

氏 名 WANGLAR, Chimwar

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1729 号

学位授与の日付 平成26年9月29日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 STUDY OF MOLECULAR INTERACTIONS UNDERLYING  
SOMITE BOUNDARY POSITIONING IN ZEBRAFISH

論文審査委員 主 査 教授 藤森 俊彦  
教授 高田 慎治  
准教授 田中 実  
教授 相賀 裕美子

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

Somitogenesis is the sequential formation of epithelial blocks of structures called somites at the anterior pre-somitic mesoderm in vertebrates, in an anterior to posterior direction. Somites are precursors to vertebrae, skeletal muscles, etc and are arranged on both sides of notochord. A “Clock and Wavefront” model is used to explain the complex mechanism of somite generation. A certain clock, controlled by the Notch/Delta signaling pathway, activates oscillating genes from posterior towards the anterior pre-somitic mesoderm, where the temporal information of the clock is converted to spatial patterning by the activation of genes such as *Mesp*. This region is defined by the wavefront of FGF signaling, where a subset of cells are released from FGF signaling and become responsive to Notch signaling leading to formation of the presumptive somite boundary.

Previous studies with mouse embryos revealed that the presumptive somite boundary is periodically created at the anterior border of the expression domain of Tbx6 protein at the anterior PSM. This Tbx6 anterior domain is also important for *Mesp2* activation, and subsequent degradation of this domain is important for proper positioning of the somite boundary. *Ripply1* and *Ripply2* are required for the determination of the Tbx6 protein border as mouse defective of *Ripply1/2* genes showed anterior expansion of Tbx6 protein expression. *Ripply* deficient embryos also showed increased expression of *Mesp2*, indicating *Ripply1/2* may act downstream of *Mesp2* in Tbx6 protein degradation. These findings indicate that *Ripply1/2* are more direct mediators of Tbx6 degradation than *Mesp2*. However, the mechanism by which this Tbx6 domain is regulated remains unclear. Interestingly, studies in zebrafish and frog showed that *Ripplys* are able to suppress Tbx6 function at the transcription level, raising questions whether *Ripply*-mediated mechanism of Tbx6 regulation is

conserved among different species.

In this study, to test the generality of Tbx6 protein-mediated process in somite segmentation and to further examine the mechanism of regulation of Tbx6 protein, antibody against zebrafish Tbx6/Fss, previously referred to as Tbx24, was generated. Consistent with the findings in mice, the anterior border of Tbx6 domain also coincides with the presumptive somite boundary and the *tbx6* mRNA domain was located far anterior to its protein domain, indicating the possibility of post-transcriptional regulation. Interestingly, the anterior Tbx6 domain showed periodic expression with a temporary upper band, which coincided with the *mesp* expression, indicating Tbx6 is also important for *mesp* expression. When *rippy1* was knockdown using morpholinos, somite boundaries were lost and Tbx6 protein expression domain was expanded anteriorly, but in a graded manner. In contrast, no significant phenotype and no expansion of Tbx6 domain were observed in *rippy2* single morphants. However, when both *rippy1* and *rippy2* were knockdown, somite boundaries disappear similar to the *rippy1* single morphants, but the Tbx6 domain was ubiquitously expanded anteriorly, indicating the redundancy in the function of *rippy1* and *rippy2*. The *tbx6* mRNA was also expanded but not so severely as the Tbx6 protein.

I further demonstrated that Ripply could directly reduce the expression level of Tbx6 protein by co-injecting either zebrafish or mouse *Tbx6* mRNA with zebrafish or mouse *Ripply* mRNA into zebrafish embryos and detecting the protein level. This Tbx6 reduction depends on physical interaction between Ripply and Tbx6, as zebrafish *Ripply1* mutated at FPVQ amino acid site or mouse *Ripply2* mutated at FPIQ site, important for interaction with Tbx proteins, failed to co-immunoprecipitate with either zebrafish or mouse Tbx6.

In mouse, *Mesp2* is required for expression of both *Ripply2* and *Ripply1*, so I

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

speculated the possibility of similar regulation or *rippy* in zebrafish. Using the hsp-Gal4/UAS-*mesp-ba* transgenic line, I over expressed *mesp-ba* and analyzed the expressions of *rippy1* and *rippy2*. Interestingly, no significant change was observed in *rippy2* expression, however, *rippy1* was highly upregulated at least at the anterior pre-somitic mesoderm and somite regions, but not posteriorly. In addition, anterior domain of Tbx6 was highly reduced. This reduction was rescued when *rippy1* and *rippy2* were both knockdown in these embryos, suggesting that *mesp* mediates *rippy* reduction of Tbx6. Expectedly, the onset of *rippy1* and *rippy2* expression occurred after reduction of FGF signaling at the anterior PSM in normal zebrafish embryos, but this expression was initiated much earlier in embryos treated with SU5402, an FGF inhibitor, indicating FGF is required for posterior inhibition of *rippy*.

My study, for the first time, reveals the expression patterns of zebrafish Tbx6 protein, and the importance of the Tbx6 anterior domain for somite boundary positioning in zebrafish. Most importantly, I showed that Ripply is a direct regulator of the Tbx6 reduction at the protein level, and this reduction is mediated by *mesp*. However, *mesp* is not sufficient to induce *rippy* unlike mouse, indicating some other factor apart from *mesp* may be involved in somite boundary formation in zebrafish.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

脊椎動物のからだの基本骨格ができる過程では、体節と呼ばれる分節状の組織が神経管の両側に数珠状に列をなして作られる。体節は沿軸中胚葉由来の組織であり、そこからは脊椎骨、骨格筋、真皮などが発生する。体節は体軸の後端にある未分節中胚葉から一定の時間間隔で形成されることが知られており、このような周期的な体節形成には、時間の周期性を生み出す分子時計（分節時計）とともに、分子時計により生み出された時間周期の情報を体節という空間周期性を持つ形態に変換する機構が必要であることがわかっている。この時間周期から空間周期への変換は未分節中胚葉の前方側で起き、ここでは分節時計の時間情報をもとに bHLH 型転写制御因子 *Mesp* を含む一連の分子経路が周期的に活性化され、一定の時空間間隔により体節が形成されると考えられている。

本研究では、時間周期から空間周期への変換機構の理解を進めるために、遺伝学的解析や胚操作が比較的容易であり体節形成機構の研究に広く用いられているゼブラフィッシュに着目した。マウスにおいては *Tbx6* タンパク質発現領域の前方端が将来の体節境界の位置を規定することが示されており、この境界が体節形成周期ごとに1体節分の幅で後方に移動することにより、体節境界の位置が順次決まって行く。申請者はゼブラフィッシュの *Tbx6* に対する抗体を独自に調製し、ゼブラフィッシュにおいても基本的にはマウスと同様に *Tbx6* タンパク質による体節境界の規定が起きるものの、*Tbx6* タンパク質パターンの変化にはゼブラフィッシュに固有の部分もあり、それが体節の頭尾軸に沿った極性形成に関わることを示唆した。さらに、この *Tbx6* タンパク質の変動にはアダプター因子である *Ripply1* と *Ripply2* が必要であることをアンチセンスモルフォリノを用いた機能阻害実験により明らかにした。そこで、*Ripply1* が *Tbx6* タンパク質の発現レベルを実際に制御し得るのかを調べるために、ゼブラフィッシュ受精卵に各々の mRNA を顕微注入したところ、*Ripply1* 依存的に *Tbx6* タンパク質の量の低下が認められた。この *Ripply* 依存的な *Tbx6* タンパク質の量の低下には、両者の直接の相互作用が必要なことが明らかになり、未分節中胚葉前側で体節形成周期に依存して誘導される *Ripply* の発現が体節境界の位置の決定に重要であるものと考えられた。そこで、*Ripply* の発現を制御する因子として *Mesp* に注目して両者の関係を検討した。マウスにおいては *Mesp2* が *Ripply* の発現には必要であるのに対し、ゼブラフィッシュにおいて熱ショックタンパク質プロモーターにより *mesp-ba* 遺伝子を強制発現させても *Ripply2* の発現は変化せず、*Ripply1* も未分節中胚葉後側では発現誘導が認められなかった。*Ripply* の発現と FGF 活性との比較ならびに FGF シグナルの阻害剤を用いた実験から、未分節中胚葉前側での *Ripply1* の発現誘導には FGF 活性の低下が必要であることが示された。以上の結果から、ゼブラフィッシュの体節形成過程においては、まず分節時計の働きかけと未分節中胚葉前方部で起きる FGF シグナルの低下によって *Ripply1* と *Ripply2* の発現が誘導され、それが *Tbx6* タンパク質の発現低下を引き起こして新たな *Tbx6* タンパク質の前方境界を規定するという一連の分子機構が周期的に引き起こされることにより、体節の境界位置が一定の時間周期とともに順次決定されて行くというモデルが提唱された。

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

なお、本研究の主要な成果については 1 報の論文にまとめられ、国際的な学術雑誌への発表が既に受理されている。

以上、本研究はゼブラフィッシュにおける **Tbx6** タンパク質と **Ripply** の発現制御機構をそれぞれ明らかにすることで、体節の境界位置が一定の時間周期のもとで逐次作られて行く分子機構についての理解を進めたものとして高く評価できる。