

# 分節時計における *Hes7* 3'UTR の重要性

藤室 武

奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 遺伝子発現制御講座  
(別所 康全 教授)

平成 26 年 9 月 16 日提出

## [目次]

### 分節時計における *Hes7* 3'UTR の重要性

序論	5
材料と方法	13
結果	23
考察	34
結論	41
図	43
謝辞	72
参考文献	73

所属 (主指導教員)	遺伝子発現制御講座 (別所 康全)		
氏名	藤室 武	提出	平成26年9月18日
題目	分節時計における <i>Hes7</i> 3'UTR の重要性		
<p>脊椎動物の骨格は頭尾軸に沿った繰り返し構造により作られている。この繰り返し構造は、発生中期に一時的に形成される体節と呼ばれる組織に由来する。体節は、胚尾部の未分節中胚葉( Presomitic mesoderm : PSM )と呼ばれる間充組織から作られる。発生の進行に伴い、体節は PSM の頭側から等間隔にくびれ切れ、胚の頭部から尾部にかけて神経管に沿って左右 1 対ずつ形成されこの分節化が繰り返されることで胚の頭尾軸にそった体節の等間隔パターンができる。マウスの PSM では、いくつかの遺伝子(<i>Hes7</i>、<i>Lfng</i> など)の発現が振動しており、その周期性が体節形成周期と一致することから、これらの遺伝子発現振動が分節化を制御する分節時計として機能すると考えられている。これまでに当研究室では、抑制性転写因子 <i>Hes7</i> が分節時計の中心的な役割を果たすことを明らかにしてきている ( Bessho et al. 2001, Gene Dev., 15, 2642-2647 )。 <i>Hes7</i> は Notch シグナルによって活性化され、 <i>Hes7</i> タンパクが自身の転写を抑制するネガティブフィードバックループを形成している ( Bessho et al. 2003, Genes Dev., 17, 1451-1456 )。 <i>Hes7</i> タンパクはユビキチン化を受けプロテアソームで速やかに分解されるので、 <i>Hes7</i> による転写抑制はすぐに解除される。そのため <i>Hes7</i> の転写が再開することで、遺伝子の発現が振動すると考えられている。しかし、振動の周期が決められるメカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究では、マウス個体で分節時計の中心をなす <i>Hes7</i> 遺伝子に改変を加えることにより、分節化周期を変化させることを試み、それによって分節時計の周期決定メカニズムを明らかにすることを目指した。</p> <p>これまでに、PSM における遺伝子発現振動は <i>Hes7</i> のネガティブフィードバックループを中心的なメカニズムとして数理モデル化されている(Lewis J,2003 Curr Biol,13,1398 -408)。このモデルから振動周期は、 <i>Hes7</i> の転写が活性化されてから <i>Hes7</i> タンパク質が <i>Hes7</i> の転写を抑制するまでにかかる時間である「時間遅れ」に依存することが予測されている。私は <i>Hes7</i> 遺伝子の 3'非翻訳領域(3'untranslated region,3'UTR)にヒト Dystrophin 由来のイントロンを導入することによって <i>Hes7</i> 遺伝子の転写に要する時間を延長させ、「時間遅れ」を増加させることにより振動周期を延長させることを試みた。 <i>Hes7</i> 遺伝子のサイズは約 2.8kb であるが、5kb、10kb、20kb のイントロンを導入すると転写時間はそれぞれ 4.5 分、9 分、18 分延長されることが期待され、モデルによる予測では、遺伝子発現の振動は安定して維持されるが、その振動周期はそれぞれ 9 分、18 分、36 分延長される。これらのイントロンを <i>Hes7</i> 3'UTR に導入したノックインマウスでは、体節形成周期が延長され、</p>			

ノックインマウス胚では体節は等間隔パターンを維持したまま体節数の減少が観察されると予想された。またマウス個体では、体節から派生する脊椎骨の数が減少することが予想された。これらマウス胚での体節数およびマウス個体での脊椎骨数の減少は遺伝子発現振動の延長に依存するので、導入したイントロンの大きさに依存して減少が観察されることが予想された。

私はマウス embryonic stem(ES)細胞の *Hes7* の 3'UTR にホモログスリコンビネーション法を用いて、5kb、10kb、20kb のヒト *Dystrophin* 由来のイントロンを導入した。組み替えに成功した ES 細胞を用いてノックインマウスの作製をおこなった。その結果、5kb、10kb、20kb のイントロンが *Hes7* の 3'UTR に導入されたマウスのホモ接合体(*Hes7*<sup>5k/5k</sup>、*Hes7*<sup>10k/10k</sup>、*Hes7*<sup>20k/20k</sup>)がそれぞれ得られた。モデルからの予測では、イントロンの導入による転写時間の延長は、安定した振動を導き、かつ挿入したイントロンの大きさに依存して遺伝子発現振動の周期および体節形成周期が延長して、体節数と脊椎骨数が減少することが期待された。しかし、得られた 3 種類のノックインマウスでは、すべてに *Hes7*<sup>-/-</sup> と類似した肋骨と椎骨に癒合などの重篤な奇形が認められ、また 3 種類のノックインマウス間で差異が見られなかった。このことからイントロンが *Hes7* の 3'UTR に導入されたノックインマウス胚では、*Hes7* ノックアウトマウス胚と同様に遺伝子発現振動が失われていることが予想された。*Hes7*<sup>10k/10k</sup> の胚を解析したところ、*Hes7* ノックアウトマウス胚と同様に体節が癒合しており、等間隔パターンが大きく乱されていることが明らかになった。さらに *Hes7* や *Lfng* の遺伝子発現振動は *Hes7* ノックアウトマウス胚と同様に消失していたことから、*Hes7*<sup>10k/10k</sup> マウス胚では *Hes7* の 3'UTR にイントロンを導入したことによって *Hes7* タンパク質の量が減少していることが予想された。*Hes7* タンパク質量をしらべたところ、*Hes7* タンパク質量は大幅に減少していることが明らかになった。さらに *Hes7* タンパク質が転写を抑制している *Hes7* 遺伝子および *Lfng* 遺伝子の転写量は、*Hes7* タンパク質量の減少のために増加していた。

次に、*Hes7* タンパク質量が減少している原因について解析した。*Hes7*<sup>10k</sup> アリルの転写産物の解析をおこなったところ、導入したイントロンのスプライシングが起こっておらず、さらにイントロンの途中のポリ A 付加シグナル様の配列を認識して、転写が終結していることが明らかになった。すなわち、*Hes7*<sup>10k</sup> アリルの転写産物は *Hes7* 3'UTR を失い、導入したヒト *Dystrophin* イントロンの 5'側の配列を 3'UTR として持っていた。このことから、正常な *Hes7* 3'UTR が失われたことによって、*Hes7* タンパク質量が劇的に減少したことが示唆された。

したがって本研究で私は、*Hes7* 3'UTR は *Hes7* タンパク質量の蓄積に必要であり、遺伝子発現振動を維持することによって、マウス分節時計で必須の役割を果たすことを示した。

## [序論]

### 脊椎動物の繰り返し構造と体節

脊椎動物の骨格は頭尾軸に沿った繰り返し構造により作られている。この繰り返し構造は、発生中期に一時的に形成される体節と呼ばれる組織に由来する。体節は胚の正中に存在する神経管・脊索の両側において頭部から尾部に沿って左右対称に並んだ均等な大きさの細胞塊である。一对の体節から脊椎骨一個分に相当する部分が分化するために、体節を単位として体の繰り返し構造が作り出される。

体節は、胚尾部の未分節中胚葉(Presomitic mesoderm:PSM)と呼ばれる間充組織から作られる。発生の進行に伴い、体節はこの未分節中胚葉の最も頭側の部分がかびれ切れ、それが上皮化することで一塊の細胞群として形成される。頭側から尾側方向に一对ずつ順番に体節が形成され、結果として正中の両側に体節が整列した繰り返し構造が形成される。このように体節は頭側から順番に周期的に形成されるが、種によって固有の体節形成周期を持っており、マウスでは120分ごとに1対の体節が形成される(Aulehla et al., 2008; Palmeirim et al., 1997; Pourquie, 2003; Schroter et al., 2008; Tam, 1981)。

### 体節形成は周期性を持つ

未分節中胚葉が周期的に分節化されることによって、均等な大きさの体節が整列した繰り返し構造がつくられる。このことは体節形成の時間的な周期性が、整列した体節の空間的な周期性に変換されたと考えられる。その結果、脊椎動物の特徴的なボディプランである前後軸に沿った繰り返し構造が確立される。したがって体節形成の周期性は脊椎動物の形づくりの基盤をになっていると捉えることができる。

体節形成が周期的に起こることは古くから知られていたが、その分子メカニズムは長く不明であった。一方で体節形成の周期性が空間的な周期性に変換されるしくみについてはいくつかのモデルが考案されてきた。そのひとつに1970年代に提唱されたClock and wavefront modelが提唱された(Cooke & Zeeman, 1976)。このモデルでは、未分節中胚葉に周期的に変動する振動子(Clock)と未分節中胚葉の前方から後方に移動するWavefrontの2つを仮定している。未分節中胚葉の各細胞内で振動子がはたらき、たとえば各細胞の状態をAまたはBに変

化させることを繰り返している。一方で Wavefront が前方から未分節中胚葉を sweep し、各細胞の状態は Wavefront が通り過ぎる時点の状態に固定される。したがって、未分節中胚葉は前方から A の状態に固定された細胞群と B の状態に固定された細胞群が交互に現れる。このように振動子(Clock)と前方から後方に移動する Wavefront を仮定すると繰り返しパターンを形成することができ、A 状態の細胞群とその直後の B 状態の細胞群が一つの体節と捉えることができる。これは体節の前方と後方で性質が異なる事実と一致している。

## サイクリックジーン(Cyclic gene)の発見

Clock and wavefront model では、未分節中胚葉に振動子を仮定しているが、それが分子実体として存在するか否かは 1990 年代半ばまで全く不明であった。1997 年になって、ニワトリ胚の未分節中胚葉で、ショウジョウバエのペア-ルール遺伝子 *hairy* のホモログである *c-hairy1* の発現が未分節中胚葉の分節化周期に一致して振動していることが発見された(Palmeirim et al., 1997)。ニワトリの未分節中胚葉では *c-hairy1* の発現が後方から前方に移動する波のように観察された。そして、この連続的に変化する発現パターンは 3 つの位相(Phase)として表現され、未分節中胚葉の尾側の細胞で発現している Phase1、未分節中胚葉の中間部の広い範囲で発現が見られる Phase2、分節化する直前の頭側未分節中胚葉で発現する Phase3 に分けられる。そして、この波状の発現変化が未分節中胚葉の尾側から頭側へ sweep するたびに分節化が起きて体節が作られる。そしてこの周期はニワトリ胚の場合 90 分である(図.1)。この発見が未分節中胚葉に振動子が存在する初めての分子的な証拠となった。これをきっかけにゼブラフィッシュ、マウスでも周期的な波状の発現を示す分子の存在が次々と明らかになった。*hairy* のホモログ遺伝子はニワトリの *c-hairy1* だけではなく、マウスでは *Hes1* (Jouve et al., 2000)、*Hes7*(Bessho et al., 2001)などの、ゼブラフィッシュでは *her1* (Holley, Geisler, & Nusslein-Volhard, 2000)、*her7*(Oates & Ho, 2002)などの発現が振動していることが明らかにされた。また *hairy* ホモログだけではなく、*Lunatic fringe(Lfng)* (Aulehla & Johnson, 1999; Forsberg et al., 1998; McGrew et al., 1998)や *Sprouty4*、*Axin2* など Notch シグナル系、FGF シグナル系、Wnt シグナル系のいくつかの遺伝子発現が振動していることが次々と発見された(Aulehla et al., 2003, Dequéant et al., 2006)。これらの周期的な発現を示す遺伝子はサイクリックジーン(Cyclic gene)と呼ばれるようになった。

## 遺伝子発現の振動が分節時計として働く

2000年代になって遺伝学的実験がサイクリックジーンの研究を強力に押し進めた。たとえばサイクリックジーンである *Hes7* のノックアウトマウスが作製され、遺伝子発現の振動が消失、または振動が減弱すると同時に、分節化の周期性が大きく乱される表現型が観察された (Bessho et al., 2001)。ゼブラフィッシュでも *her1* や *her7* の機能喪失実験がおこなわれ、これらの遺伝子が遺伝子発現の振動、周期的な分節化に必須であることが明らかにされた (Oates & Ho, 2002)。これらの知見から、遺伝子発現の振動が、未分節中胚葉に存在する振動子のリードアウトではなく、振動子そのものであることが明らかになってきた。*Hes7* や *her1*、*her7* は抑制性の bHLH 型転写因子をコードしているが、これらの転写因子が自身の発現を周期的に抑制することによってネガティブフィードバックループをつくるのが振動発生のメカニズムであることが明らかにされた (Bessho et al., 2003)。

未分節中胚葉の各細胞内では、細胞接触依存的に Notch シグナルが活性化され、そのエフェクター遺伝子である *Hes7* や *Lfng* の転写が活性化される。その後、*Hes7* タンパク質の蓄積がおこり、*Hes7* タンパク質は *Hes7* や *Lfng* の転写を抑制する。しかし、*Hes7* タンパク質はユビキチン化を受け速やかに分解されるために抑制は一過性に終り、再び Notch シグナル依存的に *Hes7* や *Lfng* の転写が活性化される。これらのことが繰り返され、遺伝子発現の振動が発生することが示された (図.2, Bessho et al., 2003)。

サイクリックジーンは周期的な分節化に必要であることは示され、またサイクリックジーンの一つである *Hes7* が遺伝子発現の振動を発生させる中心的な役割を果たすことは示された。しかし、遺伝子発現の振動が体節の周期的な分節化を制御していること、すなわち遺伝子発現の振動の周期性を利用して、体節が周期的に分節化されることは、単純な遺伝子機能喪失実験では明らかにできなかった。2003年に Hirata らにより、*Hes7* に点変異を加えて *Hes7* タンパク質を安定化させたノックインマウスが作製された。このノックインマウスでは *Hes7* の 14 番目のリジン残基がアルギニン残基に変化させられたことにより、わずかに安定化されている。*Hes7* タンパク質の半減期は野生型で 22 分であるが、この変異を加えると 30 分に増大している。ノックインマウスでは、発生の最初の数体節のステージでは未分節中胚葉ではっきりした遺伝子発現の振動が観察されたが、それ以降のステージでは遺伝子発現の振動は消失していた。一方

で最初の数体節は均等な大きさに形成されたが、それ以降の体節の形成が大きく乱れており、遺伝子発現の振動の消失と体節形成の乱れがはじまる時期が一致していた。このことから周期的な体節形成には遺伝子発現の振動が必須であることが強く示唆された(Hirata et al., 2004)。

これらの一連の研究から遺伝子発現の振動が分節時計として機能し、体節形成の周期性を制御していることが明らかになってきた。Notch シグナルの下流で Hes7 のネガティブフィードバックループを形成することが遺伝子発現振動発生の中心的メカニズムであり、それが体節形成の周期性を制御していることをさらにクリアにするためには、この分子モデルを数理モデル化し、in vivo および in silico で同じようなパラメーター変更を加えて、同様の表現型が得られるかどうかを確かめることが、一つの有効な手法であると考えられる。それによって機能喪失実験などの単純な遺伝学的実験では得られないこと、すなわちどの遺伝子や分子が必要であるという情報だけでなく、動的な分子メカニズムに迫ることができる考えた。

## 遺伝子発現振動の数理モデル化

マウス未分節中胚葉における遺伝子発現の振動は Hes7 のネガティブフィードバックループが中心的なメカニズムであることが既に明らかにされている(Bessho et al., 2003)。またゼブラフィッシュにおいても同様に Notch シグナルのエフェクターである *her1*、*her7* がコードする抑制性の転写因子がネガティブフィードバックループを形成し、それが中心的なメカニズムとして遺伝子発現の振動を発生させていることが知られている(Oates & Ho, 2002)。この抑制性の転写因子のネガティブフィードバックループに基づき、数理モデルが構築された(Hirata et al., 2004; Lewis, 2003)。この数理モデルでは、「時間遅れ」をパラメーターとして設定している。たとえば遺伝子の転写が活性化されてから成熟した mRNA が合成されるまでにはある時間を要するが、それを「時間遅れ」として  $T_m$  と設定している。そして mRNA の増加率は  $T_m$  時間前の転写活性に依存させている。同様に mRNA が翻訳され、タンパク質が合成されるまでの時間も「時間遅れ」として  $T_p$  と設定している。抑制性の転写因子タンパク質の変化率は  $T_p$  時間前の mRNA の量に依存させている。

Lewis はこのモデルで未分節中胚葉における遺伝子発現の振動を見事に再現している(Lewis, 2003)。マウスやゼブラフィッシュの胚の未分節中胚葉では遺伝子発現の振動が持続的に安定しておこっているが、この数理モデルの解析によ



って Lewis は、抑制性の転写因子の半減期が、「時間遅れ」の総和、すなわち遺伝子の転写が活性化されてから、自身の産物によって転写が抑制するまでの時間に比べて十分に短い場合には安定した振動場を持続することを示している。このことは転写因子 *Hes7* の半減期を長くしたノックインマウスで振動が途中で収束したこととよく一致している (Hirata et al., 2004)。さらに、振動の周期は「時間遅れ」の約 2 倍になり、周期は主に「時間遅れ」の長さに依存すると結論づけている。このことから、私は本研究で、「時間遅れ」を延長させ、遺伝子発現の振動周期を長くし、その結果体節形成周期を長くすること着想した。数理モデルで「時間遅れ」のパラメーターを増加させると振動周期が延長することがわかるが、ノックインマウスを作製することによって *in vivo* で同様のパラメーター変化を起こした場合に、表現型が数理モデルでの予測と一致すれば、私が想定している *Hes7* のネガティブフィードバックループが遺伝子発現振動の中心メカニズムであるという分子モデルが正しいことの証拠となり、このモデルの確からしさを高められると考えた。

「時間遅れ」には、転写、スプライシングなどの mRNA のプロセッシング、mRNA の核外輸送、翻訳、タンパク質の修飾、タンパク質の核内輸送など時間が含まれる。しかし、これらほとんどのステップの時間制御はほとんど明らかになっていない。mRNA は RNA polymerase II によって合成されるが、RNA polymerase II の合成速度はいくつかの報告があるために (Darzacq et al., 2007; Femino et al., 1998; Hanisch et al., 2013; O'Brien & Lis, 1993; Swinburne & Silver, 2008; Tennyson et al., 1995)、これらのステップの中で唯一制御が可能であると考えた。

未分節中胚葉における遺伝子発現の振動に関して、いくつかのモデルが構築されている (Goldbeter & Pourquie, 2008; Hirata et al., 2004; Lewis, 2003; Uriu et al., 2009)。しかし、実験データと比較検討された実績のあるモデルは Lewis のモデルのみなので、本研究では Lewis のモデルに基づいたモデルを構築した。

## 先行研究について

本研究を立案、開始してから、本研究と同様のアイデアで、未分節中胚葉における遺伝子発現振動を発生させる転写因子のフィードバックループの「時間遅れ」に着目した研究成果が発表された。

マウス *Hes7* に私と同様のアイデアで大きなインサクションを導入したノックインマウスを作製した研究が発表された (Stauber et al., 2012)。この研究では *Hes7*

の 2nd イントロンに human *Dystrophin* のイントロン由来の大きな挿入配列を導入し、転写時間を延長させることが試みられた。しかし不幸なことに、変異を導入したイントロンのスプライシングが正常におこらず、*Hes7* の機能が欠失させられたために、ノックインマウスは *Hes7* ノックアウトマウスと同様の表現型を示し、振動周期を延長させることはできなかった。ゼブラフィッシュで *her1*、*her7* の二重変異体は分節時計が全く働かないが、この変異体は *her1* のトランスジーンを導入することでレスキューされる。この *her1* のトランスジーン の 2nd イントロンに human *Dystrophin* のイントロン由来の配列をインサクションとして加え、転写時間を延長させる試みもおこなわれたが、スプライシングが正常におこらず、この研究でも振動周期を延長することに失敗している (Hanisch et al., 2013)。

マウスにおいて、*Hes7* のイントロンを除去したマウスが作製された。スプライシングに要する時間も「時間遅れ」に含まれており、実際にこのノックインマウスでは「時間遅れ」が減少していた (Takashima et al., 2011)。Lewis モデルでは「時間遅れ」が *Hes7* の半減期よりも十分に長い場合に安定した振動が持続すると予測されているが (Lewis, 2003)、このマウスでは *Hes7* のノックアウトマウスに似た体節形成の乱れが生じ、その結果、肋骨、椎骨の癒合などの表現型が現れており (図.3)、この結果からイントロン由来の「時間遅れ」が正常な振動周期を作り出すことに必要であり、「時間遅れ」が短くなれば振動は途中で収束することが予想される。このノックインマウスの胚では遺伝子発現の振動が消失し、体節形成が大きく乱れていることから、Lewis モデルの予測とよく一致していることが明らかになった。しかし、周期変化についてははっきりした結果は得られなかった。

同じグループが 3 つの *Hes7* イントロンのうち、1 つまたは 2 つを除いたマウスを作製し、解析している (Harima et al., 2012) (図.4)。これらのマウスでは「時間遅れ」の短縮が軽度であったために、遺伝子発現の振動は比較的長く保たれ、初期に形成される体節で体節形成周期の短縮が観察された。したがって、「時間遅れ」を短縮すると周期が短縮することを示唆する結果となっている。

## 本研究では「時間遅れ」を延長させ振動周期を長くすることを試みた

本研究では、*Hes7* に大きなインサクションを加えて転写に要する時間を長くして、「時間遅れ」を延長させることを試みた。数理モデルは、「時間遅れ」の延長は安定した振動を維持したまま、振動周期が延長されることを予測してい

る。ノックインマウスの表現型がこれと一致するならば、数理モデルの元となる *Hes7* のネガティブフィードバックループが遺伝子発現振動を発生させているという分子モデルが正しいことが強く示唆される。

具体的には、*Hes7* 遺伝子の 3'非翻訳領域(3'UTR)に human *Dystrophin* 由来のイントロンを導入することにした(図.5)。3'UTR にイントロンを導入した場合には *Hes7* 遺伝子のコーディング配列には影響を受けず、したがってタンパク質の構造を変化させない。また *Hes7* 遺伝子のストップコドン直後にインサクションを入れるデザインとするため、Nonsense-mediated mRNA decay(NMD)による mRNA の分解はいけないと考えられる(Brogna & Wen, 2009)。5kb、10kb、20kb のイントロンを導入したノックインマウスの作製を試みる。RNA polymerase II の RNA 合成速度には種々の報告がある(Darzacq et al., 2007; Femino et al., 1998; Hanisch et al., 2013; O'Brien & Lis, 1993; Swinburne & Silver, 2008; Tennyson et al., 1995)。野生型の *Hes7* の遺伝子サイズは約 2.8kb であるが、外来性の 5kb、10kb、20kb のイントロンの転写時間はそれぞれ 1.2~4.5 分、2.1~9 分、4.2~18 分と予想され、それだけの転写時間の延長、すなわち「時間遅れ」の延長期待できる。数理モデルによる予測では、遺伝子発現の振動は安定して維持され、その上で振動周期はそれぞれ 2.5~9 分、4.2~18 分、8.4~36 分延長される。

これらのイントロンを *Hes7* 3'UTR に導入したノックインマウス胚では、体節形成周期が延長され、体節は等間隔パターンを維持したまま体節数の減少が観察されると予想した。またノックインマウスの体軸骨格では、体節から派生する脊椎骨の数が減少することが予想された。これらマウス胚での体節数およびマウス個体での脊椎骨数の減少は遺伝子発現振動の延長に依存するので、導入したイントロンの大きさに依存して減少が観察されることが予想された。数理モデルの結果では、それぞれ体節数が 1~5 対、2~9 対、3~15 対ほど減少すると予測した。

本研究ではノックインマウスの作製には成功したが、先行研究と同様に、外来性のイントロンのスプライシングが正常におこらず、イントロン配列が残ったままで、イントロン内の polyA 付加配列に類似した配列を認識し、premature に mRNA の終結がおこっていることが明らかになった。その結果、mRNA の安定性がやや下がり、軽微な mRNA 量の減少と、劇的な *Hes7* タンパク質量の減少が見られ、*Hes7* ノックインマウスに類似した重度な体節形成の異常と体軸骨格の形成異常が認められた。そのために当初の目的である、「時間遅れ」を延長させることによって遺伝子発現振動の周期および体節形成周期の延長を起こすことはできなかった。しかし、*Hes7* 3'UTR が外来性の配列に置き換わったこと

により、Hes7 タンパク質量が劇的に減少し、分節時計が機能しなくなったことから、Hes7 3'UTR が Hes7 タンパク質の十分な蓄積に必要であり、それによって遺伝子発現振動の発生に必須であることを示すことができた。

また本研究では、さらに新たなデザインのノックインマウスを作製し、当初目的を達成しようと試みている。Hes7 の第 2 インترون内に rat *Mapk1*-intron を挿入し、転写時間を延長させたノックインマウスを作製することに成功した。しかし、このノックインマウスでも変異させたイントロンのスプライシングに異常が生じており、時間遅れの延長による影響を調べるができなかった。

したがって、本研究で私は、Hes7 3'UTR が分節時計の機能に必須であることを明らかにした。

## [材料と方法]

### フィーダー細胞の準備

フィーダー細胞用の培地は 440ml の D-MEM、50ml の FBS、5ml のペニシリン (5000unit/ml)・ストレプトマイシン(5mg/ml)、5ml の 200mM L-Glutamine を混ぜ、フィルターでろ過滅菌を行い作製した。細胞培養用の 10cm ディッシュを 0.1% ゼラチンでコートする。凍結されているフィーダー細胞(neo-resistant Primary Cultured cells、オリエンタル酵母工業株式会社)を 37°C の湯浴で融解し、DMSO を除くために 1000rpm で 5 分間遠心を行う。遠心後、上清を除き、培地で懸濁してゼラチンコートしたディッシュ 3 枚に 10ml ずつまく。37°C、5% CO<sub>2</sub> で 3~4 日培養後、細胞がコンフルエントな状態になったら、1/3 程度の細胞になるようにゼラチンコートしたディッシュに継代する。継代数 3 回前後の細胞を用い、1mg/ml マイトマイシン C 溶液を 10 $\mu$ l/ml になるように培地に加え、2 時間培養し、PBS で洗う。マイトマイシン C 処理が終わったフィーダー細胞は 2~3 日以内に ES 細胞の培養に使う。

### ES 細胞の培養

ES 細胞用の培地は 404ml の D-MEM、75ml の FBS、5ml のペニシリン(5000 unit/ml)・ストレプトマイシン(5mg/ml)、5ml の 200mM L-Glutamine、5ml の 100 mM ピルビン酸、5ml の 10mM 非必須アミノ酸、909 $\mu$ l の  $\beta$ -メルカプトエタノールを混ぜ、フィルターでろ過滅菌を行う。10<sup>7</sup>unit/1ml ESGRO(CHEMICON)を 10<sup>3</sup> unit/ml になるように使用直前に培地に添加する。37°C、5% CO<sub>2</sub> で 2~3 日培養後、細胞がコンフルエント状態になったら、次のように継代する。培地を吸い取り、1~2ml の PBS で洗い、0.25%トリプシンを加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 5 分間処理する。剥がした ES 細胞をピペッティングし、コニカルチューブに入れて 1000rpm で 5 分間遠心する。上清を取り除き、ES 細胞用培地で懸濁し、予めフィーダー細胞を播いたディッシュに 1/3 程度の細胞数になるように 10ml ずつまく。培地交換は毎日行う。

### human *Dystrophin* -intron を導入した ES 細胞の作製

*Hes7* のストップコドン直下に lox71 と lox2272 で挟んだネオマイシン耐性遺

伝子とチミジンキナーゼ遺伝子を入れたターゲティングベクター (lox71-NEO+TK-lox2272) を作製し、エレクトロポレーションにより TT2 由来の ES 細胞に導入した(図.6, Yagi et al., 1993)。このターゲティングベクターがゲノムに導入された場合、ネオマイシン耐性を持つために、抗生物質 G418 の存在下で増殖することができる。ターゲティングベクターがランダムインテグレーションされた場合もネオマイシン耐性を示すがジフテリアトキシン(DT)により細胞は死滅するために、G418 存在下で生育した ES 細胞はターゲティングベクターが導入された相同組換え体であると考えられる。エレクトロポレーションによる導入の結果、薬剤耐性を持つクローンを選択・単離した。5'側にプローブを作製してサザンブロッティングを行った。サザンブロッティングの結果、得られた相同組換え体を使い、human *Dystrophin*-intron の導入を行った。この lox71-NEO+TK-lox2272 をもつ相同組換え体に Cre 酵素による loxP サイト特異的相同組換えを使いヒト由来の *Dystrophin* 遺伝子の第 75 イントロン(5kb、10kb、20kb)を *Hes7* のストップコドン直下に導入した。Cre 酵素による loxP サイト特異的な組換えはバクテリオファージ P1 の研究により発見された組換え反応であり、組換え酵素 Cre により触媒され、loxP サイト同士の間で組換えを起こす (Sternberg & Hamilton, 1981)。lox66 と lox2272 で挟んだ human *Dystrophin*-intron を持つプラスミドと Cre 発現プラスミドをエレクトロポレーションにより lox71-NEO+TK-lox2272 をもつ相同組換え体に導入させると Cre 酵素により lox サイトの相同組換えが起こる。更に、lox66、lox71、lox2272 は loxP の変異体であり lox66 と lox71 が組み換わった場合、lox サイトの配列の変化により Cre 酵素の影響を受けなくなり (Araki et al., 1997)、lox2272 は lox2272 同士でしか組換えを起こさない (Araki et al., 2002) ことから効率よく human *Dystrophin*-intron を導入することが出来ると考えられる。human *Dystrophin*-intron が導入された場合、NEO+TK 部位が抜ける為に、チミジンキナーゼの産生能を失う。この結果、チミジンの類似体であるチミジンキナーゼによってリン酸化され、その結果 DNA 合成を阻害する 1-(2-Deoxy-2-fluoro- $\beta$ -D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil (FIAU) の存在下でも増殖が可能となる。よって FIAU 存在下で生育した ES 細胞は human *Dystrophin*-intron が導入された組換え体だと考えられる。そこで、FIAU 耐性を持つクローンを選択、単離した。このクローンに対し 5' long arm 内に作製したプローブを使いサザンブロッティングを行うことで 5kb human *Dystrophin*-intron、10kb human *Dystrophin*-intron、20kb human *Dystrophin*-intron を持つ ES 細胞をそれぞれ単離する(図.7)。

## rat *Mapk1*-intron を導入した ES 細胞の作製

human *Dystrophin* -intron の導入と同様の実験を行った。*Hes7* の第 2 イントロンに lox71 と lox2272 で挟んだネオマイシン耐性遺伝子とチミジンキナーゼ遺伝子を入れたターゲティングベクター(lox71-NEO+TK-lox2272)を作製し、エレクトロポレーションにより TT2 由来の ES 細胞に導入した。抗生物質 G418 による選択により得られたクローンに対し、5'側にプローブを作製してサザンブロッティングを行うことで相同組換え体を選択した。サザンブロッティングの結果、得られた相同組換え体を使い、Cre 酵素による rat *Mapk1*-intron の導入を行った。FIAU による選択により得られたクローンに対し 5'long arm 内に作製したプローブを使いサザンブロッティングを行うことで 1k rat *Mapk1*-intron、3k rat *Mapk1*-intron、7k rat *Mapk1*-intron、17k rat *Mapk1*-intron を持つ ES 細胞をそれぞれ単離する。

## エレクトロポレーション

エレクトロポレーションは BIO-RAD 社の Gene Pulser II を使用し、提供されたマニュアル通り操作を行う。ターゲティングベクターを導入する場合、細胞を必要枚数分継代し、コンフルエント状態になったら継代と同じ要領で細胞を剥がし、ピペッティング後コニカルチューブに回収し細胞数を数え、1000rpm で 5 分間遠心する。遠心後、培地を取り除き、30ml PBS で懸濁し 1000rpm で 5 分間遠心する。遠心後、 $1.25 \times 10^7$  cell/ml になるように PBS で懸濁し、キュベットに 30  $\mu$ g のターゲティングベクターと上記の懸濁液を 800  $\mu$ l 加え、GenePulser II (電圧 0.25kv、電気容量 500  $\mu$ F) でパルスをかける。10 分間室温で静置後、キュベットの細胞を ES 用培地で懸濁し、予めマイトマイシン C 処理を行ったフィーダー細胞を播いておいたディッシュ 2 枚に 10ml ずつ播く。48 時間後、G418(GIBCO) を 250  $\mu$ g/ml の濃度になるように ES 細胞用培地に添加し、セレクションを開始する。5~7 日間毎日 G418 入りの ES 細胞用培地を交換し、浮遊している死細胞が少なくなってきたら、ES 細胞コロニーのピックアップを行う。ピックアップは顕微鏡を見ながらマイクロピペッター(P20)を用いてコロニーを剥がし、吸い取った後、予めマイトマイシン C 処理を行ったフィーダー細胞を播いた 96 ウェルプレートに移す。ES 細胞用培地を入れて培養し、コンフルエント状態になったら継代と同じ要領で予めマイトマイシン C 処理を行ったフィーダー細胞を播いた 12 ウェルプレートに移す。12 ウェルプレートの細胞がコンフルエント状態

になったら一部を凍結保存し、残りを 24 ウェルプレートに播く。凍結細胞は、継代と同じ要領で細胞を剥がし、遠心して上清を取り除いた後、10%DMSO の入った ES 細胞用の培地 500  $\mu$ l で懸濁し、バイアルに入れて -80°C で保存する。24 ウェルプレートの細胞がコンフルエント状態になったらゲノム DNA を採取する。human *Dystrophin*-intron もしくは rat *Mapk1*-intron を導入する場合、ターゲティングベクターを導入する場合同様に細胞を培養し、エレクトロポレーションの準備を行う。パルスをかける際に 50  $\mu$ g の intron と 30  $\mu$ g の Cre 発現プラスミドを加える。その後、ターゲティングベクターを導入する場合同様に培養を行う。パルスをかけてから 48 時間培養後、FIAU 100ng/ml の濃度になるように ES 培地に加え 5 日間セレクションを行う。ピックアップからの操作はターゲティングベクターを導入する場合同様にを行う。

### Knockin mouse の作製

時間遅れを延長させた Knockin mouse の作製に当たって、human *Dystrophin*-intron もしくは rat *Mapk1*-intron を挿入した TT2 由来の ES 細胞を作製し、マイクロインジェクションを行うことでキメラマウスを作製した。キメラマウスの作製において、マイクロインジェクションから出産後 4 週齢までの操作と飼育に関しては奈良先端科学技術大学院大学の動物実験施設に委託して行われた。このキメラマウスと日本エスエルシー株式会社から購入した 8 週齢の ICR 雌マウスを交配することで、Knockin Mouse を作製した(図.8)。

### *in situ* ハイブリダイゼーションに用いる胚の準備

妊娠した雌マウスを頸椎脱臼し安楽死させる。帝王切開を行い、子宮全体を取り出し、氷冷した PBS の中で解剖し、胚を 4%PFA の入ったエッペンドルフチューブに回収し、4°C で 1 晩固定した。翌日、胚を固定液(4% PFA/PBS)から、PBS(2 回)、25%メタノール/PBS、50%メタノール/PBS、75%メタノール/PBS、100%メタノールの順で入れ換えて脱水後、-20°C で保存した。

### Wholemout *in situ* ハイブリダイゼーション

脱水した胚を 100%メタノール、75%メタノール/PBS、50%メタノール/PBS、25%メタノール/PBS、PBS の順に 5 分間隔に入れ換え再水和する。5 分間 PBST



に置換し、6% $H_2O_2$ /PBSTを加えて室温で15分間漂白する。PBSTを加えて室温で10分間置換し、これを3回行う。PBSTを除き、10 $\mu$ g/mlのProteinaseK(Roche)/PBSTで10分間処理する。ProteinaseK(Roche)/PBSTを除き、グリシン/PBSTを加え、10分間氷上に静置する。PBSTで3回洗浄する。4% PFA 0.2% glutaraldehyde/PBSTで置換し20分間室温に静置する。PBSTに置換し5分間室温に静置する。これを2回繰り返す。PBSTを除き、hybridization buffer(50% ホルムアミド、5 $\times$ SSC[pH4.5]、50 $\mu$ g/ml tRNA、1% SDS、50 $\mu$ g/ml Heparin)を加えて70 $^{\circ}$ Cで1時間振とう(HYBRIDIZATION INCUBATOR、TAITEC)する。DIG標識RNAプローブを85 $^{\circ}$ Cで20分間変性させ、氷冷する。70 $^{\circ}$ Cに保温したhybridization bufferに変性したプローブを300ng/mlになるよう加える。胚の入っているhybridization bufferを除き、直ちにプローブを添加したhybridization bufferを加える。70 $^{\circ}$ Cで一晩(16時間以上)振とうする。プローブを回収し、-20 $^{\circ}$ Cで保存する。十分量のSolution1(50% ホルムアミド、5 $\times$ SSC[pH4.5]、1% SDS)を加え70 $^{\circ}$ Cで30分間振とうする。これを3回繰り返す。Solution1を除き、十分量のSolution3(50% ホルムアミド、5 $\times$ SSC[pH4.5])を加え65 $^{\circ}$ Cで30分間振とうする。これを2回繰り返す。Solution3を除き、十分量のTBSTを加え5分間静置する。これを3回繰り返す。TBSTを除き、十分量の10% sheep serum/TBSTを加え、1時間静置する。10% sheep serum/TBSTを除き、1/2000倍量の抗DIG抗体(Roche)入りの1% sheep serum/TBSTを加える。4 $^{\circ}$ Cで一晩振とうする。抗体を除き、十分量のTBSTを加え、室温で5~10分間振とうする。これを10回繰り返す。その後、NTMTに置き換え、NBT、BCIP試薬を用いて発色反応を行った。

## Wholemout 免疫染色

Hes7タンパク質の染色はホールマウス胚を用いた。マウスE10.5胚を4% PFA/PBSで固定(4 $^{\circ}$ C、3時間)し、内在性peroxidaseの不活性化のために6%  $H_2O_2$ で処理(4 $^{\circ}$ C、20分)した。その後、マウス胚を抗Hes7モルモット抗体(1/200)で処理(4 $^{\circ}$ C、一晩)し、Horse radish peroxidase結合抗モルモットIgG抗体で処理(4 $^{\circ}$ C、一晩)した。シグナルの検出にはTSA kit #2(alexa fluor 488)を用いた。

## ジェノタイピング(ゲノム抽出・PCR)

マウスの組織または細胞をエッペンドルフチューブに入れ、500 $\mu$ lのLysis Buffer(50mM Tris-HCl[pH8.0]、0.2M NaCl、5mM EDTA、1% SDS)と50 $\mu$ gの

proteaseK を加えて 55°C で 1 晩振とうする。その後、500  $\mu$ l のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(pH7.9 Wako)を加え、30 秒間攪拌する。10 分間遠心分離(室温、15000rpm)し、水層 300  $\mu$ l を別のエッペンドルフチューブに回収した。750  $\mu$ l の 100%エタノールを加え、転倒混和し 10 分間遠心分離(15000 rpm、4°C)後、上清を除き 800  $\mu$ l の 70%エタノールを加え 5 分間遠心分離(室温、15000rpm)した。上清を除き 10 分間乾燥させた後、100  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O または TE buffer(10mM Tris[pH8.0]、10mM EDTA)を入れて溶かす。

ジェノタイピングは PCR によりゲノム中の挿入イントロン配列を増幅し、電気泳動により確認した。プライマーセットは以下のものを用いた(図.9A)。

Hes7\_F-GAGCAATGGTCACCCGGGAGCG

Hes7\_R-TCTGTAAGGCGGTGGCGGTGGC

Dys-intron\_R-GAGCAATGGTCACCCGGGAGCG

PCR 条件は以下の通り

95°C : 5 分、(95°C;30 秒、60°C;30 秒、72°C;60 秒)×32 回、72°C;3 分

### サザンブロッティング

抽出した 2  $\mu$ g のゲノム DNA を 15  $\mu$ l の反応系で、制限酵素により 37°C で一晩消化する。0.8%アガロースゲルで反応液を 12mA、20V で 16 時間泳動する。泳動が終わったら、アルカリ変性させた後、アガロースゲルのウェルを下に向けてメンブレンと背中合わせになるようにし、10×SSC でメンブレンに一晩トランスファーする。鉛筆でサンプルを流した位置をマークし 5×SSC で 10 分間中和し、ゴミがつかないように乾かす。90 秒間 UV リンカー処理し、よく乾かす。5×SSC を入れハイブリバックに入れる。Hybridization buffer(50% ホルムアミド、5×SSC、50mM リン酸ナトリウム、2% ブロッキング試薬、0.1% N-ラウロイルサルコシン・ナトリウム、7% SDS)を 42°C で熱しハイブリバックに入れる。メンブレンを 42°C で 1 時間振とうし、Hybridization buffer をなじませる。作製した DIG 標識プローブを 5 分間熱変性させ、すぐに氷上で 5 分間急冷する。プローブの入った Hybridization buffer を用意し、ハイブリバックに入れる。42°C で一晩振とうする。プローブを回収し、-20°C で保存する。十分量の 2×SSC 0.1% SDS のなかで室温、5 分間振とうして洗う。これを 2 回繰り返す。十分量の 0.2×SSC 0.1%SDS を加え 60°C で 30 分間振とうする。マレイン酸バッファー(0.1M マレイン酸、0.15M NaCl)で軽く洗う。2% Blocking Reagent/マレイン酸バッファーで室温、30 分間振とうする。2% Blocking Reagent/マレイン酸バッファーに

1/10000 の濃度になるよう抗 DIG 抗体 AP を添加し、メンブレンを入れて 1 時間以上振とうする。マレイン酸バッファーで 20 分間激しく振とうしながら洗う。これを 3 回繰り返す。メンブレンを Assaybuffer と CDPstar の順番に 5 分間ずつ室温で振とうする。残存する液を切り落とし、サランラップに包み泡を除きメンブレンが乾かないようにする。フィルムカセットにメンブレンのプロット面が上になるようにセットし、暗室でフィルムを挟み、カセットを閉じる。1 時間経過したらフィルムを現像する。

## RNA 抽出

胎生 10.5 日齢のマウス未分節中胚葉から、First pure RNA kit(Takara)を用いて精製した  $1\mu\text{g}$  の totalRNA を持ち込んで、ランダムプライマーと Super script II RT(invitrogen)を用いて逆転写反応を 2 時間行い、cDNA を合成した。

## リアルタイム PCR

上記 cDNA の 1/100 量を 1 サンプルとして KAPA SYBR FAST Universal 2X qPCR Master Mix(Nippon Genetics)を用いて、Light Cyclor 480(Roche)を使いリアルタイム PCR を行った。プライマーセットは以下のものを用いた。

Hes7 Exon3\_F-CGAAGCTGGAGAAAGCGGAGATACTGGA

Hes7 Intron1\_FW-GAGAGGTGGGAAGGGAGG

Lfng mRNA\_Fw-AAGCTCACAGGCAATGTGGT

Lfng intron\_Fw-TCCTACCTTTCCCTCTGTGC

Gapdh\_Fw-TTCACCACCATGGAGAAGGC

Hes7 Exon4\_R-CCGGACAAGTAGCAGCTGGCGAG

Hes7 Intron1\_RV-CTCTGACCCTGCCCTCTTTATACTT

Lfng\_Rv-CCGGAGGTTGACGTAGTTGT

Gapdh\_Rv-TTGTCATGGATGACCTTGGC

PCR 条件は以下の通り

95°C : 3 分、(95°C;10 秒、60°C;20 秒、72°C;1 秒)×40 回

## RT-PCR 解析

上記 cDNA の 1/100 量を 1 サンプルとして、LA taq(TaKaRa)を用いて PCR 反

応を行った。プライマーセットは以下のものを用いた。

Primer\_F1-AACCTCCGGAACCCGAAGCTGGAGAAA

17k\_F1-ACCGAAGGGTCCGGAGGAGCAATG

Gapdh\_Fw-TTCACCACCATGGAGAAGGC

Primer\_R1-TCAGGGCCAAGGTCTCCAAAACGC

Primer\_R2-ATGCCATGATGGGTCTTGGTTCTGGC

Primer\_R3-CGCGACTGGTATGTTTCAGATAAGTAAGCAGC

17k\_R1-CGATTTTATTCCATGCACTAGGGACTCGGG

Gapdh\_Rv-TTGTCATGGATGACCTTGGC

PCR 条件は以下の通り

94°C : 5 分、(94°C;30 秒、60°C;30 秒、72°C;10 分)×32 回、72°C;10 分

### 3'-rapid amplification of cDNA ends(3'RACE)

胎生 10.5 日齢の *Hes7*<sup>10k/10k</sup> マウス未分節中胚葉から、First pure RNA kit(Takara) を用いて精製した 1  $\mu$ g の totalRNA を持ち込んで、Oligo dT-3sites Adaptor Primer(Invitrogen)と Super script II RT(invitrogen)を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。この cDNA をサンプルとして 3'RACE\_R1、Adaptor プライマーセットと KOD plus(Toyobo)を使い PCR 反応を行った。PCR 条件は以下の通り 95°C;5 分、(95°C;30 秒、60°C;30 秒、72°C;5 分)×32 回、72°C;5 分

この PCR 産物を 100 倍希釈し、そのうち 1  $\mu$ l を鋳型とし、3'RACE\_R2,Adaptor プライマーセットと KOD plus を使い同条件で PCR 反応を行った。

使用したプライマー配列は以下の通り

Oligo dT-3sites Adaptor Primer-

GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

Adaptor-GGCCACGCGTCGACTAGTAC

3'RACE\_R1-GATCATTGTCAGTGAAGACCATGGTAGAG

3'RACE\_R2-TGAGCTCATTGGTCAAGAGCCCTG

### 骨格二重染色

生後 0 日齢のマウスを 70°C のお湯につけながら皮、内蔵、脂肪を剥ぐ。100% エタノールに入れて固定(4°C、一晚)する。エタノールを除き、アセトン処理(37°C、一晚)を行う。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)を加え静置(37°C、3日間)する。染色液を除き、水で3回ほど洗浄を行う。1% KOHを加えて静置(37°C、5日間)し、透明化を行う。透明化したら Moll solution(20% グリセリン、1% KOH)を加えて写真撮影を行う。

## NIH3T3 細胞

NIH3T3 細胞の培地は 500ml の D-MEM(ナカライテスク)に FBS(Bio West)を 50 ml(終濃度 10%)、ゲンタマイシン(ナカライテスク)500  $\mu$  l(終濃度 0.1%)を添加したものを使用した。細胞は 70%コンフルエント状態のものを使用し、次のように継代した。

細胞の培地を吸い取り、5ml の PBS で 2 回洗浄し、0.05w/v% トリプシン-EDTA(和光)を 200  $\mu$  l 添加し、37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 5 分間処理する。細胞がディッシュから剥がれたことを確認したのち、培地を 10ml 加え、ピペッティングにより細胞を懸濁した。懸濁液 1ml を取り、新しいディッシュに入れ、培地を 9ml 加えた後 37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養を行った。

## ルシフェラーゼアッセイ

70%コンフルエント状態の NIH3T3 細胞を用意し、24-well プレートのウェルに  $4.0 \times 10^4$  個の細胞をまいた後、24 時間培養を行った。細胞が 70%コンフルエント状態になった時に新しい培養培地に交換し、TransIT(Mirus)を使用して 0.1  $\mu$  g の PGL4.12 ベクターに N-box を 6 個タンデムに繋げたアクチンプロモーターを挿入したプラスミドと 1ng または 2ng の正常な Hes7 を発現するプラスミド (nHes7)、第 3 エクソンが欠損している異常な Hes7 を発現するプラスミド ( $\Delta$ 3Hes7)を NIH3T3 細胞に遺伝子導入した。この際に、コントロールとして 10ng TK プロモーター制御下のレニーラルシフェラーゼベクター(Promega)も同時に遺伝子導入をしている。2日間培養した後、500  $\mu$  l の PBS で 2 回洗浄し、100  $\mu$  l Passive Lysis Buffer(Promega)により可溶化を行った。ルシフェラーゼ活性は可溶化上清 20  $\mu$  l を Dual Luciferase reporter assay system(Promega)を用いて測定を行った。

## 生物発光リアルタイム測定装置を用いた mRNA の安定性の測定

mRNA の安定性を測定するために生物発光リアルタイム測定 Krons

Dio(ATTO)を用いてルシフェラーゼ活性の継時的な観察を行った。70%コンフルエント状態の NIH3T3 細胞を用意し、3mm ディッシュに  $2.0 \times 10^5$  個の細胞をまいた後、24 時間培養を行った。細胞が 70%コンフルエント状態になった時に新しい培養培地に交換し、ルシフェリン(ナカライテスク)を最終濃度が  $100 \mu\text{M}$  になるように加え、TransIT(Mirus)を使用して  $2.5 \mu\text{g}$  の発現ベクターの遺伝子導入を行った。2 日間培養した後アクチノマイシン D を最終濃度  $5 \mu\text{g/ml}$  になるように添加し Krons Dio を用いて測定を行った。

## [結果]

### human *Dystrophin* イントロンノックイン ES 細胞の作製

マウス胚発生期にの遺伝子発現の振動は、体節分節化のタイミングと一致しており、分節化のタイミングを制御していると考えられている。また、遺伝子発現の振動は転写因子 *Hes7* が形成するネガティブフィードバックループを中心的なメカニズムとしていると考えられており、その分子モデルに基づいた数理モデルが構築されている(Lewis, 2003)。この数理モデルでは *Hes7* 遺伝子が活性化されてから、*Hes7* タンパク質によって抑制されるまでの時間を「時間遅れ」としており、振動周期は「時間遅れ」の約 2 倍であることを予測している。「時間遅れ」には *Hes7* 遺伝子の転写、転写産物のプロセッシング、mRNA の核外輸送、翻訳、*Hes7* タンパク質の修飾、*Hes7* タンパク質の核内輸送などに要する時間を含んでいる。私は *Hes7* 遺伝子に大きなインサクションを導入することによって、転写に要する時間を長くし、「時間遅れ」を大きくすることによって遺伝子発現の振動周期を長くすることを試みた。具体的には human *Dystrophin* イントロンを借用し、*Hes7* のストップコドン直後に導入することにした。使用した human *Dystrophin* の第 75 イントロンは 20kb の長さであるが、中間の配列を除き、5kb、10kb、20kb の 3 種類の intron を挿入することとした。

まず初めに ES 細胞にホモログスリコンビネーション法で *Hes7* のストップコドンの直後に変異 loxP 配列である lox71 と lox2272 で挟んだネオマイシン耐性遺伝子とチミジンキナーゼ遺伝子のカセット(lox71-NEO+TK-lox2272)を導入した。ES 細胞は TT2 を用いた。ベクターをエレクトロポレーション法でトランスフェクションしたあと、コロニーを形成させ、抗生物質 G418 でセレクションした。また、ジフテリアトキシン(DT)をネガティブセレクションに用いた。383 個のクローンをピックアップし、5'側にプローブでサザンブロットティングを行った結果、13 クローンが相同組換えをおこしたクローンであった(図.6)。

次に、この lox71-NEO+TK-lox2272 をもつ相同組換え体に Cre 酵素の発現ベクターと lox66 と lox2722 で挟まれた human *Dystrophin* のイントロン(5k、10k、20k)を含むベクターを co-transfection した。Cre 酵素による loxP サイト特異的な組換えはバクテリオファージ P1 の研究により発見された組換え反応であり、組換え酵素 Cre により触媒され、loxP サイト同士の間で組換えを起こす(Sternberg & Hamilton, 1981)。lox66 と lox2272 で挟んだ human *Dystrophin* イントロンを持つプラスミドと Cre 発現プラスミドをエレクトロポレーションにより

lox71-NEO+TK-lox2272 をもつ相同組換え体に導入させると Cre 酵素により lox サイトの相同組換えが起こる。更に、lox66、lox71、lox2272 は loxP の変異体であり lox66 と lox71 が組み換わった場合、lox サイトの配列の変化により Cre 酵素の影響を受けなくなる(Araki et al., 1997)こと、lox2272 は lox2272 同士でしか組換えを起こさない(Araki et al., 2002)ことから効率よく human *Dystrophin* イントロンを導入することができる考えた。human *Dystrophin* イントロンが導入された場合、NEO+TK 部位が抜けるために、チミジンキナーゼの産生能を失う。この結果、チミジンの類似体でありチミジンキナーゼによってリン酸化され、その結果 DNA 合成を阻害する FIAU の存在下でも増殖が可能となる。よって FIAU 存在下で生育した ES 細胞は human *Dystrophin* イントロンが導入された組換え体であると考えられる。5kb human *Dystrophin* イントロンを導入したものを 20 個のクローン、10kb human *Dystrophin* イントロンを導入したものを 8 個のクローン、20kb human *Dystrophin* イントロンを導入したものを 22 個のクローンを単離した。

正しく組換えられた ES 細胞を選択するために 5'long arm 内に設定したプローブを用いてサザンブロッティングを行った(図.7)。制限酵素 *Stu1* を使った場合、野生型で 3.7kb の消化産物が、組換え体では 4.7kb の消化産物ができる。サザンブロッティングの結果、2 個のクローンから 5kb human *Dystrophin* イントロンを持つものを、3 個のクローンから 10kb human *Dystrophin* イントロンを持つものを、2 個のクローンから 20kb human *Dystrophin* イントロンを持つものを得た。

### human *Dystrophin* イントロンノックインマウスの作製

human *Dystrophin* イントロンが挿入されたノックインアレルを持つ ES 細胞を用いてキメラマウスの作成を行った(図.8)。それぞれの ES 細胞を ICR の胚盤胞にインジェクションし、代理母に移植することでキメラマウスを作製した。今回用いた TT2 は C57BL6 と CBA の F1 の雄の胚を利用して作られ、またそれらのマウスは、黒目黒毛である。また ICR はアルビノであるために、インジェクションされた ES 細胞由来の細胞が多くキメラマウスに含まれている場合は、キメラマウスは黒目黒毛で雄になる。キメラマウスにおける黒毛の割合を挿入 ES 細胞由来の細胞の割合(キメラ率)と考え、キメラ率の高い雄キメラマウス(5kb キメラマウス:キメラ率 80%、10kb キメラマウス:キメラ率 90%、20kb キメラマウス:キメラ率 80%)と雌の ICR マウスを掛け合わせることでノックインアレルをヘテロに持つマウス(*Hes7*<sup>5k/+</sup>、*Hes7*<sup>10k/+</sup>、*Hes7*<sup>20k/+</sup>)をそれぞれ作製した。



アルビノである ICR マウスより、黒目黒毛が優勢遺伝であることから ES 細胞由来の精子が使われた場合、黒目茶毛を持つマウスが生まれる。このヘテロマウス同士を掛け合わせることでノックインアليلをホモに持つマウス(*Hes7*<sup>5k/5k</sup>、*Hes7*<sup>10k/10k</sup>、*Hes7*<sup>20k/20k</sup>)を作製した。

### human *Dystrophin* イントロンノックインマウスは *Hes7* ノックアウトに似た表現型を示す

*Hes7* 遺伝子のサイズは約 2.8kb であるが、5kb、10kb、20kb のイントロンを導入すると転写時間はそれぞれ 1.2~4.5 分、2.1~9 分、4.2~18 分延長されることが期待される。ここで Lewis によるモデルをもとに当研究室で作製したモデルによって振動周期の予測を行った(Kim et al., 2011)。このモデルは下の式で表現される。

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

$$\frac{dm(t)}{dt} = \frac{k}{1 + p^2(t - T_m)P_0^2} - cm(t)$$

*Hes7* タンパク質の量を  $p(t)$ 、mRNA 量を  $m(t)$  とし  
 → $p(t)$  は  $m(t)$  に依存して増加し、 $p(t)$  自身の量に応じて分解する。  
 → $m(t)$  は  $p(t)$  に依存して増加が抑えられ、 $m(t)$  自身の量に応じて分解する。  
 を意味している。ここで  $a$  と  $k$  は mRNA のタンパク質合成(翻訳)速度定数、および mRNA 最大転写速度定数である。Notch による転写促進は  $k$  で表現される。  
 $b$  と  $c$  は分解速度、 $p_0$  は *Hes7* による転写抑制の度合いを示す定数(小さいほど抑制効果大きい) $T_p$  と  $T_m$  はそれぞれタンパク質と mRNA 産生にかかる時間の遅れを意味している。このモデルをもとに振動周期を測定すると、野生型に比べそれぞれ 2.5~9 分、4.2~18 分、8.4~36 分延長されると考えられる。これらのイントロンを *Hes7* 3'UTR に導入したノックインマウス(*Hes7*<sup>5k/5k</sup>、*Hes7*<sup>10k/10k</sup>、*Hes7*<sup>20k/20k</sup>)では、体節形成周期が延長され、ノックインマウス胚では体節は等間隔パターンを維持したまま体節数の減少が観察されると予想され、その結果、マウス個体では体節から派生する脊椎骨の数が減少することが予想された。

また、これらマウス胚での体節数およびマウス個体での脊椎骨数の減少は遺伝子発現振動の延長に依存するので導入したイントロンの大きさに依存して減少が観察されることが予想された。しかし、このマウスを観察したところ *Hes7*<sup>5k/+</sup>、*Hes7*<sup>10k/+</sup>、*Hes7*<sup>20k/+</sup> で頻度が低いものの *Hes7*<sup>+/-</sup> と同様の尾が曲がる表現

型が観察された。加えて、*Hes7*<sup>5k/5k</sup>、*Hes7*<sup>10k/10k</sup>、*Hes7*<sup>20k/20k</sup> では体軸や尾の長さが減少するという予想とは異なる表現型が観察された(図.9B)。

### **human *Dystrophin* イントロンノックインマウスは椎骨や肋骨に異常を示す**

human *Dystrophin* イントロンノックインマウスにおいて *Hes7*<sup>-/-</sup> に似た表現が現れた。この表現型を詳しく調べるために骨格染色により野生型とノックインマウスの比較を行った(図.10)。その結果、human *Dystrophin* イントロンノックインマウスでは *Hes7*<sup>-/-</sup> の表現型と似た椎骨や肋骨の癒合などの表現型が得られた。また、*Hes7*<sup>5k/5k</sup>、*Hes7*<sup>10k/10k</sup>、*Hes7*<sup>20k/20k</sup> を比較したところ、表現型に違いが見られなかったことから、私の予想とは異なる結果が現れたと判断した。転写時間による差が観察されなかったために、これ以降の実験では *Hes7*<sup>10k/10k</sup> を使用している。

### **human *Dystrophin* イントロンノックインマウスは体節形成に異常を示す**

*Hes7*<sup>10k/10k</sup> で椎骨、肋骨に異常が確認されたため、それらのもととなる体節を胎生 10.5 日齢の *Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚を用いて、*in situ* ハイブリダイゼーションにより体節マーカーである *uncx4.1* と *Myogenin* の発現の検出を行った(図.11)。*uncx4.1* は一つ一つの体節の後ろ側半分に限局して発現するために、ラダーパターンとして観察される。*Hes7*<sup>-/-</sup> では体節の大きさがまちまちになり、不完全な分節化も見られる。*Hes7*<sup>10k/10k</sup> は *Hes7*<sup>-/-</sup> 同様に、体節の大きさの不正、不完全な分節化が見られた(図.11A-C)。筋肉のもとになる myotome のマーカーである *Myogenin* も各体節の一部分に発現しているために、野生型ではラダーパターンが観察される。*Hes7*<sup>-/-</sup> では体節の大きさがまちまちになり、不完全な分節化も見られる。*Hes7*<sup>10k/10k</sup> でも *Hes7*<sup>-/-</sup> 同様に、体節の大きさの不正、不完全な分節化(図.13D-F)が見られた。よって *Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚では適切な体節形成が行われず、その結果、椎骨、肋骨の異常が生じていることが示された。

### ***Hes7*<sup>10k/10k</sup> マウス胚では *Hes7* mRNA、タンパク質の量が減少している**

*Hes7*<sup>10k/10k</sup> では、*Hes7*<sup>-/-</sup> 同様に体節形成に異常が生じており、その結果、椎骨、肋骨の異常が生じていることが示唆された。そこで、*Hes7* の 3'UTR に外来性のイントロンを挿入した *Hes7*<sup>10k/10k</sup> では *Hes7* の機能が消失しているか低下してい

ることが考えられた。そこで、*Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚における *Hes7* mRNA、*Hes7* タンパク質について調べた。

*Hes7* のコーディング領域をもとに作製したプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、*Hes7* mRNA を検出した。野生型胚では既に報告されているような波状の発現パターンが観察され、個体ごとに異なったパターンが観察されたが、*Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚では未分節中胚葉全体に均一に広がるように発現していた(図.12A,B)。この結果は、*Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚では *Hes7* mRNA の発現の振動が消失していることを示唆している。

*Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚で *Hes7* の発現の振動が消失している原因として *Hes7* タンパク質の機能が失われている可能性が考えられたため、*Hes7* mRNA と *Hes7* タンパク質の定量を試みた。胎生 10.5 日齢の *Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚の未分節中胚葉から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、リアルタイム PCR で mRNA 量の定量を行った(図.13)。*Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚では、野生型胚に比べ mRNA 量が 30%減少していることが明らかになった(図.13A)。また、免疫染色により *Hes7* タンパク質の局在を調べたところ、*Hes7* タンパク質ほとんど検出できずなかった(図.12C,D)。これらの結果は、*Hes7*<sup>10k</sup> アリルの転写産物からの *Hes7* タンパク質の合成が大幅に減少していることを示唆している。また、この結果は *Hes7*<sup>10k/10k</sup> と *Hes7*<sup>-/-</sup> の表現型が類似していることと一致している。

### ***Hes7*<sup>10k/10k</sup> マウス胚では *Hes7* タンパク質の量の減少により振動遺伝子の転写が活性化する**

*Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚では *Hes7* タンパク質の量が減少していることが示唆された。*Hes7* タンパク質は自身の転写や振動遺伝子である *Lfng* 等の振動遺伝子の転写を抑制していることから、これらの転写が活性化されている可能性が示唆された (Morales et al., 2002)。そこで私は *Hes7* と *Lfng* の転写活性を調べた。イントロン配列はスプライシング後すぐに分解されるためにイントロンを含む転写産物を検出することで転写活性を調べることができる (Shermoen & O'Farrell, 1991)。まず初めに *Hes7* の第 1 イントロン配列に結合するプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを行い *Hes7* の転写活性を調べた。その結果、野生型胚では mRNA と同様に既に報告されている様な発現パターンが確認されたにも関わらず、*Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚では未分節中胚葉中に均一に広がるように発現しており、発現量も増加しているようにみえた(図.12E,F)。また、*Lfng* についても同様に発現パターンの消失と発現量の増加が観察された(図.12G,H)。 *in situ* ハイブリダイゼー

ションにより転写量の増加が観察されたため、リアルタイム PCR を用いて転写活性を定量化した。*Hes7* の転写が 20%、*Lfng* の転写が 80%増加していることが観察された(図.13B,D)。これらの結果は、*Hes7* タンパク質の量が減少していることが原因となり、*Lfng* と *Hes7*<sup>10k</sup> アリルの転写活性が増加していることを示唆している。

***Hes7*<sup>10k</sup> アリルでは外来性のイントロンのスプライシング異常が生じている。**

*Hes7*<sup>10k/10k</sup> ではタンパク質の大幅な低下から *Hes7*<sup>-/-</sup>様の表現型が現れていると考えられる。これは、*Hes7*<sup>10k</sup> アリルでは human *Dystrophin* のイントロンが *Hes7* のストップコドンの直後に挿入されていることが原因であると考えられる。そこで、この挿入されたイントロンが適切にスプライシングされているかを調べた。胎生 10.5 日齢の野生型胚もしくは *Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚の未分節中胚葉から RNA を抽出し、cDNA を合成し、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)を行った。私はフォワードプライマーとして第 4 エクソン(F1)にプライマー設計し、リバースプライマーとして 3'UTR(R1)と、*Dystrophin* イントロン内に 2つのプライマー(R2,R3)を設計した(図.14A)。F1 と R1 を使い PCR を行ったところ、野生型胚では PCR 産物を検出できた。*Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚では検出することができなかったことから挿入イントロンが正常にスプライシングされていない可能性が示唆された。そこで、F1 と挿入イントロンの 2kb に位置するプライマーである R2 を使い PCR を行った。*Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚で PCR 産物が検出された。これは、挿入したイントロンが残存していることを示唆している。しかし F1 と挿入イントロンの 4kb に位置するプライマーである R3 を使い PCR を行った場合、PCR 産物が検出されなかった(図.14B)。これらの結果から、挿入したヒト由来 *Dystrophin* 遺伝子のイントロンがスプライシングの異常により残存しており R2 と R3 の間で転写が停止していることを示唆している。

挿入したイントロンの状況をさらに詳しく調べるために、*in situ* ハイブリダイゼーション法による実験を行った。*Hes7* 3'UTR に結合するプローブを使用した。このプローブでは、野生型胚で *Hes7* mRNA の波状のパターンを検出することができたが、*Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚では *Hes7* mRNA を検出することができなかった(図. 15A,B)。これは、*Hes7*<sup>10k</sup> アリル由来の *Hes7* mRNA には正常な *Hes7* 3'UTR が存在していないことを示唆している。また、*Dystrophin* イントロンの R1 プライマーより 5'側に結合するプローブを使用し mRNA を検出すると、*Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚の未分節中胚葉で均一に発現しており、*Hes7* mRNA の発現パターンと似ていた(図.

15C,D)。これらの結果からも、挿入したイントロンがスプライシングされずに残存しており、R2 と R3 の間で転写が停止していることが示唆された。

*Hes7*<sup>10k</sup> アリルの転写産物はスプライシングの異常により *Hes7* 3'UTR に異常が生じていることが明らかになった。*Hes7* mRNA の3'末端の構造を明らかにするために3'-rapid amplification of cDNA ends(3'RACE)法を行った。3'RACE法はpolyA配列を利用してmRNAの3'末端の構造をPCR法で明らかにする法法である(Schaefer, 1995)。10.5日齢の*Hes7*<sup>10k/10k</sup>胚の未分節中胚葉から抽出したRNAをつかって3'RACE法をおこなった。アーティファクト以外に、*Hes7*<sup>10k</sup>アリルの転写産物由来の2つの主要なPCR産物を検出した(図.16)。一方のPCR産物は挿入イントロンの2.4kb下流に存在するポリA付加シグナル(AATAAA)と同様の配列の後ろでポリA鎖が付加されており、もう一方のPCR産物はストップコドン3.3kb下流に存在するポリA付加シグナルと同様の配列の後ろでポリA鎖が付加されていた。これらの結果は、*Dystrophin* イントロン内に存在するポリA付加シグナルと同様の配列を認識し、prematureに転写を終結させてpolyAを付加したことを示している。結果として、正常な*Hes7* 3'UTRが欠損し、この挿入イントロンが3'UTRに置き換わっている(図.17)。また、本来の*Hes7* 3'UTRの長さは250bpであることから3'UTRの長さが2kbまたは3kb延長されたことになる。

### rat *Mapk1* イントロンノックイン ES 細胞の作製

*Hes7* のストップコドンの直後に human *Dystrophin* イントロンを挿入した human *Dystrophin* イントロンノックインマウスではスプライシングの異常が生じていた。また、他の研究グループが同様の戦略を用いて転写時間の延長に挑戦しているが、どのグループもスプライシングの異常により失敗している(Stauber et al., 2012)。スプライシングに異常が生じた理由として

- ① 種が離れたヒト由来の遺伝子のイントロンを挿入したこと。
- ② 未分節中胚葉で発現していない遺伝子のイントロンを使ったこと。
- ③ イントロン挿入部位。

以上の可能性が考えられた。そこで、マウスに近い種であるラット由来で、未分節中胚葉内で発現している *Mapk1* 遺伝子のイントロンを *Hes7* の第2イントロンに挿入した rat *Mapk1* イントロンノックインマウスを新しく作製することに

した。

*Hes7* の第 2 イントロンに rat *Mapk1* イントロンを挿入したノックインアリの概要を示す(図.18)。 *Hes7* の第 2 イントロン内に lox71 と lox2272 で挟んだネオマイシン耐性遺伝子とチミジンキナーゼ遺伝子を入れたターゲティングベクター(lox71-NEO+TK-lox2272)を作製し、エレクトロポレーションにより ES 細胞に導入した。その後、G418 存在下でセクションを行い、薬剤耐性を持つ 114 個のクローンを選択・単離した。このクローンから DNA を抽出し、サザンブロッティングによりターゲティングベクターが正確に組み込まれたクローンの検出をおこなった(図.19)。ゲノムを EcoRV 制限酵素で消化すると野生型で 14kb の消化産物が、組換え体では 10kb の消化産物が検出される。サザンブロッティングの結果、20 クローンの相同組換え体が得られた。次に、この lox71-NEO+TK-lox2272 をもつ相同組換え体 ES 細胞クローンに Cre 酵素の発現ベクターと lox66 と lox2272 で挟まれた rat *Mapk1* イントロン(1kb、3kb、7kb、17kb)を法でトランスフェクションした。1kb rat *Mapk1* イントロンを導入したもので 190 個、3kb rat *Mapk1* イントロンを導入したもので 334 個、7kb rat *Mapk1* イントロンを導入したもので 166 個、17kb rat *Mapk1* イントロンを導入したもので 310 個のクローンを選択、単離した。サザンブロッティングにより rat *Mapk1* イントロンが正常に組換えられたクローンを検出した(図.20)。ゲノムを EaeI 制限酵素で消化すると野生型で 3kb の消化産物が、1kb rat *Mapk1* イントロンを持つもので 4kb、3kb rat *Mapk1* イントロンを持つもので 6kb、7kb rat *Mapk1* イントロンを持つもので 10kb、17kb rat *Mapk1* イントロンを持つもので 20kb の消化産物が得られた。サザンブロッティングの結果、1kb rat *Mapk1* イントロンを持つクローンを 5 クローン、3kb rat *Mapk1* イントロンを持つクローンを 22 クローン、7kb rat *Mapk1* イントロンを持つクローンを 6 クローン、17kb rat *Mapk1* イントロンを持つクローンを 13 クローン得ることができた。

### rat *Mapk1* イントロンノックインマウスの作製

rat *Mapk1* イントロンが挿入されたノックインアリを持つ ES 細胞を用いてキメラマウスの作成を行った。それぞれの ES 細胞を ICR の胚盤胞にインジェクションし、代理母に移植することでキメラマウスを作製した。キメラマウスにおける黒毛の割合を挿入 ES 細胞由来の細胞の割合(キメラ率)と考え、キメラ率の高い雄キメラマウスと雌の ICR マウスを掛け合わせることでノックインアリをヘテロに持つマウス(*Hes7*<sup>1k/+</sup>、*Hes7*<sup>3k/+</sup>、*Hes7*<sup>7k/+</sup>、*Hes7*<sup>17k/+</sup>)をそれぞれ作製

した。しかし *Hes7*<sup>17k/+</sup>以外のマウスについては作製することができなかった(図.21)。17k rat *Mapk1* イントロンノックインマウスについてはヘテロマウス同士を掛け合わせることでノックインアレルをホモに持つマウス(*Hes7*<sup>17k/17k</sup>)を作製した(図.22)。

### **rat *Mapk1* イントロンノックインマウスは *Hes7* ノックアウトに似た表現型を示す**

rat *Mapk1* イントロンノックインマウスでは human *Dystrophin* イントロンノックインマウス同様に *Hes7* の転写時間が延長されることによって体節形成周期が延長され、体節の等間隔パターンを維持したまま体節数の減少、脊椎骨の減少が観察されると予想される。*Hes7*<sup>17k/17k</sup> を観察したところ *Hes7*<sup>-/-</sup> に似た、体軸や尾の長さが減少するという予想とは異なる表現型が観察された。

### **rat *Mapk1* イントロンノックインマウスは椎骨や肋骨に異常を示す**

rat *Mapk1* イントロンノックインマウスにおいて *Hes7*<sup>-/-</sup> に似た表現が現れた。この表現型を詳しく調べるために骨格染色により生後 0 日齢の野生型マウスとノックインマウスの比較を行った(図.23)。その結果、*Hes7*<sup>17k/17k</sup> では *Hes7*<sup>-/-</sup> の表現型と似た椎骨や肋骨の癒合などの表現型が得られた。

### **rat *Mapk1* イントロンノックインマウスは体節形成に異常を示す**

*Hes7*<sup>17k/17k</sup> で椎骨、肋骨に異常が確認されたため、それらのもととなる体節を胎生 10.5 日齢の *Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚を用いて、*in situ* ハイブリダイゼーションにより検出を行った。その結果、*Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚において *Hes7*<sup>-/-</sup> 胚でみられる様な体節の癒合が観察された(図.24)。よって *Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚では適切な体節形成が行われず、その結果、椎骨、肋骨の異常が生じていることが示された。

### ***Hes7*<sup>17k/17k</sup> マウス胚では *Hes7* タンパク質の量が減少している**

*Hes7*<sup>17k/17k</sup> では、時間遅れの延長により体節形成周期が延長し、体節数の減少、体節の大きさが増加するなどの表現型が現れると予測されていた。しかし *Hes7*<sup>17k/17k</sup> は体節形成に異常を示した。この表現型は *Hes7*<sup>-/-</sup> と似ていたことから、

私は *Hes7*<sup>17k/17k</sup> においても *Hes7* の遺伝子発現の振動が消失しているのではないかと考えた。そこで、胎生 8 日齢の *Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚を用いて *Hes7* の mRNA、タンパク質、そして *Hes7* の標的遺伝子である *Lfng* の mRNA の発現パターンを調べた(図.25)。

*Hes7* のコーディング領域を基に作成したプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、*Hes7* の mRNA を検出した。野生型胚では既に報告されているような波状の発現パターンが観察され、個体ごとに異なったパターンが観察されたが、*Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚では波状のパターンが観察されず、未分節中胚葉中に均一に広がるように発現していることがわかった(図.25A,B)。この結果は、*Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚では *Hes7* mRNA の発現振動が消失していることを示唆している。

次に *Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚で *Hes7* の発現振動が消失している原因として *Hes7* タンパク質の量が減少している可能性が考えられたため、免疫染色により *Hes7* タンパク質を調べた。*Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚において *Hes7* タンパク質の量が低下していた(図.25C,D)。これらの結果は、*Hes7*<sup>17k</sup> アリル由来の *Hes7* タンパク質の合成が減少していることを示唆している。

*Hes7* タンパク質の量が減少していたので、*Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚において *Hes7* タンパク質の標的である *Lfng* の発現が上昇している可能性が示唆された。*Lfng* のコーディング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、*Lfng* mRNA を検出した。*Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚では未分節中胚葉全体に *Lfng* mRNA が発現していた(図.25E,F)。この結果から、*Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚では *Hes7* タンパク質の量が減少したことで、標的遺伝子の転写活性が上昇していることが示唆された。

***Hes7*<sup>17k/17k</sup> マウス胚ではスプライシング異常が生じている。**

*Hes7*<sup>17k/17k</sup> では *Hes7* の発現振動の減衰や、mRNA、タンパク質が減少しており、その結果、*Hes7*<sup>-/-</sup> 様の表現型が現れている可能性が示唆された。*Hes7*<sup>17k</sup> アリルでは rat *Mapk1* イントロンが *Hes7* の第 2 イントロンに挿入されていることから、この挿入イントロンが *Hes7* タンパク質の量の減少の原因になっている可能性が考えられるので、この挿入されたイントロンが適切にスプライシングされているか否かを調べた。胎生 10.5 日齢の野生型胚もしくは *Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚の未分節中胚葉から RNA を抽出し、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) を行った。私はフォワードプライマーとして第 1 エクソンにプライマー設計し(17k\_F1)、リバープライマーとして 3'UTR にプライマーを設計した(17k\_R1)(図.26A)。17k\_F1 と 17k\_R1 のコンビネーションでは、*Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚に



において正常な PCR 産物と短い PCR 産物が検出された(図.26B)。この短い PCR 産物は第 3 エクソンが欠損していた。つまり、正常な mRNA と共に第 3 エクソンが欠損した異常な mRNA が産生されていることが示唆された。

***Hes7*<sup>17k</sup> アリル由来の異常な *Hes7* タンパク質は機能を持たない。**

*Hes7*<sup>17k/17k</sup> では第 3 エクソンが欠損した異常な *Hes7* mRNA ができていることが示唆された。この mRNA は第 4 エクソンでフレームシフトをおこなっているため、この mRNA から翻訳された異常な *Hes7* タンパク質は premature にストップコドンがあり、第 4 エクソン部位のほとんどを欠いている。この異常な *Hes7* タンパク質が活性を持つか否かをルシフェラーゼアッセイで検証した。異常な PGL4.12 ベクターに N-box を 6 個タンデムに繋げたアクチンプロモーターを挿入したプラスミド(Nx6 promoter)と正常な *Hes7* を発現するプラスミド(*nHes7*)、第 3 エクソンが欠損している異常な *Hes7* を発現するプラスミド( $\Delta 3Hes7$ )を NIH3T3 細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。*Hes7* タンパク質はホモダイマーを作り、標的遺伝子のプロモーター上にある N-box を認識し転写を抑制する。したがって、異常な *Hes7* タンパク質が機能性を持っていた場合ルシフェラーゼ活性が低下する。

*nHes7* を遺伝子導入した場合、ルシフェラーゼ活性が濃度依存的に減少していた。しかし  $\Delta 3Hes7$  を導入した場合、ルシフェラーゼ活性の低下が見られなかった。加えて、*nHes7* と  $\Delta 3Hes7$  を同時に遺伝子導入した場合、ルシフェラーゼ活性は *nHes7* のみを遺伝子導入したときと変わらなかったことから、第 3 エクソンが欠損した *Hes7* タンパク質は正常な *Hes7* タンパク質に影響を与えないことを示唆した(図.27)。

## [考察]

本研究では2種類の *Hes7* 遺伝子を改変したノックインマウスの作製を行った。まず初めに *Hes7* のストップコドンの直後に human *Dystrophin* イントロンを挿入したノックインマウスを作製した。このノックインマウスでは *Hes7* 3'UTR が human *Dystrophin* イントロンに置き換わっており、この3'UTR の変化が *Hes7* タンパク質の量を大幅に減少させ、未分節中胚葉中の発現振動の消失を誘導し、その結果、体節形成が周期的に形成されなくなった。したがって、*Hes7* 3'UTR は適切な量の *Hes7* タンパク質の蓄積に必須であり、それを通してマウスの分節時計が正常に働くため必要であることを示した。

また、*Hes7* の第2イントロン内に rat *Mapk1* イントロン由来の配列を挿入したノックインマウスでは、変異アレルの転写産物の一部は正常な mRNA にプロセシングされ、一部はスプライシング異常を起こして第3エクソンが欠損した mRNA になっていた。その結果、*Hes7* タンパク質の量が減少し、*Hes7* ノックアウトマウスに似た体軸骨格の形成異常を示した。したがって rat *Mapk1* イントロンノックインマウスでも何らかの異常が起こったと考えている。しかしこの変異アレルは正常な mRNA を作っており、またスプライシング異常を起こした転写産物から得られる異常 *Hes7* タンパク質は正常な *Hes7* タンパク質の機能を阻害することはなかったため、*Hes7* の転写に要する時間を延長はおこっており、*in vivo* で狙い通りのパラメーター変化を引き起こすことが出来ている可能性も捨てきれない。その場合には「時間遅れ」を大きくしたことによって遺伝子発現の振動が消失した可能性を検討する必要がある。すなわち、数理モデルの予測が誤っており、分子モデルを修正する必要があることも視野に入れる必要がある。

### スプライシングに異常が生じた原因

本研究では、*Hes7* のイントロンのサイズを外部からイントロンを挿入することで mRNA の転写時間を延長させようと考えた。RNA polymerase II の転写速度を 1.1~4.8kb/min に設定した場合(Darzacq et al., 2007; Femino et al., 1998; Hanisch et al., 2013; O'Brien & Lis, 1993; Swinburne & Silver, 2008; Tennyson et al., 1995)、10kb のイントロンの挿入により時間遅れが 2.1~9 分の範囲で増加すると考えられる。この結果を私の作製したモデルに適応した場合、*Hes7* 遺伝子の振動周期が 4~18 分の範囲で増加すると予想された。加えて、私は 5kb、17kb、20kb のイ

ントロンを挿入したノックインマウスも作製しており、このマウスはそれぞれ 2.4~9 分、8.2~31 分、8.4~36 分の範囲で振動周期が延長されると考えた。振動周期が伸びれば、体節、椎骨の数が減少し、体節や椎骨のサイズが大きくなると予想した。しかし、予想とは反してこれらのノックインマウスは体長の減少や椎骨、肋骨の形成異常、体節の不完全な分節化や大きさの不均一性など、*Hes7*<sup>-/-</sup>マウスに類似した表現型を示した。これは、**human *Dystrophin*** イントロンノックインマウス、**rat *Mapk1*** イントロンノックインマウスの両方でスプライシングに異常が生じており、その結果、**Hes7** タンパク質の量が減少したためであると考えられた。

スプライシングに異常が生じた原因として、マウス由来ではない遺伝子のイントロンを挿入していることがあげられた。しかし **Stauber** らのグループが作製した *Lfng* の第 1 イントロン内に **human *Dystrophin*** イントロンを挿入したノックインマウスでは挿入イントロンが正常にスプライシングされていることから、使用したイントロンの種の違いがスプライシングの異常の原因となっている可能性は低いと考えられる (**Stauber et al.**, 2012)。

また別の可能性としてイントロンを挿入する位置がスプライシングの異常の原因となっている可能性が考えられる。私は *Hes7* のストップコドンの直後に **human *Dystrophin*** イントロンを挿入したノックインマウスを作製したが、このノックインマウスではスプライシングの異常が生じていた。また、*Hes7* の第 2 イントロン内に **rat *Mapk1*** イントロンを挿入したノックインマウスでは、一部の転写産物からは正常な *Hes7* mRNA が産生されているものの、スプライシングの異常により第 3 エクソンが抜けた異常な mRNA も産生されていた。更に **Stauber** らのグループが、*Hes7* の第 3 イントロン内に **human *Dystrophin*** イントロンを挿入したノックインマウスを作製しているが、このノックインマウスにおいてもスプライシングの異常が生じており、第 3 エクソンが抜けた異常な mRNA が生じていた (**Stauber et al.**, 2012)。これらの結果から、本来イントロンの存在しない領域や *Hes7* の第 3 エクソン付近へのイントロンの挿入はスプライシング異常を誘導しやすい可能性が考えられる。また、イントロンの挿入部位を変更することでスプライシングが正常に行われる可能性も考えられる。

### **human *Dystrophin* イントロンノックインマウスにおける時間遅れの延長**

**human *Dystrophin*** イントロンノックインマウスではスプライシングの異常により挿入イントロンの 2.4kb 下流に存在するポリ A 付加シグナル(AATAAA)と同

様の配列の後ろでポリ A 鎖が付加されており、もう一方はストップコドンから 3.3kb 下流に存在するポリ A 付加シグナルと同様の配列の後ろでポリ A 鎖が付加されていた。*Hes7* の 3'UTR は 250bp であることから、このノックインマウスでは 3'UTR の変化と共に *Hes7* の長さが 2kb から 3kb ほど延長していると考えられる。転写時間を 1.1~4.8kb/min と考えた場合、転写時間は約 20 秒~2 分延長されると考えられた。しかし human *Dystrophin* イントロンノックインマウスでは体節形成に異常が生じており、体節数の測定が難しいために時間遅れの延長による影響を調べることができていない。また、数理モデルが間違っており、時間遅れの延長が体節形成の異常の原因になっている可能性も考えられるが、3'UTR の置換等、他の体節形成異常を誘導する原因になりうるものが存在していることから、この可能性についても確かめることができていない。これらの結果を確かめるためには、本来の *Hes7* の 3'UTR の一部を欠損させたマウスの作製、*Hes7* 3'UTR と同じ大きさの別の 3'UTR に置き換えたマウスの作製などを行う必要が考えられる。

### rat *Mapk1* イントロンノックインマウスにおける時間遅れの延長

rat *Mapk1* イントロンノックインマウスでは 17kb の rat *Mapk1* イントロンを *Hes7* の第 2 イントロン内に挿入することで転写時間を延長させようとした。その結果、このノックインマウスでは正常な mRNA と第 3 エクソンが欠損した異常な mRNA が産生された。*Hes7*<sup>17k</sup> アリルから正常な mRNA ができていることから転写時間の延長に成功した mRNA が産生されていると考えられる。しかしながら、数理モデルによる予測とは異なり、*Hes7* ノックアウトマウスによく似た体節形成の異常、体軸骨格の大きな異常、*Hes7* のタンパク質の量の減少、遺伝子発現振動の消失が観察されている。これは、異常なタンパク質がドミナントネガティブに働いている可能性、正常な mRNA 量が大幅に低下している可能性、数理モデルが間違っており転写時間の延長が振動の減衰を誘導している可能性が考えられる。異常なタンパク質がドミナントネガティブに働く可能性は、第 3 エクソンが欠損した場合、フレームシフトが生じることから *Hes7* タンパク質としての正常な機能を所持していないと考えられることや、*Hes7* の第 3 エクソン部分はホモダイマーの形成に必要な Helix-Loop-Helix 部分にあたることから低いと考えられる。実際に、ルシフェラーゼアッセイを使った実験でも第 3 エクソンが欠損した *Hes7* タンパク質は *Hes7* としての機能を持たず、ドミナントネガティブにも働かないことを示唆している(図.27)。正常な mRNA 量が大幅

に低下している可能性、数理モデルが間違っており転写時間の延長が振動の減衰を誘導している可能性については、本研究では明らかにすることができないために、rat *Mapk1* イントロンノックインマウスの未分節中胚葉における正常な *Hes7* mRNA、タンパク質量の定量、転写時間の測定を行う必要があると考えられる。

### ***Hes7* の時間遅れを延長させる方法**

*Hes7* の時間遅れは *Hes7* の転写が活性化されてから *Hes7* タンパク質が *Hes7* の転写を抑制するまでにかかる時間である。本研究では、*Hes7* の時間遅れを延長させるために外部からイントロンを挿入することで *Hes7* の転写の時間を延長させたノックインマウスを作製する方法を考えた。しかし、このノックインマウスではスプライシングに異常が生じており、時間遅れの延長による影響を明らかにすることができなかった。*Hes7* のフィードバックループによる時間遅れは転写だけではなくタンパク質の翻訳、修飾、mRNA やタンパク質の輸送などの時間が関与していると考えられているために、時間遅れを延長させる方法としてこれらの時間を延長させる方法が考えられる。しかし、これらの時間の改変は難しく、特定の遺伝子の時間遅れを改変する方法として現実的ではない。よって、失敗しているものの、*Hes7* の転写時間を延長させる方法は振動周期を増加させる方法として最も良い方法であると考えられる。

### ***Hes7* の遺伝子発現振動における時間遅れについて**

本研究では、マウス個体で分節時計の中心をなす *Hes7* 遺伝子に改変を加えることにより、分節化周期を延長させることを試み、それによって分節時計の周期決定メカニズムの解明を目指したが、スプライシングの異常により明らかにすることができなかった。しかし、Takashima らのグループは *Hes7* のイントロンを除去することで時間遅れを短くすることを試みていた (Takashima et al., 2011)。*Hes7* のイントロンを除去したマウスを解析したところ、遺伝子の振動が消失しており、体節形成に大きく影響していたことから、彼らはスプライシングに要する時間が短縮されたために「時間遅れ」が小さくなり、その結果振動が消失したと考えている。また、同じグループが *Hes7* の 3 つあるイントロンのすべてを取り除くのではなく、1 つまたは 2 つのイントロンを取り除く実験をおこなった。このマウスでは、すべてのイントロンを取り除いたマウスよりも「時

間遅れ」の短縮が小さくなり、その結果、振動の消失が遅れて、胚の前側では体節形成が正常に起こっていることが示されている。正常な前側の体節の形成周期が短くなっていたことから、「時間遅れ」軽度な短縮は周期を短くし、大きな短縮は振動を消失させると結論づけている(Harima et al., 2012)。しかし、スプライシングによる時間遅れの短縮が振動を消失させたのではなく、スプライシングやイントロンそのものが遺伝子発現の振動に必須である可能性もわずかながら残っている。

### human *Dystrophin* イントロンノックインマウスにおける mRNA の減少の原因

human *Dystrophin* イントロンノックインマウスにおいて *Hes7* の mRNA 量が減少していることが *in situ* ハイブリダイゼーションやリアルタイム PCR の結果から示唆されている。この原因として Nonsense-mediated mRNA decay(NMD)が考えられた。NMD は異常な mRNA を選択的に除去するメカニズムとしてよく知られている(Brogna & Wen, 2009)。NMD はストップコドンの下流に位置するイントロンを認識し、それによって転写産物を速やかに分解している。しかし、ストップコドンとイントロン間の距離が 50–55bp 以下である場合には、その転写産物は NMD を免れることが知られている (Nagy & Maquat, 1998)。私が作製したノックインマウスはストップコドンの後ろ 45bp の位置にイントロンを挿入するようにデザインされているので NMD を受けないと考えられる。したがって、NMD は *Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚における *Hes7* mRNA の減少の原因ではないと考えられる。

その他の可能性として 3'UTR の変化による mRNA の安定性の変化が原因として考えられる。*Hes7* と *Lfng* 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ているにも関わらずそれらの mRNA の発現パターンが異なっており、これはそれらの 3'UTR を介した mRNA の安定性が原因となって生まれていることがわかっている(Nitanda et al., 2014)。この論文により *Hes7* mRNA が *Lfng* mRNA に比べ安定であることや本研究で行ったルシフェラーゼアッセイの結果から(図.28)、*Hes7* 3'UTR の変化によって mRNA が不安定化した可能性は大いにありうる。しかし、human *Dystrophin* イントロンノックインマウスにおける *Hes7* mRNA の安定性については本研究では明らかにできていないために確認を行う必要がある。

## human *Dystrophin* イントロンノックインマウスにおける *Hes7* タンパク質の減少の原因

human *Dystrophin* イントロンノックインマウスでは、スプライシングの異常により、挿入したイントロンが残存することで *Hes7* 3'UTR が挿入した human *Dystrophin* イントロンに置き換わっていた。また *Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚の未分節中胚葉では *Hes7* タンパク質の量が減少しており、これがノックインマウスの表現型の原因となっていると考えられた。したがって、*Hes7* 3'UTR が *Hes7* タンパク質の量の維持に重要な役割をもっていると考えた。human *Dystrophin* イントロンノックインマウスにおいて *Hes7* タンパク質量が減少している原因として mRNA 量の低下が考えられる。実際にリアルタイム PCR の結果から mRNA 量が低下していることがわかっており、原因の一つであることが示唆される。しかし減少率は約 30% であり、このような軽度な mRNA の現象では、タンパク質の劇的な現象をとうてい説明することはできない。次に *Hes7* タンパク質の安定性が変化している可能性が考察する。このノックインマウスはストップコドンの直後にイントロンを挿入しており、*Hes7* の翻訳領域に変化がないために *Hes7* タンパク質の構造には影響しないと考えられる。したがって *Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚における *Hes7* の安定性が変化している可能性は低い。次に *Hes7* の翻訳効率が低下している可能性が考えられる。近年 miRNA や RNA 結合タンパク質など、3'UTR を介した翻訳調節が多く存在していることがあきらかになっており (Lee et al., 1993; Chen & Shyu, 1995; Chkheidze et al., 1999)、*Hes7* の 3'UTR 変化に伴い *Hes7* mRNA の翻訳が減少している可能性が高いと考えられた。しかし、本研究では翻訳効率については明らかにできていない。最後に 3'UTR が変化したことにより mRNA の核外への輸送が阻害されている可能性が考えられる。十分に考えられるが、この可能性についても本研究では明らかにできていない。

## rat *Mapk1* イントロンノックインマウスにおいて *Hes7* mRNA とタンパク質の振動が減衰した原因

rat *Mapk1* イントロンノックインマウスでは、正常な mRNA とスプライシングの異常による第 3 エクソンが欠損した異常な mRNA が産生された。そして *Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚の未分節中胚葉では *Hes7* mRNA とタンパク質の振動が減衰している様子が観察された。数理モデルによると *Hes7* タンパク質が安定化、もしくはタンパク質の量が減少した場合、*Hes7* の減衰が生じることが示唆されている。

*Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚では、免疫染色の結果から *Hes7* タンパク質が大幅に減少していることが示唆されており、タンパク質の減少が *Hes7* の減衰の原因となっている可能性が高い。タンパク質が減少した原因の一つとして NMD による mRNA の分解が関わっている可能性が挙げられる。*Hes7*<sup>17k</sup> アリル由来の転写産物ではスプライシングの異常が生じていることから、NMD による mRNA の分解が生じる可能性が考えられる。この結果を確かめるために mRNA 量の定量、NMD の検出を行う必要がある。また、タンパク質の減少が生じた別の原因として異常な *Hes7* タンパク質が生じていることが挙げられる。*Hes7*<sup>17k</sup> アリル由来の *Hes7* ではスプライシングの異常により第 3 エクソンが欠損した異常な mRNA が生じることが分かっている。*Hes7* の第 3 エクソンが欠損した場合、*Hes7* タンパク質としての機能を持たないことが示されていることから異常なタンパク質ができることでその分、正常なタンパク質が減少している可能性が考えられる。

一方で *Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚では正常な mRNA も同時に産生されていることから「時間遅れが延長された *Hes7* タンパク質」もできていると考えられる。現在使用している数理モデルでは、正常なタンパク質が減少した場合、体節形成初期においては *Hes7* の発現が振動していることが示唆されている。しかし *Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚では体節形成初期においても *Hes7* の発現の振動は消失していることが確認された(図.25)。このことから、数理モデルの予測とは異なり、時間遅れの延長により *Hes7* の発現振動に影響を与えている可能性が考えられる。



## [結論]

生物は様々な時間制御を受けて生活を行っている。発生段階においては決められた時間に決められた器官を作り出すことで複雑な生物の体を形成していく。また、日常の生活では 24 時間周期で変動する概日リズム、約 1 年周期で変動する概年リズム等、生物における多くの現象が時間的制御を受けていると考えられており、この時間的制御機構を理解することは生物の様々な営みを理解するうえでも重要である。これらの時間的制御は時計遺伝子と呼ばれる時間を計る役割を持つ遺伝子の働きにより作られていると考えられている。この時間的制御の一例として脊椎動物の体節の形成が挙げられる。体節形成は胚尾部の未分節中胚葉が周期的に括れ切れることで形成されることがわかっており、*Hes7* の遺伝子の発現振動が分節化を制御する分節時計として機能すると考えられている。本研究では、この分節時計における時間的制御機構を明らかにすることを目的とし、遺伝子発現振動に 3'UTR による制御が必要であることを明らかにした。

これまでに抑制性転写因子 *Hes7* のネガティブフィードバックループが作り出す遺伝子振動が体節形成における時間制御の中心的な役割を果たすことが知られており、振動周期は *Hes7* の転写が活性化されてから *Hes7* タンパク質が *Hes7* の転写を抑制するまでにかかる時間である「時間遅れ」に依存することが、数理モデルにより予測されていたものの不明な点が多く残っていた。本研究では、*Hes7* 遺伝子に外部からイントロンを加えることにより、分節化周期を延長させたノックインマウスを 2 種類作製し、その解析によって分節時計の周期決定メカニズムを明らかにすることを目指し研究を行っていた。

*Hes7* の第 2 イントロン内に rat *Mapk1* イントロンを挿入したノックインマウスでは、正常な mRNA と共に第 3 エクソンが欠損した mRNA を作成していた。その結果、*Hes7* mRNA の減衰が生じ、正常な *Hes7* タンパク質の大幅な発現低下が起こり、*Hes7* ノックアウトマウスに似た椎骨、肋骨の癒合などの表現型が現れた。少ないながらも「時間遅れが延長された *Hes7* タンパク質」ができていながらも関わらず体節形成初期においても体節形成に異常が生じていることから、時間遅れの延長が体節形成に影響を及ぼしている可能性を残しているものの、この rat *Mapk1* イントロンノックインマウスの解析では時間遅れの延長による影響を明らかにすることができなかった。

*Hes7* のストップコドンの直後に human *Dystrophin* イントロンを挿入したノックインマウスでは、スプライシングの異常により 3'UTR が human *Dystrophin* イ

ントロンに置き換わってしまっていることがわかった。この 3'UTR の変化が *Hes7* mRNA を不安定化させ、*Hes7* タンパク質の量を減少させることで、タンパク質が正常に蓄積されず未分節中胚葉中の *Hes7* の発現振動の減衰を誘導し、その結果、体節形成の異常を誘導することがわかった。過去の報告では、*Hes7* タンパク質が過剰に蓄積された場合、広範囲にわたり転写が抑制されるために発現振動が減衰すると考えられていることから *Hes7* 3'UTR が正常な *Hes7* のタンパク質の蓄積に必要であり、*Hes7* の発現振動を維持することに必要であることを示した。これは *Hes7* mRNA の安定性が 3'UTR を介して厳密に制御されていることを示唆している(図.29)。

本研究によって、*Hes7* の 3'UTR が正常な *Hes7* の mRNA の分布やタンパク質の蓄積に必要であり、遺伝子発現振動を維持することに必要であることを明らかにした。*Hes7* のネガティブフィードバックループが遺伝子発現振動の中心メカニズムであることは明らかにすることが出来なかったが、生物が正確な形で規則正しく作られる過程に必須であると考えられる時間的制御機構の一部を明らかにすることができたと考えている。今後は今回明らかにすることのできなかった発現振動周期の決定を明らかにすることでより詳細な時間の制御機構を探っていきたいと考えている。

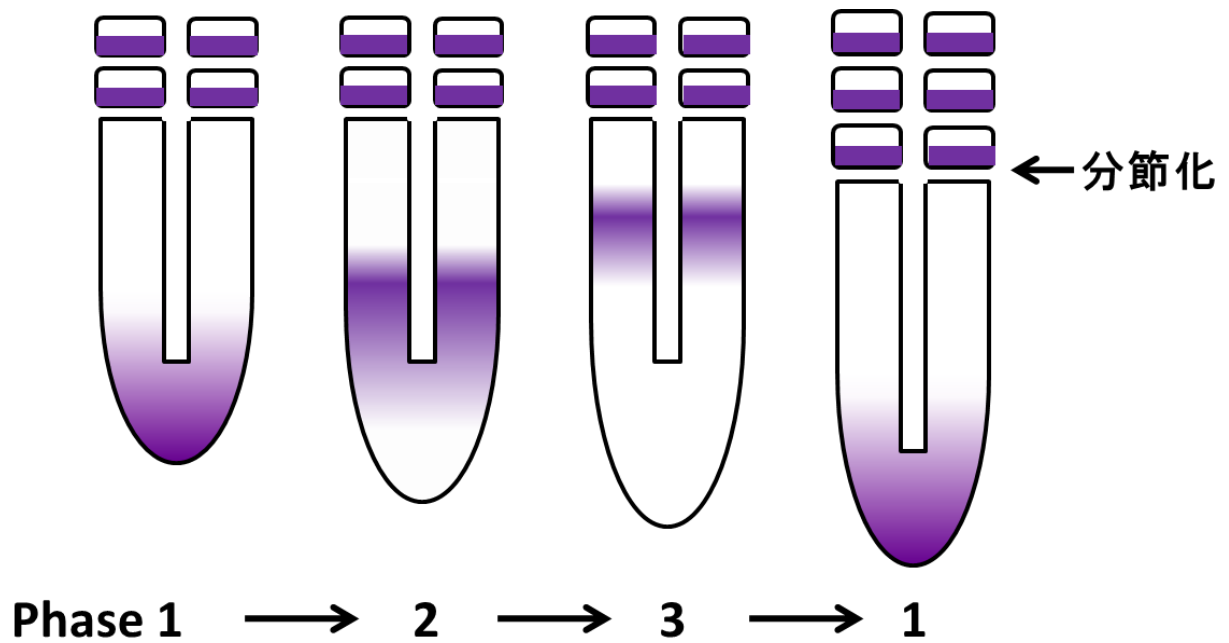


図.1 未分節中胚葉での遺伝子発現の振動モデル。

未分節中胚葉の尾側端で発現し(Phase1)、次第に未分節中胚葉の中間部の広い範囲で発現する(Phase2)。そして、未分節中胚葉の頭側一体節分離れた部位で発現が見られ(Phase3)、未分節中胚葉が分節化する。実際の未分節中胚葉では振動遺伝子の発現が Phase1 から 3 へ連続的に変化しており、波状の振動パターンを示す。そして未分節中胚葉の頭側で発現が周期的に振動することで周期的に分節化が起こり体節の繰り返し構造が作られる。未分節中胚葉ではいくつかの遺伝子の発現がこのような波状の発現パターンを示している。

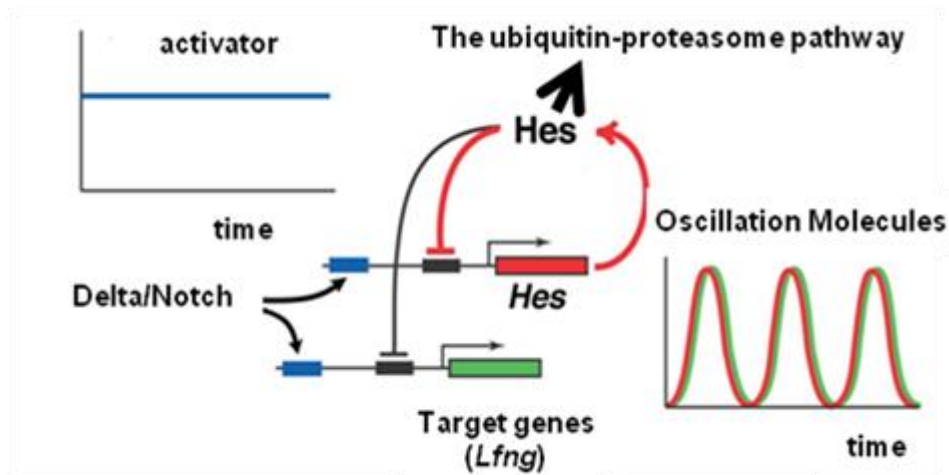


図.2 マウス未分節中胚葉における *Hes7* 遺伝子発現の振動のモデル。

*Hes7* は Notch シグナルによって転写が誘導される。*Hes7* タンパク質は自身と標的の遺伝子(*Lfng* 等)の転写を抑制する。しかし、*Hes7* タンパク質はユビキチン化によりプロテアソームで速やかに分解される為に、再び転写が誘導され、発現の振動パターンが形成される。

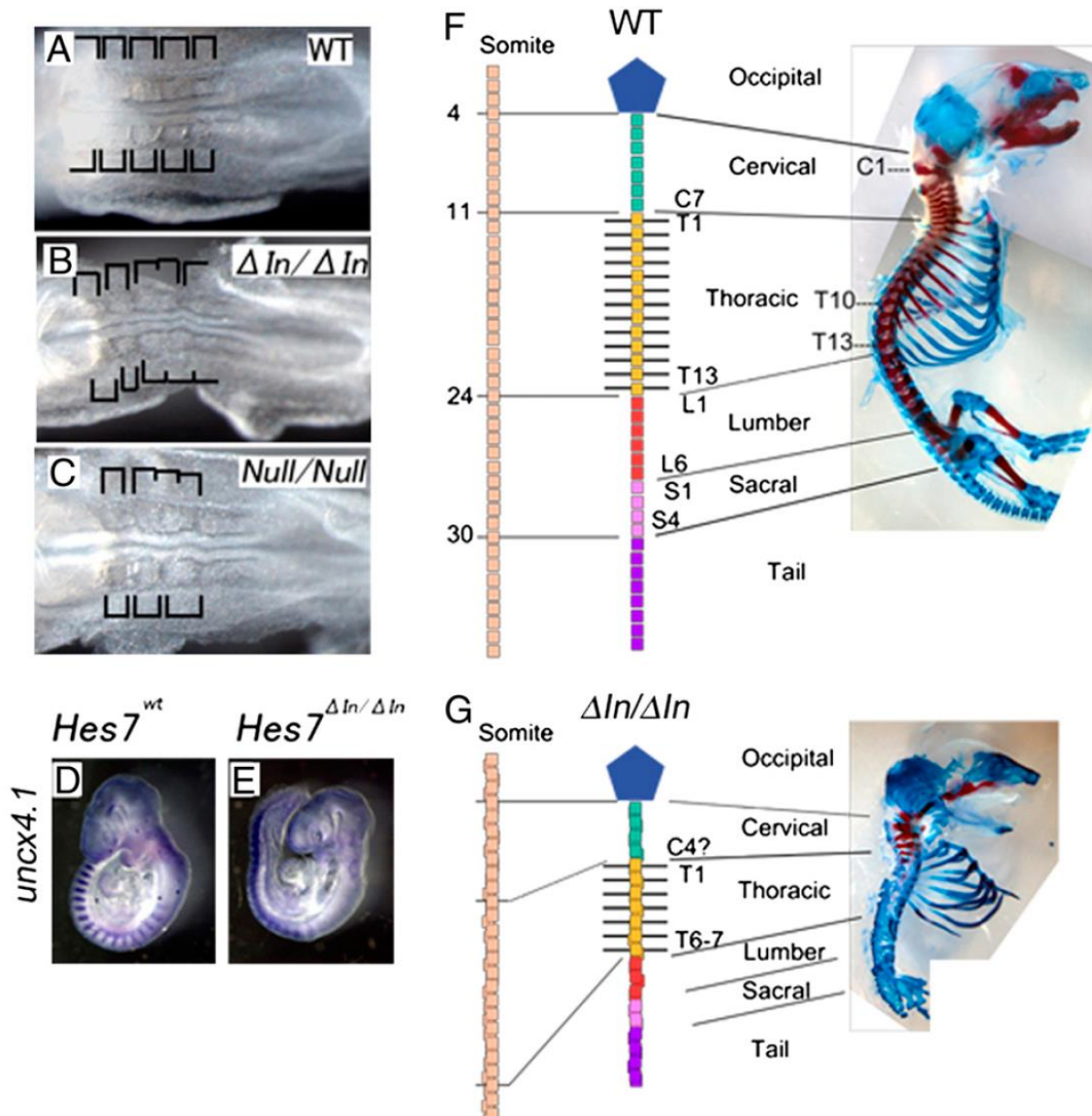


図.3 *Hes7* のイントロンを除去したマウス(*Hes7*<sup>ΔIn/ΔIn</sup>)の解析。

(A-C)胎生 8.5 日齢のマウスの体節を観察している。(A)は野生型胚、(B)は *Hes7*<sup>ΔIn/ΔIn</sup> 胚、(C)は *Hes7*<sup>-/-</sup>胚の体節を調べている。(D,E)胎生 9.5 日齢のマウスの体節を *in situ* ハイブリダイゼーションにより *Uncx4.1* を検出することで観察をしている。(D)は野生型胚、(E)は *Hes7*<sup>ΔIn/ΔIn</sup> 胚の体節を調べている。(F,G)生後 0 日目のマウスの骨格標本。硬骨(赤色)と軟骨(青色)の染色を行っている。(F)は野生型マウス、(G)は *Hes7*<sup>ΔIn/ΔIn</sup> の骨格を表している。

*Hes7*<sup>ΔIn/ΔIn</sup> では野生型に比べ *Hes7*<sup>-/-</sup> に似た体節形成の異常が生じている。その結果、椎骨や肋骨の癒合や欠損が生じていることが観察されている。(Takashima et al., 2011)

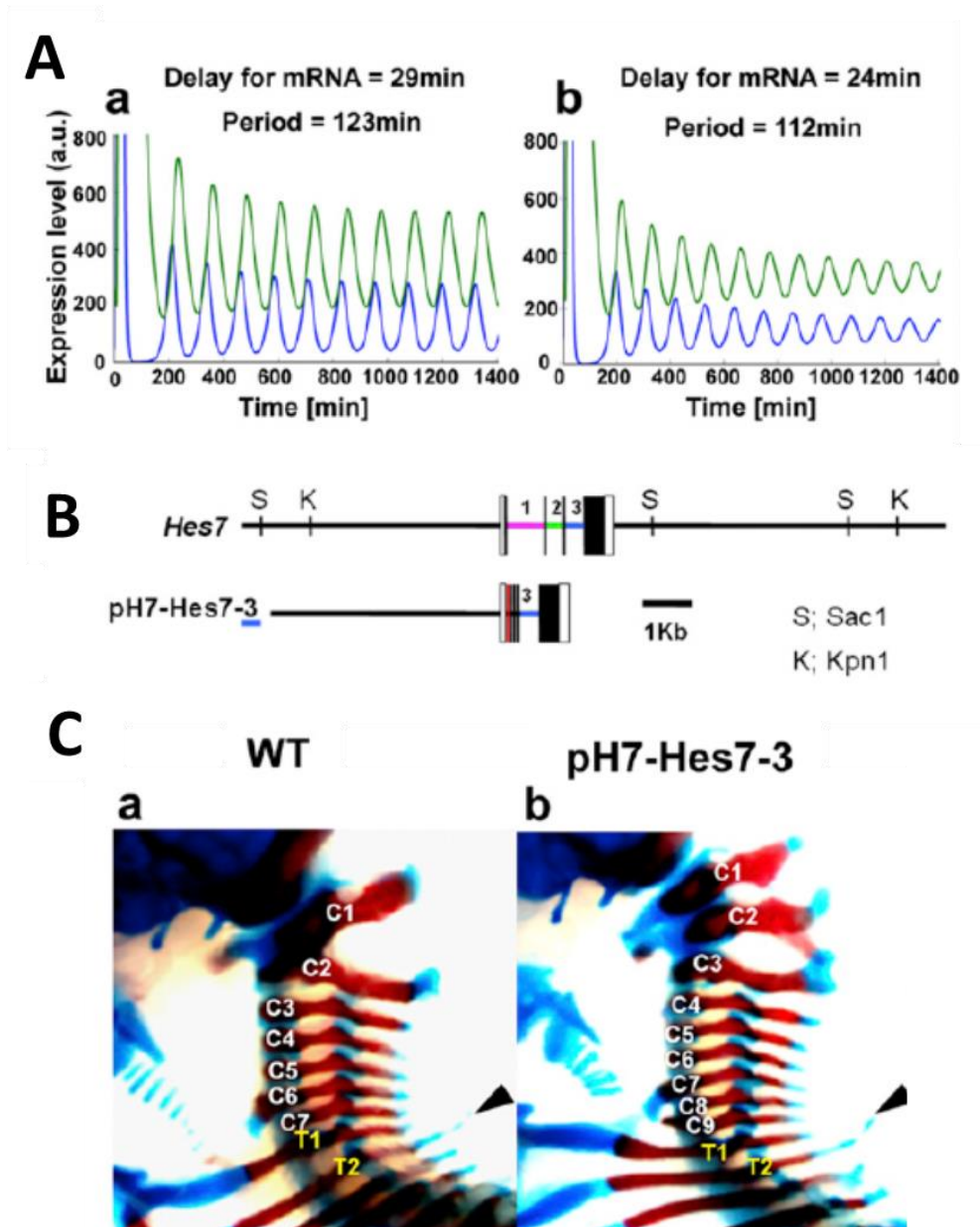


図.4 *Hes7* の第 1、2 イントロンを除去したマウス(pH7-*Hes7*-3)の解析。

(A)*Hes7* mRNA(青線)とタンパク質(緑線)の数理解析。(a)は野生型胚を示しており時間遅れを 29 分に設定している。(b)は pH7-*Hes7*-3 胚を示しており、時間遅れを 23 分に設定している。(B)野生型胚の *Hes7*(上)と pH7-*Hes7*-3 胚の *Hes7* の模式図。(C)生後 0 日目のマウスの骨格標本。硬骨(赤色)と軟骨(青色)の染色を行っている。(a)は野生型マウス、(b)は pH7-*Hes7*-3 マウスの骨格を表している。pH7-*Hes7*-3 マウスでは、振動周期が短くなったことで首の骨の数が増えている(Harima et al., 2012)。

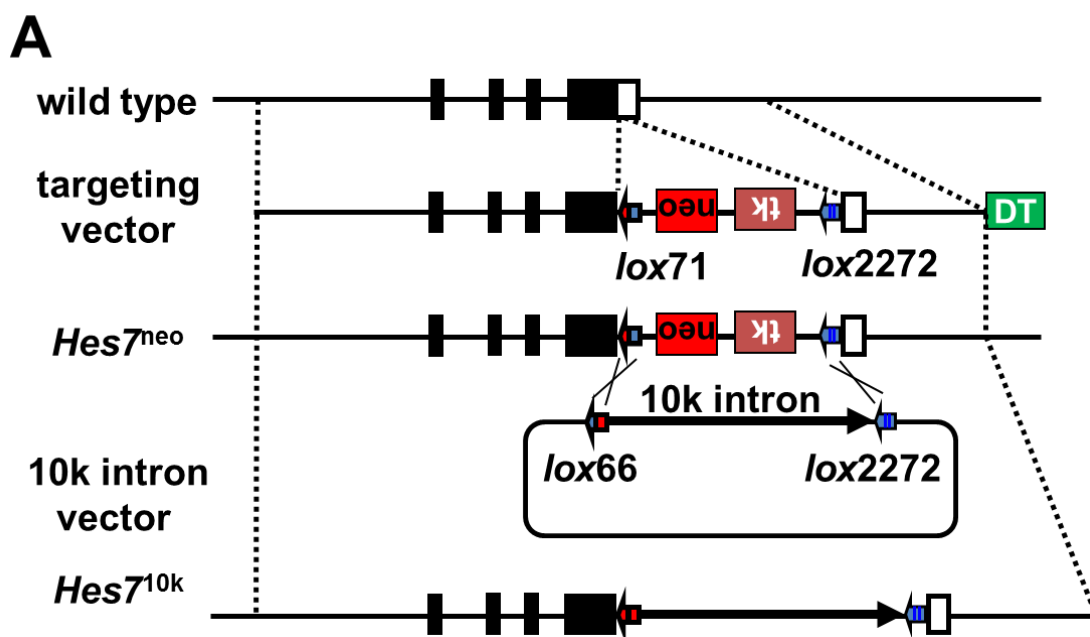


図.5 ターゲティングベクターの概略。

1 列目は野生型 *Hes7* アリルを表している。2 列目はターゲティングベクターを表している。このターゲティングベクターには *Hes7* 3'UTR 領域に *lox71*、PGK-neoPGK-TK、*lox2272* を挿入している。3 列目は組換わった後の *Hes7<sup>neo</sup>* アリルを表している。4 列目は *lox66* と *lox2272* を持つ 10kb intron ベクターを表している。5 列目は *Hes7<sup>10k</sup>* アリルを示している。黒色のボックスはエクソンを示しており、白色のボックスは 3'UTR 領域を示している。また、DT はジフテリアアトキシン配列を示している。



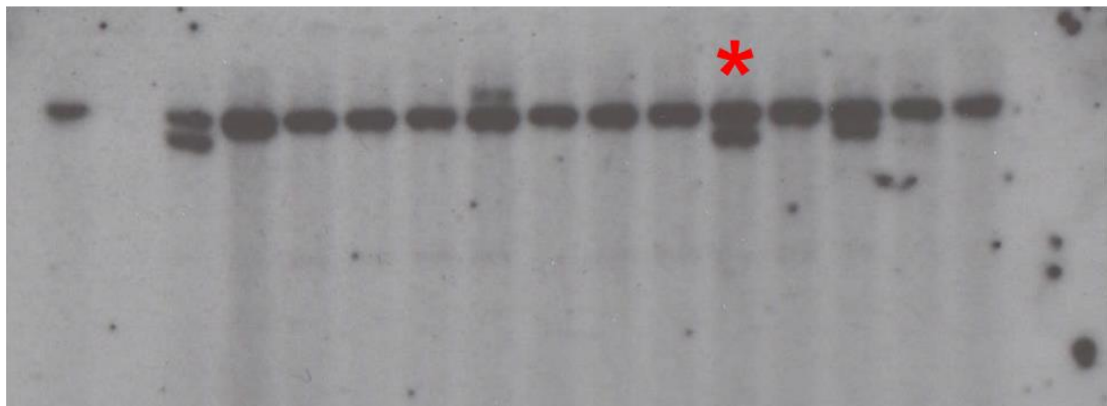
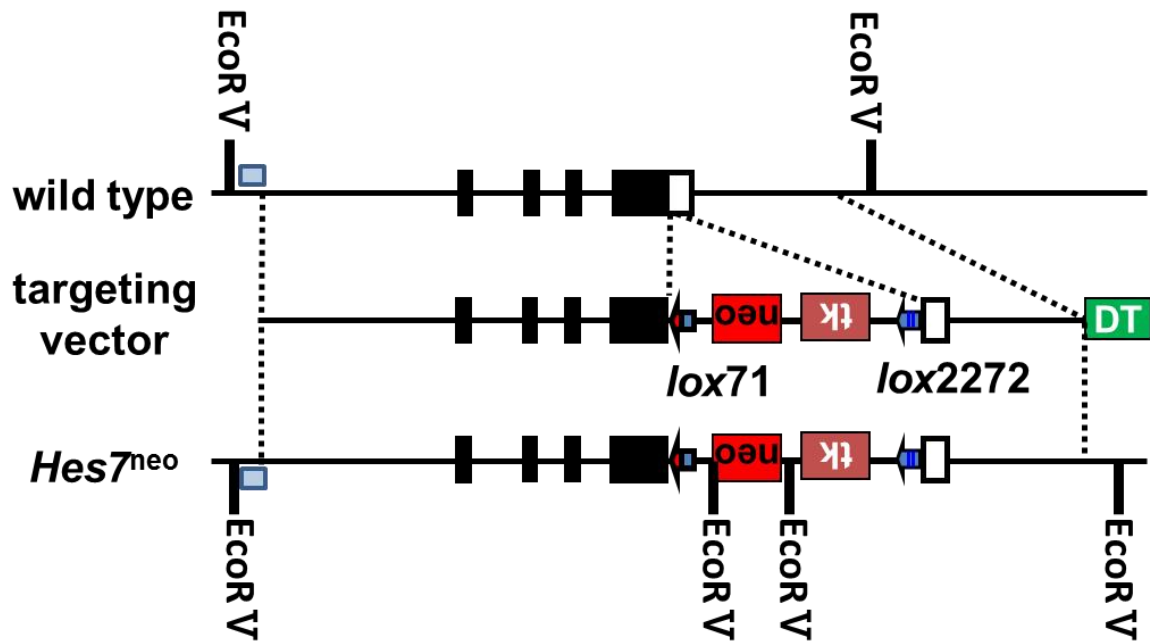


図.6  $Hes7^{neo}$  アリルを持った ES 細胞の選択。

$Hes7^{neo}$  アリルを持った ES 細胞を選択するために 5'側に作製したプローブを用いてサザンブロッティングを行った。青色のボックスは使用したプローブの位置を示している。制限酵素  $EcoRV$  を使った場合、野生型で 14kb の消化産物が、組換え体では 10kb の消化産物ができる。サザンブロッティングの結果、383 個のクローンから 13 つの相同組換え体を得られた(\*)。黒色のボックスはエクソンを示しており、白色のボックスは 3'UTR 領域を示している。また、DT はジフテリアトキシン配列を示している。



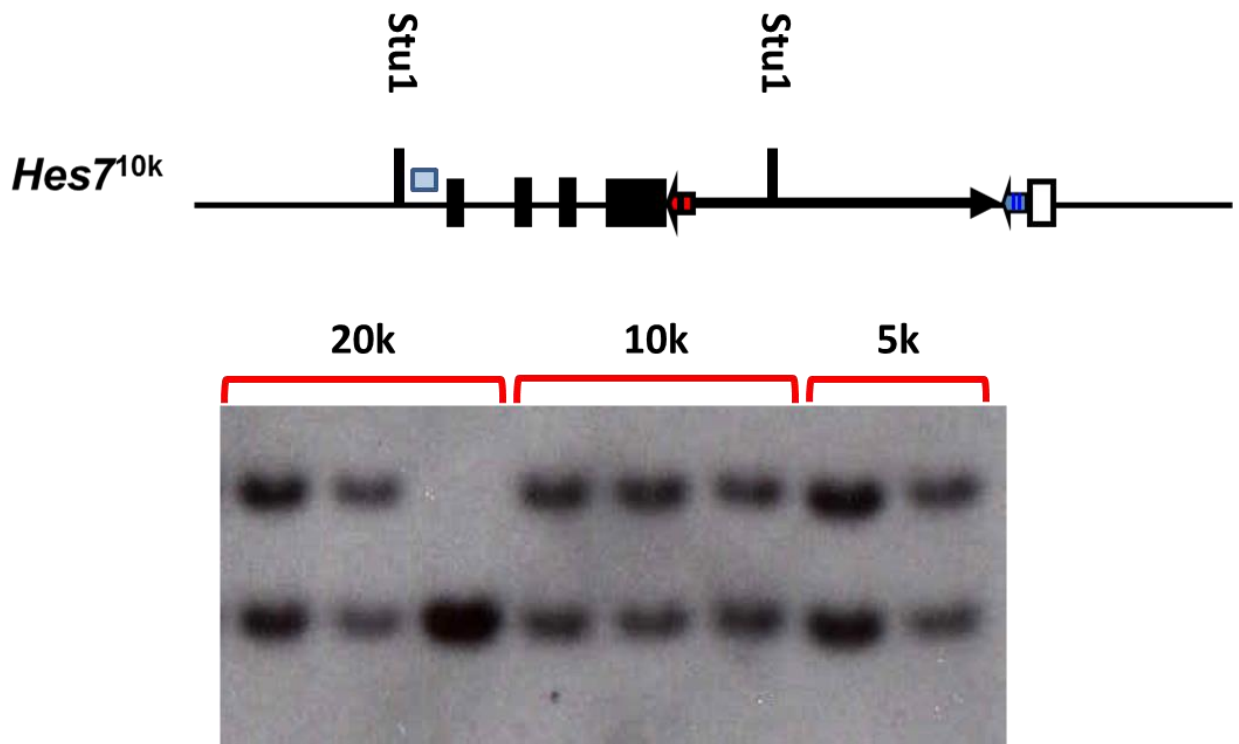


図.7 human *Dystrophin*-intron ノックインアレルを持った ES 細胞の選択。

human *Dystrophin*-intron ノックインアレルを持った ES 細胞を選択するために 5' long arm 内に作製したプローブを用いてサザンブロッティングを行った。青色のボックスは使用したプローブの位置を示している。制限酵素 *Stu1* を使った場合、野生型で 3.7kb の消化産物が、組換え体では 4.7kb の消化産物ができる。サザンブロッティングの結果、2 個のクローンから 5kb human *Dystrophin*-intron を持つものを、3 個のクローンから 10kb human *Dystrophin*-intron を持つものを、2 個のクローンから 20kb human *Dystrophin*-intron を持つものが得られた。黒色のボックスはエクソンを示しており、白色のボックスは 3'UTR 領域を示している

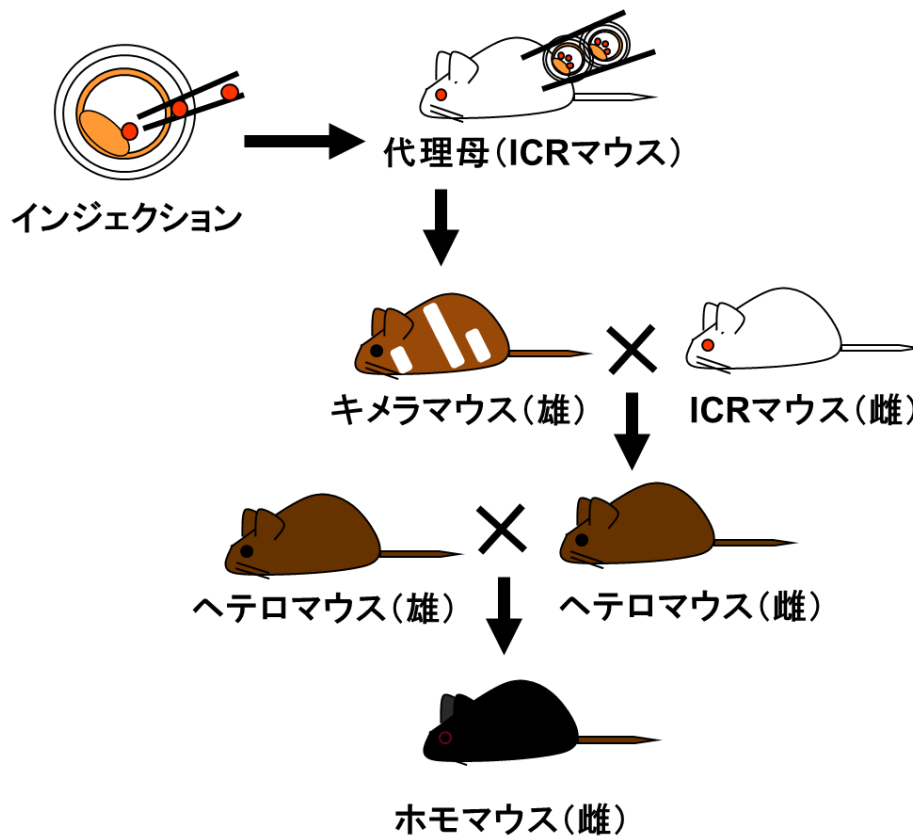


図.8 human *Dystrophin*-intron ノックインマウス作成の概要。

ノックインマウス作成の概要。human *Dystrophin*-intron アリルを持つ ES 細胞を ICR の胚盤胞にインジェクションし、代理母に移植することでキメラマウスを作製する。挿入した ES 細胞は TT2 マウスの雄由来であることから、インジェクションされた ES 細胞由来の細胞が多く、精細胞に分化していた場合、黒目黒毛を持つ雄マウスが生まれる。このキメラマウスと ICR マウスを掛け合わせヘテロマウスを作製する。ICR マウスは白毛赤目を持つマウスであり、黒目黒毛が優勢遺伝であることから挿入された ES 細胞由来の精子が使われた場合、黒目茶毛を持つマウスが生まれる。その後ヘテロマウス同士を掛け合わせることでホモマウスを作製する。

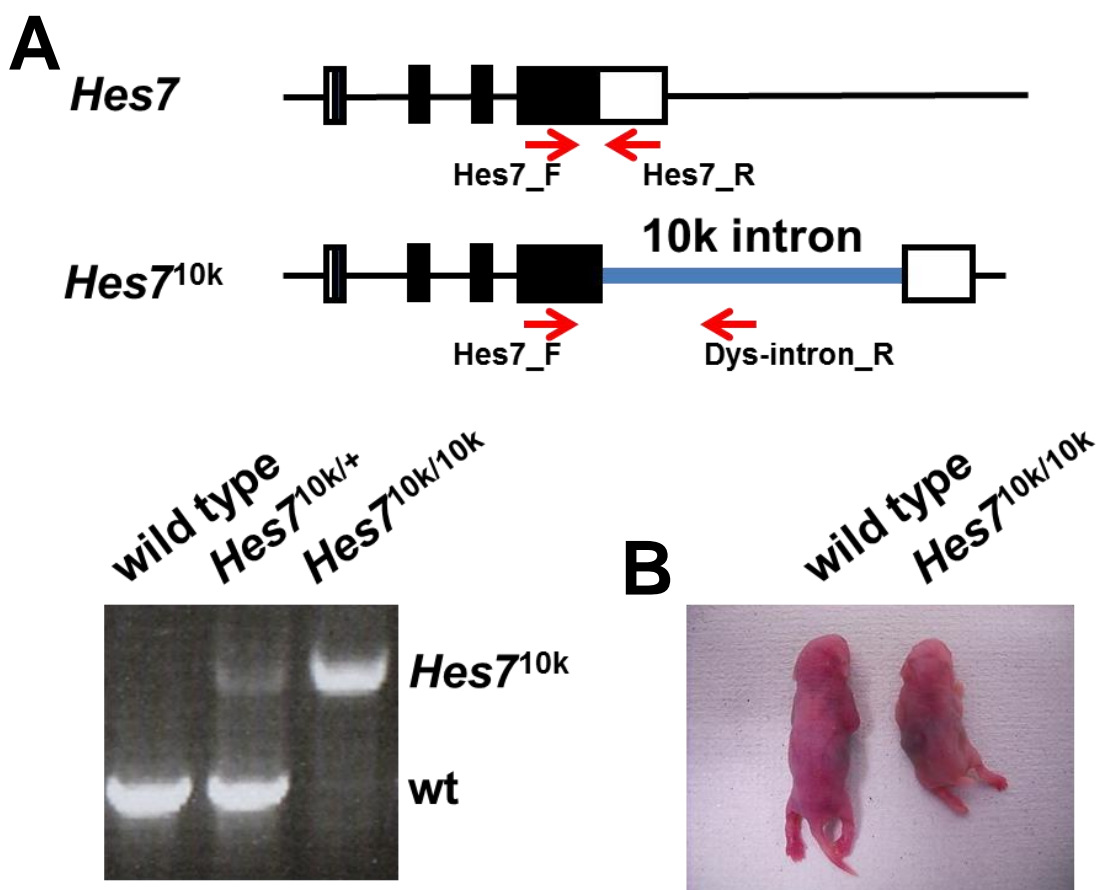


図.9 *Hes7*<sup>10k/10k</sup> マウスの作製。

(A)PCR によるジェノタイプの解析。使用した PCR プライマーのポジションを赤矢印で表した。Hes7\_F、Hes7\_R の組み合わせにより野生型アレルで 540bp のバンドが検出される。また、Hes7\_F、Dys-intron\_R の組み合わせにより *Hes7*<sup>10k</sup> アレルから 1570bp のバンドが検出される。(B)野生型マウスと *Hes7*<sup>10k/10k</sup> マウスの新生児。*Hes7*<sup>10k/10k</sup> マウスで体軸長、尾の縮小、湾曲が見られる。黒色のボックスはエクソンを示しており、白色のボックスは UTR 領域を示している

**A** wild type



**B** *Hes7*<sup>-/-</sup>



**C** *Hes7*<sup>5k/5k</sup>



**D** *Hes7*<sup>10k/10k</sup>



**E** *Hes7*<sup>20k/20k</sup>



図.10 *Hes7*<sup>10k/10k</sup> の椎骨形成異常。

硬骨(赤色)と軟骨(青色)の染色を行った。(A)野生型マウス、(B)*Hes7*<sup>-/-</sup>、(C) *Hes7*<sup>5k/5k</sup>、(D)*Hes7*<sup>10k/10k</sup>、(E)*Hes7*<sup>20k/20k</sup> の新生児を表している。

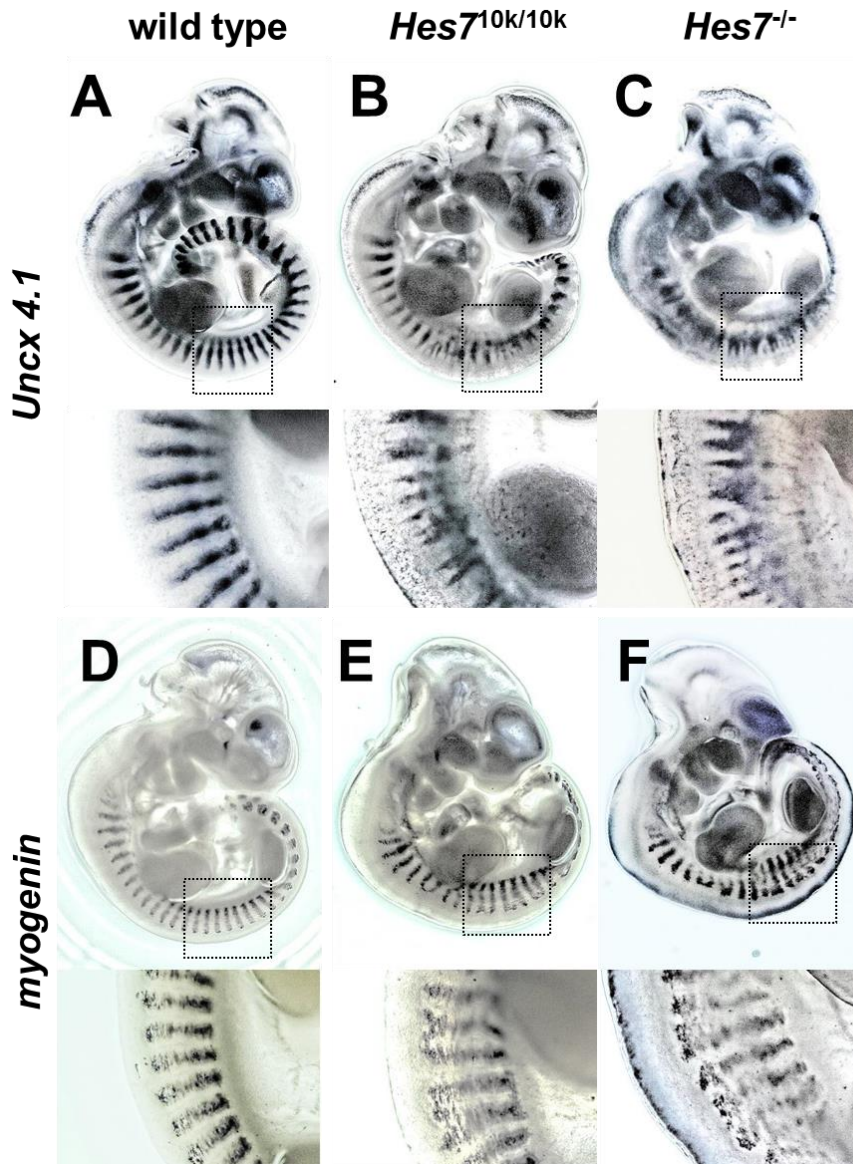


図.11 *Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚の体節形成異常。

*In situ* ハイブリダイゼーションにより(A-C)*uncx4.1* と(D-F)*Myogenin* の発現パターンを調べることで体節形成の確認を行った。(A,D)野生型マウス、(B,E) *Hes7*<sup>10k/10k</sup>、(C,F)*Hes7*<sup>-/-</sup>胚を表している。



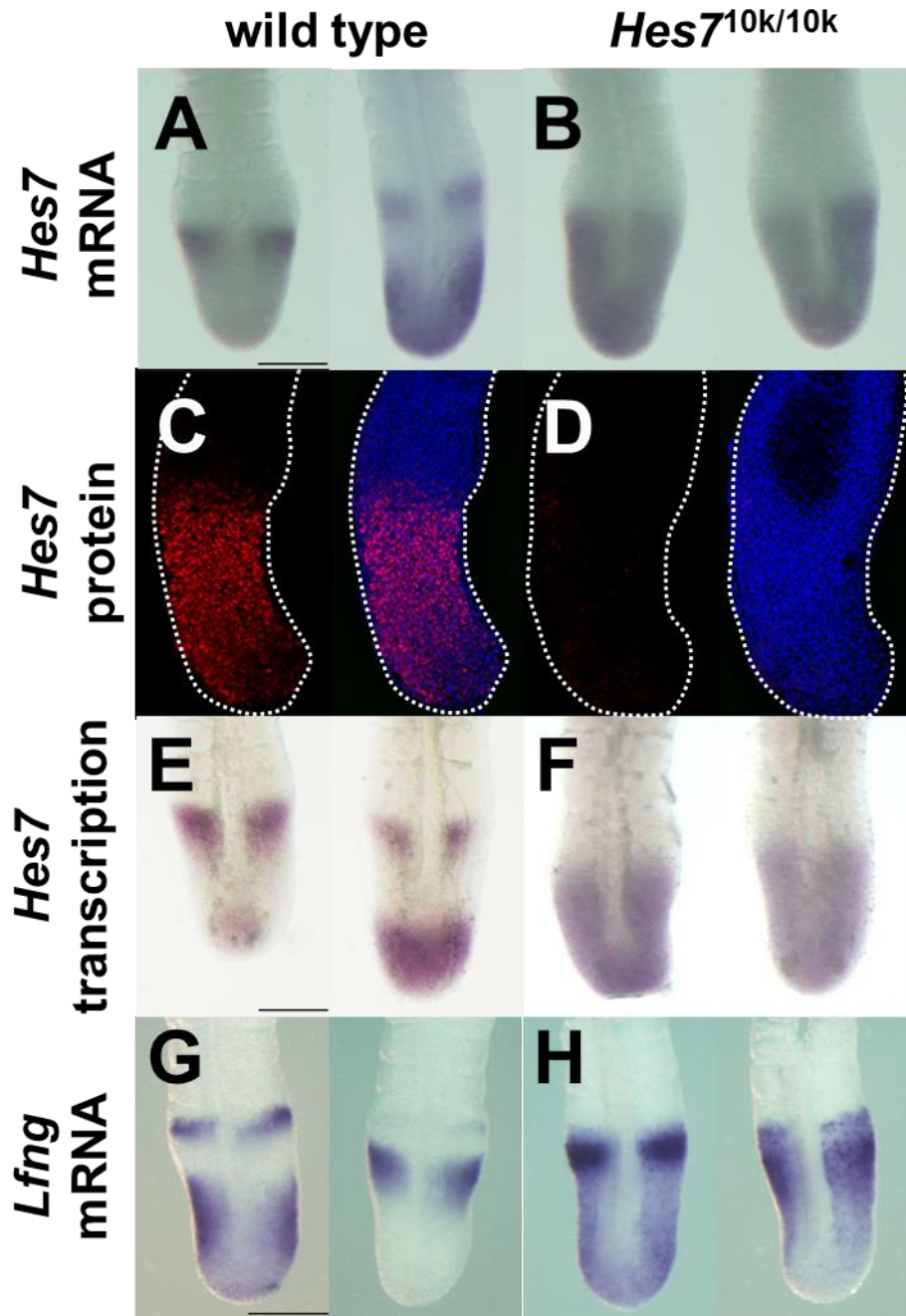


図.12 *Hes7* と *Lfng* の発現パターンと *Hes7* タンパク質の分布。

(A,B)未分節中胚葉における *Hes7* mRNA の分布、(C,D)*Hes7* タンパク質の分布、(E,F)*Hes7* の転写活性、(G,H)*Lfng* mRNA の分布を示した。(A,C,E,G)野生型 10.5 日胚、(B,D,F,H)*Hes7*<sup>10k/10k</sup> 10.5 日胚を表している。スケールバーは 100  $\mu$  m を示している。

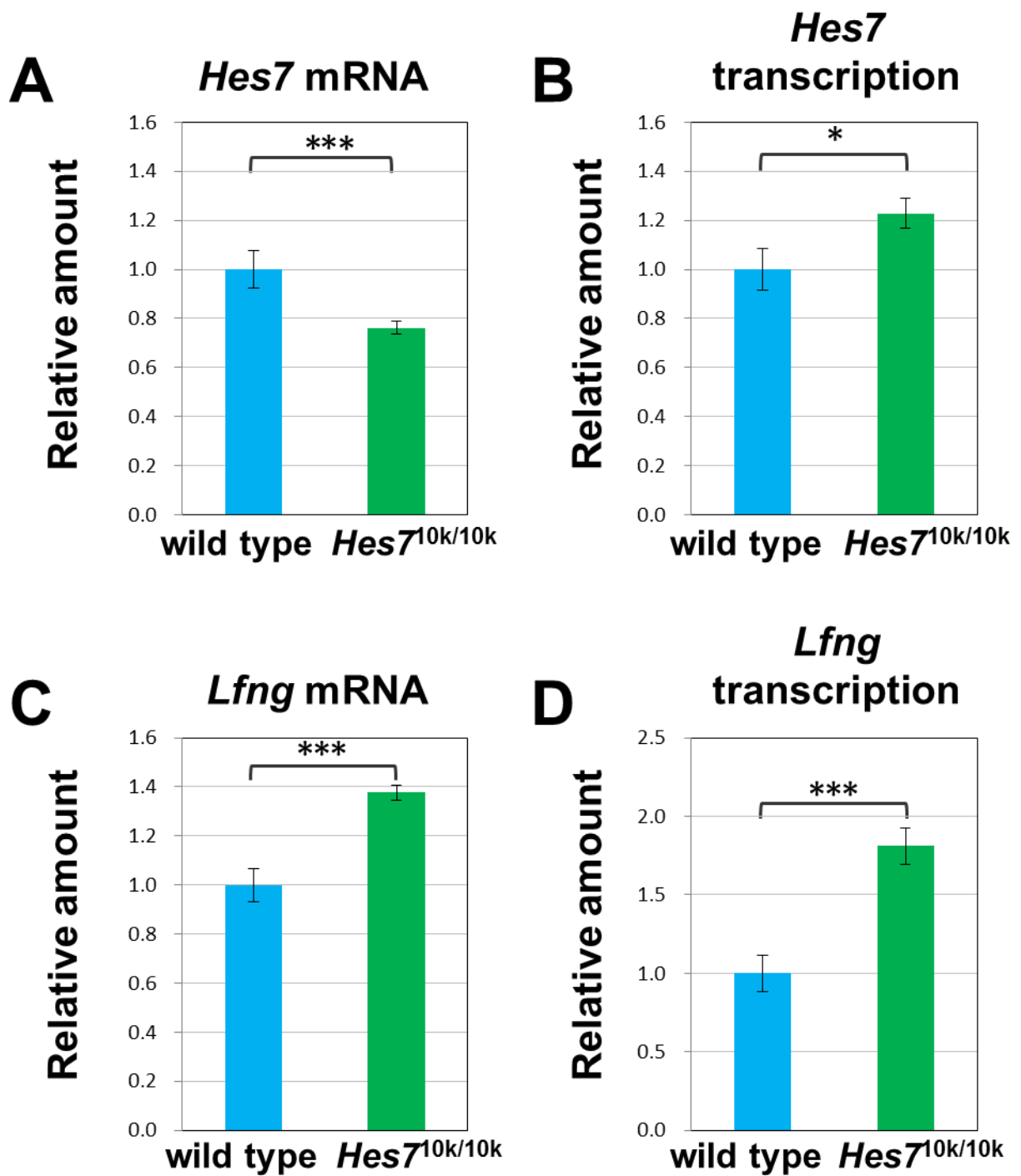


図.13 胎生 10.5 日齢のマウス胚における *Hes7* mRNA、*Lfng* mRNA と *Hes7*、*Lfng* の転写活性の定量解析。

リアルタイム PCR を用いて野生型胚と *Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚の(A)*Hes7* mRNA、(B)*Hes7* の転写活性、(C)*Lfng* mRNA、(D)*Lfng* の転写活性を示した。\* $p < 0.05$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 。

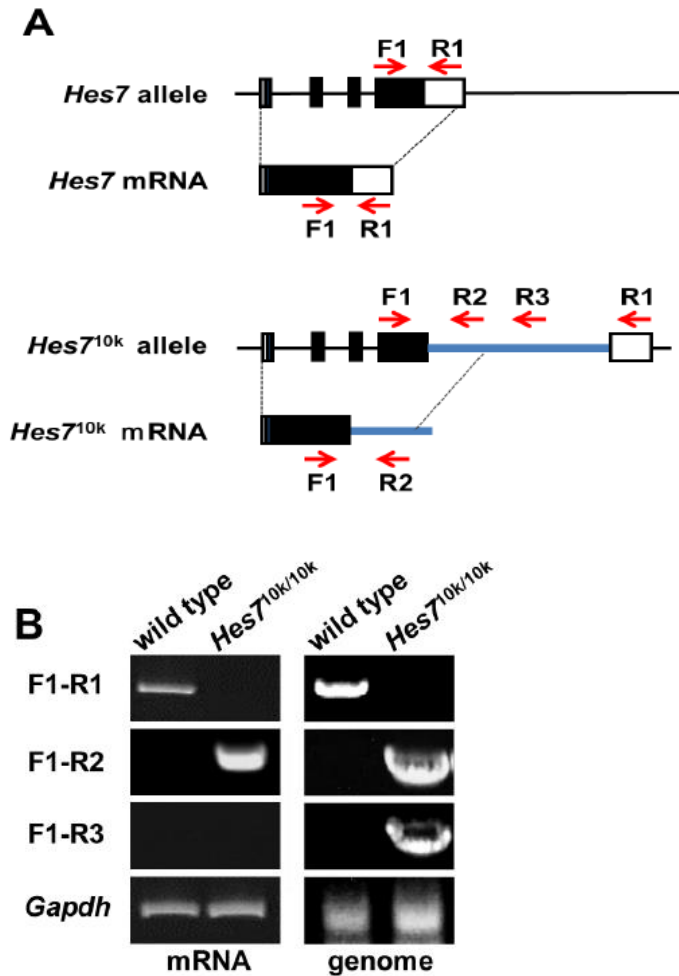


図.14  $Hes7^{10k}$  アリル由来の  $Hes7$  転写産物の解析。

(A)  $Hes7$  遺伝子と  $Hes7$  mRNA の構造を表している。上は野生型アリル、下は  $Hes7^{10k}$  アリルを示している。挿入したヒト由来の *Dystrophin* イントロンは青線で示し、RT-PCR に用いたプライマーの位置は赤色の矢印で表記した。(B)  $Hes7^{10k}$  アリル由来の転写産物を RT-PCR を用いて解析した。野生型胚もしくは  $Hes7^{10k/10k}$  胚の未分節中胚葉から RNA を抽出し RT-PCR を行った(左)。コントロールとして野生型胚、もしくは  $Hes7^{10k/10k}$  胚の未分節中胚葉から DNA を抽出し PCR 解析を行った(右)。*Gapdh* mRNA はポジティブコントロールとして使用している。また、プライマー F1 と R1 の組み合わせでは、 $Hes7^{10k/10k}$  マウスの mRNA、DNA からバンドを検出できなかった。黒色のボックスはエクソンを示しており、白色のボックスは UTR 領域を示している



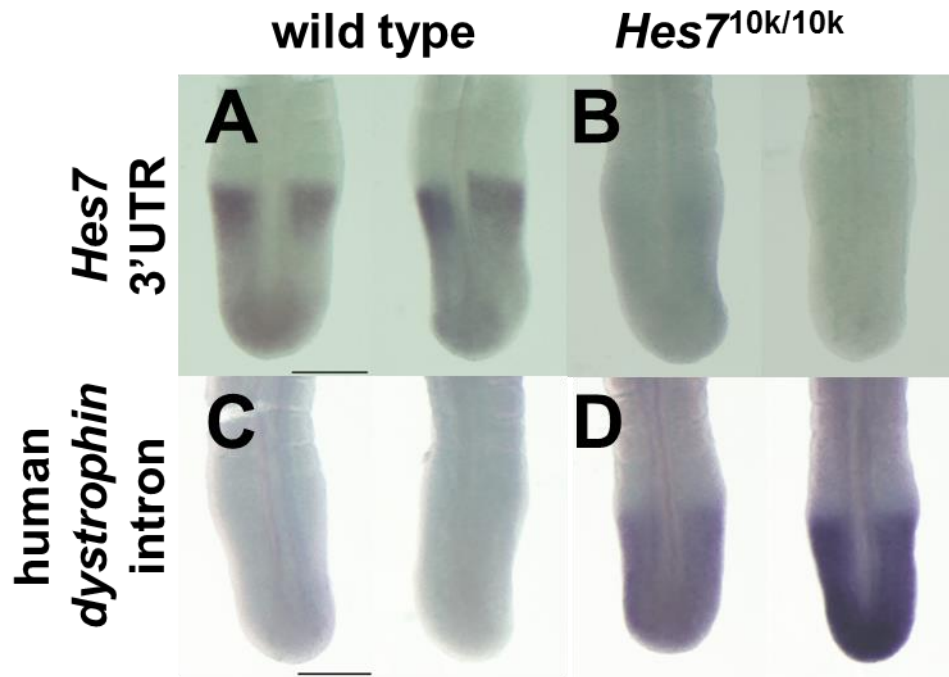
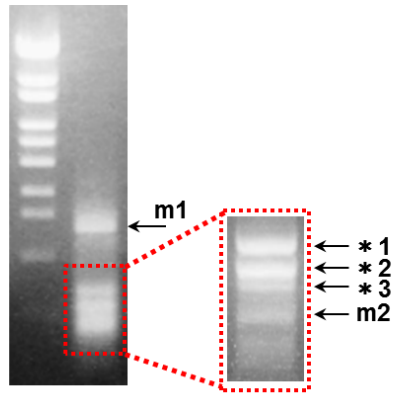


図.15  $Hes7^{10k}$  アリル由来の  $Hes7$  転写産物では正しい 3'UTR が欠損している。  
 (A,B)  $Hes7$  3'UTR に結合するプローブを用いて *In situ* ハイブリダイゼーションを行った。(A)野生型胚では  $Hes7$  mRNA が検出できたものの、(B)  $Hes7^{10k/10k}$  胚では検出できなかった。(C,D)ヒト由来 *Dystrophin*-intron 74 の 5'側 754bp に結合するプローブを用いて *In situ* ハイブリダイゼーションを行った。



m1

```

3304
TAGTATTC AATAAA TATTGTTGAATGCATTAATGAAAAAAAAAAAAAAAA
TAGTATTC AATAAA TATTGTTGAATGCATTAATGAAAAAAAAAAAAAAAA
TAGTATTC AATAAA TATTGTTGAATGCATTAATGAAAAAAAAAAAAAAAA
TAGTATTC AATAAA TATTGTTGAATGCATTAATGAAAAAAAAAAAAAAAA
TAGTATTC AATAAA TATTGTTGAATGCATTAATGAAAAAAAAAAAAAAAA
TAGTATTC AATAAA TATTGTTGAATGCATTAATGAAAAAAAAAAAAAAAA
TAGTATTC AATAAA TATTGTTGAATGCATTAATGAAAAAAAAAAAAAAAA
TAGTATTC AATAAA TATTGTTGAATGCATTAATGAAAAAAAAAAAAAAAA

```

m2

```

2350
AACCCAGAT AATAAA GAAGAGTAAGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAA
AACCCAGAT AATAAA GAAGAGTAAGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

図.16 3'RACE 法を用いた *Hes7*<sup>10k</sup> アリル由来の転写産物の解析。

*Hes7*<sup>10k/10k</sup> 胚の未分節中胚葉から RNA を抽出し 3'RACE を行った。その結果 2 つの主なバンド(m1、m2)を検出し、矢印で表記した(上)。また、得られた配列情報をそれぞれ表記した(下)。ポリ A 末端を赤文字で表記した。また、その他のバンド(\*1、\*2、\*3)の配列を調べたところ *Hes7* とは無関係であった。

\*1, family with sequence similarity 69 member B ( Fam69b ) ( 650 bp ) ;

\*2, histone cluster 1, H2ag ( His1h2ag ) ( 500 bp ) ;

\*3, hemoglobin alpha, adult chain 1 ( Hba-a1 ) ( 400 bp )

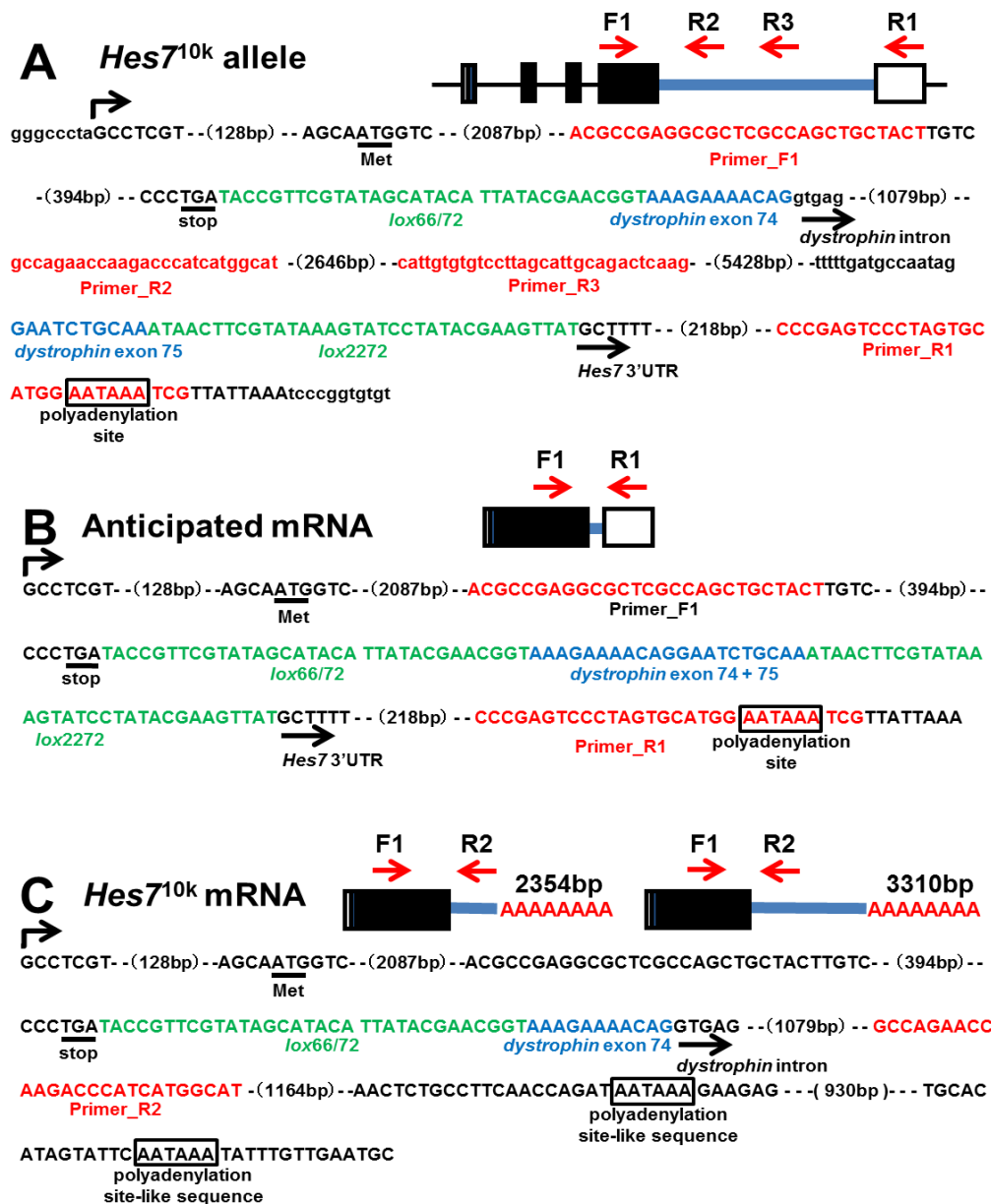


図.17 *Hes7*<sup>10k</sup> アリルとその転写産物の構造。

(A)*Hes7* アリルの構造。転写開始店の直前から *Hes7* のポリ A 付加シグナル直後までの配列を示している。イントロン配列は小文字で表記している。(B)予測された *Hes7*<sup>10k</sup> アリル由来の *Hes7* 転写産物の構造。(C)実際に得られた *Hes7*<sup>10k</sup> アリル由来の転写産物の構造。プライマー(F1、R1、R2、R3)の位置は赤色の矢印で表記した。また UTR は白色のボックスで表記しており、*Hes7* のエクソンは黒色のボックスで表記した。*lox* 配列は緑色、*Dystrophin* 遺伝子のエクソン配列は青色、プライマー配列は赤色の文字で表記している。開始コドン、停止コドンは下線で示している。

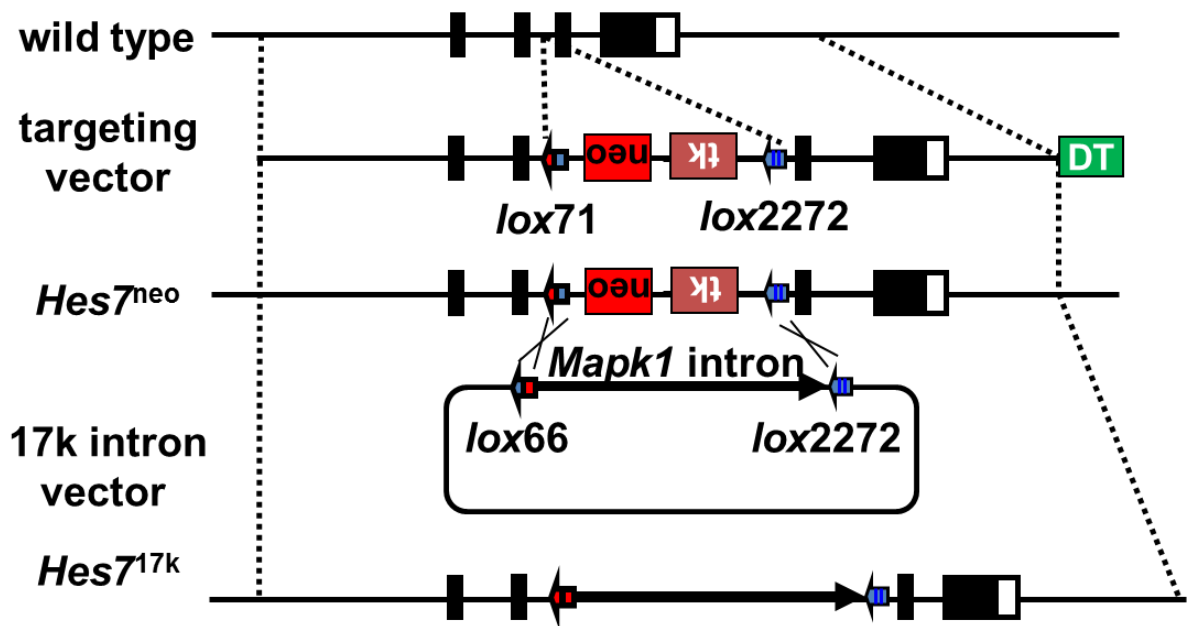


図.18 ターゲティングベクターの概略。

1 列目は野生型 *Hes7* アリルを表している。2 列目はターゲティングベクターを表している。このターゲティングベクターには *Hes7* 3'UTR 領域に lox71、PGK-neoPGK-TK、lox2272 を挿入している。3 列目は組換わった後の *Hes7<sup>neo</sup>* アリルを表している。4 列目は lox66 と lox2272 を持つ 17kb intron ベクターを表している。5 列目は *Hes7<sup>17k</sup>* アリルを示している。黒色のボックスはエクソンを示しており、白色のボックスは 3'UTR 領域を示している。また、DT はジフテリアアトキシン配列を示している。

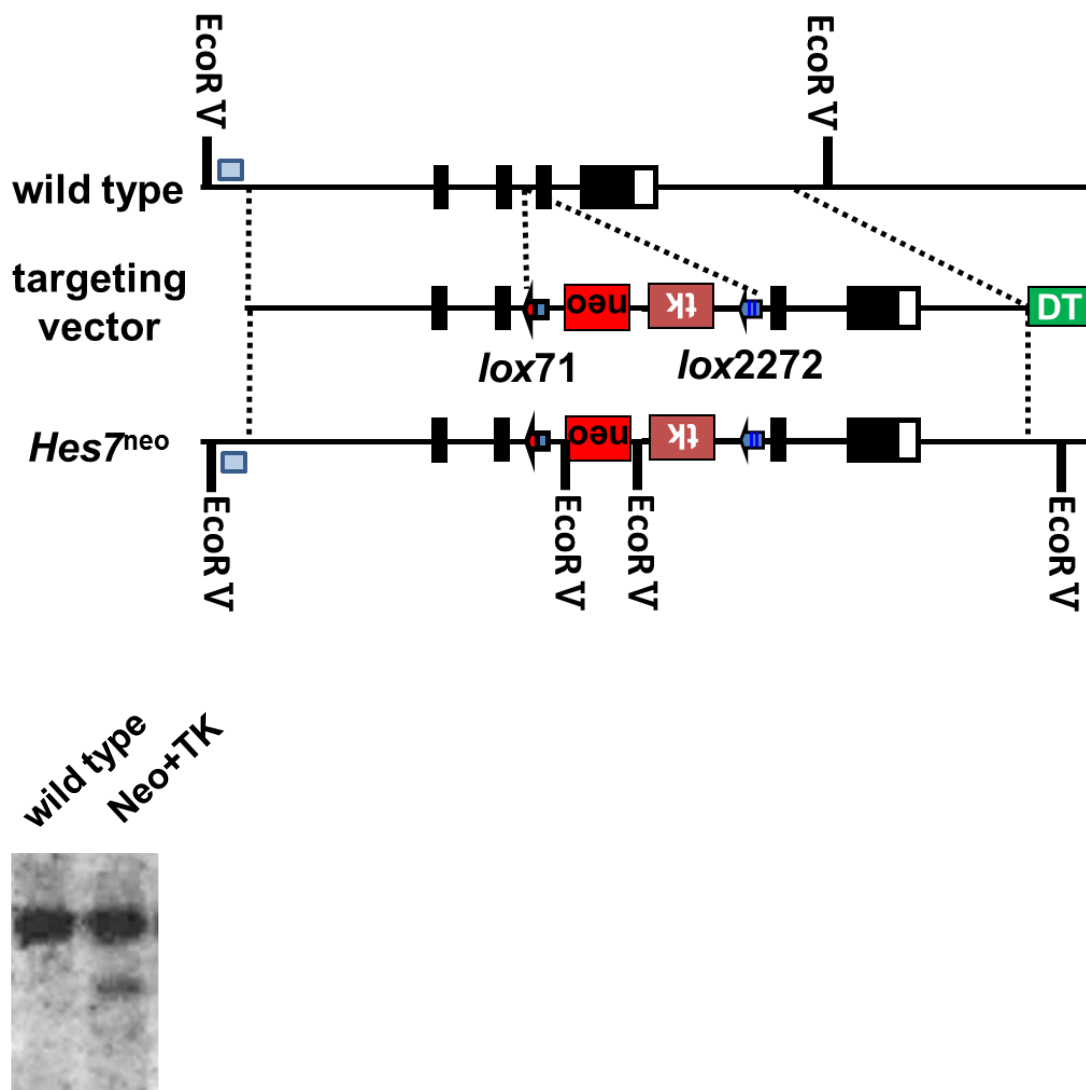


図.19 *Hes7<sup>neo</sup>* アリルを持った ES 細胞の選択。

*Hes7<sup>neo</sup>* アリルを持った ES 細胞を選択するために 5'側に作製したプローブを用いてサザンブロッティングを行った。青色のボックスは使用したプローブの位置を示している。G418 存在下でセレクションを行い、薬剤耐性を持つ 114 個のクローンを選択・単離した。このクローンから DNA を抽出し、サザンブロッティングによりターゲティングベクターが正確に組み込まれたクローンの検出をおこなった。ゲノムを *EcoRV* 制限酵素で消化すると野生型で 14kb の消化産物が、組換え体では 10kb の消化産物ができる。サザンブロッティングの結果、20 個の相同組換え体が得られた。黒色のボックスはエクソンを示しており、白色のボックスは 3'UTR 領域を示している。また、DT はジフテリアトキシン配列を示している。

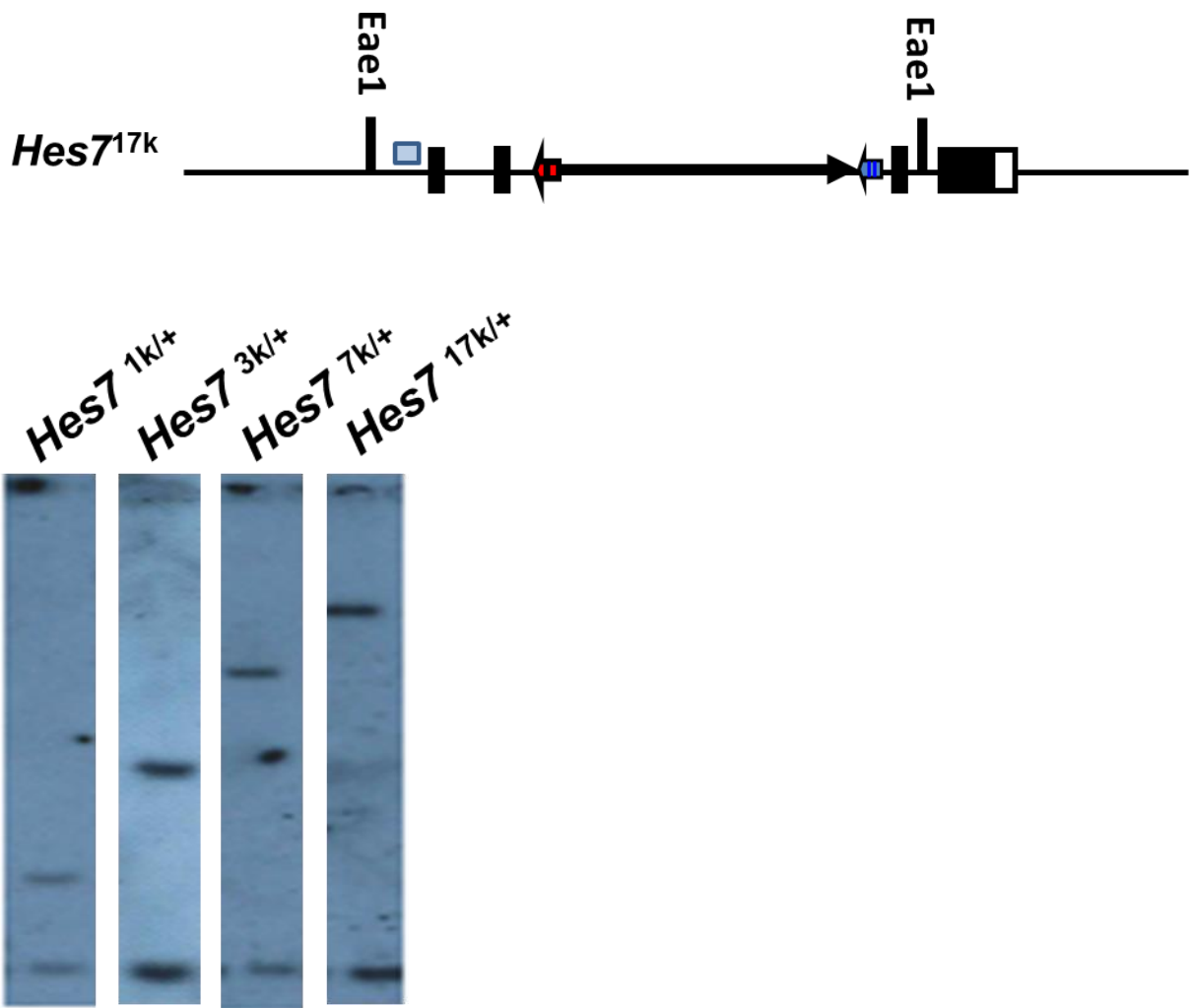


図.20 rat *Mapk1*-intron ノックインアレルを持った ES 細胞の選択。

rat *Mapk1*-intron ノックインアレルを持った ES 細胞を選択するために 5'long arm 内に作製したプローブを用いてサザンブロッティングを行った。青色のボックスは使用したプローブの位置を示している。ゲノムを *EaeI* 制限酵素で消化すると野生型で 3kb の消化産物が、1kb rat *Mapk1*-intron を持つもので 4kb、3kb rat *Mapk1*-intron を持つもので 6kb、7kb rat *Mapk1*-intron を持つもので 10kb、17kb rat *Mapk1*-intron を持つもので 20kb の消化産物が得られた。サザンブロッティングの結果、5 個のクローンから 1kb rat *Mapk1*-intron を持つものを、22 個のクローンから 3kb rat *Mapk1*-intron を持つものを、6 個のクローンから 7kb rat *Mapk1*-intron を持つものを、13 個のクローンから 17kb rat *Mapk1*-intron を持つものを得た。黒色のボックスはエクソンを示しており、白色のボックスは 3'UTR 領域を示している

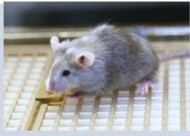
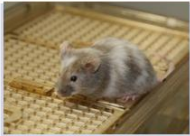

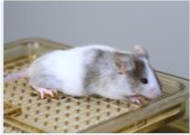



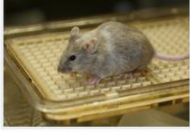

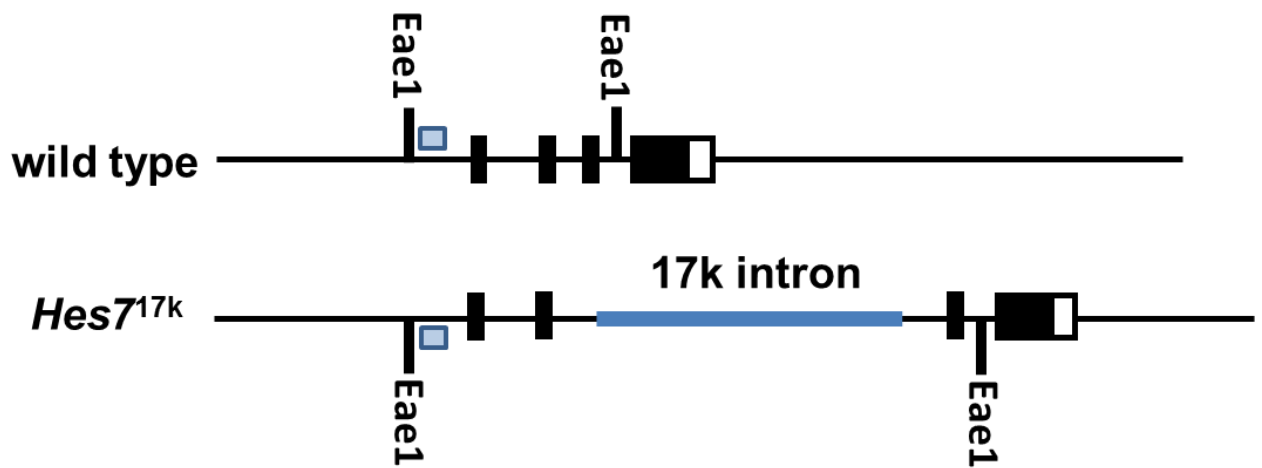
length of intron	chimeric mouse	Number of knock-in heterozygotes	length of intron	chimeric mouse	Number of knock-in heterozygotes
1k		0/158	3k		0/48
1k		0/148	7k		0/39
1k		0/144	7k		0/42
1k		0/146	17k		12/25
1k		0/152			

図.21 rat *Mapk1*-intron ノックインマウス作成。

rat *Mapk1*-intron アリルを持つ ES 細胞を ICR の胚盤胞にインジェクションし、代理母に移植することでキメラマウスを作製する。挿入した ES 細胞は TT2 マウスの雄由来であることから、インジェクションされた ES 細胞由来の細胞が多く、精細胞に分化していた場合、黒目黒毛を持つ雄マウスが生まれる。このキメラマウスと ICR マウスを掛け合わせヘテロマウスを作製する。ICR マウスは白毛赤目を持つマウスであり、黒目黒毛が優勢遺伝であることから挿入された ES 細胞由来の精子が使われた場合、黒目茶毛を持つマウスが生まれる。キメラ率の高い雄キメラマウスと雌の ICR マウスを掛け合わせることでノックインアリルをヘテロに持つマウス(*Hes7*<sup>1k/+</sup>、*Hes7*<sup>3k/+</sup>、*Hes7*<sup>7k/+</sup>、*Hes7*<sup>17k/+</sup>)をそれぞれ作製した。しかし *Hes7*<sup>17k/+</sup> 以外のマウスについては作製することが出来なかった。



wild type  
Hes7<sup>17k/+</sup>

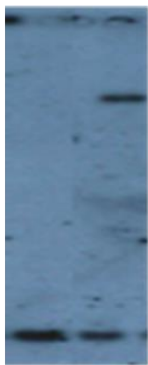


図.22 *Hes7*<sup>17k/17k</sup> マウスの作製。

サザンブロッティングによるジェノタイプの解析。青色のボックスは使用したプローブの位置を示している。Eae1 制限酵素で消化すると野生型で 3kb の消化産物が、17kb rat *Mapk1*-intron を持つもので 20kb の消化産物が得られる。この結果で得られた *Hes7*<sup>17k/-</sup> マウス同士を掛け合わせることで *Hes7*<sup>17k/17k</sup> マウスを作製した。黒色のボックスはエクソンを示しており、白色のボックスは 3'UTR 領域を示している



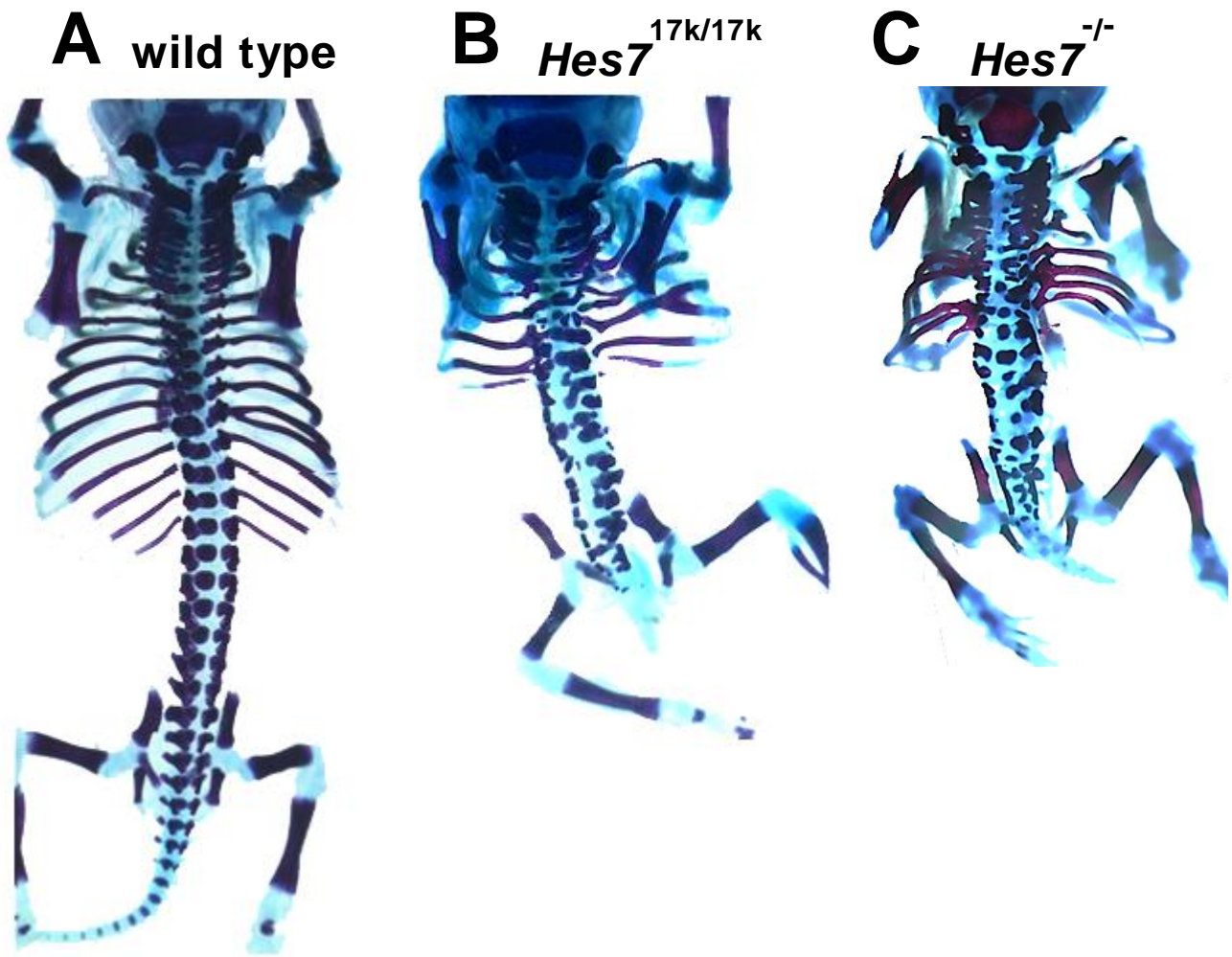


図.23 *Hes7*<sup>17k/17k</sup> の椎骨形成異常。

硬骨(赤色)と軟骨(青色)の染色を行った。(A)野生型マウス、(B)*Hes7*<sup>17k/17k</sup>、(C)*Hes7*<sup>-/-</sup>の新生児を表している。

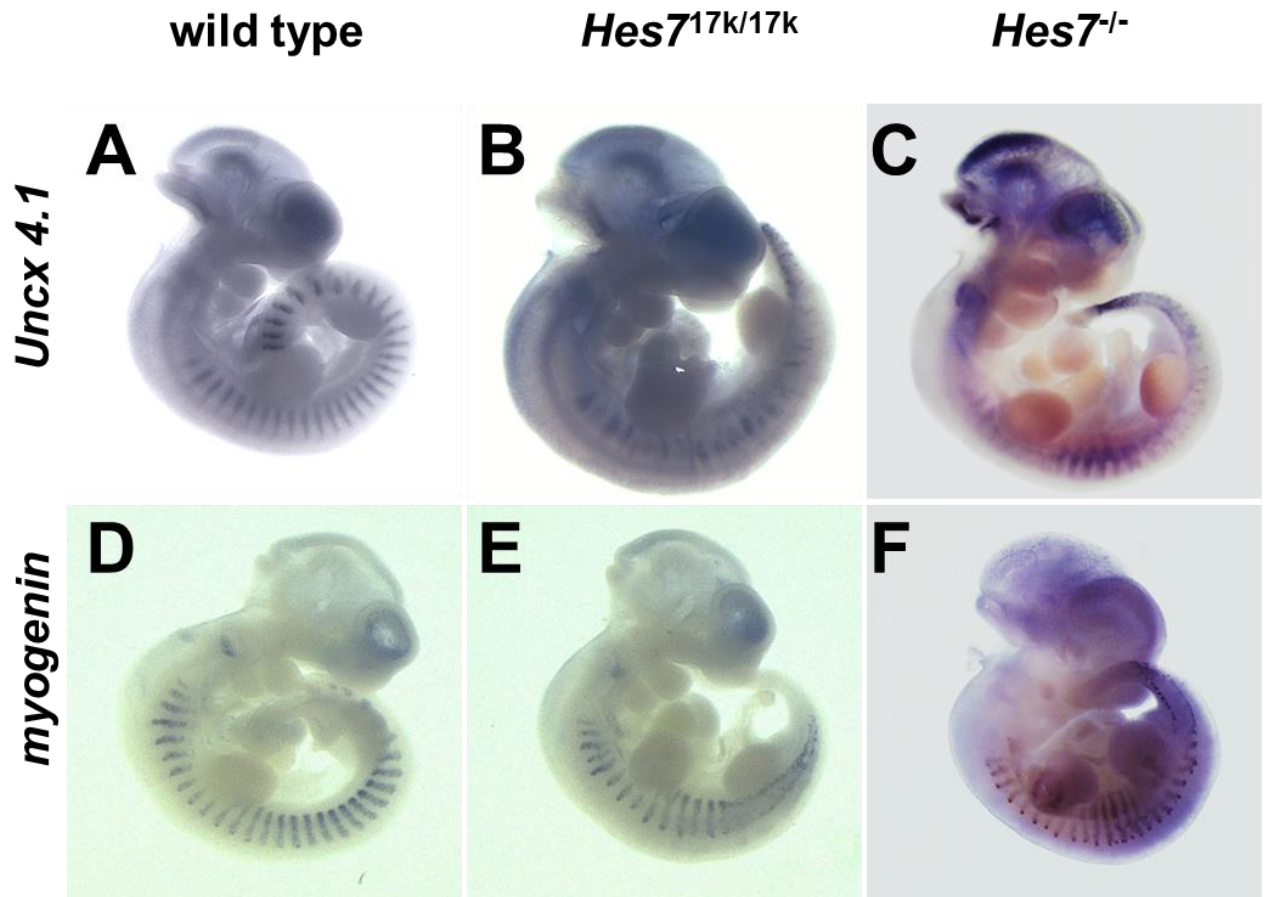


図.24 *Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚の体節形成異常。

*In situ* ハイブリダイゼーションにより (A-C)*uncx4.1* と (D-F)*Myogenin* の発現パターンを調べることで体節形成の確認を行った。(A,D)野生型マウス、(B,E)*Hes7*<sup>17k/17k</sup>、(C,F)*Hes7*<sup>-/-</sup>胚を表している。

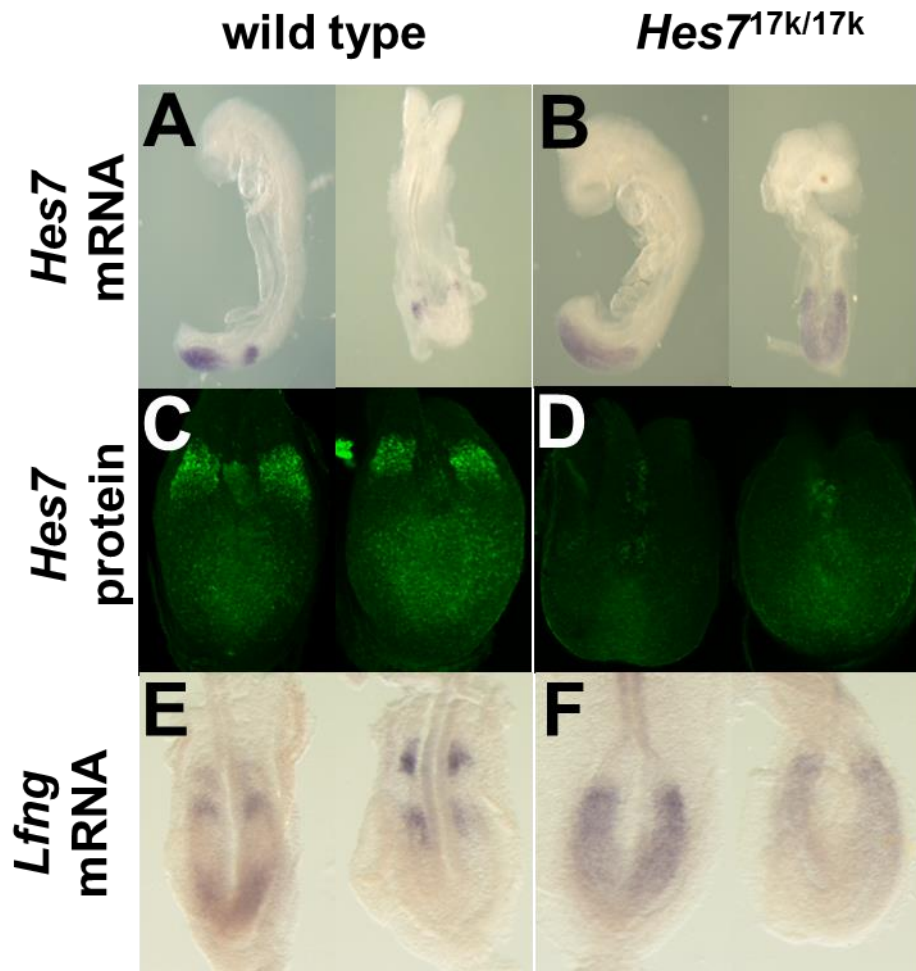


図.25 *Hes7* と *Lfng* の発現パターンと *Hes7* タンパク質の分布。

(A,B)未分節中胚葉における *Hes7* mRNA の分布、(C,D)*Hes7* タンパク質の分布、(E,F)*Lfng* mRNA の分布を示した。(A,C,E)胎生 8 日齢の野生型胚、(B,D,F)胎生 8 日齢の *Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚を表している。

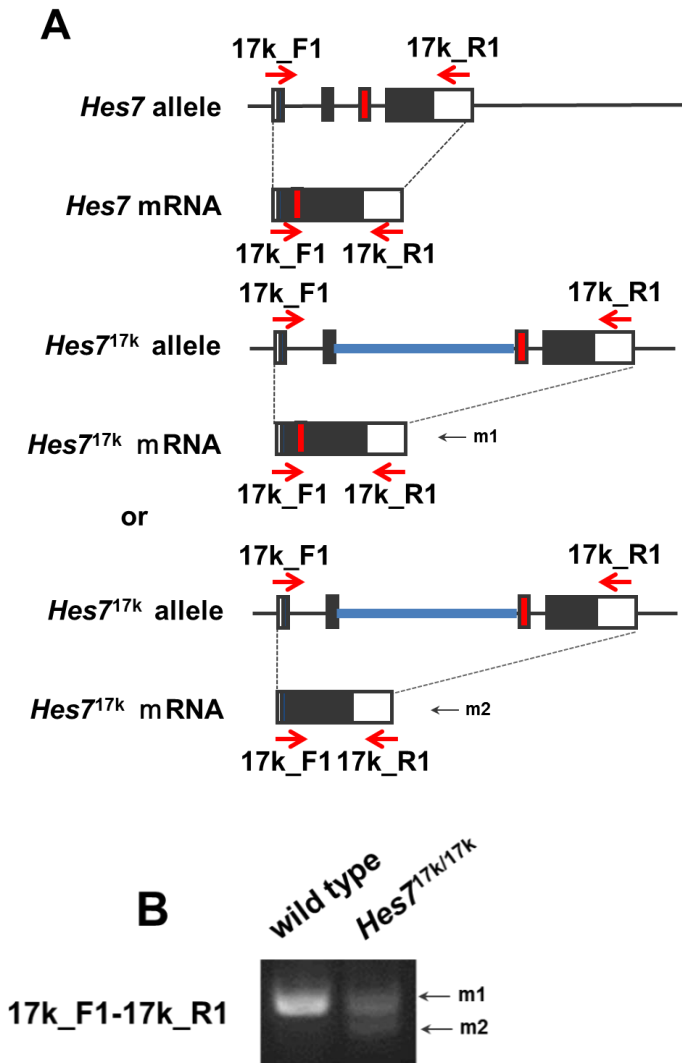


図.26 *Hes7*<sup>17k</sup> アリル由来の *Hes7* 転写産物の解析。

(A) *Hes7* 遺伝子と *Hes7* mRNA の構造を表している。上は野生型アリル、下は *Hes7*<sup>17k</sup> アリルを示している。挿入し *rat Mapk1*-intron は青線で示し、RT-PCR に用いたプライマーの位置は赤色の矢印で表記した。(B) *Hes7*<sup>17k</sup> アリル由来の転写産物を RT-PCR を用いて解析した。野生型胚もしくは *Hes7*<sup>17k/17k</sup> 胚の未分節中胚葉から RNA を抽出し RT-PCR を行った。その結果 2 つの主なバンド(m1、m2)を検出し、矢印で表記した。それぞれのバンドを調べたところ、m1 は正常な mRNA であり、m2 はスプライシングの異常により第 3 エクソンが欠損した mRNA であった。黒色のボックスは翻訳領域を示しており、白色のボックスは 3'UTR 領域を示している。

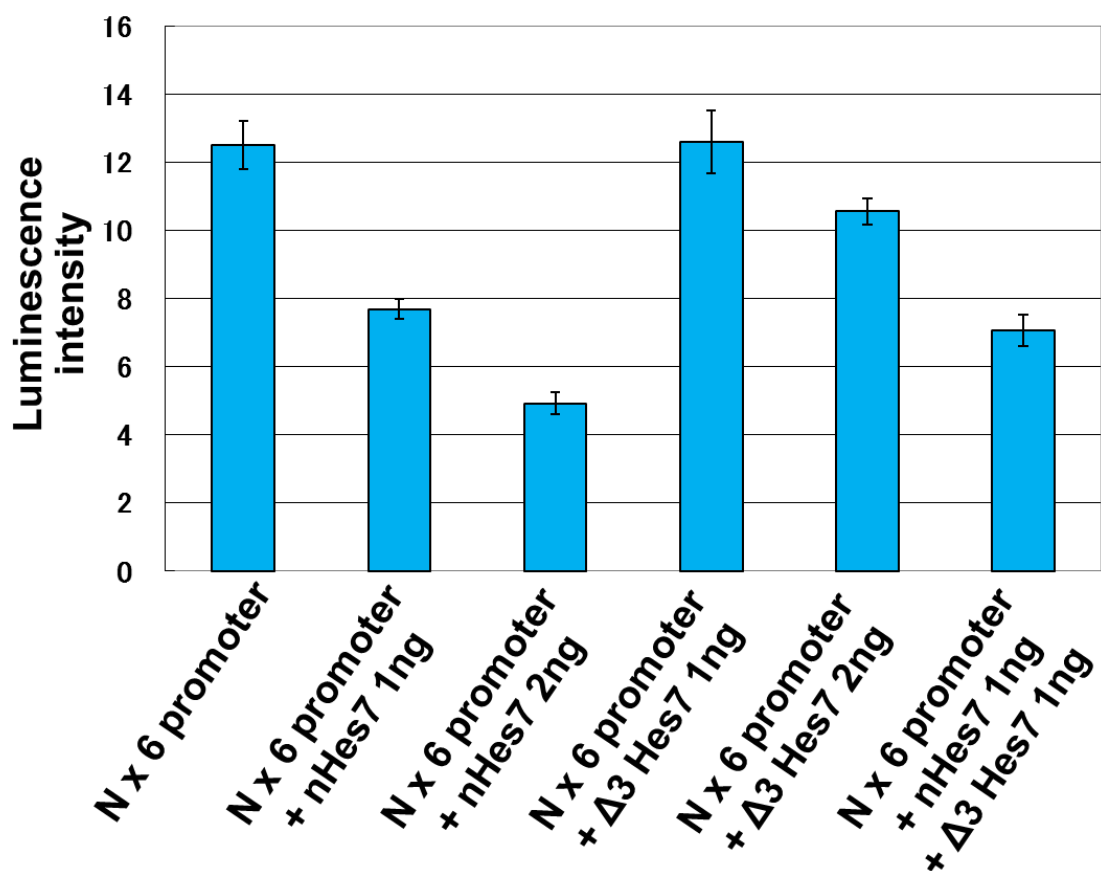


図.27 ルシフェラーゼアッセイによる変異型 Hes7 の機能解析。

PGL4.12 ベクターに N-box を 6 個タンデムに繋げたアクチンプロモーターを挿入したプラスミド(Nx6 promoter)と正常な *Hes7* を発現するプラスミド(nHes7)、第 3 エクソンが欠損している変異型 *Hes7* を発現するプラスミド( $\Delta 3$ Hes7)を NIH3T3 細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。nHes7 を遺伝子導入した場合、ルシフェラーゼ活性が濃度依存的に減少していた。しかし  $\Delta 3$ Hes7 を導入した場合、ルシフェラーゼ活性の低下が見られなかった。加えて、nHes7 と  $\Delta 3$ Hes7 を同時に遺伝子導入した場合、ルシフェラーゼ活性は nHes7 のみを遺伝子導入したときと変わらなかったことから、第 3 エクソンが欠損した *Hes7* タンパク質は正常な *Hes7* タンパク質に影響を与えないことを示唆した。

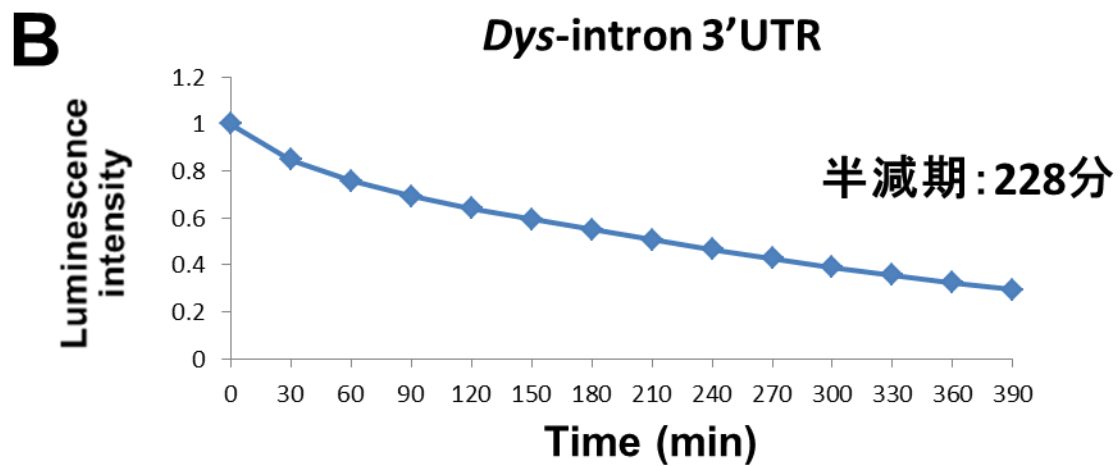
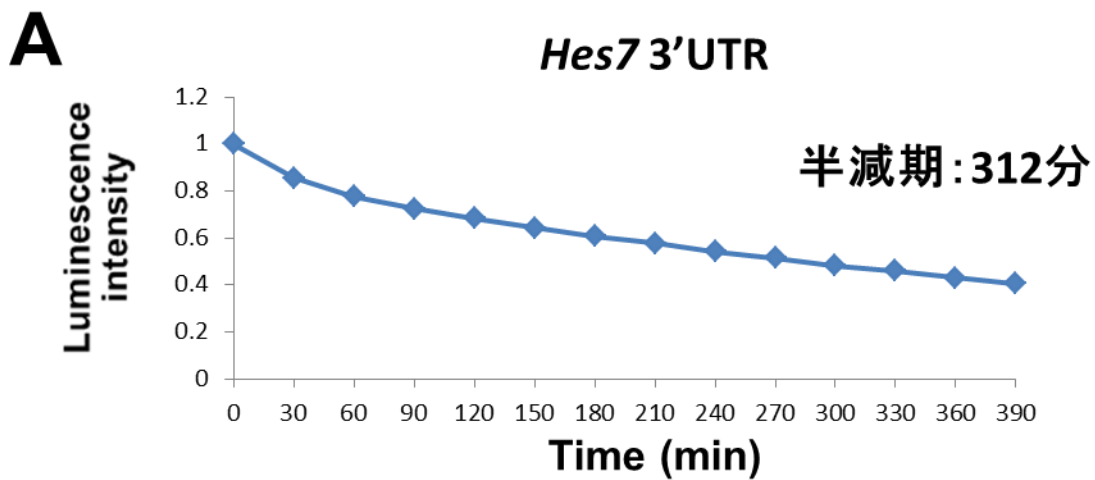
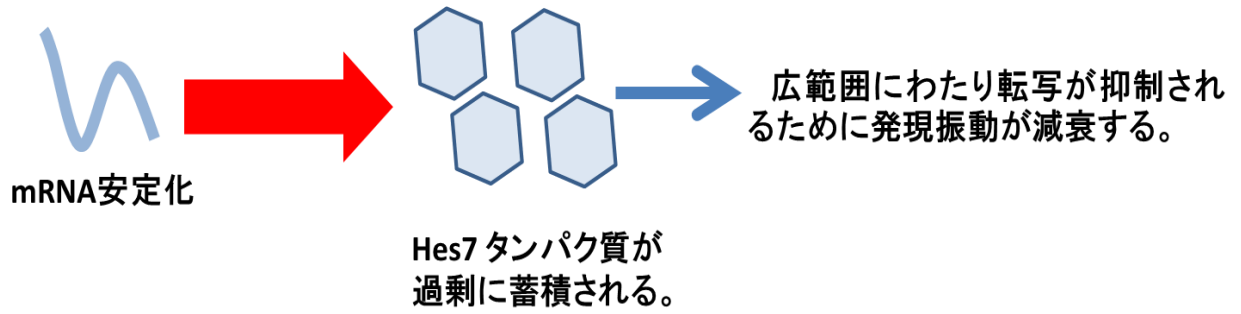


図.28 ルシフェラーゼアッセイによる mRNA の安定性の計測。

PGL4.12 ベクターに CMV プロモーターを挿入したプラスミドに *Hes7* 3'UTR(*Hes7* 3'UTR-Luc)を繋げたものと human *Dystrophin*-intron(*Dys-intron*-Luc)を繋げたものを作製し、HEK293T 細胞に遺伝子導入を行った。その後、アクチノマイシン D を加え転写を止めた後に生物発光リアルタイム測定装置を用いてルシフェラーゼ活性の測定を行った。その結果、*Hes7* 3'UTR-Luc では半減期が 312 分であったものが *Dys-intron*-Luc では半減期が 228 分に減少した。

### 過去の報告



### 本研究の結果

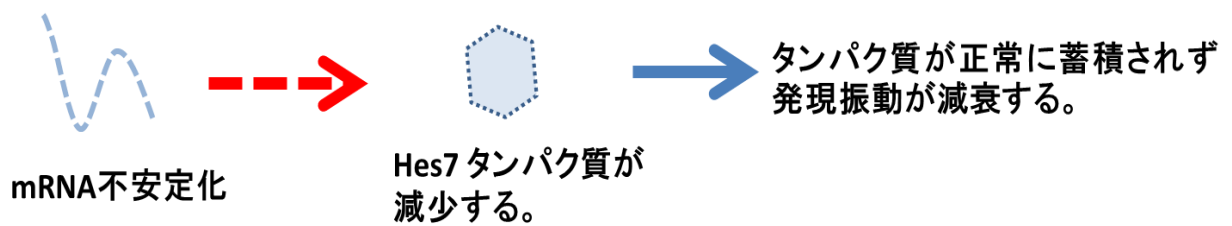


図.29 本研究のまとめ。

*Hes7* 3'UTR が正常な *Hes7* のタンパク質の蓄積に必要であり、*Hes7* の発現振動を維持することに必要であることを示した。これは *Hes7* mRNA の安定性が 3'UTR を介して厳密に制御されていることを示唆している。

## [謝辞]

本研究の遂行に当たりご指導いただいた多くの方に感謝いたします。まず、本研究の機会を与えていただいた別所康全教授、研究に当たりあらゆる基本を親切、丁寧に教えてい松井貴輝助教、中畑泰和助教に深く感謝いたします。また、アドバイザー委員として貴重な助言を下された中島欽一教授、稲垣直之准教授、片岡浩介准教授、そして、学位論文の審査をいただく河野憲二教授に御礼申し上げます。本研究における数理解析のサポートを頂いた作村諭一准教授に感謝いたします。遺伝子組み換えマウスの作製など多岐にわたるサポートを頂いた動物実験施設の皆様にも感謝いたします。

遺伝子発現制御学講座の皆様には大変お世話になりました。林真一先輩、金雄先輩にはマウスの実験から、ES細胞の管理の仕方など多方面で支援いただきました。秋山龍太郎先輩にはゼブラフィッシュの管理から、実験データの議論等大変お世話になりました。二反田康秀君、松田達郎君をはじめ後輩の皆様には、議論の相手やアドバイス、研究以外についてもお世話になり感謝しております。また、技官の重里宏子さん、横内舞子さん、村山千恵さん、秘書の田野美佐さんには日々の実験や研究生活においてご支援いただきました。

最後に、ここまでわたしのわがままを支えてきてくれた両親に深く感謝します。



[参考文献]

Araki, K., Araki, M., & Yamamura, K. (1997). Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, 25(4), 868-872.

Araki, K., Araki, M., & Yamamura, K. (2002). Site - directed integration of the cre gene mediated by cre recombinase using a combination of mutant lox sites. *Nucleic Acids Research*, 30(19), e103-e103.

Aulehla, A., & Johnson, R. L. (1999). Dynamic expression of lunatic fringe suggests a link between notch signaling and an autonomous cellular oscillator driving somite segmentation. *Developmental Biology*, 207(1), 49-61.

Aulehla, A., Wehrle, C., Brand-Saberi, B., Kemler, R., Gossler, A., Kanzler, B., et al. (2003). Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Developmental Cell*, 4(3), 395-406.

Aulehla, A., Wiegraebe, W., Baubet, V., Wahl, M. B., Deng, C., Taketo, M., et al. (2008). A beta-catenin gradient links the clock and wavefront systems in mouse embryo segmentation. *Nature Cell Biology*, 10(2), 186-193.

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 & Development*, 17(12), 1451-1456.

Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S., & Kageyama, R. (2001). Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes & Development*, 15(20), 2642-2647.

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(2), 175-185.

Brogna, S., & Wen, J. (2009). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(2), 107-113.

Chen, C. A., & Shyu, A. (1995). AU-rich elements: Characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11), 465-470.

Chkheidze, A. N., Lyakhov, D. L., Makeyev, A. V., Morales, J., Kong, J., & Liebhaber, S. A. (1999). Assembly of the  $\alpha$ -globin mRNA stability complex reflects binary interaction between the pyrimidine-rich 3' untranslated region determinant and poly (C) binding protein  $\alpha$ CP. *Molecular and Cellular Biology*, 19(7), 4572-4581.

Cooke, J., & Zeeman, E. (1976). A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *Journal of Theoretical Biology*, 58(2), 455-476.

Darzacq, X., Shav-Tal, Y., de Turris, V., Brody, Y., Shenoy, S. M., Phair, R. D., et al. (2007). In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(9), 796-806.

Dequéant, M., Glynn, E., Gaudenz, K., Wahl, M., Chen, J., Mushegian, A., et al. (2006). A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock. *Science*, 314(5805), 1595-1598.

Femino, A. M., Fay, F. S., Fogarty, K., & Singer, R. H. (1998). Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science*, 280(5363), 585-590.

Forsberg, H., Crozet, F., & Brown, N. A. (1998). Waves of mouse lunatic fringe expression, in four-hour cycles at two-hour intervals, precede somite boundary formation. *Current Biology*, 8(18), 1027-1030.

Goldbeter, A., & Pourquie, O. (2008). Modeling the segmentation clock as a network of coupled oscillations in the notch, wnt and FGF signaling pathways. *Journal of Theoretical Biology*, 252(3), 574-585.

Hanisch, A., Holder, M. V., Choorapoikayil, S., Gajewski, M., Ozbudak, E. M., & Lewis, J. (2013). The elongation rate of RNA polymerase II in zebrafish and its significance in the somite segmentation clock. *Development*, *140*(2), 444-453.

Harima, Y., Takashima, Y., Ueda, Y., Ohtsuka, T., & Kageyama, R. (2012). Accelerating the tempo of the segmentation clock by reducing the number of introns in the *Hes7* gene. *Cell Reports*, *3*(1), 1-7

Hirata, H., Bessho, Y., Kokubu, H., Masamizu, Y., Yamada, S., Lewis, J., et al. (2004). Instability of *Hes7* protein is crucial for the somite segmentation clock. *Nature Genetics*, *36*(7), 750-754.

Holley, S. A., Geisler, R., & Nusslein-Volhard, C. (2000). Control of *her1* expression during zebrafish somitogenesis by a delta-dependent oscillator and an independent wave-front activity. *Genes & Development*, *14*(13), 1678-1690.

Jouve, C., Palmeirim, I., Henrique, D., Beckers, J., Gossler, A., Ish-Horowicz, D., et al. (2000). Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene *HES1* in the presomitic mesoderm. *Development*, *127*(7), 1421-1429.

Kim, W., Matsui, T., Yamao, M., Ishibashi, M., Tamada, K., Takumi, T., et al. (2011). The period of the somite segmentation clock is sensitive to notch activity. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(18), 3541-3549.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843-854.

Lewis, J. (2003). Autoinhibition with transcriptional delay: A simple mechanism for the zebrafish somitogenesis oscillator. *Current Biology*, *13*(16), 1398-1408.

McGrew, M. J., Dale, J. K., Fraboulet, S., & Pourquie, O. (1998). The lunatic fringe gene is a target of the molecular clock linked to somite segmentation in avian embryos. *Current Biology*, *8*(17), 979-982.

Morales, A. V., 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(1), 63-74.

Nagy, E., & Maquat, L. E. (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: When nonsense affects RNA abundance. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(6), 198-199.

Oates, A. C., & 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*, 129(12), 2929-2946.

O'Brien, T., & Lis, J. T. (1993). Rapid changes in drosophila transcription after an instantaneous heat shock. *Molecular and Cellular Biology*, 13(6), 3456-3463.

Oginuma, M., Takahashi, Y., Kitajima, S., Kiso, M., Kanno, J., Kimura, A., et al. (2010). The oscillation of notch activation, but not its boundary, is required for somite border formation and rostral-caudal patterning within a somite. *Development*, 137(9), 1515-1522.

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(5), 639-648.

Pourquie, O. (2003). The segmentation clock: Converting embryonic time into spatial pattern. *Science*, 301(5631), 328-330.

Schroter, C., Herrgen, L., Cardona, A., Brouhard, G. J., Feldman, B., & Oates, A. C. (2008). Dynamics of zebrafish somitogenesis. *Developmental Dynamics*, 237(3), 545-553.

Shermoen, A. W., & O'Farrell, P. H. (1991). Progression of the cell cycle through mitosis leads to abortion of nascent transcripts. *Cell*, 67(2), 303-310.

Stauber, M., Laclef, C., Vezaro, A., Page, M. E., & Ish-Horowicz, D. (2012). Modifying transcript lengths of cycling mouse segmentation genes. *Mechanisms of Development*, 129(1), 61-72.

Sternberg, N., & Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. recombination between loxP sites. *Journal of Molecular Biology*, 150(4), 467-486.

Swinburne, I. A., & Silver, P. A. (2008). Intron delays and transcriptional timing during development. *Developmental Cell*, 14(3), 324-330.

Takashima, Y., Ohtsuka, T., González, A., Miyachi, H., & Kageyama, R. (2011). Intronic delay is essential for oscillatory expression in the segmentation clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(8), 3300-3305.

Tam, P. P. (1981). The control of somitogenesis in mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 65 Suppl, 103-128.

Tennyson, C. N., Klamut, H. J., & Worton, R. G. (1995). The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nature Genetics*, 9(2), 184-190.

Uriu, K., Morishita, Y., & Iwasa, Y. (2009). Traveling wave formation in vertebrate segmentation. *Journal of Theoretical Biology*, 257(3), 385-396.

Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y., Nada, S., Yoshida, M., Tsukada, T., et al. (1993). A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Analytical Biochemistry*, 214(1), 70-76.