

博士論文番号: 0981002

予定体節境界の確立における FGF/MAPK シグナルの役割

秋山隆太郎

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 25 年 12 月 4 日 提出

## 目次

序論	5
材料と方法	11
結果	16
考察	23
図・表	29
謝辞	45
参考文献	46

所属 (主指導教員)	遺伝子発現制御学研究室 (別所 康全 教授)		
氏名	秋山 隆太郎	提出	平成 25 年 12 月 4 日
題目	予定体節境界の確立における FGF/MAPK シグナルの役割		
<p>要旨</p> <p>生物は発生過程において、分節構造をつくりだす。せきつい動物の体節の形成過程は、分節構造形成を理解するための良いモデルである。体節は、発生前期の未分節中胚葉 (PSM) が頭側から尾側へ、一定時間おきに等間隔にくびれ切れることで形成される。ニワトリ胚における PSM 細胞の移植実験や、ゼブラフィッシュ胚における一過的なヒートショックを用いた実験から、PSM にはすでに体節 5 個分(S0 から S-IV)のプレパターンが形成されていることが示唆されている。すなわち、体節の分節構造は、まず将来分節化されるべき位置がきまり、その位置の中胚葉が後に分節化という形態変化をおこすことによって獲得される。しかしながら、S-IVにおいて最初に予定体節境界の位置を決定する分子メカニズムはよくわかっていない。</p> <p>PSM では尾側端に FGF が発現することで、尾側から頭側へ向かって FGF の濃度勾配が形成されている。FGF の濃度がある閾値を下回った地点で予定体節境界が形成されると考えられている。FGF は、PSM 細胞の受容体に結合し、下流の Ras-MAPK カスケードを活性化する。そこで本研究は FGF/MAPK シグナルに着目し、S-IVにおける予定体節境界がどのように確立されるのかを明らかにすることを目的とした。</p> <p>まず、FGF/MAPK シグナルの PSM における空間的な活性化パターンを知るために、下流のリン酸化 Erk の局在を調べた。体節形成期のゼブラフィッシュ胚においてリン酸化 Erk 特異的な抗体を用いて免疫染色を行ったところ、PSM におけるリン酸化 Erk は FGF のような濃度勾配を形成せず、二峰性のパターンを示した。さらに、フラットマウントした胚を用いてリン酸化 Erk の局在の時空間的变化を推定したところ、リン酸化 Erk が局在する領域の頭側端は新しく切れた体節境界から一定の距離に維持されており、次の 1 体節が形成される少し前のタイミングで 1 体節分尾側へシフトした。すなわち、リン酸化 Erk の局在は体節形成周期に連動して、尾側へ周期的に移動することがわかった。このことから私はリン酸化 Erk の局在が、その頭側端において予定体節境界を決めているのではないかと予想した。</p>			

そこで、Erk のリン酸化を一過的に阻害・亢進させる実験を試みた。リン酸化 Erk の局在が S-IV を規定するならば、Erk 活性の操作時には既に 5 体節分の正常なプレパターンが存在するため、実際の体節境界に異常が現れるまでに 5 体節分のタイムラグが生じるはずである。FGFR のリン酸化阻害剤を体節形成期のゼブラフィッシュ胚に一過的に処理すると、リン酸化 Erk は処理直後にのみ一過的に消失した。さらに、リン酸化 Erk の一過的消失の時点から数えて 5 個目に形成された体節でのみ、体節サイズの一過的な増大がみられた。反対に、Erk の脱リン酸化酵素阻害剤を処理して Erk 活性を亢進させた場合には、一過的なリン酸化 Erk 局在の頭側への伸展と、5 体節目における体節サイズの減少がみられた。これらの結果は、リン酸化 Erk による境界が S-IV での予定体節境界を規定することを示唆している。さらに同様の実験系において、*mesp-b* の発現について調べた。*mesp-b* は S-II (最新の体節境界から体節 3 個分尾側の領域) に発現し、これまでに知られている分節パターンを示す遺伝子のうち、最も尾側で発現するものの一つである。その結果、Erk 活性の一過的な変化から 3 体節形成された時点でのみ発現パターンに異常がみられた。よって、Erk により生み出された予定体節境界は、*mesp-b* の発現を規定する、すなわち *mesp-b* より上流に位置することが示唆された。

では、リン酸化 Erk の局在は、どのように周期的に後方へ移動するのだろうか。Erk 上流の Ras の活性化領域を調べたところ、Ras が活性化されているにもかかわらず Erk がリン酸化されていない領域が頭側 PSM に存在することがわかった。このことは、Erk のリン酸化が PSM の頭側領域において抑制されていることを示唆している。また、PSM では Notch シグナル下流の転写因子 *her1, her7* の発現が振動し、この周期性が体節形成周期を制御し、等間隔パターンを作っていると考えられている。そこで私は、*her1, her7* が周期的に頭側 PSM の Erk リン酸化を抑制することで、リン酸化 Erk 局在が周期的に変化するのではないかと考えた。この仮説を検証するために *her1, her7* をノックダウンしたところ、体節形成の周期性は崩れ、リン酸化 Erk の局在の頭側端は最終分節面から一定の位置に収束しなかった。このことから、リン酸化 Erk 局在の周期的な移動には、*her1, her7* が必須であることがわかった。

以上の結果より、一様にみえる未分節中胚葉組織の中に最初に分節境界面を生み出すのは、分節周期に連動した FGF/MAPK シグナル下流の局在パターンであることが明らかになった。さらに、この局在パターンの確立には *her1, her7* の発現が必要であることから、遺伝子発現の振動という時間情報が FGF/MAPK シグナルという空間情報に結びつくことにより、分節構造へと変換されることを示唆している。

## 序論

多細胞生物の多くは、分節構造を有する。分節構造は発生過程において一様で未分化な組織に、境界を形成することによって生み出される。からだをいくつかの区画に分けることで得られるこの構造は、モジュール構造として捉えることができる。

分節により形成された各モジュールは、それぞれ異なる形態をとることにより、異なる機能を持つことができるようになる。例えばショウジョウバエの初期発生過程では、まず縞状に発現するセグメントポラリティー遺伝子によって節構造がつくられる。その後、区切られた各節の特徴づけがホメオティック遺伝子によって行われ、触角や肢の生える位置が決定される。このシステムでは、各モジュールの特徴を変えるだけで多様な形態・機能を生み出すことができる。よって、分節構造を持つことは、生物にとって進化上有利に働いたと考えられる。ゆえに、分節構造の成り立ちを知ることは、生物の形態形成における戦略を理解する上で重要である。

### せきつい動物の体節形成

せきつい動物の体節の形成過程は、分節構造形成の良いモデルである。発生中期の胚に一過性に現れる体節は、球状の間充織が上皮に包まれた構造をとる。体節は神経管・脊索の左右両側に対称に存在しており、この左右一对の体節を構成単位として、頭尾軸に沿って連なる構造、すなわち繰り返し構造をなしている。体節は後に、硬節、筋節、皮節へと分化し、さらに脊椎骨、肋骨、体幹骨格筋・真皮へと分化していく。この過程では、頭尾軸のレベルに応じて異なる Hox 遺伝子が発現することにより、異なる形態変化が起きる (Krumlauf 1994)。したがって、脊椎骨や肋骨、体幹骨格筋にみられる繰り返し構造は、体節の構造に由来するといえる。さらに、体節由来ではない脊髄神経や血管の配置も、体節の空間パターンに依存して決定される (Keynes et al 1988)。ゆえに、体節はあらかじめ用意されたモジュールであり、それぞれの体節を頭尾軸上のレベルに応じたかたちに特化させることで、せきつい動物に特徴的な繰り返し構造が獲得される。

せきつい動物の体節は、未分節中胚葉 (Presomitic Mesoderm: PSM) の頭側端がくびれ切れることにより形成される。くびれ切られる領域の大きさはほぼ一定であるため、体節は等間隔に形成される。また、未分節中胚葉は一定時間おきにくびれ切れるため、体節は周期的に形成される。

体節形成の周期は、動物種ごとに特異的であることがわかっている。マウス胚の分節周期は約 120 分、ニワトリ胚は 90 分、ゼブラフィッシュ胚は 30 分である (Giudicelli and Lewis 2004)。また、体節形成過程が持続する時間も動物種ごとに異なっており、それによって最終的な体節数 (総体節数) も異なる。マウス胚では約 65 対、ニワトリ胚では約 50 対、ゼブラフィッシュ胚では 30–34 対の体節がつくられる (Gomez et al., 2008)。

### Clock and wavefront モデル

PSM の周期的な分節化を説明するためのモデルは、これまでいくつか提唱されている (Cinquin 2007)。代表的なものに Clock and wavefront モデル (Cooke et al., 1976) がある (図 1A)。このモデルは、PSM で周期的に変動する“振動子 (Clock)”と、PSM の前からうしろに一定速度で移動する“Wavefront”をそれぞれ仮定している。Clock の位相が OFF から ON へ変化するとき、Wavefront において体節境界面が形成されるとする。すると、分節面を周期的かつ等間隔に決定することができる。しかしながら、このモデルが提唱されて以降、Clock と Wave-front に相当する分子実体は長く不明であった。

1997 年に Pourquie らは、遺伝子 *c-hairy1* が、ニワトリ胚 PSM において体節形成と同じ周期で発現振動することを報告した (Palmeirim et al., 1997)。この報告の後、PSM において発現振動する遺伝子群の存在が明らかとなり、これら遺伝子の発現振動が Clock を構成すると考えられている (図 1B)。また同時期に、液性因子 FGF8 が PSM で濃度勾配を形成し、この閾値が体節サイズを規定する事が明らかにされた。この濃度勾配は尾の伸長とともに、PSM の前からうしろに一定速度で移動すると考えられる。よって、FGF8 の濃度勾配による閾値が Wavefront に相当すると考えられている (図 1C)。しかしながら、遺伝子発現の振動 (Clock) と、FGF の濃度勾配 (Wavefront) が、どのようにシグナルを組み合わせることで周期的な境界形成をおこなっているのか、その分子実体はよくわかっていない。

### 分節時計による体節形成の周期性の制御

体節形成の周期は、分節時計と呼ばれる遺伝子発現の振動によって制御されている。マウス胚の PSM では Notch, FGF, Wnt の関連因子を中心とするおよそ 40 個の遺伝子の発現量が、一体節の形成にかかる時間と同じ 120 分周期で振動している (Dequeant et al., 2006)。これら遺伝子の発現領域は、PSM の尾側から

頭側にむかって波状に移動し、各波が分節面へ到達すると分節が起きるように見える。これは細胞移動によるものではなく、各細胞での発現が周期的に振動することにより発現領域が波状に見えるものである。

また、Hes7 や Lfng など、PSM において発現振動する遺伝子のノックアウトマウスでは、体節の分節化が不規則に起こり、それによって骨格や血管の等間隔なパターンが失われる (Bessho et al., 2001; Evrard et al., 1998)。よって、分節時計が体節形成の周期性を制御していると考えられている。

ゼブラフィッシュにおいてはマウス Hes7 のホモログである *her1, her7* や *delta-C* の発現が、PSM で波状の発現パターンを示すことが知られている (Holley, 2007)。*her1, her7* をノックダウンすると、Hes7 ノックアウトマウスと同様に分節構造の周期性が失われる (Oates et al., 2002)。よって、ゼブラフィッシュでも分節時計が体節の周期性を制御していると考えられる。

## FGF シグナル経路

分節時計による時間的制御とともに近年明らかにされてきたのが、分節の空間的制御である。空間的制御においては、Fibroblast growth factor (FGF) シグナルが主要な役割を果たしていると考えられている。

FGF シグナルは、その下流のシグナル伝達経路によって細胞増殖や細胞移動、分化などさまざまな発生過程に関与することが知られている。現在までに、FGF ファミリーはヒトとマウスでは 22 種、ゼブラフィッシュでは 16 種が報告されている (Itoh, N et al., 2007)。

分泌性タンパク質である FGF は、その特異的レセプターである FGFR に結合する。FGFR は不活性型では単量体で存在するが、その細胞外ドメイン Ig II、Ig III が高分子へパラン硫酸プロテオグリカン HSPG を介して 2 つの FGF 分子と結合することにより、二量体を形成する (Schlessomger et al., 2000)。リガンドとの結合によって FGFR の細胞内ドメインは自己リン酸化され、いくつかのシグナル経路が活性化される (図 2)。代表的な経路に、Ras/MAPK キナーゼ経路、PI3 キナーゼ (PI3K) 経路、イノシトールリン脂質ホスホリパーゼ C (PLC  $\gamma$ ) 経路があり、それぞれ主に細胞の増殖・分化、形態・移動、生存に関わると考えられている (Dorey et al., 2010)。

このうち、Ras/MAPK キナーゼ経路は、膜タンパク FGFR substrate2  $\alpha$  (FRS2  $\alpha$ ) が自身の PTB ドメインを介して FGFR の細胞内ドメインに結合することで始まる。FGFR によるチロシン残基のリン酸化を受けた FRS2  $\alpha$  は、アダプタータンパク Grb2 と結合する。さらに Grb2 は Ras に対するグアニンヌクレオチド

交換因子(Ras-GEF)である Sos を活性化するので、Ras は GDP 型から GTP 型へ変化し、下流の MAP キナーゼ経路が活性化される。最終的にリン酸化された MAP キナーゼ (MAPK) が核へ移行し、標的遺伝子の転写活性を調節する。

また、FGFR-FRS2 $\alpha$ -Grb2 の複合体は、Grb2-associated binding protein1 (Gab1) との結合を介して、PI3K 経路を活性化することもできる。活性化された PI3K は細胞膜においてホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (PIP2)をリン酸化し、ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 (PIP3) を生成する。PIP3 が Akt に結合すると、Akt は PDK によってリン酸化されて活性化する。活性化した Akt は細胞膜から遊離し、さまざまな細胞内シグナル経路を活性化する。

一方、活性化した FGFR の細胞内ドメインは、PLC $\gamma$ とその SH2 ドメインを介して結合する。これによってリン酸化された PLC $\gamma$ は、細胞膜付近においてホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸(PIP2)をイノシトール-1,4,5-三リン酸(IP3)とジアシルグリセロール (DAG)とに加水分解する。IP3 は細胞内 Ca イオンの上昇を引き起こし、DAG は protein kinase C (PKC) を活性化する。

## FGF シグナルによる体節形成の空間的制御

FGFR はマウスやゼブラフィッシュ、ニワトリ胚において、PSM や体節に発現している。ゼブラフィッシュとニワトリ胚においては PSM に発現する FGFR は FGFR1 のみであり、FGFR1 を介した FGF シグナルが体節形成に深く関与していると考えられる (Dubrulle et al., 2001)。また、Ras-MAPK シグナル下流の Erk がリン酸化されている領域と *fgf8a* 発現領域がほぼ等しいことから、PSM では FGF8 によって FGFR1 が活性化されていると考えられる (Sawada et al., 2001)。しかしながら、FGFR1 または FGF8 のノックアウトマウスはそれぞれ、体節形成期以前の原腸陥入異常とそれに伴う沿軸中胚葉への分化異常を引き起こす (Deng et al., 1994; Sun et al., 1999)。したがって、PSM において FGF シグナルがどのように体節形成を制御しているのかは、以下に示すような実験により明らかにされてきた。

まず、ニワトリ胚 PSM では、*fgf8* が尾側から頭側にかけて濃度勾配を形成していることが、*in situ* hybridization によって明らかになった (Dubrulle et al., 2001)。また、*fgf8* mRNA イントロンに結合するプローブを用いた *in situ* hybridization によって、*fgf8* は尾側末端でのみ転写されていることがわかった (Dubrulle et al., 2004)。よって、尾の伸長によって PSM 細胞の相対的位置が頭側へ近づくほど転写産物が分解されるために、mRNA の濃度勾配が形成されることがわかった。また、タンパク質レベルでの濃度勾配の存在も示唆された。



FGF の濃度が最も高いと考えられる PSM の尾末端では、細胞分裂が盛んに起こっており、分裂に由来する新しい細胞が尾の先端につき足されることで、尾が伸長する。尾の伸長に伴い、尾の先端から供給された未分化な細胞の位置は、相対的に頭側へと移動し、やがて体節へ取り込まれる。したがって、FGF の濃度勾配は、PSM 細胞から体節細胞への分化を制御していると考えられる。

実際に、ニワトリ胚とゼブラフィッシュ胚において FGFR1 阻害剤である SU5402 を用いて一過的に FGF シグナルを阻害すると、体節のサイズが大きくなった(Dobrulle et al., 2001; Sawada et al., 2001)。一方、PSM に FGF8 を染み込ませたビーズを移植し、一過的・局所的に過剰発現させると、小さい体節が形成された(Dobrulle et al., 2001; Sawada et al., 2001)。これらの結果は、FGF 濃度勾配が変化したことによって、PSM 細胞が体節へ分化する位置が前後に変化したためであると考えられる。したがって、FGF シグナルは、FGF 濃度の閾値によって、分節化の位置を決めていると考えられる。

#### 予定体節境界の存在とその決定機構

PSM は一見すると、節構造のない未分化な組織であるが、以下の報告により、実際には節構造のプレパターン、すなわち予定体節境界が存在することが示唆されている (図 3A)。

ニワトリ胚 PSM を電子顕微鏡により観察すると、PSM に体節様の細胞塊に見える構造体 “somitomere” が認められた (MeierS., 1981)。また、体節形成期のゼブラフィッシュ胚に一過的にヒートショックを与えると、4 個の体節が正常に形成されたのち、5 個目の体節で初めて体節境界の境界面に異常が観察された(Roy et al., 1999) (図 3B)。同様の結果はニワトリ胚においても確認された(Primmet et al., 1988)。また、ニワトリ胚において PSM の S- I の領域を切り取り、頭尾軸を反対にして元の場所へ戻すと、異所的な分節がみられた(図 3C)。S- I から S-IV における同様の操作でもそれぞれ同じ結果が得られたが、S- V、S- VI の操作では得られなかった(Dobrulle et al., 2001)。これらのことから、PSM ではすでに体節 5 個分 (S0 から S-IV) のプレパターンが決まっていることが示唆された。したがって、予定体節境界の決定は S-IV のレベルで行われると考えられる。

さらに、すでに記したような体節形成期ゼブラフィッシュ胚に対する FGFR1 阻害剤の一過的な曝露が行われ、2 体節における FGF シグナルの阻害は 7 体節目に体節サイズの増大をもたらした (Sawada et al., 2001)。したがって、S-IV のレベルでの予定体節境界の決定プロセスには FGF シグナルが関与している

と考えられる。しかしながら、その分子メカニズムはよくわかっていなかった。そこで本論文は FGF/MAPK シグナルに着目し、S-IVにおける予定体節境界がどのように確立されるのかを明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### ゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュ (*danio rerio*) は、人口海水 (塩濃度 0.03%、水温 28.5°C) を用い、明期 14 時間、暗期 10 時間の条件下で飼育された。性成熟後の雄と雌は異なる水槽で隔離飼育され、これらの交配によって受精卵を得た。交配の際には、暗期に入る数時間前、小型の水槽に底部が網状の水槽を重ねて雌を入れ、さらにもう一段の網底水槽を重ねて雄を入れた。こうして隔離された雌雄が同一水槽にある状態で、一晚飼育した。次の明期に雄と雌を混合することで産卵させ、卵を回収した。発生段階は Kimmel らの発生段階表に従った (Kimmel et al., 1995)。

### ゼブラフィッシュ受精卵へのマイクロインジェクション

マイクロインジェクションに用いたのガラス管は、NARISHIGE ガラス管 (G-1)1x90mm をプラー (PC-30, NARISHIGE) で曳いた後、ガラス管の先端をカッターで切断して使用した。先端の口径を揃えるために、基準となるガラス管を用意し、実体顕微鏡下 (Olympus SZ61) でその口径に合わせるよう切断した。

マイクロインジェクションは、FemtoJet (Eppendorf) を用いて、実体顕微鏡下で行った。受精卵を得た後、その発生ステージが 1-2 細胞期のうちに、数本の溝をつけた 1% アガロースゲルに受精卵を並べ、インジェクションを行った。インジェクション量は、受精卵 1 個につき平均 5 nℓ であった。インジェクション後、あらかじめ用意した、受精卵飼育液 (塩濃度 0.03%、メチレンブルー  $3 \times 10^{-5}$ %) に受精卵を移し、28.5°C のインキュベーター内で飼育した。

### モルフォリノオリゴ

モルフォリノアンチセンスオリゴ (Geen Tools 社製) は、以下の配列のものを使用した。

*her1* MO: 5' - TTCGACTTGCCATTTTTGGAGTAAC - 3' (Holikawa et al., 2007; Oates et al., 2002),

*her7* MO: 5' - CAGTCTGTGCCAGGATTTTCATTGC - 3' (Holikawa et al., 2007; Oates et al., 2002),

*mesp-b* MO: 5' - TCGGTTCTTGCTTGAGGTTTGCATG - 3' (Kawamura et al., 2005; Lee et al., 2009),

### ***in situ* hybridization** プローブの作成

*fgf8a*, *mesp-b*, *her1*mRNA に対するプローブは、cDNA を鋳型にして作成した。cDNA プール (12hpf のゼブラフィッシュ胚) から RT-PCR により、目的の cDNA 断片を得た。プライマー配列は以下のとおりである。

*fgf8a* F 5'-GCTCTGCAGAATGTGAAGTACGAAGGCTGG-3'

*fgf8a* R 5'-AGAGGTGCCCCGGCTGCTGC-3'

*mespb* F 5'-CGACATGCAAACCTCAAGCAAGA-3'

*mespb* R 5'-TCCGTCATCTCCAGTAAGTCTGA-3'

*her1*F5'- ACTACTAGTGCAAAACTGAAGACACTTAGCAT-3'

*her1*R 5'-TCTTCTAGATTAAATTATATAAATTTTAAATAAGTGAAAAAAC

TGTACAATTAATTTACAATCTAC-3'

目的の cDNA をクローン化したのち、制限酵素処理によりプラスミド DNA を直線化した (環状プラスミド DNA 5  $\mu$ g、制限酵素 3  $\mu$ l, 10xBuffer 3  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O up to 30  $\mu$ l, 37°C、3 時間)。得られた DNA の一部を電気泳動し、DNA が制限酵素によって完全消化され、直線化したことを確認した。制限酵素を分解するためプロテアーゼ K (1mg/ml) を 5  $\mu$ l 加え、37°C、10 分間処理した。TE buffer を 165  $\mu$ l 加え、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールを 200  $\mu$ l 加えた。転倒混和し、室温 10 分間 10000rpm で遠心した。その後、先端を切ったチップで水層のみを別のチューブに移し、再びフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールを加えて遠心し、水層のみを別のチューブに移した。これに NaOAc を 30  $\mu$ l、100%EtOH を 700  $\mu$ l 加え、ボステックスの後、-30°C で 15 分処理した。4°C、15000rpm で 5 分間遠心し、上清をとり除き、5 分間風乾の後、TE Buffer を 20  $\mu$ l に DNA を溶解させた。こうして得た template DNA をもとに、In vivo transcription を行った。直線化した DNA 1  $\mu$ g、10×反応緩衝液 2  $\mu$ l、10×DIG RNA labeling Mixture 2  $\mu$ l, RNA polymerase 1  $\mu$ l, DEPC 水 (20ul に調整)を混合し、37°C で 2 時間反応させ、エタノール沈殿の後、ホルムアミドに溶解させ、-30°C にて保存した。

### **Whole-mount *in situ* hybridization**

4%PFA/PBS で 4°C・一晩固定したゼブラフィッシュ胚を、100%メタノールによって脱水したのち、-30°Cで一時的に保存した。その後、実験に使用する際には 50%、25%メタノール、1xPBS を用いて段階的に再水和した。つづいて、氷上で 4%PFA/PBS を加えて 20 分間固定処理をし、PBS で 2 回洗浄後、10  $\mu$ g/ml のプロテアーゼ K で 1 分間処理した。これをただちにグリシン溶液に置換して酵素反応を止めた。その後、再び 4%PFA/PBS による 20 分間氷上固定を行い、PBT による 3 回の洗浄後、ハイブリダイゼーション溶液を加えて 70°C で 1 時間、プレハイブリダイゼーション処理を行った。ハイブリダイゼーション溶液を取り除き、目的の mRNA に対するアンチセンス RNA プローブ溶液(終濃度 100ng/ml, ハイブリダイゼーションバッファーに溶かした)を加え、70°C 14 時間ハイブリダイゼーション処理を行った。その後、Solution 1 (ホルムアミド 50ml, 20xSSC pH4.5 25ml, 20%SSC 5ml, dH<sub>2</sub>O 20ml) で 70°C 1 時間 3 回、Solution3 (ホルムアミド 50ml, 20xSSC pH4.5 10ml, dH<sub>2</sub>O 40ml) 65°C 1 時間 2 回の洗浄を行った。その後、TBST 室温 5 分 3 回の洗浄を行い、10%ヤギ血清/TBST を加えて 1 時間のブロッキングの後、アルカリホスファターゼが結合した抗 DIG 抗体を 10%ヤギ血清で溶かした溶液で、4°C にて一晩インキュベートした。その後、TBST による洗浄を、常温 5 分 3 回、常温 15 分 10 回を行い、PBT で洗浄した。NTMT 10ml, 75mg/mlNBT45  $\mu$ l, 50mg/ml BCIP35  $\mu$ l を混合した液を基質として加え、常温にて発色させた。

## 免疫染色

ゼブラフィッシュ胚を 4%PFA, 0.2%グルタルアルデヒド混合液をもちい、4°C で一晩固定した。その後 100%メタノールによって置換したのち、-30°C で一旦保存した。その後、50%メタノール、25%メタノール、1xPBS により段階的に再水和した。細胞内のペルオキシダーゼを失活させるため、10%Triton・6%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS で常温 20 分処理し、マレイン酸バッファー(MABDT)で洗浄した。2%FBS/MABDT で 1 時間ブロッキングしたのち、dp-ERK 抗体 (SIGMA) を 1:2000 になるよう 2%FBS/MABDT で調整し、4°C で 24 時間以上おいた。その後、MABDT で 15 分 6 回洗浄し、PBT で洗浄後、二次抗体 (anti  $\alpha$ -mouse-IgG, conjugated with HRP) を 1:100 になるよう、2%FBS/MABDT で希釈し、4°C で 24 時間以上おいた。その後、再び MABDT で 15 分 6 回洗浄し、PBT で洗浄後、チラミドシグナル増幅法:TSA(PerkinElmer)を用いて Alexa-488 または Alexa-555 で標識した。

## ゼブラフィッシュ胚のフラットマウント

時計皿上において、免疫染色あるいは *in situ* hybridization 後のゼブラフィッシュ胚 10 個を 100%グリセロール 200  $\mu$ l で置換し (30 分間)、グリセロール下でピンセットによって卵黄部分と胚部分を引き離した。その後、スライドガラス(76×26mm, MATSUNAMI)に 2 枚のカバーガラス(18×18mm, 厚さ 0.12~0.17mm)を置き、その間に胚を置いた。そこに、マウンティングメディウム (VECTASHIELD, VECTOR) を添加し、上から更にカバーガラス (24×50mm, MATSUNAMI) を置いて、マニキュアを周囲に塗って封入した。フラットマウントした胚は、コンフォーカルレーザー顕微鏡(LSM510 または LSM710, Carl Zeiss)により撮影された。

## フラットマウント胚のシグナルラインスキャン

撮影により得られた画像を用いて、まず PI 染色した画像によって、最新の体節境界に目印をつけた。そこから PSM の先端にいたるまでのミッドラインに沿った領域 (脊索のすぐ脇) に、image j (Rasband, et al., 1997-2009) を用いて太さ 5、10 または 15 ピクセル分の線を引き、ラインスキャンを行った。得られたシグナル輝度情報とその変化を示したグラフに基づき、発現領域・局在領域を示した。

## ゼブラフィッシュ胚の阻害剤処理

50 から 70%epiboly ステージのゼブラフィッシュ胚のコリオンをピンセットで除去し、体節形成期直前にメチレンブルー水で well を満たした 24well plate へ胚を移した (20 個体/well)。2 体節期にメチレンブルー水で希釈した阻害剤を 300  $\mu$ l 添加し、暗所(28°C)でインキュベートしたのち、一部は固定し、その他は洗浄した。洗浄は、メチレンブルー水で満たした 10cm ディッシュへ胚を移し、穏やかにディッシュを回し、この過程を 3 回繰り返すことにより行われた。阻害剤には SU5402(CALBIOCHEM), Dual Specificity Protein Phosphatase 1/6 Inhibitor, BCI (CALBIOCHEM)の stock solution(DMSO に溶かし 10mg/ml とした)をメチレンブルー水でそれぞれ 0.2mg/ml、0.1mg/ml に希釈して用いた。また、処理時間は、SU5402: 8 分間、BCI: 4 分間とした。

## ゼブラフィッシュ胚のヒートショック

あらかじめ 50ml チューブにメチレンブルー水を 20ml 入れ、ヒートブロッカー (TAITEC CORPORATION) により 3 時間かけて 40℃に温めた。2-3 体節期の胚 50 個を 50ml チューブにメチレンブルー水とともに移し、28℃でインキュベートした。その後 6 体節期にチューブのメチレンブルー水を温めたメチレンブルー水に置き換え、ヒートブロッカーにより 30 分間 40℃で温めた。その後一部はそのまま固定し、その他はメチレンブルー水で満たした 10cm ディッシュへ移し、28℃でインキュベートの後 30 分、90 分後、24 時間後に固定した。

## 結果

### *fgf8a* の発現領域は尾の伸長とともに連続的に移動した

まず FGF/MAPK シグナルの最上流に位置する *fgf8a* の発現パターンを調べた。*fgf8a* の mRNA は PSM において濃度勾配をつくっていると考えられており、体節形成期の尾の連続的な伸長にともない、*fgf8a* の濃度勾配も連続的に後方へ伸長するはずである。*fgf8a* 発現領域の空間的な変化をとらえるために、*in situ* hybridization 法により *fgf8a* mRNA を染色した後、いくつかの胚をフラットマウントし、胚を PSM の長さ順に並べた。ここでは、同体節数の胚同士において、PSM の長さが時間経過に比例するものと考え、発現の時間的変化を推定した。その結果、*fgf8a* の発現領域は尾の伸長に伴い、連続的に後方へ移動することが観察された (図 4A)。

より正確な推定を行うために、3-5 体節期の 29 個の胚についてラインスキャンを行い、PSM における発現領域の分布を計測した。その結果、すべての胚において、*fgf8a* の発現は濃度勾配を形成していた。また、新しく切れた体節から *fgf8a* 発現領域の頭側端までの距離は、PSM が伸長するとともに長くなった (図 4B)。したがって、*fgf8a* の発現領域は尾の伸長にともない、連続的に尾側へ移動することが明らかになった。

### Ras の活性化領域は尾の伸長とともに連続的に移動した

次に、*fgf8a* mRNA の連続的な移動パターンが、FGF/MAPK シグナル下流である Ras の活性化パターンに受け継がれているかを調べた。このために、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用し、Ras-Raf 相互作用を時空間的に捉えられるプローブ(Raichu-Ras)を用い、ライブイメージングを行った。Raichu-Ras をコードする mRNA を *in vitro* で合成し、受精卵に注入することで Raichu-Ras を強制発現させた(図 5A,B)。強制発現させた胚から、体節形成期においてタイムラプス画像を取得し、Ras の活性化領域の時空間的変化を定量した(図 5C)。その結果、Ras の活性化領域は、尾の伸長に伴い、後方へ連続的に移動した。



## リン酸化 Erk の局在は体節形成周期にあわせて不連続に移動した

さらに、FGF/MAPK シグナルにおいて Ras よりも下流の因子の活性化パターンを知るために、リン酸化 Erk の局在を調べることを考えた。体節形成期のゼブラフィッシュ胚においてリン酸化 Erk 特異的な抗体 (anti-di-phosphorylated ERK: dp-ERK) を用いて免疫染色を行ったのち、胚をフラットマウントした。その結果、リン酸化 Erk の局在は、*fgf8a* のような濃度勾配は示さなかった。また、フラットマウントした胚を PSM の長さ順に並べると、リン酸化 Erk 局在の頭側端は新しく切れた体節から一定の距離に保たれていることが観察された (図 6A)。また、リン酸化 Erk 局在領域の長さは、PSM の長さに比例して長くなることが観察された (図 6A)。

より正確に局在の変化をとらえるために、3-5 体節期の 39 個体の胚でラインスキャンを行い、PSM における局在領域の分布を計測した。リン酸化 Erk は KV 周辺を除く尾側 PSM と頭側 PSM に分布しており、頭側では *fgf8a* の発現よりも急激にシグナルが低下していた (図 11B)。さらに、最後に切れた体節からリン酸化 Erk の頭側端までの距離は  $198.6 \pm 4.8 \mu\text{m}$  に維持されていた (図 6B)。PSM 長さが  $666.3 \pm 22.3 \mu\text{m}$  であることを考えると、ばらつきが非常に小さいと考えられた。さらにリン酸化 Erk の局在の頭側端は、次の 1 体節が形成されるタイミングで 1 体節分 (約  $50 \mu\text{m}$ ) 尾側へシフトしていた (図 6B)。以上の結果から、リン酸化 Erk の局在は体節形成周期に連動して、不連続に後方へ移動すると考えられた。

さらに、上記のような *fgf8a*, リン酸化 Erk の挙動が、同一胚において、おなじ染色方法 (蛍光) を用いた場合にも観察されるか調べるため、*fgf8a* mRNA とリン酸化 Erk の二重染色を行い、同様の解析を行った。その結果、上記と同様の挙動が観察された (図 7)。

未分節中胚葉では、転写因子をコードする遺伝子 *her1* の発現が振動し、この振動の周期性が体節形成周期を制御し、等間隔パターンをつくっていると考えられている。したがって私は、*her1* の発現パターンを時間軸のマーカースとして使うことを考えた。*her1* mRNA とリン酸化 Erk の染色を同一胚に対して行い、*her1* の発現パターンを基準に胚を並べた。その結果、やはりリン酸化 Erk の局在は、分節周期に同調して 1 体節分後方へ不連続的に移動することが観察された (図 8)。

## リン酸化 Erk の局在の不連続な移動には *her1,her7* の発現が必要である

次に、リン酸化 Erk の局在を周期的に後方へ移動させるメカニズムについて調べた。マウス胚の PSM では、FGF/MAPK シグナルのフィードバックインヒビターである *Sprouty2* , *Sprouty4*, *Dusp2* といった遺伝子が、これら遺伝子のプロモーター領域に対する Notch シグナルの周期敵な制御によって、発現振動していることが報告されている(Niwa et al., 2007; Hayashi et al., 2009)。また、FGF フィードバックインヒビターの振動によって、マウス胚 PSM ではリン酸化 Erk の局在領域も振動していることが明らかになっている(Niwa et al., 2011)。さらに、当研究室の増田らにより、同一胚における Ras の活性化と Erk リン酸化が調べられた。その結果、Ras が活性化されているにもかかわらず Erk がリン酸化されていない領域が頭側 PSM に存在することがわかっている(増田美和 修士論文 2008, 図 5D)。このことは、PSM の頭側領域において、FGF/MAPK シグナルが Ras の下流から Erk のリン酸化の間で抑制されていることを示唆している。ゼブラフィッシュ胚 PSM においては、Notch シグナル下流の転写因子 *her1,her7* の発現が振動し、この周期性が体節形成周期を制御し、等間隔パターンを作っていると考えられている。そこで私は、*her1,her7* が周期的に頭側 PSM の ERK リン酸化を修飾することで、リン酸化 Erk 局在が周期的に変化するのではないかと考えた。

この仮説を検証するために、アンチセンスモルフォリノオリゴを用いて、*her1,her7* のノックダウンを行った。その結果、ノックダウン胚の体節は等間隔にはくびれ切れず、分節面がランダムな間隔で生じていた(図 9B,C)。また、いくつかの胚を PSM の長さ順に並べると、新しく切れた体節からリン酸化 Erk 局在の頭側端までの距離がばらついていることが観察された(図 9A)。4-6 体節期のノックダウン胚 35 個を PSM の長さ順に並べ、ラインスキャンし、リン酸化 Erk の局在を定量したところ、その頭側端は最新の分節面から  $190.6 \pm 17.0 \mu\text{m}$  の位置に存在しており、WT よりも値がばらついていた(図 9D)。このことから、リン酸化 Erk 局在の周期的な移動には、*her1,her7* が必須であることが明らかになった。

## *her1,her7* は周期的な体節形成に必要である

上記の結果から、*her1, her7* ノックダウン胚では体節が周期的には形成されず、分節面がランダム生じることが示唆された。しかしながら、これまで *her1,her7* ノックダウン胚において、実際に体節形成がランダムに生じる様子を詳細に観

察した例はなかった。そこで私は、*her1,her7* ノックダウン胚の体節形成過程をライブイメージングによって観察することにした。野生型胚、ノックダウン胚において、1 体節の形成にかかった時間と、その結果できた体節の大きさを計測した (図 10A)。

その結果、野生型胚では 1 体節の形成にほぼ 30 分を要し、 $50\ \mu\text{m}$  程の体節が形成された (図 10B)。一方ノックダウン胚では、1 体節形成にかかる時間は大きくばらつき、形成される体節の大きさもばらついた (図 10C)。よって、*her1,her7* ノックダウン胚においては分節がランダムに起こっていることが確かめられた。また、ノックダウン胚において、体節形成にかかる時間とできた体節の大きさとの間には、正の相関関係がみられた。

### リン酸化 Erk の勾配は *fgf8a* の濃度勾配よりも急である

*fgf8a* と下流のリン酸化 Erk の違いをより詳細に調べるため、*fgf8a* mRNA の濃度勾配とリン酸化 Erk の勾配をラインスキャンによって比較した。*fgf8a* はクッペル胞 (KV) をピークとするなだらかな勾配を形成していた (図 11A)。一方リン酸化 Erk は、KV より頭側と尾側においてより強いシグナル強度を示す、二峰性のパターンを示した (図 11B)。勾配部分の傾きを比較すると、リン酸化 Erk は *fgf8a* に比べて傾きが急であった (図 11C)。このことは、*fgf8* よりも下流のリン酸化 Erk のほうが、シグナルの On-Off の境界をより容易に形成しやすい、ということを示唆している。

### 一過的な Erk リン酸化の阻害は 5 体節形成後の体節サイズを増大させた

ここまでの結果から、私はリン酸化 Erk の局在が、その頭側端において予定体節境界を決めているのではないかと予想した。そこで、Erk のリン酸化を一過的に阻害・亢進させる実験を試みた。

リン酸化 Erk の局在が S-IV を規定するならば、Erk 活性の操作時には既に 5 体節分の正常なプレパターンが存在するため、実際の体節境界に異常が現れるまでに 5 体節分のタイムラグが生じるはずである。Sawada らの報告によれば、2 体節期に一過的に高濃度の FGFR のリン酸化阻害剤を添加すると、6 個の体節が正常に形成され、続く 7 体節目でのみ大きな体節が形成される。(Sawada et al 2001)。しかしながら、この一過的な阻害剤処理によりリン酸化 Erk の局在がどのように変化するのは報告されていない。私はこの系を利用し、ERK リン酸化状態と分節化との関連性を調べた。

具体的には、2体節期のゼブラフィッシュ胚に対し、FGFR1の阻害剤であるSU5402を一過的に処理し、処理直後から3つの時点において胚を固定し、リン酸化Erkに対する抗体染色を行った(図12A)。その結果、リン酸化Erkは処理直後にのみ一過的に消失し(n=20; 図12E, 2-somite)、阻害剤処理後1体節形成時にはすでにその局在パターンは回復していた(n=20; 図12E, 3-somite)。さらに、リン酸化Erkの一過的消失の時点(2s)から数えて5個目に形成された体節(7s)でのみ、体節サイズの一過的な増大がみられた(n=18; 図12B, SU5402)。

### 一過的なErkリン酸化の亢進は5体節形成後の体節サイズを減少させた

反対に、Erkリン酸化を一過的に上昇させる実験を試みた。Erkの脱リン酸化酵素であるDusp1/6に対する阻害剤:BCI (Dual Specificity Protein Phosphatase 1/6)を、上記と同様の系を用いて一過的に添加する実験を行った(図12A)。その結果、阻害剤の添加直後には、リン酸化Erk局在の頭側端の、一時的な伸展がみられたが(n=13; 図12G, 2-somite)、阻害剤処理後1体節形成時にはすでにその局在パターンは回復していた(n=15; 図12G, 3-somite)。さらに、この一過的なリン酸化Erkの伸展(2s)から数えて5体節目(7s)でのみの体節サイズの減少がみられた(n=19; 図12B, BCI)。これらの結果から、リン酸化Erkの頭側端がS-IVでの予定体節境界を規定していることが示唆された。

また、これらのリン酸化Erk局在の変化、体節サイズの変化をより詳細に計測した。BCI処理胚の処理直後におけるリン酸化Erk非局在領域の長さ、7番目の体節のサイズを計測すると、それぞれコントロールに比べて有意に変化していた(表1)。

### 一過的なErkリン酸化の阻害・亢進は、3体節形成後の*mesp-b*の発現パターンを変化させた。

*mesp-b*はS-I, S-II(最新の体節境界から体節3個分尾側の領域)に発現し(図16)、これまでに知られている分節パターンを示す遺伝子のうち、最も尾側で発現するものの一つである。上述の阻害剤を用いた同様の実験系において、*mesp-b*の発現の変化について観察した。Erk活性を一過的に阻害した時、阻害直後の発現パターンに異常は見られなかった(n=20; 図12F, 2-somite)。しかしながら、阻害から3体節形成後の胚では*mesp-b*発現のストライプの間隔がコントロールよりも拡大していた(n=18; 図12F, 5-somite)。また、Erk活性を一過的に亢進した時は反対に、3体節形成後における*mesp-b*発現のストライプの感覚は小さ

くなっていた (n=17; 図 12H, 5-somite, 表 1)。これらの結果から、リン酸化 Erk による予定体節境界の決定は、*mesp-b* よりも早い段階で行われていることが示唆された。

### ***mesp-b* の発現領域はリン酸化 Erk の局在領域よりも頭側にある**

*mesp-b* は S-I、S-II に発現するが、上記の結果より私は、リン酸化 Erk 局在の頭側端が S-IV に位置し、*mesp-b* よりも尾側に存在すると考えた。そこで、二つの因子がそれぞれ存在する領域を確かめるために、*in situ hybridization* 法による *mesp-b* mRNA の染色と、免疫染色によるリン酸化 Erk の染色を同一胚に対して行った。その結果、*mesp-b* の 2 本のストライプのうち、尾側の発現領域は、リン酸化 Erk が局在する領域よりも頭側に存在していた (図 13)。

### ***mesp-b* のノックダウン胚でもリン酸化 Erk の局在は不連続に後方へ移動した**

FGF/MAPK シグナルにより生み出された予定体節境界が、*mesp-b* の発現を規定する、すなわち *mesp-b* より上流に位置するならば (図 16)、*mesp-b* をノックダウンしてもリン酸化 Erk の局在に異常はみられないと考えられる。このことを確かめるために、*mesp-b* のノックダウンを行った。*mesp-b* ノックダウン胚では、Kawamura らの報告と同様、体節境界が見えにくくなり、境界面がやや歪む異常がみられた (図 14A,B)。また、これらの胚のリン酸化 Erk を免疫染色により観察したところ、コントロールと同様の不連続な局在パターンを示した (図 14C-F)。よって、*mesp-b* による体節境界への制御は、FGF/MAPK シグナルによる制御の下流にあることが示唆された (図 16)。

### **一過的なヒートショックは一過的な Erk 活性の低下と 5 体節形成後の境界形成異常を引き起こす**

体節形成期のゼブラフィッシュ胚に一過的にヒートショックを与えると、ヒートショック時から数えて 5 個目に形成される体節において初めて、体節境界の境界面に異常が観察される (Roy et al., 1999)。このことから、体節 5 個分のプレパターンの存在が示唆されてきた。そこで、同様の実験系におけるリン酸化 Erk の局在を調べた。具体的には、ヒートショック直後、30 分後、90 分後の胚を固定し、リン酸化 Erk の局在を観察した。その結果、ヒートショック直後

にリン酸化 Erk の活性は一様に低下していた(図 15A)。また、リン酸化 Erk 局在の頭側端はやや頭側へシフトしていたが、この異常はヒートショック後 30 分では回復していた(図 14B,C)。さらに、*mesp-b* の発現パターンは、90 分後にもみストライプが崩れることが観察された。これらのことから、最新の体節から 5 体節分前の予定体節境界 (S-IV) の決定には、リン酸化 Erk が関与することが推測された。

## 考察

序論で述べたように、未分節中胚葉には体節 5 個分のプレパターンが存在することが知られていたが、その境界形成がどのように行われるのかは不明であった。本論文では FGF/MAPK シグナルの各因子(*fgf8a*, Ras, Erk)に着目して解析を行った。まず FGF/MAPK シグナルの最上流に位置する *fgf8a* の発現パターンと、Ras の活性化パターンを調べたところ、尾の伸長とともに連続的に移動していた。一方、下流のリン酸化 Erk の局在を調べたところ、リン酸化 Erk の局在は体節形成周期に連動して、尾側へ不連続に移動していた。阻害剤を用いて Erk のリン酸化を操作する実験から、リン酸化 Erk 局在の頭側端が S-IV の予定体節境界であることが示唆され、*mesp-b* による体節境界決定はその下流にあることがわかった。さらにリン酸化 Erk の不連続な動きには、分節時計である *her1, her7* が必須であった (図 16)。

### 濃度勾配と遺伝子発現振動の統合によるプレパターンの決定 (Clock and Wavefront model の分子実体)

Clock and wavefront モデルは、PSM で周期的に変動する“振動子 (Clock)”と、PSM を前からうしろに一定速度で移動する“Wavefront”の存在を仮定し、この 2 つを組み合わせることにより、周期的かつ等間隔な体節形成を説明するモデルである (図 1 A)。これまで Clock は分節時計(Hes)の発現振動、Wavefront は FGF 濃度勾配の閾値であると考えられてきた。しかしながら、これら 2 つのシグナルがどのように統合され、最終的にプレパターンすなわち予定体節境界を決定するのか、その分子メカニズムはよくわかっていなかった。

マウス胚においては、Notch シグナルの振動がリン酸化 Erk の振動を引き起こし、さらにそのリン酸化 Erk が周期的に消失する領域において、Notch シグナルが *Mesp2* の発現を誘導する。これにより、S-I に周期的に (離散的に) *Mesp2* が発現することが報告されている (Niwa et al., 2011)。この報告では、Notch シグナルの振動が Clock に、Fgf の振動が“rippled wavefront”に相当するとされている。しかしながら、このモデルはゼブラフィッシュ胚においては当てはまらないと考えられる。なぜなら、ゼブラフィッシュ胚における体節プレパターンは 5 個分存在しており、S-I, S-II に発現する *Mesp2* ホモログである *mesp-b* は、最も尾側 (S-IV) のプレパターンを決定できないからである。

本論文では、FGF シグナルのリガンドである *fgf8a* の発現、さらに下流の細

胞内 Ras 活性が、Wavefront 様の空間パターンを取ることを示した (図 16)。一方、さらに下流のリン酸化 Erk は Wavefront 様のパターンをとらず、不連続なパターンをとることを明らかにした(図 16)。このパターンは、体節形成と連動した周期的な変化であったが、マウス胚リン酸化 Erk の振動とは異なっていた。さらに、このパターンは Clock である *her1,her7* 依存的であること、S-IV のプレパターンを決定することが明らかになった。よって、ゼブラフィッシュ胚におけるリン酸化 Erk は、Clock と Wavefront の情報が統合される、いわば”Signal Integrating Spot”として捉えることができる。このモデルでは、Clock (Hes) と Wavefront (FGF) を両シグナルの下流で統合させるという点はマウス胚のモデルと共通しているが、シグナルをどの地点 (因子) で統合させるかという点では異なるものである。

### FGF シグナルの周期的な変動

FGF/MAPK シグナルはその下流にいくつかのネガティブフィードバック因子を持つことから、そのシグナル量は振動すると予想できる。実際に、生体における FGF/MAPK シグナルの振動現象はいくつか報告されている。例えば、正常ヒト乳腺上皮細胞を EGF 刺激すると、GFP-ERK 融合タンパクの核局在は、約 15 分間隔で振動する(Shankaran et al., 2009)。また、C3H 10T1/2 細胞を bFGF で刺激すると、ERK のリン酸化レベルが Hes1 の発現とともに振動することが報告されている(Nakayama et al., 2008)。さらに、マウス胚とニワトリ胚 PSM では、Sprouty や Dusp といった FGF シグナルの下流遺伝子の発現が振動している(Dequeant,M.L et al., 2006; Hayashi et al., 2009)。また、前述したように、マウス胚 PSM ではリン酸化 Erk の局在が Hes7 の発現振動に同調して振動していることが報告されている(Niwa et al., 2009; 2011)。しかしながら、ゼブラフィッシュ胚において発現振動する遺伝子は Notch シグナル関連因子のみであり、FGF シグナルとその下流に属するものは報告されていない (Holley., 2007)。FGF シグナルの下流にあるとされる *tbx16* の発現レベルが *her1* の発現と同じ周期で変動するという結果が、マイクロアレイを用いた解析により報告されたが、*in situ* hybridization による *tbx16* の発現パターンをみると、尾側 PSM に一様に発現しており (Krol et al., 2011)、*her1* と同様の発現振動をしているとは考えにくい。また、マウス・ニワトリで発現振動する Sprouty や Dusp も、ゼブラフィッシュでは尾側 PSM に一様に発現している。

本論文ではゼブラフィッシュ胚 PSM における FGF/MAPK シグナルの動的変化の解析を試みた。その結果、リン酸化 Erk 局在の頭側端が体節形成周期に一



致して移動しており、周期的な変動を示した。しかしながらゼブラフィッシュのリン酸化 Erk は、マウス胚のそれとは異なり、頭尾軸にそったダイナミックな振動をしているようには見えなかった。よって、PSM における周期的な遺伝子発現の振動という現象自体は羊膜類と魚類との間で保存されているものの、その体節形成における利用方法、特に FGF シグナルにおける役割は、異なっていると考えられる。

### リン酸化 Erk 局在の頭側端はどのように予定体節境界へ変換されるのか

本論文では、リン酸化 Erk 局在の頭側端が予定体節境界を規定することを示した。しかしながら、このリン酸化 Erk の ON-OFF の境界は、1 体節が形成されるごとに、尾側へ移動していく。よって、すぐに境界としての情報を他の形へ変換し維持しなければ、後の *mesp-b* の発現へと、境界の情報が受け継がれることは難しいと考えられる。

リン酸化 Erk の ON 領域-OFF 領域の間には、細胞の性質に何らかの差異が生じ、その差が *mesp* の発現として受け継がれるのではないかと予想している。しかしながら、Erk のリン酸化レベルの差異が、直接どういった下流遺伝子の発現に影響を与えるのかはわかっていない。さらに、それを受けた細胞動態（細胞の動き方や形）にどのような差が生じるのかなど、詳細は不明であり、今後明らかにすることが求められる。

### FGF/MAPK シグナルのライブイメージングの必要性

本論文では、体節形成期の異なる胚を PSM の長さ順に並べることで、遺伝子発現パターン、シグナルの活性パターンを推測するという方法を用いた。*her1* mRNA とリン酸化 Erk の二重染色の結果において、*her1* の位相変化に合わせて PSM の長さが変化したことから、この手法は有効であったと考えられる。一方で、1 細胞レベルの挙動といった情報は、固定された胚では失われてしまう。本論文では、Ras の活性についてのみ、Raichu-Ras probe を用いることで、ライブイメージングを行うことができた。しかしながら、前項で述べたような、予定体節境界付近での細胞の挙動を知るためには、この領域において Erk のライブイメージングを行うことが必要である。すでに Erk 活性をモニターするための FRET probe が開発されており (Komatsu et al., 2011)、これを用いることで、リン酸化 Erk 境界付近の細胞が、*meesp-b* の発現に至るまでどのように振舞うのかが明らかにされることを期待する。

## FGF/MAPK シグナルの操作

リン酸化 Erk の頭側端が、S-IV の境界を決定するかどうかを確かめるためには、リン酸化 Erk の頭側端の位置を操作する必要があった。本論文では、Erk 脱リン酸化酵素の阻害剤(BCI)を用いて、Erk のリン酸化を亢進させる方法を使った。しかし、FGF シグナルは *mesp-b* の発現を負に制御することが知られている。また、Eph などの分節関連遺伝子も、*mesp-b* と同じ領域に発現している。よって、これら遺伝子発現へのリン酸化 Erk の影響を除外するために、操作範囲は 1 体節 (約 50 $\mu$ m) 以内である必要があった。本論文では、短時間 (4 分) 高濃度 (0.1mg/ml) の BCI で処理することにより、リン酸化 Erk の頭側端を 15 $\mu$ m のみ頭側へ伸展させることに成功した (図 12)。

上記の方法に加え、リン酸化 Erk が存在しない S-III の一部の細胞において Erk のリン酸化を素早く人為的に ON-OFF する方法 (例えば、光刺激によって Erk リン酸化を可逆的に操作できるプローブ) の適用は、より有効であると考えられる。これを用いれば、S-III において、任意の場所の Erk リン酸化を操作することができる。現在、Rac1 の活性を光刺激で操作可能なプローブは存在する(Wu et al., 2009)が、Erk に関しては報告されていない。しかし、こうした手法を Erk のライブイメージングと組み合わせることで、予定体節境界決定機構の詳細が解明されると考えられる。

## *her1,her7* による周期的な Erk 活性の抑制

本論文ではリン酸化 Erk の局在が、*her1,her7* 依存的に周期的に変動することを示した(図 6)。しかしながら、*her1,her7* がどのようにリン酸化 Erk の局在を変化させ得るのかについては、解明できていない。この疑問に対する答えとして、FGF シグナルの抑制因子を介する可能性が考えられた。マウス胚 PSM では、Sprouty や Dusp といった FGF シグナル抑制因子の発現が Hes7 に制御されており、これらを介した周期的な FGF シグナルの抑制がリン酸化 Erk の振動パターンを生み出している。ゼブラフィッシュ胚においても、S-III から IV にかけて、FGF 抑制因子による周期的な制御が行われれば、リン酸化 Erk の不連続なパターンを生み出すことができる。しかしながら、ゼブラフィッシュ胚で Sprouty や Dusp は発現振動しているようには見えない。FGF シグナル抑制因子の発現ではなく、活性や細胞内局在が周期的に変動していれば、FGF シグナル

を周期的に制御するので、今後そのような可能性を検討することが必要である。

## Ras-MAPK 経路とその他の経路について

序章でも触れたように FGF はいくつかの下流経路を活性化できる。これまでに、Ras-MAPK 経路が体節形成に果たす役割についてはよく調べられてきた。例えば、マウス胚を MEK インヒビターである U0126 で処理すると、PSM における Hes7 の発現振動が正常に起こらなくなることを報告されている(Niwa et al., 2007)。また、ニワトリ胚で electroporation 法によりドミナントネガティブ型 MEK を強制発現すると、体節形成が正常に起こらないことが報告されている(Delfini et al., 2005)。しかしながら、ゼブラフィッシュ胚においては、FGFR の阻害剤処理などにより Ras-MAPK シグナルを含む FGF シグナルの重要性は示されていたものの、Ras-MAPK 経路のみを操作して体節形成における役割を検討した報告はなかった。本論文では Erk の脱リン酸化酵素 DUSP の阻害剤である BCI を用いることにより、FGF/MAPK 経路を特異的に変化させ、体節の大きさが変化することを示した。このことは、ゼブラフィッシュにおいても Ras-MAPK 経路が体節形成過程において重要なシグナルであることを示す。しかしながら、本論文では他の FGF 経路については検討しておらず、これらの経路と予定体節形成境界形成とのかかわりについても検討する必要がある。

## FGF シグナルによる分節時計の制御の可能性

FGF シグナルが分節時計を制御するという報告はいくつかある。例えば、転写因子 Her13.2 は Her の自己抑制のための補助因子であり、Her1 とヘテロダイマーを形成して her1 の転写を抑制するが、her13.2 の発現は Notch シグナルではなく FGF シグナルに依存することが報告されている(Kawamura et al., 2005)。よって、ゼブラフィッシュ胚の PSM において、FGF シグナルは her13.2 を介して her1, her7 の発現振動を制御しているといえる。また、ゼブラフィッシュ胚の her1 の発現振動が始まる原腸陥入期において、ビーズ移植によって局所的に FGF シグナルを阻害すると、her1 の発現振動が起きなくなる(Ishimatsu et al., 2010)。このことから、FGF シグナルが her1 の発現開始に必要であると考えられる。さらに、体節形成期に未分節中胚葉に発現する遺伝子 T の下流に Cre を挿入したノックインマウスと FGFR1 を loxp 配列で挟んだノックインマウスを利用し、PSM 特異的に FGFR1 をノックアウトした個体では、Notch シグナル系、

Wnt シグナル系遺伝子の発現振動がみられなくなる。(Wahl et al., 2007; Niwa et al., 2007)。よって、マウス胚においても FGF シグナルは分節時計を制御しているといえる。

本論文では、分節時計による FGF シグナルへ制御を仮定した。しかしながら、反対の、FGF から分節時計への制御、すなわちリン酸化 Erk の不連続な局在が分節時計関連遺伝子の発現にどのような影響を与えているのかについては不明であり、今後の解析が必要である。

### *mesp-b* ノックダウンについて

*mesp-b* ノックダウン胚は、これまでの報告(Kawamura et al., 2005)と同様の体節境界の形成異常を生じたが、リン酸化 Erk の局在はコントロールと同様の不連続な移動を示した(図 12)。

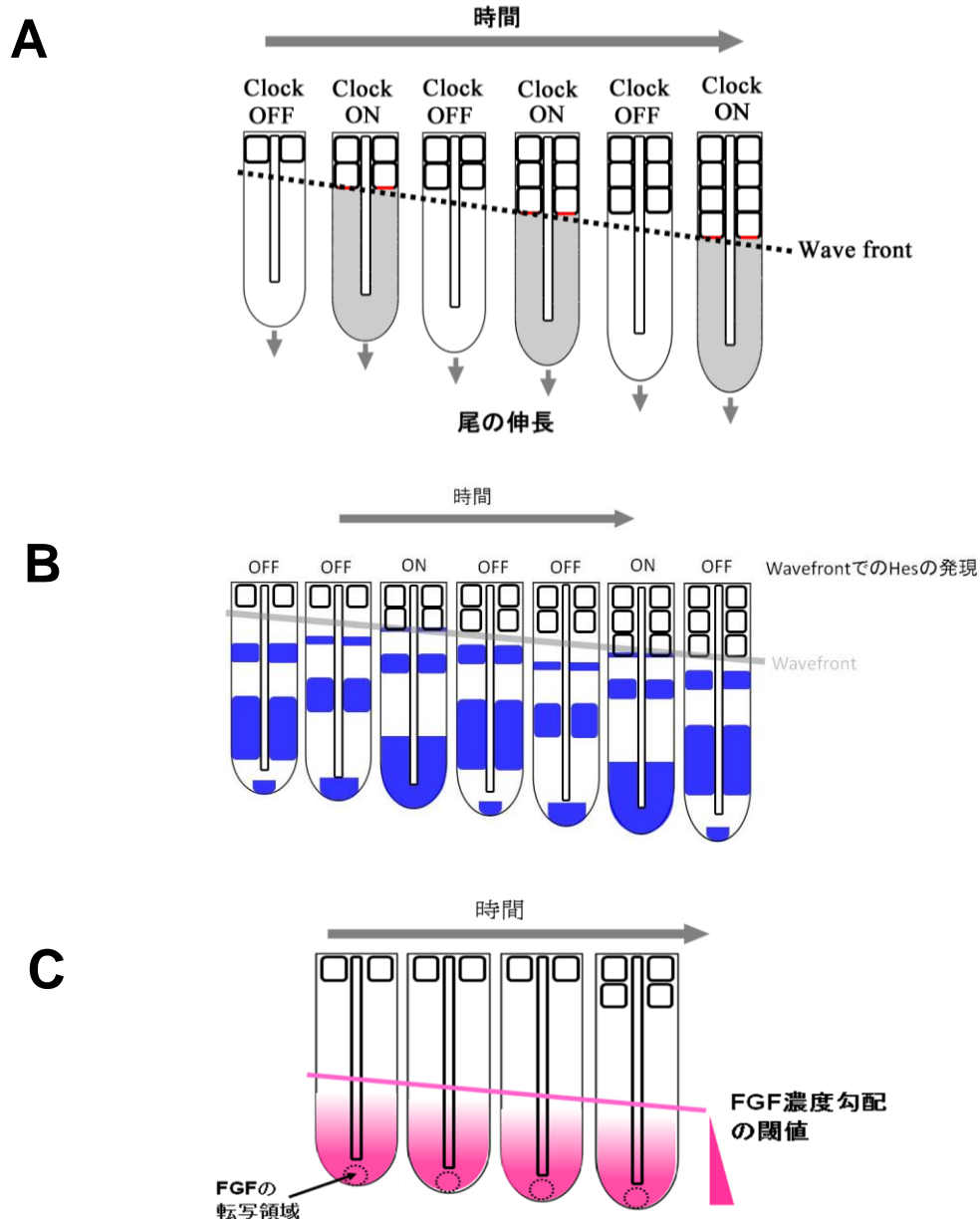
ゼブラフィッシュ *mesp* 遺伝子は *mesp-aa, ba, ab, bb* の 4 つのパラログを持つ<sup>1)</sup>。このうち、*mesp-aa, mesp-ba* についてはその発現と機能に関する解析が報告されているが、(Sawada., et al 2000; Hart et al., 2007; Kawamura et al., 2005)、*mesp-ab, mesp-bb* についてはその発現・機能は報告されていない。*mesp-aa, mesp-ba* とともに S- I, S- II の頭側にストライプ状に発現する。*mesp-aa* は尾側 PSM にも発現し、ノックダウン胚は原腸陥入に異常を生じる事から(Hart et al., 2007)、本論文では *mesp-ba* をノックダウンした。その結果、体節境界形成に異常はみられたが、体節境界の完全な消失はみられなかった。一方、マウス胚において S- II に発現する *Mesp2* のノックアウトマウスでは、体節境界が消失する(Takahashi et al., 2000)。このことは、体節形成における *mesp-b* 以外の *mesp* 遺伝子の関与を示唆しており、より詳細な解析が必要である。

1) 本論文では *mesp-aa, mesp-ba* をそれぞれ *mesp-a, mesp-b* と記した。

### おわりに

何も無いところに境界をつくり、境界で区切られたモジュールを様々に加工することは、生物のかたちづくりの基本戦略である。よって、境界をつくるメカニズムは、かたちづくりの根幹にかかわる。本論文では、予定体節境界の形成をモデルとし、生物が等間隔なモジュールを生成するために、振動と濃度勾配をいかに利用しているのか、という問題に取り組んだ。今回の研究結果が、かたちづくりの基本原理の解明に、少しでも貢献できれば幸いである。

## 図表



### 図 1. Clock and Wavefront モデル

(A) Clock and Wavefront モデルの概要。Clock は PSM で周期的に OFF(白色)と ON(灰色)を繰り返す。また、Wavefront は尾の伸長とともに後方へ移動する。Clock が ON になったとき、Wavefront で境界が形成される(赤色)と仮定すると、周期的な分節が起きる。(B) PSM における Hes の発現(青色)。PSM の頭側端では、体節形成周期に合わせて発現の ON-OFF を繰り返す。(C) FGF は尾の末端のみで転写され、尾の伸長とともに濃度勾配が移動する。

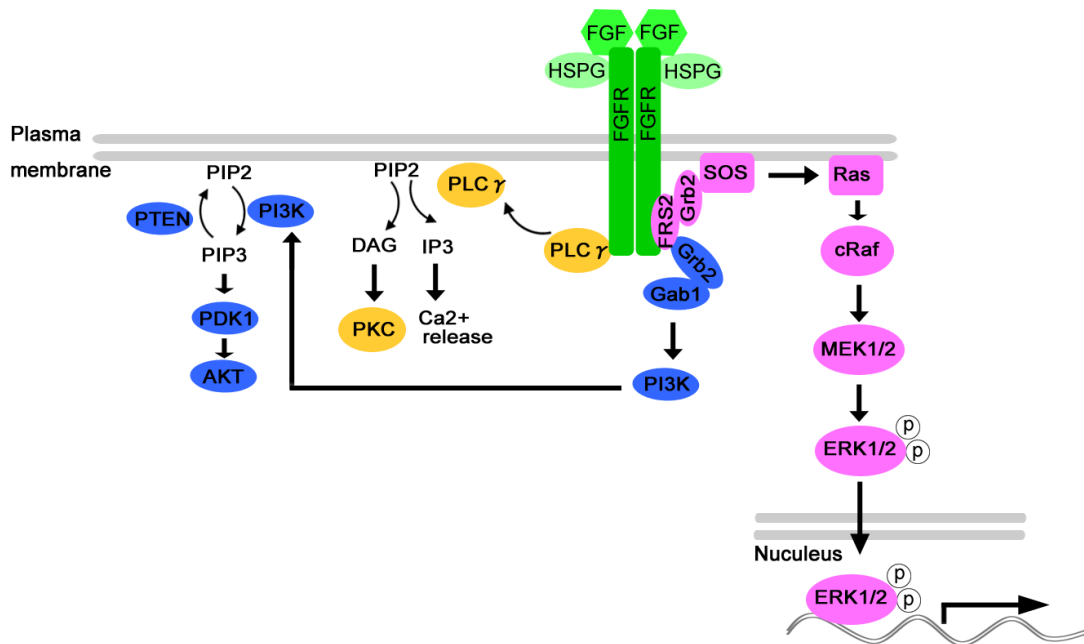
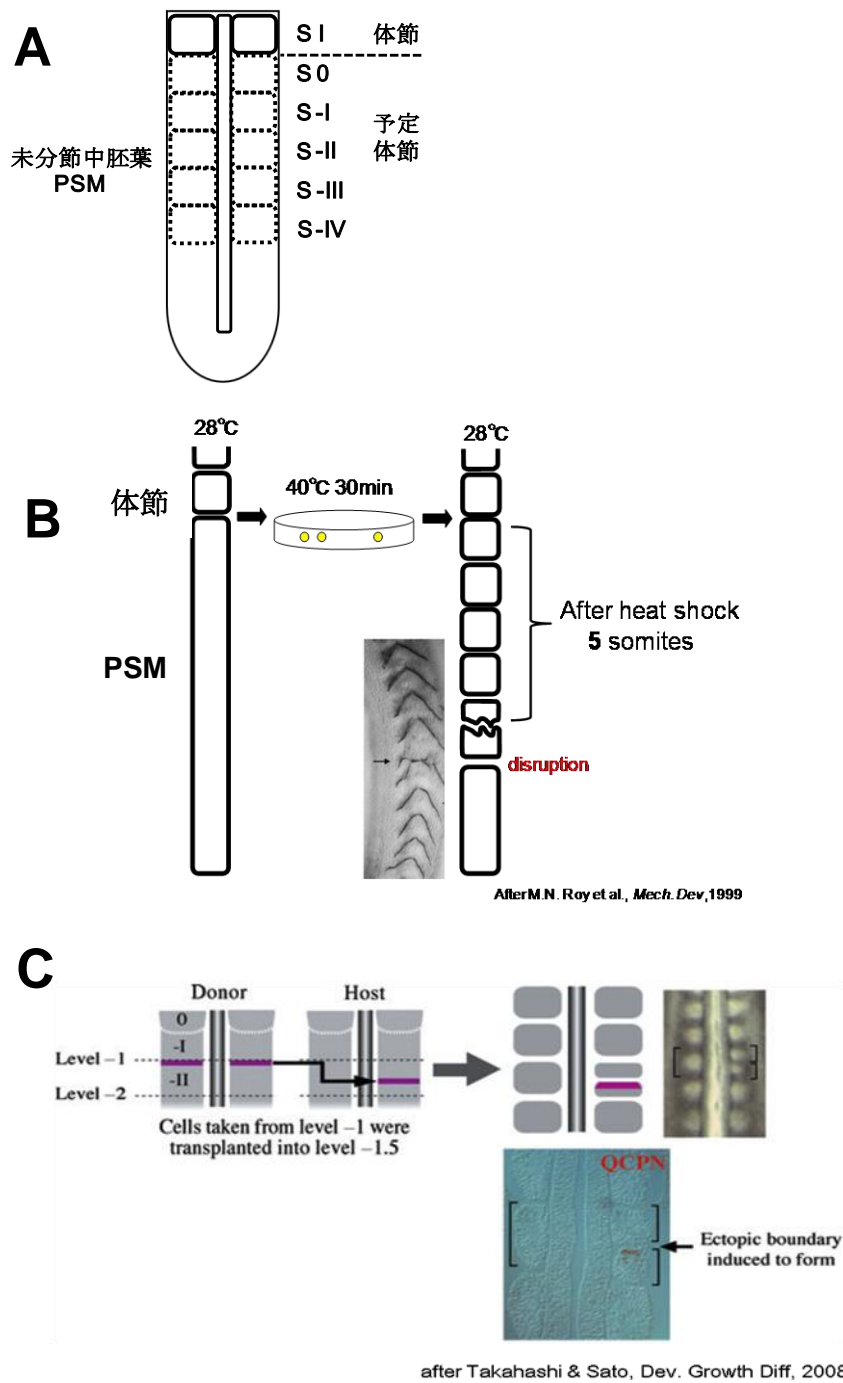


図 2. FGF シグナル経路

FGF シグナルの下流経路のうち、Ras/MAPK キナーゼ経路(ピンク色)、PI3 キナーゼ (PI3K) 経路 (青色)、イノシトールリン脂質ホスホリパーゼ C (PLC  $\gamma$ ) 経路 (黄色) を記した。



### 図 3.PSM には予定体節境界が存在する

(A) PSM には 5 個分の予定体節境界が存在する。(B) ゼブラフィッシュ胚におけるヒートショック実験。一過的なヒートショックから体節境界の異常が生じるまで、5 体節分の遅れがある。(C) ニワトリ胚の予定体節領域における移植実験。予定体節境界の移植によって異所的な境界が生じる。

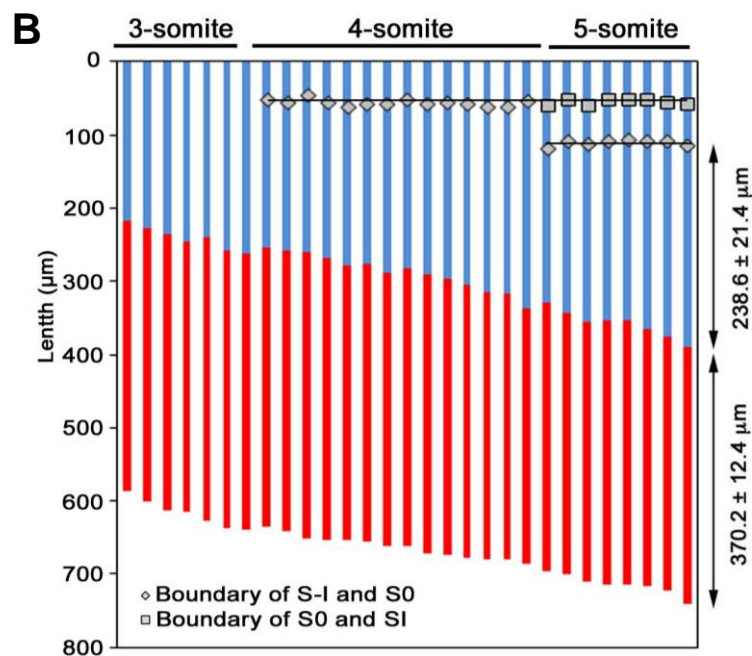
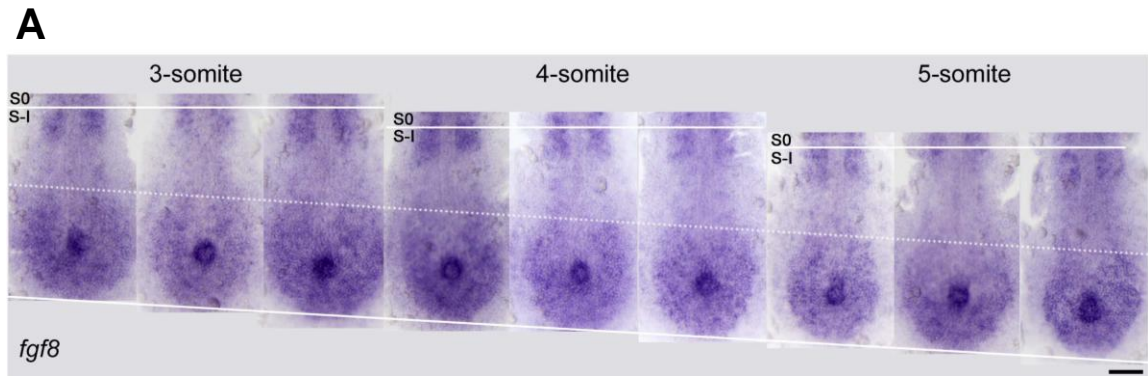
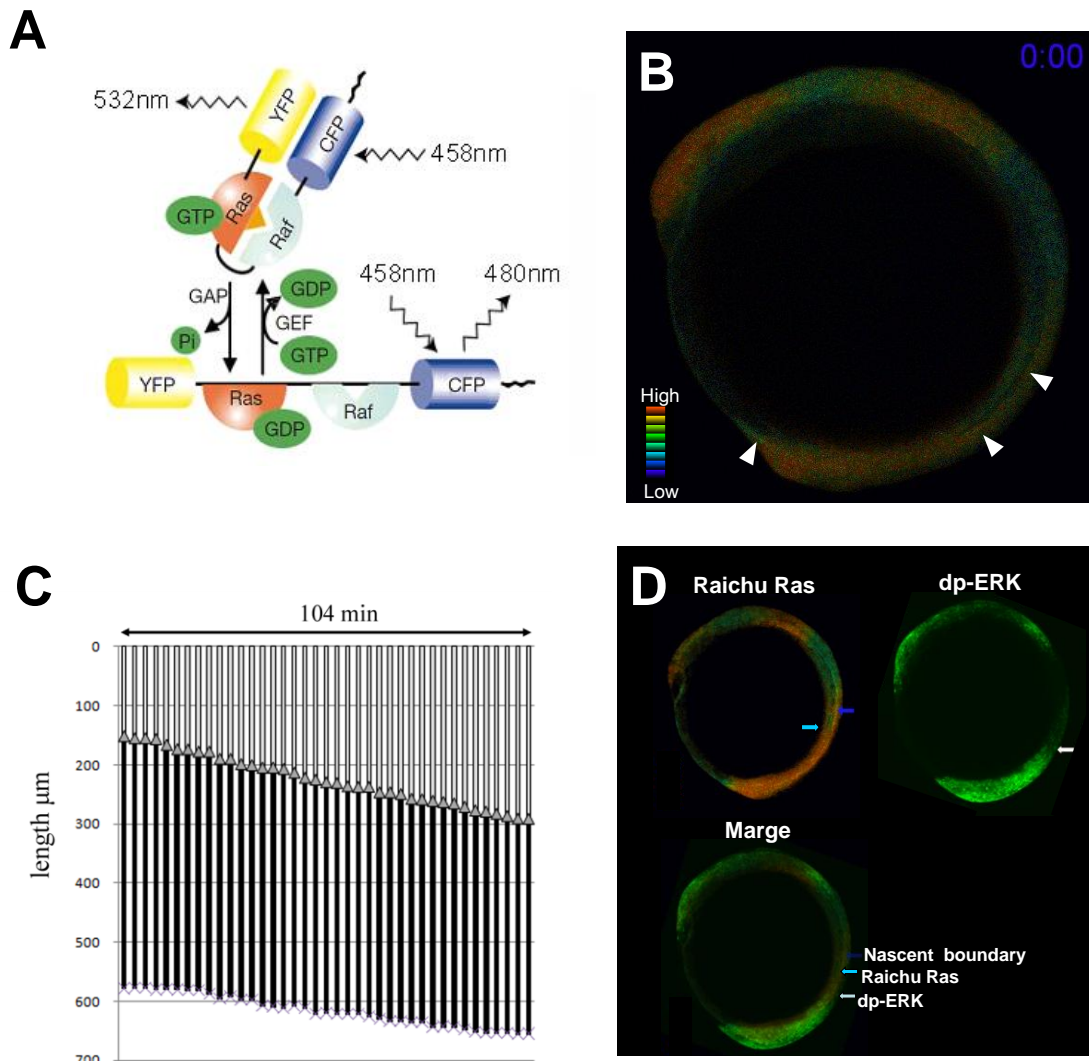


図 4. *fgf8a* 発現領域は連続的に尾側へ移動した

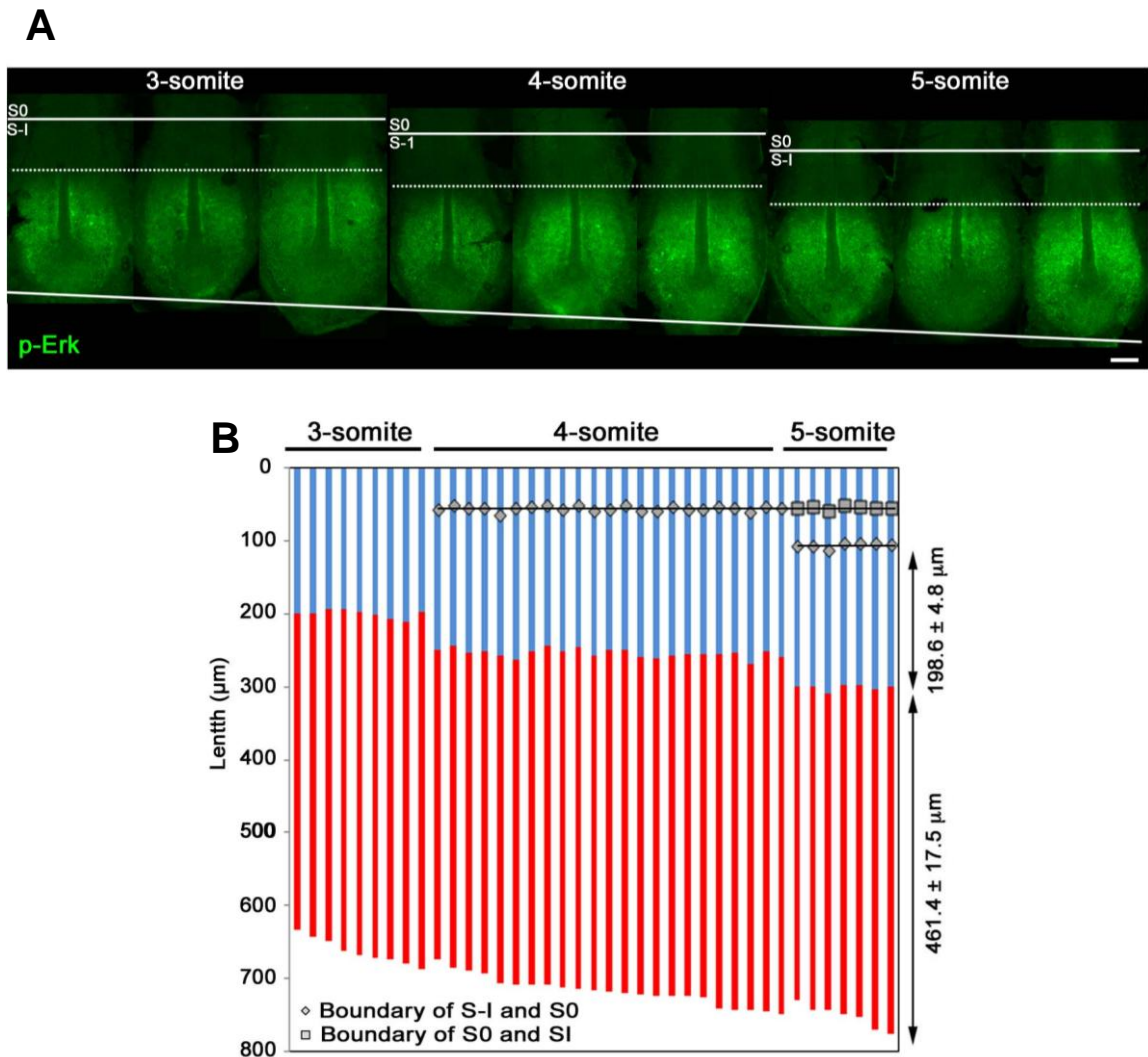
(A) *fgf8* mRNA を *in situ* hybridization 法により染色し、3 から 5 節期の胚をフラットマウントし、代表的なものを PSM の長さ順に並べた。*fgf8a* 発現領域の頭側端の位置を点線で示す。(B) 29 個のフラットマウントした胚についてラインスキャンを行い、非発現領域 (青) と発現領域 (赤) を示した。発現領域は PSM の伸長とともに尾側へ移動した。





### 図 5. Ras 活性化領域は連続的に後方へ移動した

(A) Raichu-Ras probe の構造 (Mochizuki et al., 2001)。 (B) 体節形成期における Raichu-Ras の活性化部位。矢頭は左から順に、PSM の尾側端、Ras 活性の頭側端、最新の体節境界を表す。 (C) 104 分間 (3 体節形成) の PSM における Ras 活性化領域の変化。Ras 活性化領域は PSM の伸長と連動して尾側へ移動した。 (D) 同一胚における Ras 活性化領域とリン酸化 Erk 局在領域の比較。Ras は活性化されているが、Erk は活性化されていない領域が存在した。(増田美和 修士論文 2008)



**図 6. リン酸化 Erk の局在は不連続的に尾側へ移動した**

(A) 抗リン酸化 Erk 抗体を用いて免疫染色を行い、3 から 5 体節期の胚をフラットマウントし、代表的なものを PSM の長さ順に並べた。リン酸化 Erk 局在の頭側端の位置を点線で示す。(B) 39 個のフラットマウントした胚についてラインスキャンを行い、リン酸化 Erk 局在領域 (赤) と非局在領域 (青) を示した。リン酸化 Erk 局在の頭側端は最新の体節境界から一定の距離にとどまっており、次の体節が形成される少し前のタイミングで 1 体節分尾側へ移動した。

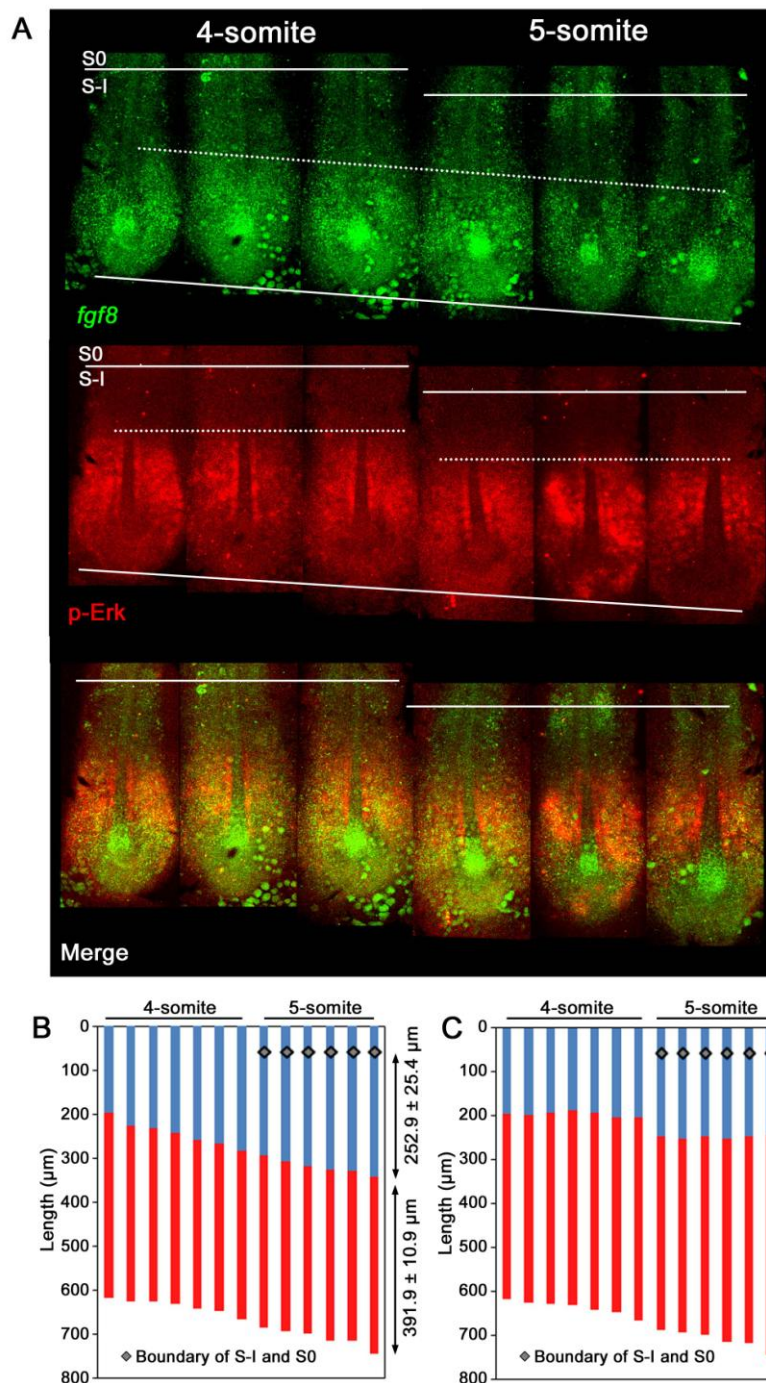


図 7. *fgf8a* mRNA とリン酸化 Erk の二重染色

*fgf8a*, pErk の二重染色を行った 4、5 体節期の胚について、図 5、図 6 と同様の解析を行った。(A)胚をフラットマウントし、代表的なものを PSM の長さ順に並べた。*fgf8*, リン酸化 Erk 発現局在の頭側端の位置を点線で示す。(B)(C)13 個のフラットマウントした胚についてラインスキャンを行い、*fgf8a*(B)または pErk (C) について、それぞれ非発現領域 (青) と発現領域 (赤) を示した。

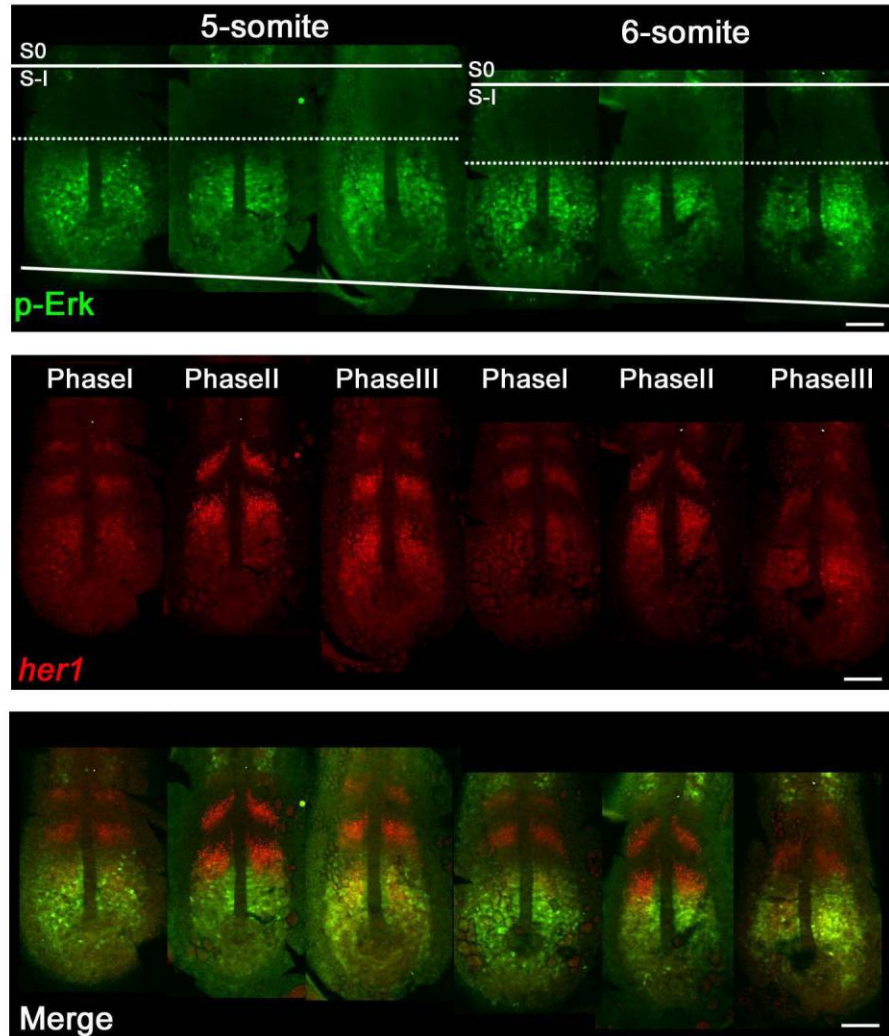


図 8. *her1*mRNA とリン酸化 Erk の二重染色

*in situ* hybridization 法により *her1* mRNA (赤色) を染色し、さらにリン酸化 Erk を免疫染色により染色した (緑色)。*her1* の発現パターンをもとに胚を並べたとき、リン酸化 Erk の局在は不連続に尾側へ移動した。

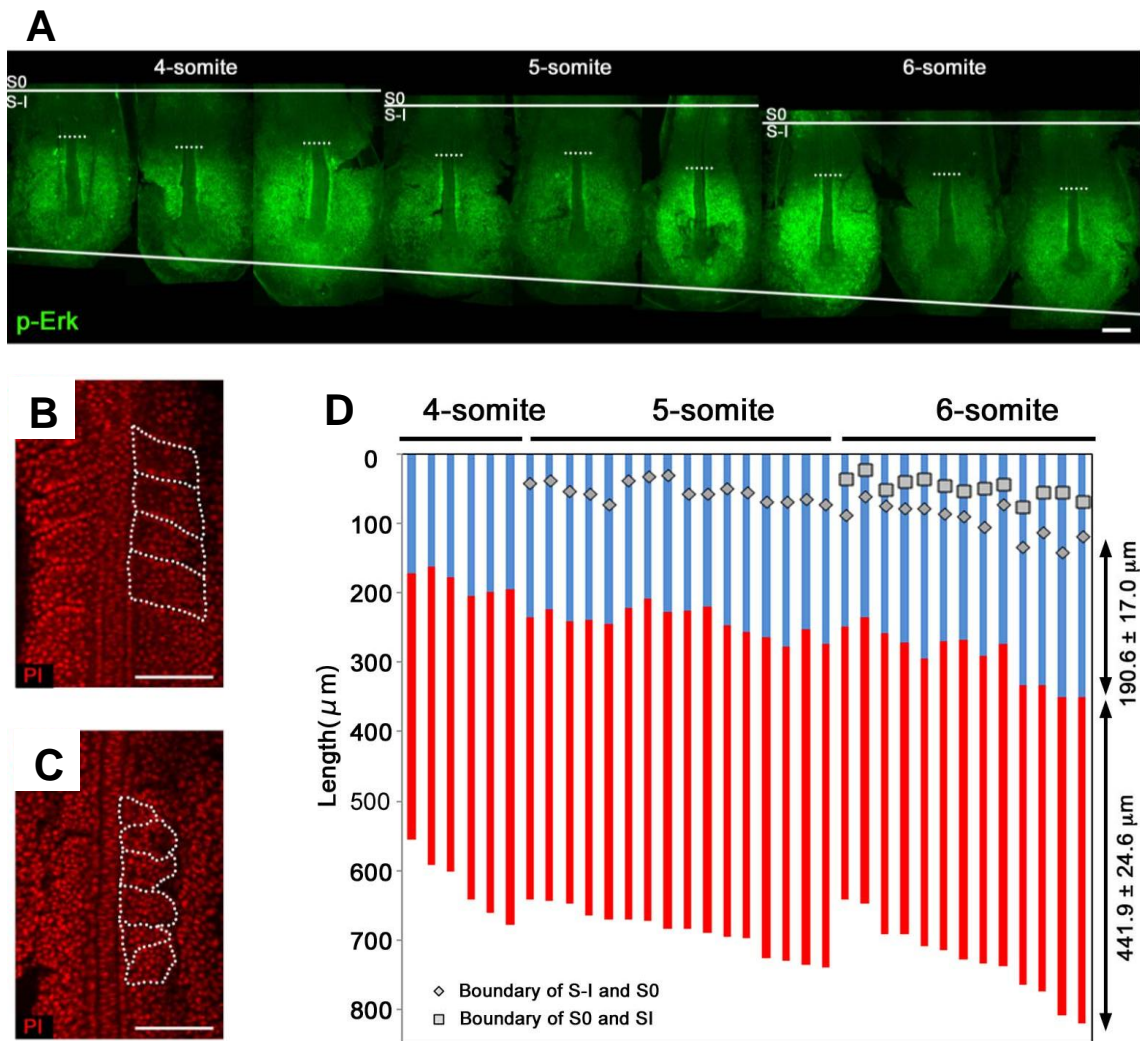


図 9. *her1, her7* ノックダウン胚のリン酸化 Erk 局在は不連続的に移動しなかった (A) ノックダウン胚について抗リン酸化 Erk 抗体を用いて免疫染色を行い、4 から 6 体節期の胚をフラットマウントし、代表的なものを PSM の長さ順に並べた。(B, C) 野生型胚(B)とノックダウン胚(C)における体節形成。PI 染色で核を染めた。ノックダウン胚では分節パターンの周期性が失われた。(D) 35 個のフラットマウントした胚についてラインスキャンを行い、リン酸化 Erk 局在領域 (赤) と非局在領域 (青) を表した。リン酸化 Erk 局在の頭側端は最新の体節境界から一定の位置にとどまらず、ランダムにその位置を変えている。

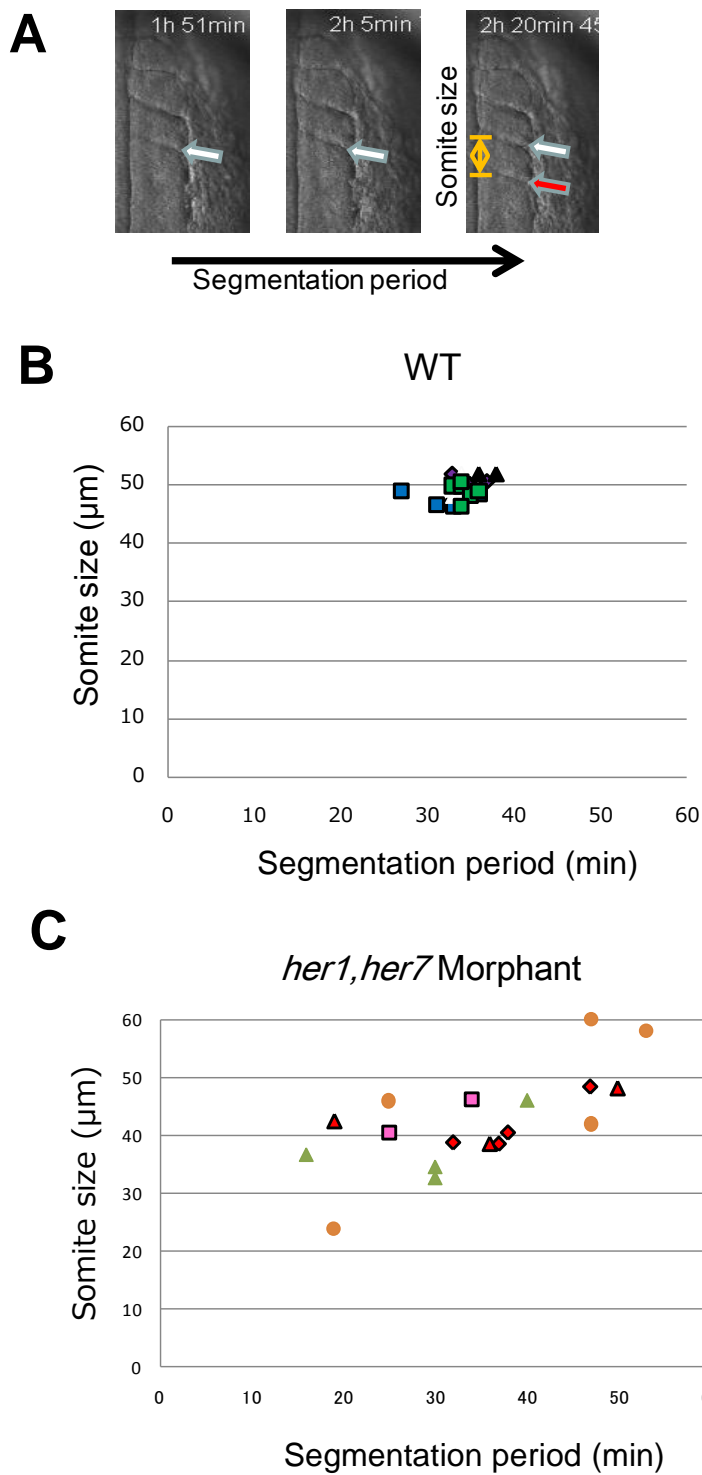


図 10. *her1,her7* ノックダウン胚における体節形成

(A) 体節形成のライブイメージング画像から、1 体節形成にかかる時間(横軸)と、形成された体節の大きさ(縦軸)を計測した。(B) 野生型 胚と(C)ノックダウン胚の結果。同じ図柄は同一個体を示す。

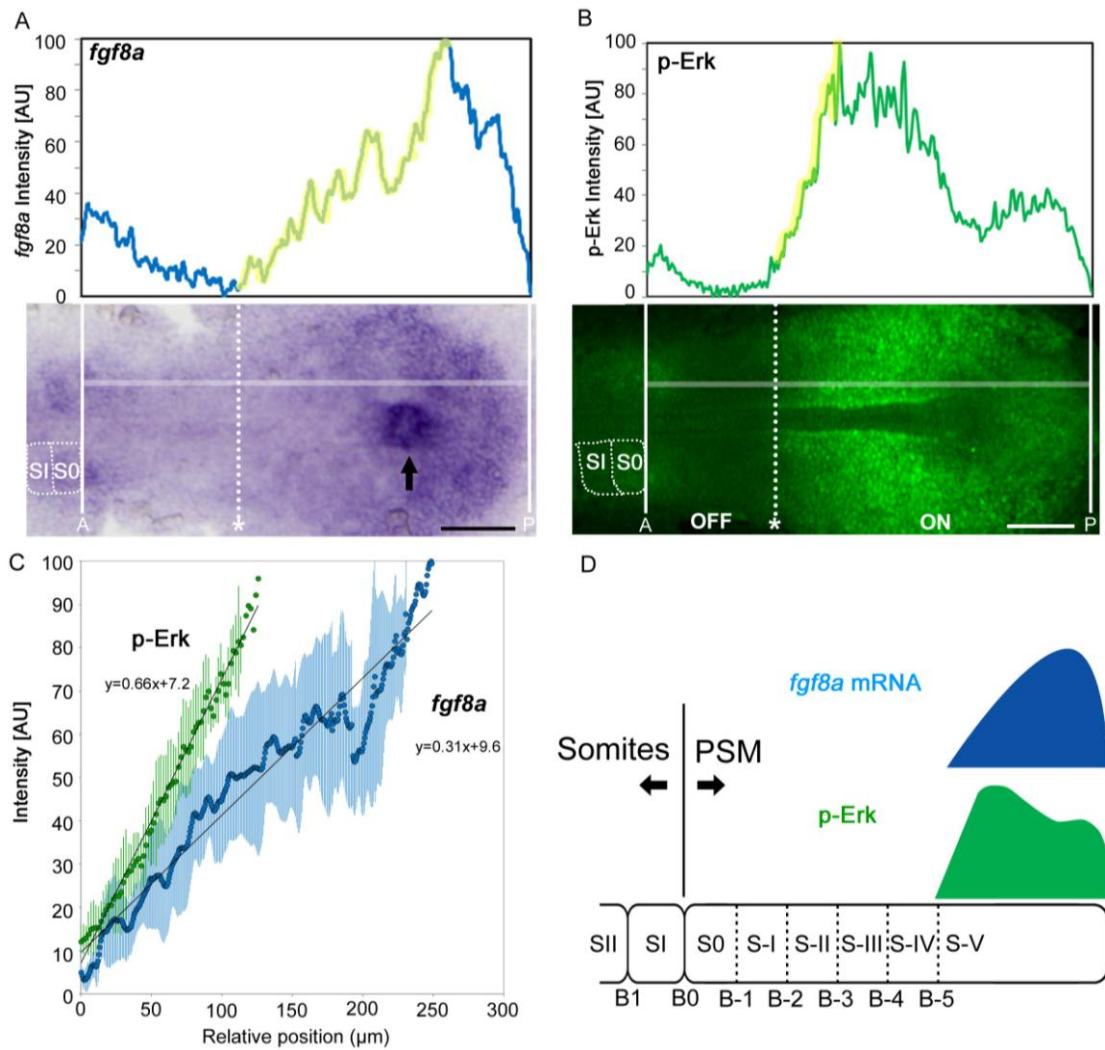
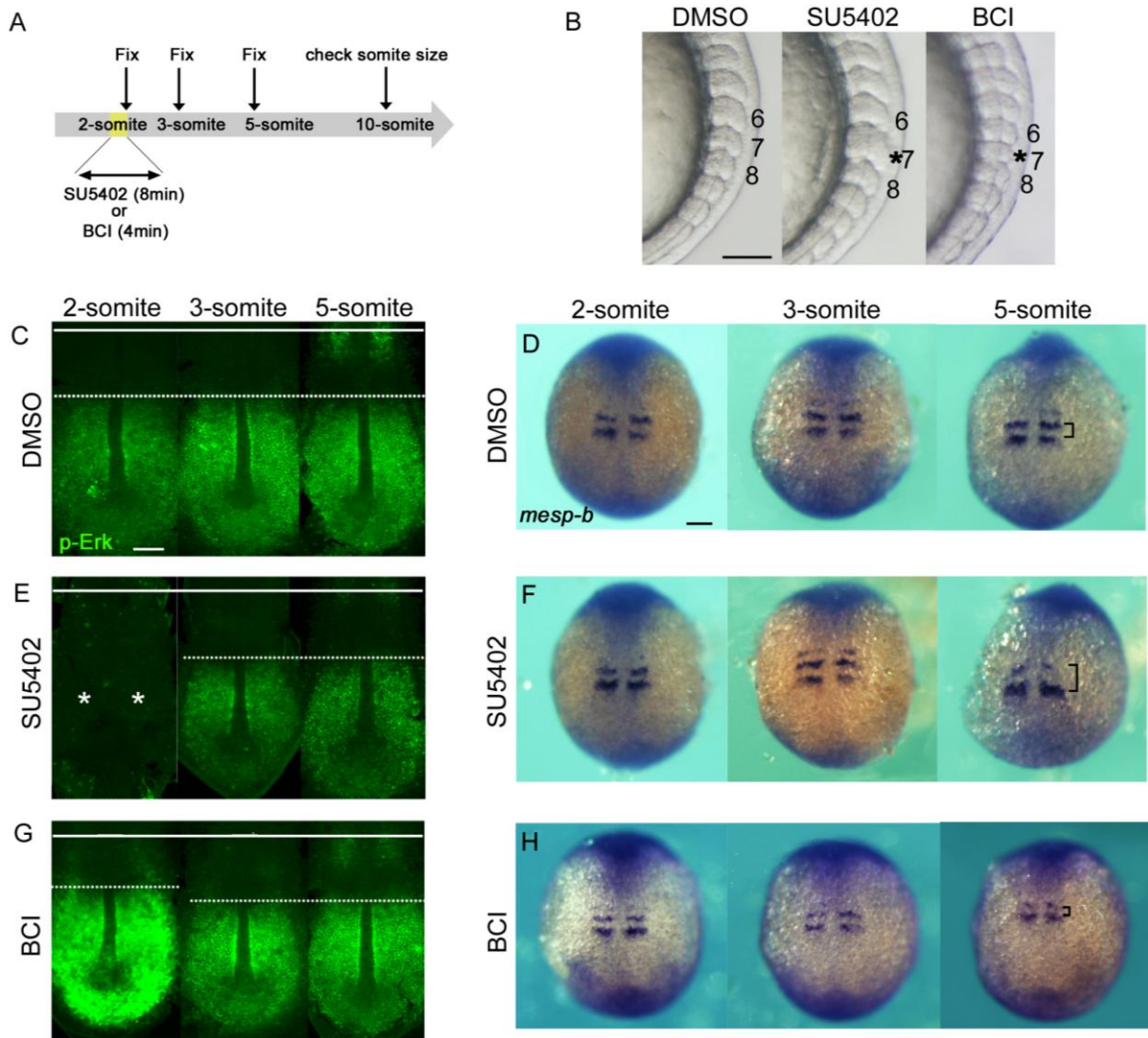


図 11. *fgf8a* mRNA とリン酸化 Erk の PSM における濃度勾配の違い

(A, B) *fgf8a* の発現はゆるやかな濃度勾配を示すのに対し、リン酸化 Erk はより急な勾配を示した。グラフは、写真の白線に沿ってラインスキャンを行い、得られたシグナル強度をプロットしたものの。左側が頭側、右側が尾側。矢印は クップル胞を示す。A, P はそれぞれ、PSM の頭側端、尾側端を示す。スケールバーは 100 $\mu$ m。 (C) *fgf8a* と p-Erk の勾配部分 (A,B のグラフにおける黄色部分) の比較。*fgf8a* (n = 8) and p-Erk (n = 7) のシグナル強度の平均値と標準誤差を示す。 (D) *fgf8a* mRNA (青)と p-Erk (green)の分布の模式図。



**図 12.** 一過的な Erk リン酸化の阻害・亢進による体節形成と *mesp-b* 発現への影響 (A)2 体節期の胚に 0.2mg/ml の FGFR1 阻害剤:SU5402 を添加し、8 分間 37°C のインキュベートの後ウォッシュアウトした。または、0.1mg/ml の Erk 脱リン酸化酵素阻害剤:BCI を添加し、4 分間 37°C のインキュベートの後ウォッシュアウトした。阻害剤処理直後 (2 体節期)、3 体節期、5 体節期それぞれにおいて、胚を固定した。(B) 10 体節期に体節を観察した。SU 処理胚では 7 体節目 (\*) が大きくなり。BCI 処理胚では小さくなった。(C, E, G) それぞれ DMSO 処理(C)、SU 処理 (E)、BCI 処理 (G) 後、2,3,5 体節期におけるリン酸化 Erk。(D, F, H) それぞれ DMSO 処理(D)、SU 処理 (F)、BCI 処理 (H) の後、2,3,5 体節期における *mesp-b* の発現。



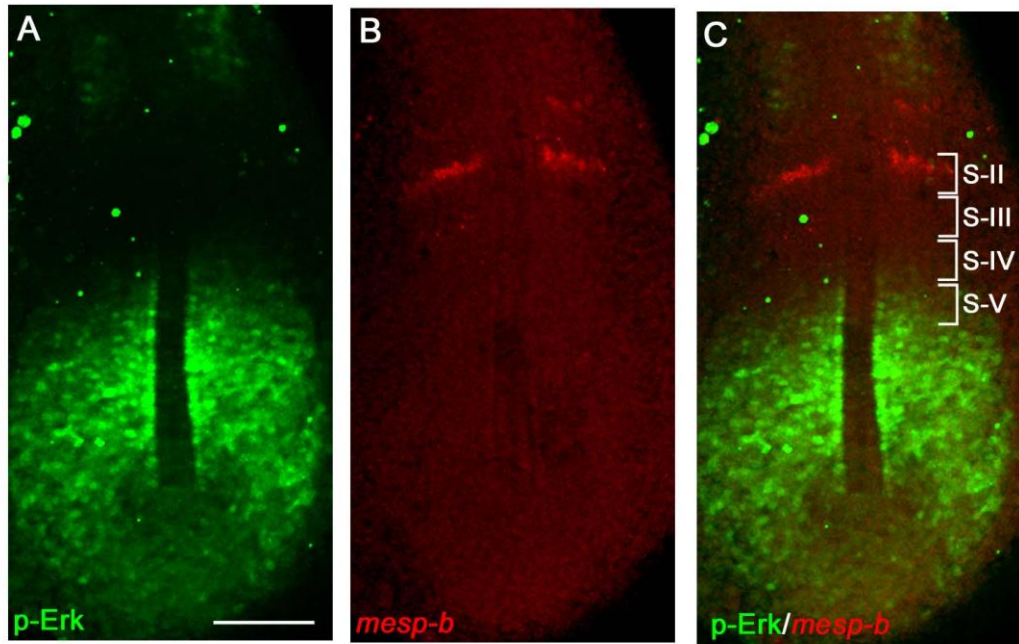


図 13. *mesp-b* とリン酸化 Erk の二重染色

*in situ* hybridization 法により *mesp-b* mRNA (赤色) を染色し、さらにリン酸化 Erk を免疫染色により染色した (緑色)

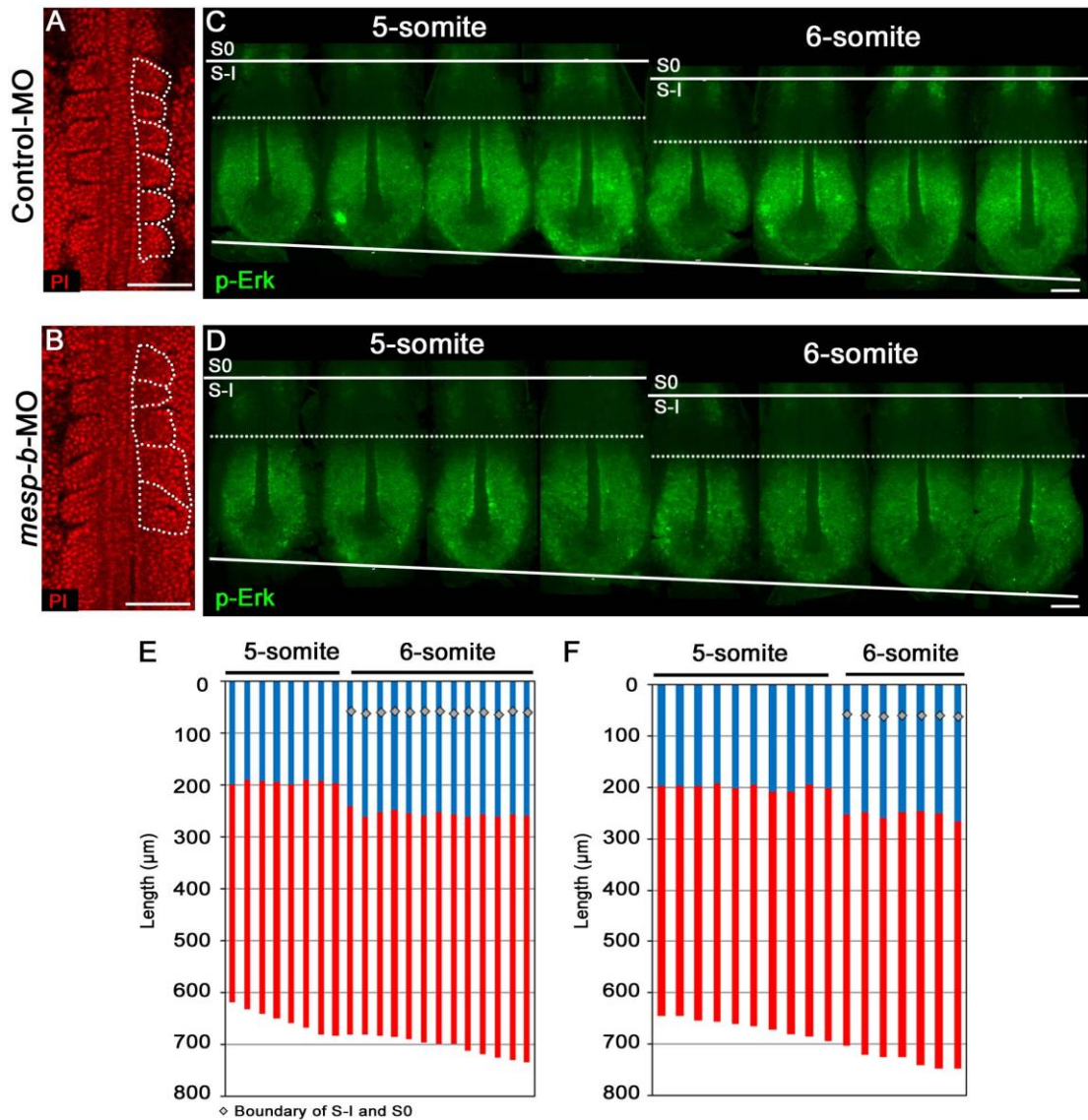


図 14. *mesp-b* ノックダウン胚においてもリン酸化 Erk 局在は不連続的に移動した (A, B) 野生型胚(A)とノックダウン胚(B)における体節形成。PI 染色で核を染めた。ノックダウン胚では分節境界が見えにくくなり、境界の入り方にゆがみがみられた。(C, D) 抗リン酸化 Erk 抗体を用いて免疫染色を行い、5,6 体節期のコントロール胚(C), ノックダウン胚 (D) をフラットマウントし、代表的なものを PSM の長さ順に並べた。(E,F)フラットマウントした 21 個のコントロール胚(E), 17 個のノックダウン胚(F)についてラインスキャンを行い、リン酸化 Erk 局在領域 (赤) と非局在領域 (青) を示した。コントロール、ノックダウン胚の両方で、リン酸化 Erk 局在の頭側端は最新の体節境界から一定の距離にとどまっております。次の体節が形成される少し前のタイミングで 1 体節分尾側へ移動した。

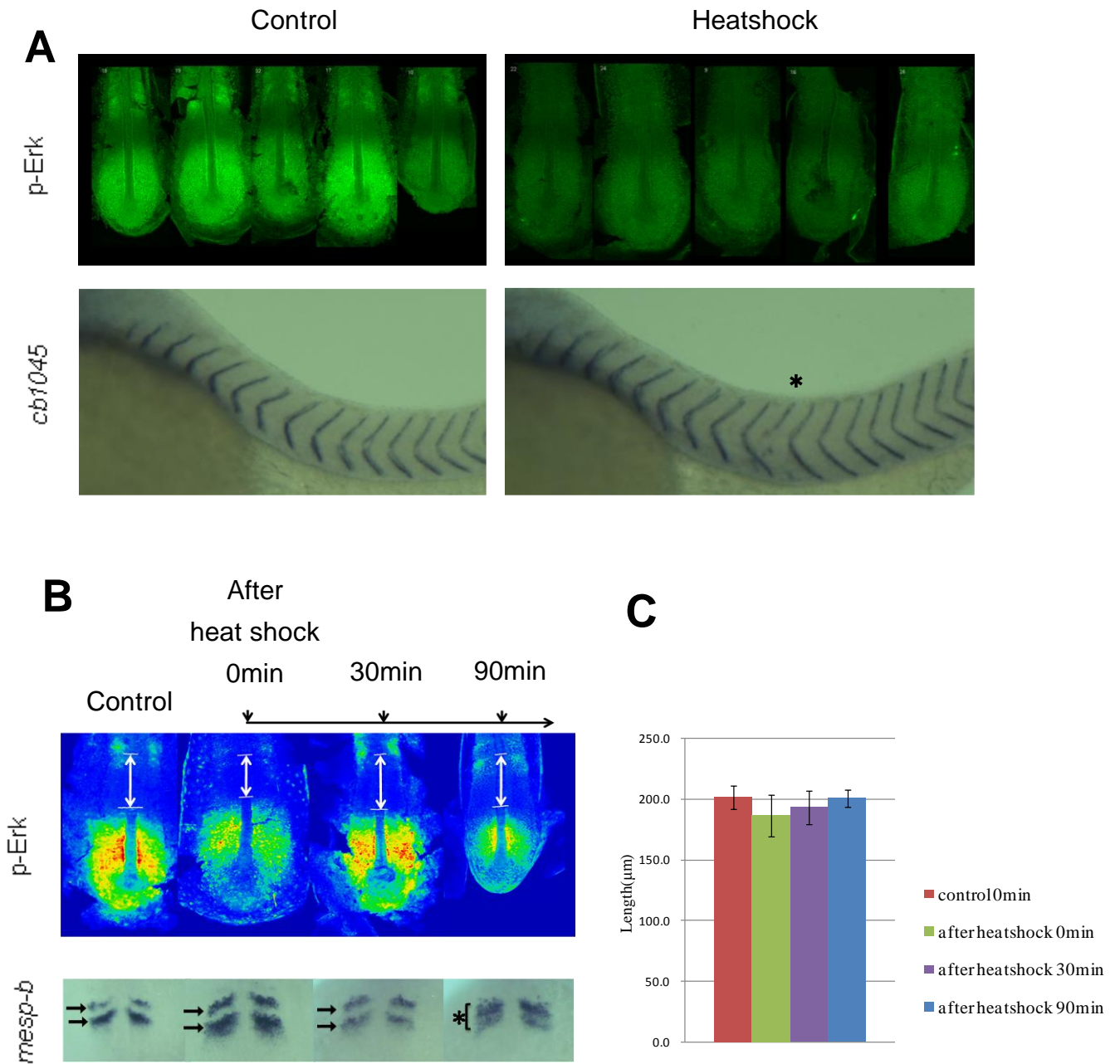


図 15. ヒートショックのリン酸化 Erk 局在、*mesp-b* 発現への影響

(A) 6 体節期における一過的なヒートショック直後に固定した胚のリン酸化 Erk 局在。コントロールに比べリン酸化レベルが低下した。また一部の胚を 24hpf で固定し、体節境界マーカである *cb1045* の発現を観察したところ、11 番目の体節境界が異常な境界を形成した。(B) ヒートショック直後(0 分)、30 分、90 分後に固定した胚の、リン酸化 Erk 局在と *mesp-b* の発現。(C) リン酸化 Erk 非局在領域の長さ。リン酸化 Erk の局在の頭側端は 0 分で頭側に伸展しているようにみえた。また、*mesp-b* 発現のストライプは、処理後 90 分でのみ異常を示した

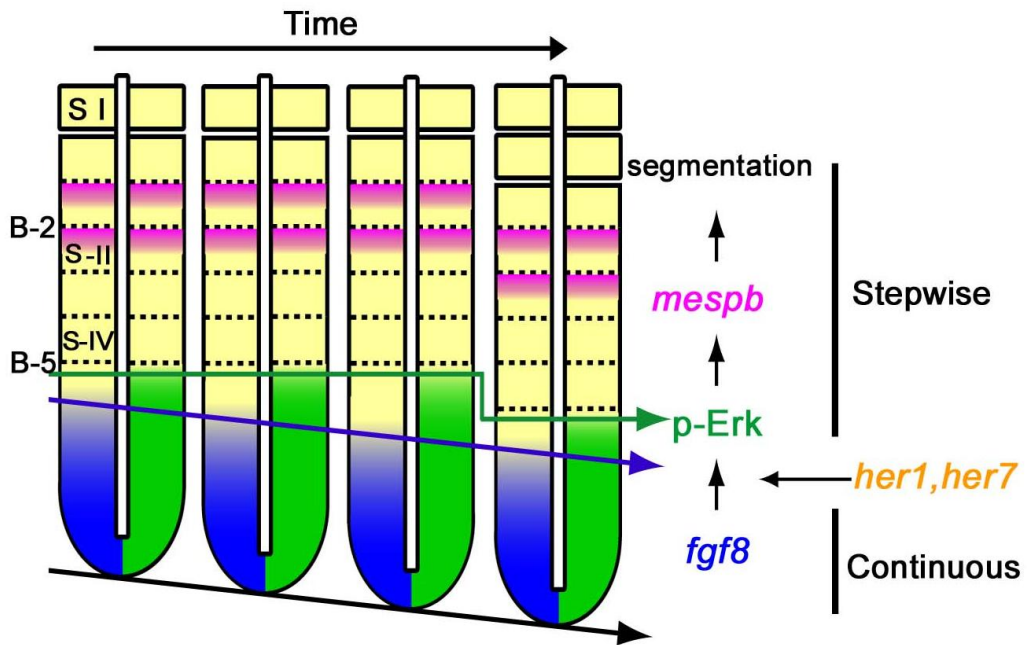


図 16. FGF/MAPK シグナルによる予定体節境界形成のモデル図

表 1.

Length	N	DMSO	N	BCI
p-Erk OFF region (2s)	18	193.5 ± 6.0	13	179.4 ± 11.9*
<i>mesp-b</i> (5s)	16	52.2 ± 2.9	17	39.0 ± 4.1*
somite (7s)	17	54.2 ± 3.3	19	41.2 ± 4.1*

BCI treatment in 2-somite stage embryos.

\*P < 0.05

## 謝辞

本研究の遂行に当たりご指導頂いた多くの方に感謝いたします。研究の機会を与えて頂いた別所康全教授、あらゆる基本を教えて頂いた松井貴輝助教、中畑泰和助教に感謝いたします。また、アドバイザー委員としてご助言くださった中島欽一教授、稲垣直之准教授、片岡浩介准教授に感謝いたします。Raichuプローブを提供いただきました京都大学松田道行教授に感謝いたします。

中島教授はじめ分子神経分化制御研究室の皆様には大変お世話になりました。融合棟へ移動するまでの3年間居室を共にし、実験器具をシェアさせていただきました。また、ジャーナルクラブ、プログレスレポートでは、異なる視点からの数々のご指摘を頂き、ありがたかったです。

稲垣准教授はじめ神経形態形成学研究室の皆様には、大変お世話になりました。居室ならびに実験室をシェアさせていただくのみならず、日々の実験での機器を使用させていただくなど、助けていただきました。感謝いたします。

遺伝子発現制御学講座の皆様にも大変お世話になりました。増田美和先輩にはゼブラフィッシュのライブイメージング系について、教えていただきました。また、貴重なデータを提供していただきました。金雄先輩には、データの議論に加え、先輩のあり方など、教えていただきました。技官の村田朋子さん、横内舞子さん、重里宏子さんには、日々の実験、特にゼブラフィッシュの維持管理において助けていただきました。Banbamg Retnoajさんには、英語を使わざるを得ない環境をつくっていただきました。また、松田達朗君、柘植翔一郎君はじめ後輩の皆さんには、議論の相手になって頂きました。皆様に感謝いたします。

## 参考文献

- 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.* 20, 2642-2647.
- Cinquin, O. (2007). Understanding the somitogenesis clock: what's missing? *Mech. Dev.* 7-8, 501-517.
- Cooke, J., and Zeeman, E.C. (1976). A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J. Theor. Biol.* 2, 455-476.
- Delfini, M.C., Dubrulle, J., Malapert, P., Chal, J., and Pourquie, O. (2005). Control of the segmentation process by graded MAPK/ERK activation in the chick embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 32, 11343-11348.
- Deng, C.X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M.M., Daugherty, C., Ornitz, D.M., and Leder, P. (1994). Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev.* 24, 3045-3057.
- 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* 5805, 1595-1598.
- Dorey, K., and Amaya, E. (2010). FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development* 22, 3731-3742.
- Dubrulle, J., McGrew, M.J., and Pourquie, O. (2001). FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell* 2, 219-232.
- Dubrulle, J., and Pourquie, O. (2004). fgf8 mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature* 6973, 419-422.

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* 6691, 377-381.

Giudicelli, F., and Lewis, J. (2004). The vertebrate segmentation clock. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 407-414.

Gomez, C., Ozbudak, E.M., Wunderlich, J., Baumann, D., Lewis, J., and Pourquie, O. (2008). Control of segment number in vertebrate embryos. *Nature* 7202, 335-339.

Hart, D.O., Raha, T., Lawson, N.D., and Green, M.R. (2007). Initiation of zebrafish haematopoiesis by the TATA-box-binding protein-related factor Trf3. *Nature* 7172, 1082-1085.

Hayashi, S., Shimoda, T., Nakajima, M., Tsukada, Y., Sakumura, Y., Dale, J.K., Maroto, M., Kohno, K., Matsui, T., and Bessho, Y. (2009). Sprouty4, an FGF inhibitor, displays cyclic gene expression under the control of the notch segmentation clock in the mouse PSM. *PLoS One* 5, e5603.

Holley, S.A. (2007). The genetics and embryology of zebrafish metamerism. *Dev. Dyn.* 6, 1422-1449.

Horikawa, K., Ishimatsu, K., Yoshimoto, E., Kondo, S., and Takeda, H. (2006). Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. *Nature* 7094, 719-723.

Ishimatsu, K., Takamatsu, A., and Takeda, H. (2010). Emergence of traveling waves in the zebrafish segmentation clock. *Development* 10, 1595-1599.

Itoh, N., and Konishi, M. (2007). The zebrafish fgf family. *Zebrafish* 3, 179-186.

Kawamura, A., Koshida, S., Hijikata, H., Ohbayashi, A., Kondoh, H., and Takada, S. (2005). Groucho-associated transcriptional repressor ripply1 is required for proper transition from the presomitic mesoderm to somites. *Dev. Cell.* 6, 735-744.

Kawamura, A., Koshida, S., Hijikata, H., Sakaguchi, T., Kondoh, H., and Takada, S. (2005). Zebrafish hairy/enhancer of split protein links FGF signaling to cyclic gene expression in the periodic segmentation of somites. *Genes Dev.* *10*, 1156-1161.

Keynes, R.J., and Stern, C.D. (1988). Mechanisms of vertebrate segmentation. *Development* *3*, 413-429.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* *3*, 253-310.

Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., Matsuda, M., (2011) Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases *Mol. Biol. Cell*, *22*, 4647-4656

Krol, A.J., Roellig, D., Dequeant, M.L., Tassy, O., Glynn, E., Hattem, G., Mushegian, A., Oates, A.C., and Pourquie, O. (2011). Evolutionary plasticity of segmentation clock networks. *Development* *13*, 2783-2792.

Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* *2*, 191-201.

Lee, H.C., Tseng, W.A., Lo, F.Y., Liu, T.M., and Tsai, H.J. (2009). FoxD5 mediates anterior-posterior polarity through upstream modulator Fgf signaling during zebrafish somitogenesis. *Dev. Biol.* *2*, 232-245.

増田美和 (2008) 体節形成過程における FGF シグナルの可視化 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文

Meier, S. (1981). Development of the chick embryo mesoblast: morphogenesis of the prechordal plate and cranial segments. *Dev. Biol.* *1*, 49-61.

Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A, Matsuda M. (2001). Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature*. *6841*, 1065-8

Nakayama, K., Satoh, T., Igari, A., Kageyama, R., and Nishida, E. (2008). FGF induces oscillations of Hes1 expression and Ras/ERK activation. *Curr. Biol.* *8*, R332-4.



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.* 2, 298-304.

Niwa, Y., Shimojo, H., Isomura, A., Gonzalez, A., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2011). Different types of oscillations in Notch and Fgf signaling regulate the spatiotemporal periodicity of somitogenesis. *Genes Dev.* 11, 1115-1120.

Oates, A.C., and Ho, R.K. (2002). Hairy/E(spl)-related (Her) genes are central components of the segmentation oscillator and display redundancy with the Delta/Notch signaling pathway in the formation of anterior segmental boundaries in the zebrafish. *Development* 12, 2929-2946.

Oginuma, M., Niwa, Y., Chapman, D.L., and Saga, Y. (2008). Mesp2 and Tbx6 cooperatively create periodic patterns coupled with the clock machinery during mouse somitogenesis. *Development* 15, 2555-2562.

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* 5, 639-648.

Primmatt, D.R., Norris, W.E., Carlson, G.J., Keynes, R.J., and Stern, C.D. (1989). Periodic segmental anomalies induced by heat shock in the chick embryo are associated with the cell cycle. *Development* 1, 119-130.

Primmatt, D.R., Stern, C.D., and Keynes, R.J. (1988). Heat shock causes repeated segmental anomalies in the chick embryo. *Development* 2, 331-339.

Roy, M.N., Prince, V.E., and Ho, R.K. (1999). Heat shock produces periodic somitic disturbances in the zebrafish embryo. *Mech. Dev.* 1-2, 27-34.

Sawada, A., Fritz, A., Jiang, Y.J., Yamamoto, A., Yamasu, K., Kuroiwa, A., Saga, Y., and Takeda, H. (2000). Zebrafish Mesp family genes, mesp-a and mesp-b are segmentally expressed in the presomitic mesoderm, and Mesp-b confers the anterior identity to the developing somites. *Development* 8, 1691-1702.

Sawada, A., Shinya, M., Jiang, Y.J., Kawakami, A., Kuroiwa, A., and Takeda, H. (2001). Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation. *Development* 23, 4873-4880.

Schlessinger, J., Plotnikov, A.N., Ibrahimi, O.A., Eliseenkova, A.V., Yeh, B.K., Yayon, A., Linhardt, R.J., and Mohammadi, M. (2000). Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol. Cell* 3, 743-750.

Shankaran, H., Ippolito, D.L., Chrisler, W.B., Resat, H., Bollinger, N., Opresko, L.K., and Wiley, H.S. (2009). Rapid and sustained nuclear-cytoplasmic ERK oscillations induced by epidermal growth factor. *Mol. Syst. Biol.* 332.

Sun, X., Meyers, E.N., Lewandoski, M., and Martin, G.R. (1999). Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev.* 14, 1834-1846.

Takahashi, Y., Koizumi, K., Takagi, A., Kitajima, S., Inoue, T., Koseki, H., and Saga, Y. (2000). Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway. *Nat. Genet.* 4, 390-396.

Takahashi, Y., and Sato, Y. (2008). Somitogenesis as a model to study the formation of morphological boundaries and cell epithelialization. *Dev. Growth Differ.* S149-55.

Wu YI, Frey D, Lungu OI, Jaehrig A, Schlichting I, Kuhlman B, Hahn KM. (2009). A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature.* 7260, 104-8