

氏 名 荻沼政之

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1162 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 19 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Mesp2 and Tbx6 cooperatively establish periodic  
patterns, coupled with the clock machinery during  
mouse somitogenesis

論文審査委員 主 査 教授 城石 俊彦  
教授 広海 健  
准教授 一色 孝子  
助教 隅山 健太  
教授 武田 洋幸（東京大学）

During mouse embryogenesis, many morphogenetic events occur sequentially according to the scheduled time, indicating that these sequential events are linked with the precise temporal regulation. Such regulations must exist throughout embryogenesis to coordinate many developmental processes, although the molecular nature coordinating such temporal regulation is largely unknown.

The vertebrate body is subdivided into repeating segments along the anterior-posterior (AP) axis. This segmental or metameric pattern is established early in embryogenesis by the process of somitogenesis. Somites are blocks of paraxial mesoderm cells that give rise to the axial skeleton and their associated muscles and tendons, which retain a metameric pattern. During development, somitogenesis is tightly coupled with axis elongation. Precursors of the somites, called presomitic mesoderm (PSM), arise from the posterior end of embryo, called tail bud. Somites are aligned along the neural tube, and budding off from the anterior-most end of the unsegmented presomitic mesoderm at the regular time. Therefore, somitogenesis is an event that occurs according to the scheduled time, and it is believed that somitogenesis is under the precise control of temporal information.

The timing of somitogenesis is regulated by the so-called 'segmentation clock', which is associated with a periodic activation of Notch signal pathway in PSM cells. Notch signal activates the target genes, *Hes7* and *L-fng*. The transcription factor *Hes7* (hairy and enhancer of split 7) in turn represses own transcription as well as that of *L-fng*, making negative feedback loops. *L-fng* encodes a glycosyltransferase that acts as a negative regulator of Notch activity, which generates the oscillation of Notch signal activity within the PSM. However, the oscillation itself does not make a segmental boundary, as exemplified by a pendulum clock in which the correct time is not provided by the rhythm of pendulum. This temporal information has therefore to be accurately translated into a spatial pattern during somitogenesis.

The basic helix-loop-helix (bHLH) protein *Mesp2* is a crucial factor in this process. *Mesp2* expression is periodically observed only in the anterior PSM, and the anterior border of the *Mesp2* expression domain determines the next somite segmental border. To understand dynamic expression of *Mesp2*, the enhancer sequence, which is required for the expression in the PSM, has been mapped within 185bp upstream region in the 5' flanking region of *Mesp2* gene, and it has been shown that a T-box transcriptional factor, *Tbx6*, directly binds to the enhancer elements, and is essential for the activation of *Mesp2*. Furthermore, it is shown that Notch signaling synergistically works with *Tbx6* and enhances *Mesp2* activation when these factors coexist. However, since the enhancer analysis was mainly conducted using the cultured cell system, mechanisms involved in the spatial restriction and periodic regulation of *Mesp2* expression remain elusive.

In this study, I have employed high resolution fluorescent in situ hybridization in conjunction with immunohistochemical methods to analyze sections derived from single specimens. These methods have enabled me to determine the spatio-temporal relationship among several factors involved in mouse somitogenesis. Initially I show that the timing of *Mesp2* expression is determined by the periodic waves of Notch activity, indicating the temporal link between Notch signal oscillation and *Mesp2* transcription cycle. Next, I find that *Tbx6* defines the anterior limit of *Mesp2* expression domain by serving as an important transcription activator. Intriguingly, *Mesp2* mRNA initially shares an identical anterior border, but that once translated, the *Mesp2* protein is found to suppress *Tbx6* expression post-translationally. This was strongly supported by the fact that *Tbx6* protein expression was expanded to the anterior somitic region in the *Mesp2*-null embryo without altering expression pattern of the transcript. The negative regulation of the *Tbx6* by *Mesp2* is critically important to set up the next anterior border of *Mesp2* expression domain. These results indicate that interactions of three factors, *Mesp2*, *Tbx6* and Notch activity are critically important to translate temporal information to the spatial patterning. I also find that onset of *Mesp2* transcription is intimately linked with the initiation of Notch signal oscillation, indicating that the relationship of three factors appears to be established in the early stage embryo via initial Notch oscillation. I further show that the lack of FGF signaling results in the posterior shift of *Mesp2* expression domain, indicating that FGF signaling provides a spatial cue to position the posterior border of *Mesp2* expression.

Furthermore, to reveal the mechanism of post-translational *Tbx6* suppression downstream of *Mesp2*, I tried to determine the domain of *Tbx6* protein that was required for the suppression process. I generated transgenic mice harboring several types of *Tbx6* protein that had truncation in several domains, under the control of endogenous promoter and enhancers of *Tbx6* using a BAC-base transgenic mouse technology. These results indicate that the T-box domain containing a DNA-binding motif, is essential and sufficient for the suppression of *Tbx6* expression. In good agreement with these results, I find that *Mesp2* also suppresses the expression of *Brachyury*, the other T-box factor protein, by the post-translational mechanism.

Taken together, I conclude that *Mesp2* is the final output signal by which the temporal information from the segmentation clock is translated to the segmental patterning, and reciprocal regulation between *Mesp2* and *Tbx6* creates the periodic pattern during somitogenesis.

脊椎動物の体節は、発生期に均等な大きさの細胞塊として形成され、脊椎骨などの繰り返し構造の基盤となる組織である。マウスの体節前駆体細胞は、未分節中胚葉と呼ばれ、胚の後部末端（尾芽領域）から産出される。体節は未分節中胚葉の前側から順々に、2時間という周期性をもって、均等な大きさに分節化されることによって形成される。このような過程をたどる体節形成は、厳密な時間制御を受ける現象であり、分節化の時間的周期性が体節の空間的周期性に転換されることにより成立すると考えられる。

体節の正確な時間制御は、体節時計と呼ばれる遺伝子の発現が未分節中胚葉で、一定時間ごとに振動し、リズムをとることによってなされている。この体節時計の中心は Notch シグナル伝達系であり、Notch シグナルの活性化状態が細胞内で一定時間ごとにオン・オフを繰り返し、リズムを刻んでいる。しかし、体節時計（Notch シグナル）が正確にリズムを刻むだけでは、周期的な分節を行うことはできない。そのためには、体節時計が持つ時間情報を体節の空間的パターンに変換する仕組みが必要である。現在、bHLH 型転写因子 *Mesp2* は、この過程に非常に重要な役割を示すと考えられている。*Mesp2* のノックアウトマウスでは、体節の分節境界が形成されない。また、*Mesp2* 遺伝子は一つ一つの体節が形成される直前に一過的な発現を示し、未分節中胚葉の前方部で発現のオン・オフを繰り返す。このような特徴的な発現の制御機構を明らかにするために、体節特異的なエンハンサーが同定され、そのエンハンサー配列には T-box 転写因子 *Tbx6* が直接的に結合し、Notch シグナルと協調的に *Mesp2* の転写を誘導する事がこれまで示されていた。しかし、これらの研究は培養細胞を用いた実験が主であり、実際の組織・体節形成過程におけるダイナミックに変動する *Mesp2* の発現制御機構は明らかにされていなかった。したがって、時間的周期性を空間的周期性に変換する仕組みに *Mesp2* 遺伝子がどのような働きをするかは不明であった。

荻沼君は、この問題に取り組むために、*Mesp2* のエクソン及びイントロンプロンプを用いた高感度 RNA-ISH 法と免疫組織学法を組み合わせ、マウス発生胚を用いて組織レベルで *Mesp2* の時空間的な転写状態と他の遺伝子の発現との相関について正確に可視化する実験系を構築した。この系を用いた実験の結果、*Mesp2* 遺伝子の発現するタイミングは、体節時計の中心である Notch シグナルの波に依存し、*Mesp2* 遺伝子発現の前方境界は転写因子 *Tbx6* の発現ドメインによって決まることが分かった。さらに興味深いことに、*Tbx6* は *Mesp2* の転写を誘導するが、一方、誘導された *Mesp2* によってタンパク質レベルですみやかに分解されることが明らかとなった。そして、このような相反的な制御機構が、次節に発現する *Mesp2* の発現境界を決めることが分かった。さらに、FGF シグナル下流遺伝子の発現との相関解析により、*Mesp2* の後方発現境界は FGF シグナルによって決まることが示唆された。これらの実験から、荻沼君は、*Notch*, *Mesp2*, *Tbx6* の三つの遺伝子間の相互制御が時間周期性と空間周期性をカップリングするための鍵となるシステムであるというモデルを提示した。

荻沼君は、さらに引き続いて、*Tbx6* が *Mesp2* によりタンパク質レベルで分解される機構に迫るため、*Tbx6* の分解に必要なドメインの同定を試みた。そのために、BAC

modification のシステムを駆使して様々なドメインを欠いた *Tbx6* 遺伝子を構築し、それらを導入したトランスジェニックマウスを作製して解析した。その結果、*Tbx6* の分解には DNA 結合ドメインを含む T-box が必要十分であることがわかった。また、これらの結果と対応して、未分節中胚葉で発現する他の T-box 転写因子である *Brachyury* も *Mesp2* によってタンパク質レベルで分解されることが分かった。

以上の荻沼君の一連の研究により、*Mesp2* は、マウスの体節形成において、体節時計が作り出した時間情報を、空間的なパターンに変換する出力機構として働いており、周期的な体節形成に重要な役割を持っていることが明らかとなった。この研究は、脊椎動物の体節形成の制御機構の解明に大きく貢献するものとして高く評価できる。