転写が観察される(白線)場合でも、未分節中胚葉細胞の下端を含む広い範囲の細胞で転写が見られた(細い灰色線)。この結果から、L3U-2、H3U-2 マウスでは、レポーター遺伝子は内在性 *Hes7* と異なる転写パターンを示すことが示唆された。一方、胎生 10.5 日齢の L3U-1 と H3U-1 胚で *Venus* の転写領域(白線)は内在性 *Hes7* の転写領域と同様、未分節中胚葉の一部に局限されていた。これらの結果から、L3U-1 と H3U-1 では *Venus* の転写は内在性 *Hes7* の転写と同様のパターンを示す一方で、L3U-2 と H3U-2 では *Venus* の転写は内在性 *Hes7* の転写と比較して広い領域で起こることが示唆された。

しかし、この比較は異なる個体間でなされたために、発現パターンの差異は発現変化のフェーズの違による可能性が考えられた。そこで、転写パターンを同じフェーズで比較するため、バイセクションしたサンプルで、内在性 *Hes7* とレポーターの転写パターンを比較した(図 28)。転写パターンは、おおまかに 2 つのフェーズ、III ~ I (未分節中胚葉の上端と下端で *Hes7* の転写が見られる)、II (未分節中胚葉の中央で *Hes7* の転写が見られる) の胚を用いて比較した。その結果、L3U-2、H3U-2 では内在性 *Hes7* と同じ領域の多くの細胞でレポーターの転写が観察された(白線)が、内在性 *Hes7* が転写されない領域でもレポーターの転写が見られた(細い灰色線)。これらの結果から、L3U-2、H3U-2 ではレポーターの転写は内在性 *Hes7* よりも広い領域で起こること確認された。一方、胎生 10.5 日齢の L3U-1 と H3U-1 胚で、レポーターの転写は内在

性 *Hes7* と同様の波状に局限された発現パターン (白線) を示した(図 27B、図 28)。これらの結果から、L3U-1 と H3U-1 では期待どおり、レポーター遺伝子が内在性 *Hes7* と同様の転写パターンを示すと結論付け、以降の実験には L3U-1 と H3U-1 を用いることを決定した。

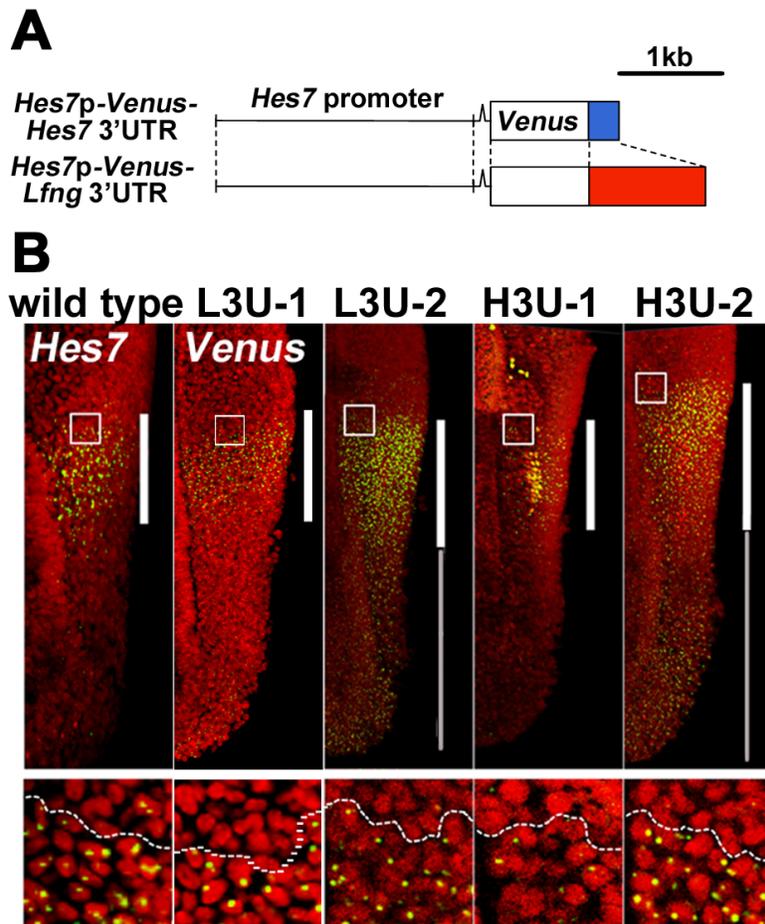


図 27 トランスジェニックマウス未分節中胚葉におけるレポーター遺伝子の転写領域

(A)トランスジェニックマウス作成に用いたレポーター遺伝子のベクター配列。*Hes7* プロモーター (2.4kb) により発現する *Venus* レポーター翻訳領域の直後に *Hes7* 3'UTR (青) もしくは *Lfng* 3'UTR (赤) を挿入し、(*Hes7p-Venus-Hes7* 3'UTR) と (*Hes7p-Venus-Lfng* 3'UTR) を作成した。レポーター遺伝子の発現量を高める目的で、短いイントロン配列をプロモーターとレポーターの間に挿入した。*Hes7p-Venus-Lfng* 3'UTR プラスミドを用いて、トランスジェニックマウスの L3U-1 と L3U-2 が、*Hes7p-Venus-Hes7* 3'UTR プラスミドを用いて、H3U-1 と H3U-2 マウスが作成された。

(B)胎生 10.5 日胚未分節中胚葉における *Venus* 遺伝子の転写パターン。トランスジェニックマウス未分節中胚葉における Pre-mRNA のシグナルは *Venus* mRNA を認識するプローブと TSA キットを用いた高感度蛍光 *in situ* 法を用いて検出した。*Hes7* の pre-mRNA のシグナルは *Hes7* のイントロン配列に対するプローブを用いて野性型マウ

スの中で検出された。それぞれ、多くの細胞で転写が起こっている領域は白線で示し、比較的少ない細胞でのみ転写が起こっている領域を細い灰色の線で示した。それぞれの写真の四角い領域の拡大図は下に示した。転写の活性は hoechst33258 で染色した核の上にドット状のシグナルとして検出できた。転写している細胞としていない細胞の境界は白い点線で示した。

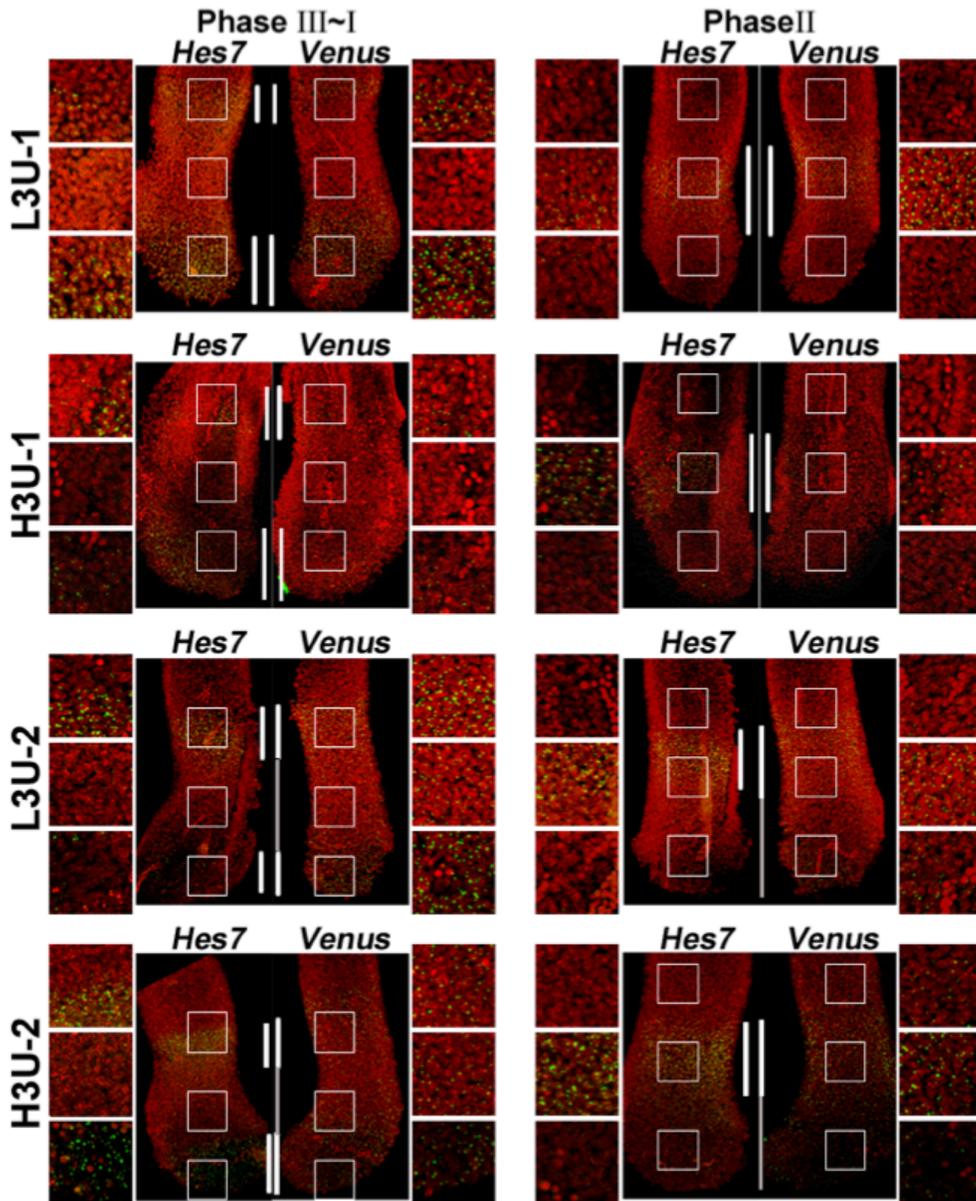


図 28 トランスジェニックマウス未分節中胚葉での *Hes7* と *Venus* レポーターの転写領域の比較

胎生10.5日齢のマウス胚尾部を神経管に沿って半分に切り分けた。*Hes7*のプレmRNAはTSAシステムを用いた高感度*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて、2つに切り分けた胚の左半分で、検出された。*Venus*のプレmRNAは半分に切り分けた胚の右側で検出された。四角い領域の拡大図（上、中、下）は、それぞれのパネルの左側に示した。それぞれの未分節中胚葉全体図中の白線は、大部分の細胞が*Hes7/Venus*の転写を起こしている領域を

示している。灰色の線は、領域の中で少数の細胞が転写を起している領域を示している。In L3U-1 と H3U-1 系統では *Venus* の転写活性化領域は明瞭な発現変化を示し、フェーズ III-I (左)、Phase II (右)、に分けられ、内在性の *Hes7* の転写と同調パターンで変化していた。対照的に L3U-2 と H3U-2 ラインでは *Venus* の転写活性化領域は内在性の *Hes7* の転写領域と比較して広がっていた。

未分節中胚葉で *Lfng* 3'UTR は *Hes7* 3'UTR より mRNA を不安定化する

ここまでの野性型マウスと培養細胞を用いた実験結果から、*Lfng* 3'UTR は *Hes7* 3'UTR と比較して mRNA の安定性を低下させる作用が強く、限局した mRNA 発現パターンを生じると考えられた。この予想をトランスジェニックマウスにおいても検証するため、まず、L3U-1 と H3U-1、マウス未分節中胚葉におけるレポーター mRNA の安定性を比較した。*Lfng* と *Hes7* の 2 種類のレポーター mRNA について、未分節中胚葉における安定性を調べるため、定量的 PCR 法を用いて、レポーター mRNA の安定性を評価した。具体的には、胎生 10.5 日齢の L3U-1 と H3U-1 マウス胚尾部を神経管に沿って半分に切り、左側の未分節中胚葉をすぐに冷凍し、右半分はアクチノマイシン D を含む培地で 1 時間培養した後、未分節中胚葉を回収した。未分節中胚葉から全 RNA を精製し、内在性 *Hes7*、*Lfng*、レポーターの mRNA 量について、培養の前後での変化を調べた。その結果、L3U-1 と H3U-1 どちらにおいても、1 時間の培養後、内在性 *Lfng* mRNA は 70%、内在性 *Hes7* mRNA は 30% 減少し、*Lfng* mRNA のほうが *Hes7* mRNA よりも有意に減少していた (図 29A)。この結果は野性型マウスで得られた結果 (図 25B) を良く再現しており、レポーター遺伝子の発現条件でも、内在性 *Lfng* や *Hes7* mRNA の分解機構は損なわれていないことが確認された。

次に、それぞれのレポーター mRNA の安定性を内在性 *Lfng* mRNA や *Hes7* mRNA と比較した。まず、L3U-1 で、レポーター mRNA は 70% 減少していた。この値は内在性 *Lfng* mRNA の減少率と同程度であり、内在性 *Hes7* mRNA の減少率と比較して有意に低かった ($n=6$)。一方で H3U-1 では、レポーター mRNA は 35% 程度減少していた。この値は内在性 *Hes7* mRNA の減少率と同程度であり、内在性 *Lfng* mRNA の減少率と比較して有意に高かった ($n=10$)。これらの結果から、未分節中胚葉において、レポーター mRNA の 3'末端に挿入した *Lfng* 3'UTR もしくは *Hes7* 3'UTR は、それぞれの内在性遺伝子と類似した安定性を再現することが示された。さらに、L3U-1 と H3U-1 において、胎生 10.5 日齢マウス胚の未分節中胚葉におけるレポーター遺伝子の発現パターンを *Venus* のコード領域に対する RNA プロブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションで比較した。その結果、L3U-1 では、レポーター mRNA は未分節中胚葉で波状の発現パターンを示し、狭い領域に局在していた (図 29B, $n=12$)。この発現パターンは内在性 *Lfng* の明瞭な発現パターンと良く似ていた。ただし、レポーターは *Hes7* プロモーターによって発

現するため、内在性 *Lfng* に特有の未分節中胚葉の上端での発現は見られなかった(図 23C)。一方、H3U-1 において、レポーターmRNA は波状の発現パターンを示していたが、その発現は L3U-1 と比較して、未分節中胚葉の広い範囲で観察された(図 29B, n=19)。この発現パターンは内在性 *Hes7* でみられる幅の広い発現パターンを良く再現していた。

これら全ての結果をまとめると、*Lfng* 3'UTR は *Lfng* mRNA の分解を促進することにより *Lfng* mRNA の狭い発現パターンを生み出しており、*Hes7* の 3'UTR 配列は比較的緩やかな RNA の分解制御によって、共通の転写調節から広い領域での発現パターンを生み出していることが示唆された。つまり、3'UTR 配列に依存した mRNA 安定性の調節が *Lfng* と *Hes7* の mRNA 発現パターンの違いを生み出すことが示された。

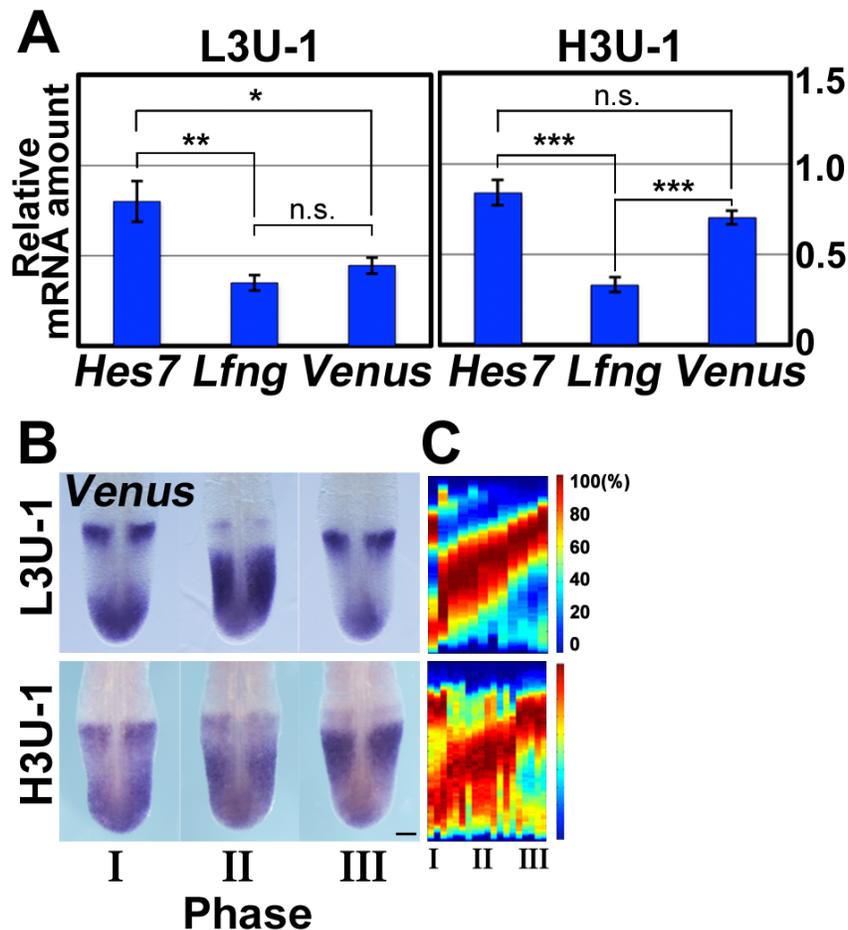


図 29 L3U-1 と H3U-1 未分節中胚葉における、Venus mRNA 発現のパターン変化

(A) L3U-1 と H3U-1 マウスの体の後半部を神経管に沿って半分に切り分け、片方はすぐに冷凍し、他方は、転写阻害剤アクチノマイシン D (10 μ g/ml) を含む培地で 1 時間培養して回収した。回収した未分節中胚葉から RNA を回

収し、Lfng と Hes7、Venus の mRNA 量について Gapdh を内在性のコントロールとする定量的 PCR で測定した。それぞれのサンプルで、培養前の mRNA 量を 1 として、培養後の mRNA 残存量を図に示した。それぞれ、エラーバーは、(L3U-1: n=6, H3U-1: n=10)での標本標準誤差を表している。n.s.は有意差がないことを、* 印はそれぞれ、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ の有意差があることを示している。

(B) L3U-1 (上) と H3U-1 (下) マウスの胎生 10.5 日未分節中胚葉における Venus mRNA の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーションで示した。スケールバーは 100 μ m である。

(C) シグナル強度は、色温度に変換され、100%としてシュードカラーで右のパネルに表した。青色 : ~20 %, シアン : ~40 %, 黄色 : ~60 %, オレンジ : ~80 %, and 赤 : ~100 %。フェーズごとに横に並べられたカラムそれぞれは 1 個体の結果を示していて、個体数は L3U-1 (n=12), H3U-1 (n=19)を用いた。

考察

マウスの発生において体節形成は 2 時間周期で繰り返す。体節形成の周期性は分節時計遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子発現の変化によってもたらされる。この章では、2 つの主要な分節時計遺伝子 *Lfng* と *Hes7* は、Notch と *Hes7* による転写活性化と転写抑制により、その転写活性化領域が同一のパターン変化を示すことを確認した。次に、マウス胚の培養実験により、内在性 *Lfng* mRNA は *Hes7* mRNA と比較して安定性が低いことを明らかにした。さらに、レポーターを用いた実験により、この安定性の違いは 3'UTR の違いによることが示唆された。それぞれの 3'UTR をもつレポーター遺伝子はトランスジェニックマウスにおいて、それぞれの内在性遺伝子と類似した mRNA の安定性と mRNA 発現パターンを再現した。これらの結果から、*Lfng* と *Hes7* は共通の転写制御によって転写活性が変化するが、3'UTR の違いにより *Lfng* mRNA の安定性は *Hes7* mRNA の安定性より低く、*Lfng* mRNA が *Hes7* mRNA より素早い分解を受けるために明瞭な発現パターンを示すことを明らかにした。

Lfng と *Hes7* の転写制御について

これまで、未分節中胚葉において *Lfng* と *Hes7* の転写は NICD による転写活性化と *Hes7* による転写抑制により制御されることが報告されている[20]。一方未分節中胚葉上端では、転写因子 *Mesp2* が発現し、*Lfng* の転写を誘導することが報告されている[64]。今回、*Lfng* と *Hes7* の転写パターンは未分節中胚葉の下側で同一であったが、未分節中胚葉の上側では *Lfng* の転写のみが行われる領域が存在した(図 23B)。過去の報告を考慮すると、未分節中胚葉の上側でみ

られた *Lfng* の転写は *Mesp2* によると考えられる。

トランスジェニックマウス作成の際、遺伝子発現の振動をレポーターで再現するため、*Hes7* プロモーターのうちヒトとマウスで相同性が高い転写開始点上流 2.4kb を使用した。L3U-1 と H3U-1 において、レポーター遺伝子の転写は内在性 *Hes7* と同じパターンで変化していたことから、2.4kb の *Hes7* プロモーターは内在性 *Hes7* の転写を再現するのに十分であると考えられた。

mRNA の転写制御は、転写領域の制御と転写量の制御に分けられる。今回、*Lfng* と *Hes7* の転写パターンについて、バイセクション *in situ* ハイブリダイゼーションやバイカラー *in situ* ハイブリダイゼーションで詳細に比較し、未分節中胚葉の下側で *Lfng* と *Hes7* の転写領域は同一であることを示した。しかしながら、*Lfng* mRNA と *Hes7* mRNA の絶対的な転写量の違いについては調べていない。mRNA の転写量が多い場合 mRNA の分解に時間を要し、mRNA の発現領域が広がると予想される。分節時計遺伝子の遺伝子発現パターン制御の詳細については、分節時計遺伝子の mRNA 絶対量を定量する必要があると考えられる。そのような研究により得られる mRNA 分子数の実測値は、振動パターンの数理解析を進めるためにも必要である。

mRNA の安定性について

Lfng と *Hes7* の mRNA は 2 時間周期で合成・分解を繰り返し、未分節中胚葉において振動することから、これら分節時計遺伝子の mRNA は速やかに分解されると考えられてきた。実際、ニワトリ胚では *Lfng* の転写活性化領域は mRNA の発現領域と殆ど同じだということが報告されている[40]。また、ニワトリ胚と転写阻害剤を用いた実験から、*Fgf8* mRNA と比較して *Lfng* mRNA は素早く分解されることが報告されている[12]。これらの報告は *Lfng* mRNA は合成後素早く分解されることを示している。今回、阻害剤処理条件下の未分節中胚葉で *Lfng* mRNA と *Hes7* mRNA の分解について調べると、1 時間の培養後、*Lfng* mRNA は 70%、*Hes7* mRNA は 30% 分解していた。1 時間の培養後、*Lfng* mRNA 大部分が分解されることはこれまでの報告と矛盾しない。一方で、*Hes7* mRNA は 1 時間の培養後比較的多くの mRNA が残っていた。この結果は *in situ* ハイブリダイゼーションでも確認した。*Lfng* mRNA と比較して *Hes7* mRNA の安定性が高いことの生理学的意義については今後の研究が必要である。

mRNA の分解における 3'UTR の役割について

これまで、ニワトリ胚と Tet-OFF システムを用いた研究から、*Lfng* 3'UTR は *Fgf8* 3'UTR と比較して、レポーター mRNA を不安定化することが報告されている[62]。*Lfng* の 3'UTR には AU リッチ領域 (AUUUA) が存在し、興味深いことに、ヒトとマウスで保存されている。一方で *Hes7* 3'UTR に AU リッチ領域 (AUUUA) は存在しない。mRNA が素早く分解されるいくつかの

mRNAでは、AUリッチ領域RNA結合タンパク質などが結合し、mRNAの分解を促すことが報告されている[65]。これらの報告から、*Lfng* mRNAの分解には3'UTR配列が重要であることが示唆されていた。今回私は、*Lfng*と*Hes7*の3'UTRの違いに注目し、培養細胞とトランスジェニックマウスを用いて、*Lfng* 3'UTRが*Hes7* 3'UTRと比較してmRNAを分解する働きが強いことをつきとめた。最近、ニワトリ胚で、*Lfng* 3'UTRの3'末端にマイクロRNA (mir-125a-5p) が結合し、*Lfng* mRNAの分解を促進し、正常な胚発生を行うために必要であると報告されている[66]。この報告は、*Lfng* mRNAの分解にはその*Lfng*3'UTRの3'末端の配列が重要であることを示唆している。しかしながら、マウス*Lfng* 3'UTRを部分欠損させて安定性を検証した実験では、*Lfng* 3'UTRの5'側の配列がmRNAの分解に必要なことが報告されている[67]。これらの報告は*Lfng* 3'UTRがmRNAの分解を促進する配列を含むという点で私の研究を支持する。しかし、*Lfng* 3'UTR配列のどの領域がmRNAの素早い分解のために重要なかを調べるためには、さらなる研究が必要である。

レポーター遺伝子の安定性について

これまで、マウスES細胞を用いて網羅的にmRNAの安定性を報告した研究では、*Lfng* mRNAの安定性は*Hes7* mRNAと比較して早いことが報告されているが、その時間は比較的長く3時間以上であることが報告されている[68]。今回培養細胞を用いた実験により、*Lfng* 3'UTRは*Hes7* 3'UTRと比較してmRNAの安定性をより低下させる働きがあることがわかったが、その半減期は未分節中胚葉での*Lfng*の発現変化から予想される時間より長かった。*Lfng* mRNAや*Hes7* mRNAが未分節中胚葉より培養細胞において安定に存在する理由は不明だが、未分節中胚葉特異的にこれら分節時計遺伝子のmRNAを分解するRNA結合タンパク質やmi-RNAが発現している可能性が考えられる。

トランスジェニックマウスの選択について

この研究において、*Hes7* プロモーター制御下で*Venus-Lfng* 3'UTR (L3U-1、L3U-2) もしくは*Venus-Hes7* 3'UTR (H3U-1 と H3U-2) を発現する4系統のトランスジェニックマウスを作成した。それらのラインでレポーター遺伝子の転写活性化領域を調べた結果、L3U-1とH3U-1マウスでレポーターの転写パターンは内在性*Hes7*の転写パターンを良く再現していたため、これら2ラインを実験に用いた。一方、他の2ラインL3U-2とH3U-2では*Venus*の転写は未分節中胚葉で波状の発現パターンを示してはいたが、内在性*Hes7*の転写が起らない領域でも弱い転写が見られた(図27B、図28)。L3U-2とH3U-2の未分節中胚葉において、レポーターmRNAの発現が波状のパターンを示す個体と、全体で発現が見られる個体が存在したが、

L3U-2 では H3U-2 と比較して波状の発現パターンが観察される個体が多かった(図 30)。この観察結果は *Lfng* 3'UTR が *Hes7* 3'UTR より mRNA を不安定にするという私の主張を支持するかもしれないが、私はこれらのラインを以降の実験には使用しなかった。

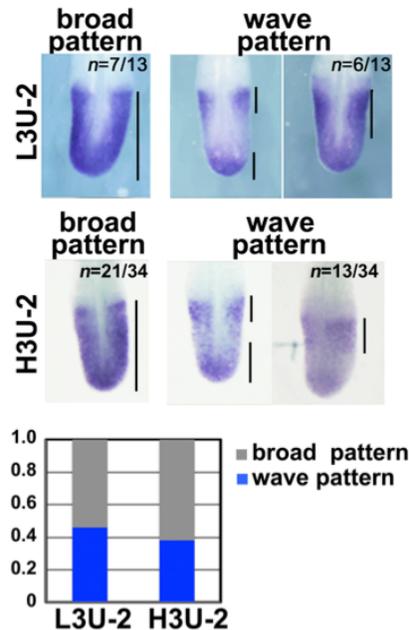


図30 L3U-2とH3U-2未分節中胚葉におけるVenus mRNAの発現パターン

L3U-2とH3U-2における胎生10.5日齢の未分節中胚葉におけるVenus mRNAの発現パターンは*in situ*ハイブリダイゼーションで検出された。どちらのラインでも、Venus mRNAが波状の発現パターンを示す個体（青色、L3U-2: 6個体/13個体中, H3U-2: 13個体/34個体中）と、未分節中胚葉の後半全体でmRNAの発現が見られる個体（灰色、L3U-2: 7/13, H3U-2: 21/34）があった。波状の発現パターンを示す個体の割合はH3U-2と比較してL3U-2で高い傾向にあった。

遺伝子発現制御における転写後調節の意義

Lfng と *Hes7* の他にも、Notch シグナルや Fgf シグナルに関係するいくつかの遺伝子は、未分節中胚葉で *Lfng* や *Hes7* と同様に発現変化する。これら一群の遺伝子は類似した発現パターンを示す遺伝子として“Synexpression group”と分類される[69]。それらの遺伝子は共通もしくは類似した転写制御を受けるが、それらの mRNA 発現領域は、常に同一とは限らないことから、今回報告した 3'UTR を介した mRNA の安定性制御は、“Synexpression group”の遺伝子における発現の多様性に貢献しているかもしれない。

分節時計遺伝子の転写後調節の生理学的意義

これまで、分節時計遺伝子の mRNA は非常に早く分解されると考えられていた。今回の実験から、*Lfng* mRNA は従来の予想通り素早く分解されることが確かめられたが、*Hes7* mRNA は比較的安定であることが明らかになった。*Lfng* は未分節中胚葉で Notch の細胞外ドメインの糖鎖修飾を介して Notch 活性を調節し、Notch 活性の振動を引き起こしている。Notch 活性の振動は体節形成と関わっており、Notch 活性はより明瞭に振動するべきであり、Notch 活性を調節する *Lfng* の発現も、より限られた範囲で起こることが望ましいかもしれない。一方で、*Hes7* は未分節中胚葉でフィードバックループを形成し、未分節中胚葉での遺伝子発現振動を生み出す中心的な機構である。*Hes7* は転写抑制因子として働き、一定時間転写を抑えることで、転写 on/off のフェーズを生み出している。もし、*Hes7* mRNA の安定性が *Lfng* のように低ければ、転写抑制に十分なタンパク量が得られず、転写 on/off を正確に切り替えられない可能性が考えられる。また、Hes/Her の振動周期は、フィードバックに要する時間遅れにより規定されると考えられているが、mRNA の安定性はタンパクの合成速度の変化を介して時間遅れを変化させうる。*Hes7* mRNA の比較的高い安定性は適切な振動周期を維持するために必要なかもしれない。これらの残された課題を解決するためには、*Hes7* の振動つまり mRNA・タンパク質量の時間変化を定量的に解析し、精密な数理モデルを構築することが必要だと考えられる。

結論

多細胞生物のからだは、個体、器官、組織、細胞、の順番に細分化でき、階層構造をもつ。からだの最小単位は細胞で、同じはたらきの細胞が規則正しく集まり、組織を形成する。多細胞生物の仕組みを理解するためには、そのからだが作られる過程つまり、発生における組織形成のメカニズムを明らかにすることが必須である。体節形成は、中胚葉細胞から連続的に体節が分化する過程であり、多細胞生物の組織形成を理解するモデルとして理想的である。本研究では、体節形成における遺伝子発現振動を利用してストライプパターンの形成が明瞭に行われるための2つの機構を明らかにした。

これまで、未分節中胚葉の遺伝子発現振動の同調に **Notch** シグナルが必要であることが知られていたが、その分子メカニズムはまだよくわかっていなかった。また、**Notch** 活性調節因子 *Nrarp* 欠損マウスで椎骨癒合が起こることは知られていたが、その原因は明らかになっていなかった。本研究では、*Nrarp* 欠損マウスにおいて、未分節中胚葉における遺伝子発現振動パターンと、それに引き続き形成される体節の内部極性が乱れることを明らかにした。このことは、細胞内部の **Notch** 活性の調節が遺伝子発現振動の同調性に関与する可能性を示している。また、*Nrarp* 欠損マウスは、催奇形性薬剤やヒートショックによって、体節や椎骨の形成異常を引き起こしやすいことが明らかになった。このことは、遺伝子発現振動の効率よい同調が、外部環境刺激に対してロバストに体節形成を進める機構の1つである可能性を示唆している。

本論文の後半では、分節時計遺伝子の **3'UTR** を介した **mRNA** 安定性の違いが遺伝子発現パターンを調節することを明らかにした。これまで、未分節中胚葉で発現振動する遺伝子の **mRNA** は素早く分解される必要があると考えられてきたが、それぞれの遺伝子発現パターンに **mRNA** 安定性の違いがどのように影響するかはよくわかっていなかった。本研究では、**mRNA** の **3'UTR** を介して **mRNA** の分解が素早く行われる程、明瞭なストライプパターンが形成されることを明らかにした。

本研究は体節形成過程において、遺伝子発現振動が明瞭なストライプパターンを生み出すための2つの機構を明らかにした。未分節中胚葉では、それぞれの細胞が内在的なリズムを保持し、それが隣接する細胞間で同調し、細胞間の連携が生まれ、均整のとれた組織が形成される。これまで、分子生物学研究では、ヒトの体を構成する細胞を分類し、それぞれの細胞で働く遺伝子やタンパク質の解析が行われてきた。その結果、種々の細胞の機能・系譜の詳細が明らかになった。しかしながら、ヒトのからだを構成する **60** 兆の細胞が互いに情報交換し、**1** 個体として機能するロジックは未だ解明されていない。私は、細胞がリズムを持つことと、それが互いに同調することは、からだの細胞を統制するための重要なツールであると信じている。遺伝学やシミュレ

ーション、イメージングを駆使して、細胞と個体のギャップを説明するロジックを導き出すことが、今後の生物学の目標だと考える。

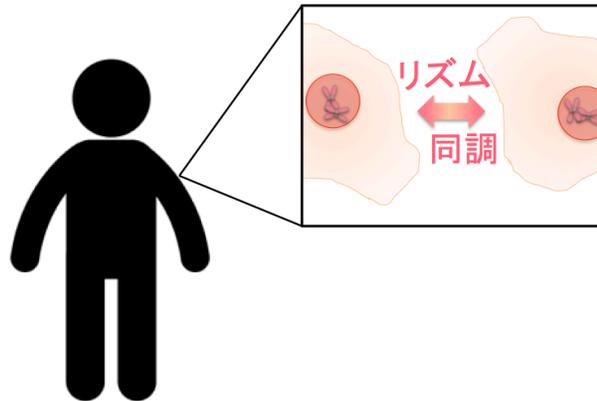


図 31 細胞がリズムを持ち、それが互いに同調することは、からだの細胞を統制するための重要なツールとなりうる

謝辞

本研究の第1章では、別所康全教授により作成された*Hes7*欠損マウス、松井貴輝助教と卒業生の金雄さんにより作成された*Nrarp*欠損マウスを、第2章では卒業生の樋上絢さんにより作成された*Hes7p-Venus*マウスを使用させていただきました。これらのマウスのおかげで、研究を行うことができました。感謝いたします。また、研究生活をとおして、遺伝子発現制御研究室のスタッフ・学生の方々、アドバイザーの先生がたから、非常に多くの考え方を学び、充実した大学院生活を送り、投稿論文、博士論文を仕上げることができました。どれひとつとっても、自分ひとりの力だけでは到底なし得なかったと思います。深く感謝いたします。最後になりますが、大学院の5年間で人生の手本とすべき多くの人と出会うことができました。先生、先輩、後輩、関係なく素晴らしい出会いに恵まれたことに感謝します。

引用文献

- [1] Wray, GA, Levinton, JS & Shapiro, LH (1996) Molecular evidence for deep Precambrian divergences among metazoan phyla. *Science* **274**, 568-573.
- [2] Dahmann, C, Oates, AC & Brand, M (2011) Boundary formation and maintenance in tissue development. *Nature Reviews Genetics* **12**, 43-55.
- [3] Pourquié, O (2001) Vertebrate somitogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 311-350.
- [4] Hamburger, V & Hamilton, HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* **88**, 49-92.
- [5] Christ, B & Ordahl, CP (1995) Early stages of chick somite development. *Anat Embryol* **191**, 381-396.
- [6] Pourquié, O (2011) Vertebrate segmentation: from cyclic gene networks to scoliosis. *Cell* **145**, 650-663.
- [7] Eckalbar, WL, Fisher, RE, Rawls, A & Kusumi, K (2012) Scoliosis and segmentation defects of the vertebrae. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1**, 401-423.
- [8] McGrew, MJ & Pourquié, O (1998) Somitogenesis: segmenting a vertebrate. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 487-493.

[9] Bessho, Y & Kageyama, R (2003) Oscillations, clocks and segmentation. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 379-384.

[10] Cooke, J & Zeeman, E (1976) A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J Theor Biol* **58**, 455-476.

[11] Dubrulle, J, McGrew, MJ & Pourquié, O (2001) FGF Signaling Controls Somite Boundary Position and Regulates Segmentation Clock Control of Spatiotemporal Hox Gene Activation. *Cell* **106**, 219-232.

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

[13] Pourquié, O (2003) The segmentation clock: converting embryonic time into spatial pattern. *Science* **301**, 328-330.

[14] Pourquie, O (2007) Building the spine: The vertebrate segmentation clock. **72**, 445-449.

[15] Palmeirim, I, Henrique, D, Ish-Horowicz, D & Pourquié, O (1997) Avian hairy Gene Expression Identifies a Molecular Clock Linked to Vertebrate Segmentation and Somitogenesis. *Cell* **91**, 639-648.

[16] Hirata, H, Yoshiura, S, Ohtsuka, T, Bessho, Y, Harada, T, Yoshikawa, K & Kageyama, R (2002) Oscillatory expression of the bHLH factor *Hes1* regulated by a negative feedback loop. *Science* **298**, 840-843.

- [17] Lewis, J (2003) Autoinhibition with transcriptional delay: a simple mechanism for the zebrafish somitogenesis oscillator. *Current Biology* **13**, 1398-1408.
- [18] Giudicelli, F & Lewis, J (2004) The vertebrate segmentation clock. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 407-414.
- [19] Bessho, Y, Miyoshi, G, Sakata, R & Kageyama, R (2001) Hes7: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes to Cells* **6**, 175-185.
- [20] Bessho, Y, Hirata, H, Masamizu, Y & Kageyama, R (2003) Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock. *Genes Dev* **17**, 1451-1456.
- [21] Bessho, Y, Sakata, R, Komatsu, S, Shiota, K, Yamada, S & Kageyama, R (2001) Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes Dev* **15**, 2642-2647.
- [22] Aulehla, A & Johnson, RL (1999) Dynamic Expression of lunatic fringe Suggests a Link between notch Signaling and an Autonomous Cellular Oscillator Driving Somite Segmentation. *Dev Biol* **207**, 49-61.
- [23] Oates, AC, Morelli, LG & Ares, S (2012) Patterning embryos with oscillations: structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock. *Development* **139**, 625-639.
- [24] Aulehla, A, Wiegraebe, W, Baubet, V, Wahl, MB, Deng, C, Taketo, M, Lewandoski, M & Pourquié, O (2007) A β -catenin gradient links the clock and wavefront systems in

mouse embryo segmentation. *Nat Cell Biol* **10**, 186-193.

[25] Dunwoodie, SL (2009) The role of Notch in patterning the human vertebral column. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 329-337.

[26] Kelly Kuan, C, Tannahill, D, Cook, GM & Keynes, RJ (2004) Somite polarity and segmental patterning of the peripheral nervous system. *Mech Dev* **121**, 1055-1068.

[27] Saga, Y & Takeda, H (2001) The making of the somite: molecular events in vertebrate segmentation. *Nature Reviews Genetics* **2**, 835-845.

[28] Nacke, S, Schäfer, R, De Angelis, H & Mundlos, S (2000) Mouse mutant "rib-vertebrae"(rv): A defect in somite polarity. *Developmental Dynamics* **219**, 192-200.

[29] Johnson, J, Rhee, J, Parsons, SM, Brown, D, Olson, EN & Rawls, A (2001) The anterior/posterior polarity of somites is disrupted in paraxis-deficient mice. *Dev Biol* **229**, 176-187.

[30] Shermoen, AW & O'Farrell, PH (1991) Progression of the cell cycle through mitosis leads to abortion of nascent transcripts. *Cell* **67**, 303-310.

[31] Jiang, Y, Aerne, BL, Smithers, L, Haddon, C, Ish-Horowicz, D & Lewis, J (2000) Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock. *Nature* **408**, 475-479.

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

719-723.

[33] Herrgen, L, Ares, S, Morelli, LG, Schröter, C, Jülicher, F & Oates, AC (2010) Intercellular coupling regulates the period of the segmentation clock. *Current Biology* **20**, 1244-1253.

[34] Mara, A & Holley, SA (2007) Oscillators and the emergence of tissue organization during zebrafish somitogenesis. *Trends Cell Biol* **17**, 593-599.

[35] Mara, A, Schroeder, J, Chalouni, C & Holley, SA (2007) Priming, initiation and synchronization of the segmentation clock by deltaD and deltaC. *Nat Cell Biol* **9**, 523-530.

[36] Krebs, LT, Deftos, ML, Bevan, MJ & 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.

[37] 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.

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

[39] Kim, W, Matsui, T, Yamao, M, Ishibashi, M, Tamada, K, Takumi, T, Kohno, K, Oba, S, Ishii, S & Sakumura, Y (2011) The period of the somite segmentation clock is sensitive to Notch activity. *Mol Biol Cell* **22**, 3541-3549.

[40] Morales, AV, Yasuda, Y & Ish-Horowicz, D (2002) Periodic Lunatic fringe Expression Is Controlled during Segmentation by a Cyclic Transcriptional Enhancer Responsive to Notch Signaling. *Developmental cell* **3**, 63-74.

[41] Delaune, EA, François, P, Shih, NP & Amacher, SL (2012) Single-cell-resolution imaging of the impact of Notch signaling and mitosis on segmentation clock dynamics. *Developmental cell* **23**, 995-1005.

[42] Mara, A, Schroeder, J, Chalouni, C & Holley, SA (2007) Priming, initiation and synchronization of the segmentation clock by deltaD and deltaC. *Nat Cell Biol* **9**, 523-530.

[43] Menegola, E, Di Renzo, F, Broccia, ML, 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* **74**, 392-398.

[44] Phiel, CJ, Zhang, F, Huang, EY, Guenther, MG, Lazar, MA & Klein, PS (2001) Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* **276**, 36734-36741.

[45] Di Renzo, F, Broccia, ML, Giavini, E & Menegola, E (2010) VPA-related axial skeletal defects and apoptosis: a proposed event cascade. *Reproductive Toxicology* **29**, 106-112.

[46] Di Renzo, F, Cappelletti, G, Broccia, ML, Giavini, E & Menegola, E (2007) Boric acid inhibits embryonic histone deacetylases: a suggested mechanism to explain boric acid-related teratogenicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **220**, 178-185.

[47] Li, Z & Shiota, K (2000) Stage-specific homeotic vertebral transformations in mouse fetuses induced by maternal hyperthermia during somitogenesis. *Developmental Dynamics* **216**, 336-348.

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

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

[50] Yang, L, Nichols, JT, Yao, C, Manilay, JO, Robey, EA & Weinmaster, G (2005) Fringe glycosyltransferases differentially modulate Notch1 proteolysis induced by Delta1 and Jagged1. *Mol Biol Cell* **16**, 927-942.

[51] Bray, SJ (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**, 678-689.

[52] Stanley, P (2007) Regulation of Notch signaling by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 530-535.

[53] Van Eeden, F, Granato, M, Schach, U, Brand, M, Furutani-Seiki, M, Haffter, P, Hammerschmidt, M, Heisenberg, C, Jiang, Y & Kane, DA (1996) Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 153-164.

[54] Dale, J, Maroto, M, Dequeant, M, Malapert, P, McGrew, M & Pourquie, O (2003) Periodic notch inhibition by lunatic fringe underlies the chick segmentation clock. *Nature*

421, 275-278.

[55] Lianoglou, S, Garg, V, Yang, JL, Leslie, CS & Mayr, C (2013) Ubiquitously transcribed genes use alternative polyadenylation to achieve tissue-specific expression. *Genes Dev* **27**, 2380-2396.

[56] Hilgers, V, Perry, MW, Hendrix, D, Stark, A, Levine, M & Haley, B (2011) Neural-specific elongation of 3' UTRs during Drosophila development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 15864-15869.

[57] Lim, C, Lee, J, Choi, C, Kilman, VL, Kim, J, Park, SM, Jang, SK, Allada, R & Choe, J (2011) The novel gene twenty-four defines a critical translational step in the Drosophila clock. *Nature* **470**, 399-403.

[58] Woo, K, Kim, T, Lee, K, Kim, D, Kim, W, Lee, K & Kim, K (2009) Mouse period 2 mRNA circadian oscillation is modulated by PTB-mediated rhythmic mRNA degradation. *Nucleic Acids Res* **37**, 26-37.

[59] Woo, K, Ha, D, Lee, K, Kim, D, Kim, T & Kim, K (2010) Circadian amplitude of cryptochrome 1 is modulated by mRNA stability regulation via cytoplasmic hnRNP D oscillation. *Mol Cell Biol* **30**, 197-205.

[60] Gallego, M & Virshup, DM (2007) Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 139-148.

[61] Giudicelli, F & Lewis, J (2004) The vertebrate segmentation clock. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 407-414.

[62] Hilgers, V, Pourquie, O & Dubrulle, J (2005) In vivo analysis of mRNA stability using the Tet-Off system in the chicken embryo. *Dev Biol* **284**, 292-300.

[63] Kuersten, S & Goodwin, EB (2003) The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nature Reviews Genetics* **4**, 626-637.

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

[65] Guhaniyogi, J & Brewer, G (2001) Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* **265**, 11-23.

[66] Riley, MF, Bochter, MS, Wahi, K, Nuovo, GJ & Cole, SE (2013) mir-125a-5p-Mediated Regulation of Lfng Is Essential for the Avian Segmentation Clock. *Developmental cell* **24**, 554-561.

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

[68] Sharova, LV, Sharov, AA, Nedorezov, T, Piao, Y, Shaik, N & Ko, MS (2009) Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA research* **16**, 45-58.

[69] Niehrs, C & Pollet, N (1999) Synexpression groups in eukaryotes. *Nature* **402**, 483-487.