

氏 名 大久保 佑亮

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1347 号

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 24 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 The coupling mechanism to generate synchronized
oscillation of segmentation clock in mouse

論文審査委員 主 査 教授 城石 俊彦
准教授 木村 暁
准教授 平田 たつみ
教授 広海 健
教授 武田 洋幸（東京大学）

The body of vertebrate is composed of many repeated structures such as vertebrae, ribs, skeletal muscles and subcutaneous tissues. These are based on transient metameric structures, called somites, which are produced sequentially at certain spatiotemporal intervals in an anterior to posterior sequence concomitant with the posterior elongation of presomitic mesoderm (PSM). The periodicity is regulated by a segmentation CLOCK which undergoes the oscillation of Hes gene expression under the control of Notch signaling within a cell. The traveling wave of the CLOCK is observed from the tail bud region and stops in the anterior PSM where a new somite is generated. This waved pattern is generated by the change of gene expression in each cell and not by cell movement. If CLOCK oscillates among individual cells without synchrony, the waved pattern will not be generated. Thus, it is required for the additional mechanism which works in non-cell-autonomous manner to synchronize CLOCK phase among neighboring cells.

In zebrafish, a CLOCK and its synchronization mechanism has been well understood. A coupled oscillator model was proposed to link these two phenomena; it has been explained that 1) INPUT receives OUTPUT from neighboring cells, 2) Effectors of the CLOCK are activated by the INPUT and operate as CLOCK components, 3) OUTPUT transmits information reflecting the own CLOCK phase to neighboring cells, therefore, they correct their CLOCKS each other by coupling their CLOCKS. In zebrafish somitogenesis, it was demonstrated that INPUT is Notch signaling from Notch1a, the CLOCK is Her1/7 that shows oscillation via negative feedback mechanism and OUTPUT is DeltaC oscillation controlled by Her1/7.

However it has been difficult to reveal synchronization mechanism in mouse somitogenesis because CLOCK itself disappears in the simple gene-knockout (KO) mouse that lacks function of Notch signaling, since Notch signal is a core component of the CLOCK. Furthermore, the segmentation CLOCK components involved in the regulation are more complicated in mice compared with zebrafish. In the mouse PSM, Lfng a glycosyltransferase that is not implicated in zebrafish, oscillates upon activation by Notch activity and repression by Hes7, and acts as a negative regulator for Notch signaling via modifying Notch1 receptor. Hence, the cyclic expression of Lfng makes a Notch signal oscillation as a segmentation CLOCK.

To reveal the mechanism to generate synchronized CLOCK oscillation in mice, I first examined Dll1 expression pattern that works as an OUTPUT in zebrafish. The results that Dll1 transcripts slightly oscillated in the PSM but its protein did not show clear oscillation indicate that the OUTPUT mechanism of the coupling in mice is different from that of zebrafish. Next, I performed mosaic embryo analyses to clarify the synchronization mechanism. The mosaic analysis using wild-type and KO cell is a powerful method to ask the mechanism involved in the cell-cell communication. I conducted two types of mosaic embryo analyses using Dll1-null and Lfng-null cells. If the coupled oscillator model via Notch signaling is utilized to generate the synchronized CLOCK oscillation in mouse somitogenesis, it is thought that INPUT is Notch

signaling through Notch1 receptor, the CLOCK is the oscillation of Hes7 and OUTPUT is an unknown factor through a transmitter Dll1. In Dll1-null mosaic embryos, Dll1-KO cells do not have Dll1 which acts as a transmitter of the CLOCK to transmit the own CLOCK state to neighboring cells but they have Notch1 (receiver). Therefore, I expected that Dll1-KO cells must show incomplete coupling with neighboring wild-type cell, but, should not interfere synchronized oscillation of the CLOCK among wild-type cells because Dll1-KO cells cannot transmit signals. I found that the CLOCK showed abnormal pattern in Dll1-null mosaic embryos, however, it exhibited synchronized oscillation in some degree. Therefore, the reduction of coupling cells may have caused abnormal CLOCK pattern. On the other hand, the CLOCK synchronization will be disrupted in the Lfng-null mosaic embryo if Notch signal regulates synchronized CLOCK oscillation through a coupling mechanism as zebrafish and if Lfng is involved in the coupling mechanism. Lfng-null mosaic embryos showed severer defect in the synchronized CLOCK oscillation compared with the Dll1-null mosaic embryos. These results suggest that the Notch signal also exhibits dual roles in the CLOCK and its synchronization through the coupling mechanism as in the case of zebrafish. Surprisingly, Lfng KO cells in Lfng-null mosaic embryos showed either positive or negative Notch activity. This result was unexpected since Notch activity should be up-regulated in the absence of Lfng as expected from the analysis of Lfng KO embryo. Therefore, the Notch activity oscillation in Lfng KO cells in Lfng-null mosaic embryos must be caused by the presence of wild-type cells that have functional Lfng. These results suggest that Lfng works on Notch signaling via not only *cis* but also *trans* regulation mechanisms and Dll1 activity might be regulated by Lfng. Accordingly, I explored in detail the role of Lfng in the Notch signaling by co-culture experiments using Notch signal reporter luciferase assay. The results indicate that Lfng alter the Notch signaling activity by modifying Dll1 and Notch1.

In this study, I propose a new coupling mechanism to generate synchronized oscillation of segmentation CLOCK in the mouse. It is possible to consider that Lfng can work as the OUTPUT which retains/reflects CLOCK phase information and alters Notch signaling to synchronize CLOCK phase among neighboring cells through the coupling mechanism. Therefore, in mouse somitogenesis, it is required five elements for the coupling mechanism, 1) INPUT; Notch signaling, 2) CLOCK; the oscillation of Hes7 expression, 3) OUTPUT; Lfng expression reflecting CLOCK phase information, 4) transmitter; Dll1 and 5) receiver; Notch1. In mice, expressions of both Dll1 and Notch1 are not regulated by the CLOCK.

博士論文の審査結果の要旨

脊椎動物の胚性期に一過的に形成される体節は、周期性を持つ構造である。この周期性は遺伝子の発現振動に基づく Segmentation Clock によって調節されており、Clock の波が次の体節形成境界に達したときに新たな体節が形成される。Clock の波の形成には、個々の細胞の Clock が同調して振動する必要があると考えられている。このためには、体節の局所領域の細胞集団で Clock を同調させる機構が想定されている。ゼブラフィッシュでは、Clock と遺伝子発現振動の同調をリンクさせる機構として、Notch signal を介した“Coupled oscillator model” が提唱されている。それは、三つの構成要素から成る。1) DeltaC により活性化された Notch1a signal が INPUT として作用する。2) Notch signal は Her1/7 の転写を活性化し、それらは自身に対して Negative-feed back を形成することで Clock として働く。3) Her1/7 によって抑制される DeltaC の発現は Clock の状態を反映して振動し、Clock の OUTPUT として周囲の細胞の INPUT を活性化する。以上により、細胞集団の Clock は同調する。マウス体節形成では、Notch1 を修飾して Notch signaling を変化させる Lfng が振動し、Clock 形成に重要な役割を果たしていることが知られている。この複雑な Clock の構成要素のため、マウス体節形成での Clock の同調化機構は未だに明らかになっていない。

大久保君は、本論文においてマウス体節形成において Clock の同調化機構を明らかにする目的で実験を行った。まず、最初に、ゼブラフィッシュで OUTPUT として働く DeltaC のマウス相同遺伝子 D111 の発現パターンを調べた。その結果、D111 の転写産物とタンパク質量は明確な振動を示さなかった。したがって、マウスとゼブラフィッシュでは Clock の同調化における OUTPUT の機構が異なることが示唆された。次に、マウス体節形成においても、Notch signaling が Clock を形成するだけでなく、同調化機構を介して Clock の振動を同調させているかどうかを調べた。Notch signal は Clock の中心的な構成要素であるため、その関連因子の単なる gene-knockout (KO) では Clock 自身まで消失してしまい、Clock の同調化機構を解析することができない。そこで、D111 あるいは Lfng の null 細胞と野生型細胞のモザイク胚解析を行い、Clock とその同調性について、それらの遺伝子の non-cell-autonomous な働きに着目して解析した。その結果、両遺伝子のモザイク胚で Clock の同調性は乱れたが、Lfng のモザイク胚での乱れはより顕著であった。さらに、Lfng モザイク胚での Lfng KO 細胞は、Notch 活性のあるものと無いものが観察された。これは周囲の Lfng の野生型細胞のトランスの影響と考えられた。以上の結果は、マウスでは Notch signal の修飾因子でありその発現が振動している Lfng が OUTPUT として働く可能性を示している。そこで、Lfng の OUTPUT としての機能を調べるために、co-culture 系を用いた Notch signal reporter luciferase assay を *ex vivo* で行った。その結果、Lfng は D111 と Notch1 を共に修飾することで Notch signaling activity を変化させ、non-cell-autonomous に振動を同調するための OUTPUT として作用し得ることが示された。

本論文は、これまで不明であったマウス体節形成における Clock の同調化機構に、Lfng の non-cell-autonomous な働きが大きな役割を持っていることを明らかにし、その機構の

解明を大きく前進させるものである。審査員全員で、本論文は総合研究大学院大学の学位授与の水準に達していると判断した。