

## 結合振動系としての分節時計 - ゼブラフィッシュを用いた解析

武田洋幸\*

### The 'coupled-oscillators' in the zebrafish segmentation clock

Hiroyuki Takeda

**Abstract** The most unique feature of vertebrate segmentation is its strict periodicity which is governed by the segmentation clock consisting of numerous cellular oscillators. These cellular oscillators, driven by a negative-feedback loop of Hairy transcription factor, are linked through Notch-dependent intercellular coupling and display the synchronous expression of clock genes. Combining our transplantation experiments in zebrafish with mathematical simulation, we have examined how the cellular oscillators maintain the synchrony and how they form a robust system against developmental noise such as stochastic gene expression and active cell-proliferation. Accumulated data demonstrated that the segmentation clock behaves as a 'coupled oscillators', a mechanism that is used for a synchronous flashing of fireflies.

**Key words** : somitogenesis, zebrafish, oscillators, clock, Notch

脊椎骨のような繰り返し構造の創出過程では、リズムを空間的パターンに変換する機構が存在する。私たちはその代表例として体節形成に注目している。体節は発生過程で一時的に見られる構造だが (Fig. 1a)、脊椎骨や肋骨など体節由来の組織のみならず、脊髄神経や血管など、他の器官の分節的構造の分節性を規定している。複雑なメカニズムのため、自然の状態や養殖の現場でも分節性がおかしくなった奇形や突然変異は多く見かける。背骨が融合したり、湾曲した魚である。

体節は、中胚葉性の細胞が体の後端にある尾芽から生み出されると同時に、前方に押し出され、ある一定の時間 (マウスでは 120 分) 毎に、一定の (空間的) 間隔で頭部側からくびれ切れていくことで順次形成される。このように時を刻むように正確に進んでいく体節形成は、時計のような機構、即ち分節時計が必須である。そして、近年その存在と分子メカニズムが明らかとなってきた。分節時計とは、未分節中胚葉 (presomitic mesoderm, PSM) 内に存在する小さな時計細胞の集合体である。個々の時計細胞内では、いくつかの遺伝子が一定のリズムで発現の ON/OFF を繰り返す。

最近の研究により、分節時計を構成する遺伝子群 (構成要素) は、転写因子ヘアリ (Hairy) を中心とするノッチ (Notch) シグナル関連遺伝子であることが判明している。さらにそれぞれの遺伝子に変異を起こした個体では、分節時計が正常に機能しないことも示されている (Rida et al., 2004)。しかし、このような遺伝学的、分子生物学的な手法では解明できない重要な問題が残されている。それは、固有に振動する時計細胞を集団内でどのように同調しているか、また生体内で生じるノイズをどのように軽減して正確に時を刻み続けるか、という分節時計の作動原理とも言える問題である。我々は、ゼブラフィッシュ胚において改変した細胞を正常な胚へ移植すること、そしてその結果をシミュレーションで検証することでこの問題に取り組んだ。

2008 年 4 月 23 日受理 (Received on April 23, 2008)

\* 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻動物学大講座動物発生学研究室 113-0033 文京区本郷 7-3-1

(Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of TokyoHongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033 Japan)

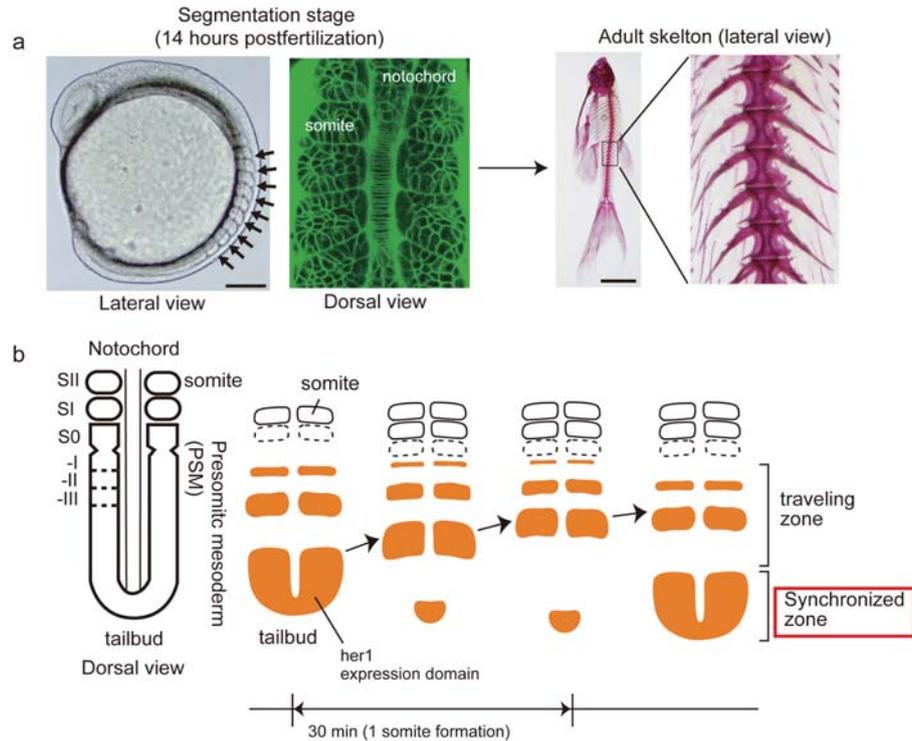


Fig. 1. Somitogenesis and segmentation clock in zebrafish

a, lateral and dorsal views of zebrafish embryos (left). Somites give rise to the repeated axial skeleton in adult. b, Schematic diagrams illustrating expression profile of the *her1* gene (orange) in the PSM.

### 分節時計の構成要素

分節を制御する時計遺伝子として最初に発見されたのが、1997年にニワトリで単離された *c-hairy* (ヘアリ)-1 という bHLH 型転写因子である (Palmeirim et al., 1997)。この発見以降、時計関連遺伝子が次々に他の脊椎動物でも同定された。興味深いことに、それら多くがノッチシグナル関連因子であった。本研究の対象であるゼブラフィッシュ胚では、分節は30分に1回のペースで起こる。それに伴い、尾芽領域で30分に1回、ゼブラフィッシュのヘアリ遺伝子である *her1* の発現メインが現れる (Fig. 1b) (武田洋幸, 2002) (Holley and Takeda, 2002)。*her1* 発現領域はPSMの後半1/4程度を占めるが、その発現領域はその後、前後の幅が狭くなりながら前方に移動して、将来の分節位置で停止する。詳しい発現解析の結果、最初に発現が現れるPSMの後半1/4では、ほぼすべてのPSM細胞が同時に *her1* 発現のON/OFFを繰り返す同調的振動を示し、一方その前方では、発現領域が移動波を形成し前方へ移動していることが判明した。

最近開発された高解像度 *in situ* hybridization 法でRNAの局在を同調振動ゾーンで観察すると、Fig. 2aのように、① *her1* mRNA 陰性、②核で転写開始(核

でアレルに対応した2つの点状のシグナル)、③ mRNA が翻訳のために細胞質に移動、の3つの状態をほぼすべての細胞が同調的に繰り返していることが視覚的に明らかになった。我々はこの最も基本的な同調振動に注目しその同調メカニズムを以下で解析した。

ゼブラフィッシュの時計細胞(PSM細胞)における振動機構について、遺伝学的解析によりFig. 2bのようなモデルが提案されている。このモデルでは、他の脊椎動物同様にヘアリ遺伝子である *her1* のネガティブ・フィードバックループがコアとなり、さらにヘアリ転写因子はノッチ受容体のリガンドであるデルタ遺伝子 (*delta*) の発現も抑制している。一方、PSM細胞間にはノッチ・デルタを介して共役している。これはかなり単純化しているモデルであるが (Lewis, 2003)、我々は名古屋大学・近藤滋研究室と共同で、10個から30個のPSM細胞がノッチ・デルタを介してリニアに結合したシミュレーターを作成し、同調振動ゾーンにおける同調的振動を再現することに成功した。このシミュレーターを用いて、以下に述べる移植実験の検証およびシミュレーターの予測の *in vivo* での検証を行い、分節時計の作動原理を明らかにした。シミュレーターの詳しい記述は文献 (Horikawa et al., 2006) の supplement を参照。

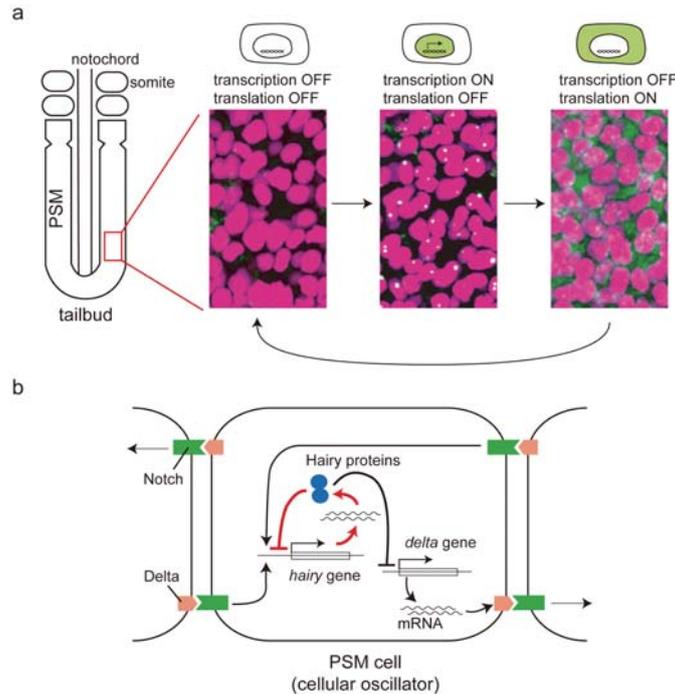


Fig. 2. Cellular oscillators in the zebrafish segmentation clock.

a, High resolution in situ hybridization detects subcellular localization of *her1* mRNA. The PSM cells display a cycle of no signal (left), nuclear dots (middle) and cytoplasmic signals (right). The posterior PSM exhibit synchronous oscillation.

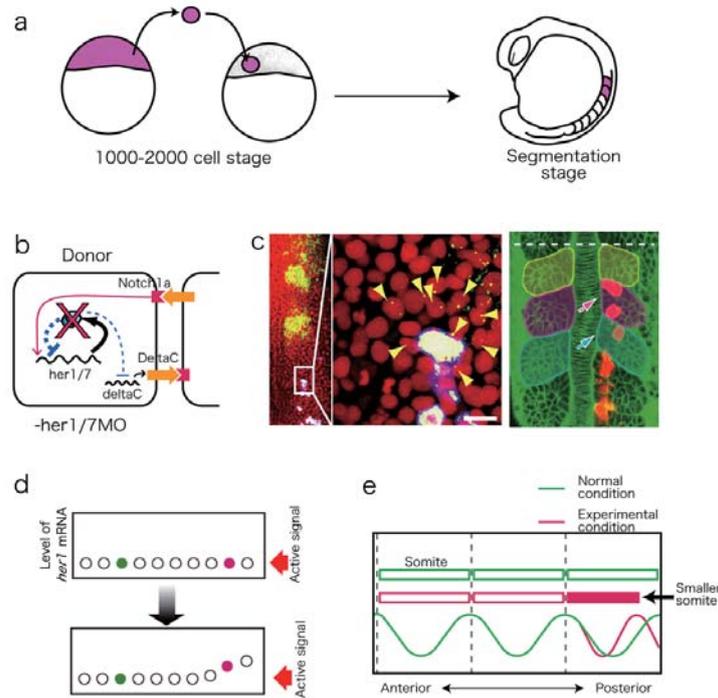
b, The negative feedback-loop of Hairy lies at the core of the cellular oscillator.

### デルタ強制発現細胞による分節時計の加速

仮に Fig. 2b のような機構が時 PSM 細胞の内外で働いているとすると、正常に時を刻んでいる分節時計内に少数のデルタ強制発現細胞を移植した場合、その影響が周囲の正常な細胞に及び、分節時計の位相に変化が見られるはずである。このような仮説を検証するために、Fig. 3a のような移植実験を行った。デルタ強制発現細胞は、ヘアリの翻訳をアンチセンスモルホリノオリゴヌクレオチド (MO) を注入して阻害した胚から得た。ヘアリはデルタ遺伝子の発現を抑制するので、ヘアリの機能を喪失した細胞では、デルタ遺伝子の発現が恒常的に上昇している。つまりこの細胞は、自分自身は振動せずに周囲の PSM 細胞に対してノッチ受容体を活性化するシグナルを恒常的に送っていると考えられる (Fig. 3b)。ドナー細胞であるデルタ強制発現細胞を宿主の胞胚 (受精後 4 時間) の将来体節を形成する領域に移植し、観察は宿主胚が体節を形成する受精後 14 時間頃に行った。

移植結果は非常に興味深いものであった。Fig. 3c は、移植実験の結果の一例を示している。多くの場合 (91/96)、ドナー細胞が存在する PSM で体節境界が対照側に比べて前方へシフトしていた。さらに分節境界のシフトは、移植側の PSM における *her1* の周期的発

現が加速された結果であることが判明した。デルタを恒常的に発現するドナー細胞が正常に機能している分節時計を加速させたことは確かであるが、この結果は Fig. 2b のモデルが *in vivo* で機能していることの反映であろうか？このことを確かめるために、我々の分節時計シミュレーターにデルタを恒常的に発現する仮想的ドナー細胞を置く実験を *in silico* で行った。その結果、仮想的ドナー細胞に隣接する PSM 細胞で発現振動が加速されるのが観察された (Fig. 3d, e)。これは、まさに我々が移植実験で得た結果と同じであった。つまり、Fig. 2b のモデルを基にしたシミュレーターは、分節時計の正常な同調振動を再現するだけでなく、外からの刺激に対して反応する様子まで正確に予測できたのである。これらの結果より、分節時計では、ヘアリ転写因子自身のネガティブ・フィードバックループを振動子のコアとし、ヘアリの制御下で周期的に発現変動するデルタを介して周囲の細胞を同期していることが示された。これは、物理・化学の現象でよく見られる、いわゆる結合振動計 (coupled oscillators) そのものであり、生物現象である分節時計が一般的な coupled oscillators としてふるまっていることは、我々にとって驚きであった。実はホタルの発光同期もこの原理が使われている。



**Fig. 3.** Notch-dependent intercellular communication in the segmentation clock

a. Cell-transplantation assay at the blastula stage.

b. Donor cells that constitutively expresses DeltaC due to morpholino-knockdown of Her.

c. Effects of *her*-MO cells on transcription of *her1* (left) and segmentation points (right). The timing of *her1* transcription is locally advanced in the area near to the explants in the posterior PSM. Nuclei, *her1* mRNA and explants are stained in red, green, and blue, respectively. Arrowheads indicate nuclear-*her1*-cell, whose phase is advanced by the transplant. This effect results in a segment-shift phenotype. The segment positions are anteriorly shifted on the transplanted side (arrows). Donor cells are in red and the dashed line indicates the last normally formed segment border. Bar, 20  $\mu$ m.

d. 1-D simulation of oscillating PSM cells (dots). Snap shots of the calculated results in the 1<sup>st</sup> (up) and 10th-round of oscillation (down) are shown. Actively signaling cell is represented as red arrow. The active signal from the transplanted cell influences the adjacent cell to accelerate the oscillating phase (13.4% of oscillation phase after 500 min.). This effect is transmitted in succession, and results in the phase-shift of relatively distant cells, although the effect is still locally limited.

e. The smaller somite (red solid box) is formed by the accelerated oscillation (red line). The spatial pattern of clock oscillation (lines at the bottom) is translated according to the clock-and-wavefront mechanism.

### 分節時計内に存在するノイズと補正機構

生体内での遺伝子発現は化学反応を反映したものであり、従ってそれ自体 stochastic である。つまり、正確に時を刻む時計細胞であっても、遺伝子発現の ON/OFF のタイミングは微妙にずれているはずである。高解像度 in situ hybridization で *her1* 遺伝子の転写タイミングを細胞レベルで精査とすると、すべての細胞が同調していることが期待される同調振動ゾーンであっても、数%の非同調細胞が常に存在していることが判明した。さらに発生中の胚では、遺伝子発現のタイミングを狂わす大きな要因が存在する。それは高頻度の細胞分裂である。一般に分裂中の細胞核ではクロマチンが凝縮し、転写が抑制される傾向がある。実際

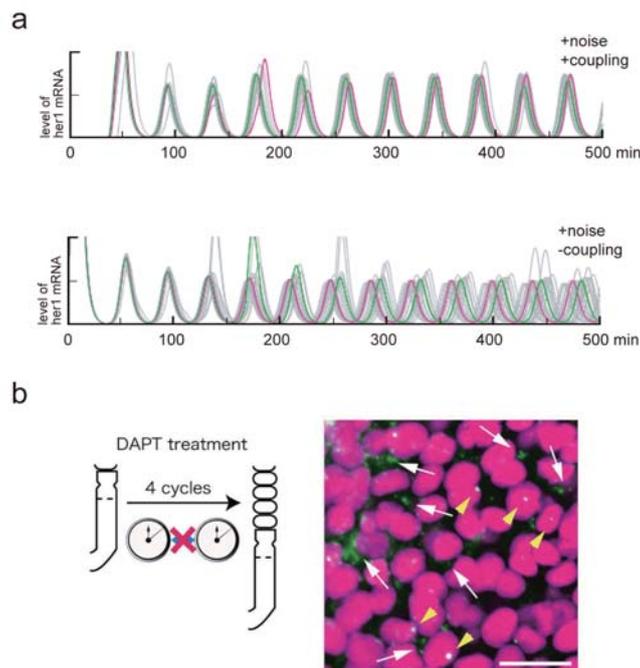
ゼブラフィッシュ胚では、一回の分節期間 30 分の間に実に 10-15% の PSM 細胞が分裂を経験しており、このような高頻度の細胞分裂は分節時計に対してノイズとして大きな負荷を与えていた。

分節時計は生物が必然的に持つ様々なノイズを内包していることが判明した。それにもかかわらず、分節時計は長い期間正確に時を刻み続けなければならない。このことは分節時計内にノイズを効率よく軽減し、同調振動を維持する機構が存在していることを示唆している。ここで我々が注目したのが、同調機構でも登場したノッチ・デルタを介した共役である。ノイズとノッチ・デルタシグナルの関係を調べるために、in vivo での観察に基づいたノイズをシミュレーターに導入して、ノッチ・デルタによる共役が存在する条件

と非存在下で振動を行わせた (Fig. 4a)。すると、ノッチ・デルタを介した共役が存在すれば、一定のばらつき (ノイズ) を持った状態で定常的な同調振動が実現し、一方共役がない場合は、わずか数サイクルの振動で同調性が大きく損なわれることが判明した。前者は通常 *in vivo* で見られる同調振動の状態に酷似していた。シミュレーターによる後者の予測を *in vivo* で検証するために、我々は正常に発生している野生型胚をノッチシグナルの化学阻害剤 DAPT (ノッチ受容体のプロセッシングに必須な  $\gamma$ -セクレターゼの阻害剤) で一過的に処理した。すると、同調振動ゾーンにおいても、その同調性が低下して、非同調的振動を示す細胞の割合が著しく増加した (Fig. 4b)。この結果は、ノッチ・デルタを介した共役機構が、生体内で発生するノイズを効果的に軽減し、分節時計の持続的な同調振動を可能にしていることを示している。

## まとめ

今回の移植実験とシミュレーターを用いた一連の研究により、多数の振動子 (時計細胞) で構成される分節時計がノッチ・デルタを介して同調とノイズ軽減を行っていること、そしていわゆる *coupled oscillators* としてふるまっていることを見出した。一個の受精卵に端を発する発生では、その過程で①細胞増殖により個体のサイズを増大、と②多くの遺伝子の秩序だった転写・翻訳、を両立させなくてはならない。しかし、細胞分裂は、遺伝子の発現に“ずれ”をもたらす最も大きな要因の一つとなるため、美しいパターンを作るための正確な遺伝子発現を実現することへの障害となっている。こうしたノイズの影響を、からだ作りの遺伝子プログラムが積極的に排除している様子を今回はじめて垣間見ることができたと考えている。本研究で明らかになったようなノイズの最小化機構は、ほとんどの遺伝子プログラムにもともと備わっていると考えられる。



**Fig. 4.** Notch-dependent phase synchronization

a, *in silico* analysis. The noise condition observed *in vivo* is introduced. At time 0, all the cells in the array oscillate synchronously. Without the coupling (down), the phase of oscillation soon becomes random. However, with coupling (up), the cell array can maintain the coherent oscillation. The traces of 10 cells are superimposed.

b, Disrupted synchrony in 10-somite-stage embryos transiently treated with DAPT for 2 hours. A great number of cells becomes out of phase, with delayed (arrows) and advanced (arrowheads) phase, in the synchronized zone of the posterior PSM (compare with 1d1-3 in the normal PSM).

## 謝 辞

本総説で紹介した研究は、当研究室のスタッフであった堀川一樹博士（現北海道大学）を中心に、名古屋大学・近藤滋博士の研究室との共同で行われた。また、大学院生である石松愛（東京大学）、吉元英一（名古屋大学）氏の本研究への多大な貢献に感謝します。

## 文 献

- Holley, S. A. and Takeda, H., 2002: Catching a wave: the oscillator and wavefront that create the zebrafish somite. *Semin Cell. Dev. Biol.*, **13**, 481-418.
- Horikawa, K., Ishimatsu, K., Yoshimoto, E., Kondo, S. and Takeda, H., 2006: Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. *Nature*, **441**, 719-723.
- Lewis, J., 2003: Autoinhibition with transcriptional delay: a simple mechanism for the zebrafish somitogenesis oscillator. *Curr. Biol.*, **13**, 1398-1408.
- Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D. and Pourquie, O., 1997: Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell*, **91**, 639-648.
- Rida, P. C., Le Minh, N. and Jiang, Y. J., 2004: A Notch feeling of somite segmentation and beyond. *Dev. Biol.*, **265**, 2-22.
- 武田洋幸, 2002: 波と分節. 蛋白質核酸酵素, **47**, 2017-2023.