計画研究：2005 ～ 2009 年度

生体における分子振動メカニズム

●別所 康全　◆松井 貴輝
奈良先端科学技術大学院大学　バイオサイエンス研究科

＜研究の目的と進め方＞

ゲノム情報の解析から、遺伝子・生体分子の相互作用は複雑なネットワークを作っていることが明らかになっている。複雑なネットワークは、振動や波などの「動的な振る舞い」を引き起こす可能性があり、それが発生や神経回路網形成などの複雑な生命現象のキーになっているという理論的な予測がある。しかし、動的な変化の実験的な観測の難しさや、振動など動的変化の理解には計算機シミュレーションなどを使わざるを得ないことなどから、依然として分子レベルでの解明に至った例は無い。

脊椎動物の体節原基では、転写因子 Hes などの遺伝子発現の振動が観察されており、その振動自体が体節の等間隔パターンの形成に必須である。分子振動が形態形成に働くことが証明された初めての例であり、その分子レベルのメカニズムに注目が集まっているが、上述の理由などのためにその全体像は未だ明らかになっていない。我々はマウスの培養細胞においても体節原基でおきている振動と全く同じ周期の Hes の振動が起きることを発見し、さらに Hes のネガティブフィードバックループが、振動メカニズムのコアにあることを明らかにした。これらの実験系を用い数理的な解析を組み合わせることにより、生体における分子振動メカニズムの全容を解明したい。体節形成は分子振動を利用した形態形成のよいモデル系であり、分子の濃度勾配という連続した情報から、分子振動を利用して、不連続性を生みだす現象である（図 1）。この機構を上記の手法で明らかにする。

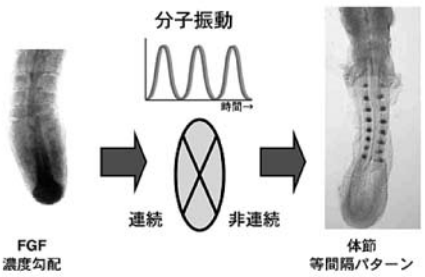

図 1

脊椎動物の体節が周期的に分節化されることによって、等間隔パターンとして形成されることは古くから知られていた。しかし、その周期性がどのようなしくみで決められているかは全く不明であった。しかし、1997 年に、Olivier Pourquie らのグループによって、体節原基である未分節中胚葉においていくつかの遺伝子の発現が振動していることが明らかにされ、体節形成を制御する “生物時計” が実在することが分子生物学的に強く示唆された。

その後、我々を含むいくつかのグループにより、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュなどの未分節中胚葉においてその発現が振動する遺伝子が複数同定された。その後、遺伝子発現の振動が発生のメカニズムが盛んに研究され、マウスにおいて我々のグループが転写因子 Hes7 のネガティブフィードバックループが振動発生の中心的なメカニズムであることを明らかにした。Hes7 は Notch シグナルの直接の下流因子であり、Hes7 がさまざまな遺伝子の発現を周期的に抑制することによって、遺伝子の発現が同調して振動し、それによって PSM 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形成されると考えられている。

一方で PSM の後端から前方に向けて FGF シグナル活性の濃度勾配が形成されており、それを位置情報として利用し、体節の分節化の位置が決定されるということを示唆する報告がなされていた。このことから、Notch シグナル／ Hes7 が作り出す遺伝子発現の振動が時間情報を担い、FGF シグナル活性の濃度勾配が空間情報を担っており、それらが統合されることで等間隔パターンとしての体節が形成されることが予想されていた。すなわち脊椎動物の体節形成機構は、遺伝子・生体分子の相互作用が作る複雑なネットワークから生じる遺伝子発現の振動という分子の動的な振る舞いが、パターン／形態形成に利用されているはじめての例であると言える。

本研究は、分子の動的な振る舞いが基盤となる生命現象の代表例として、脊椎動物の体節形成をモデル系とし、実験と計算を組み合わせた手法を用いて、モデル化とシミュレーションによりその動作原理の理解を目指す。具体的には、体節形成における分子振動のしくみとそれを使った形づくりのしくみを解明することを目的とする。これに基づき、以下の３点に焦点を絞り明らかにすること試みた。

1）１細胞内の分子振動のメカニズムを詳細に明らかにする。
2）細胞間で振動情報が受け渡されるメカニズムを明らかにする。
3）分子振動の周期性が体節の等間隔パターン形成に変換されるメカニズムを明らかにする。

＜研究開始時の研究計画＞

体節形成は、未分節中胚葉の細胞内でおこる遺伝子発現の振動の周期性を時間情報とし、未分節中胚葉の後方から前方にかけて作られる拡散因子の濃度勾配を位置情報として、これらを組み合わせて等間隔パターンが形成される現象である。したがってこのプロセスは細胞内でおこる振動、細胞間の情報の受け渡し、細胞の集合体としての組織レベルの分節化など複数の階層からなる多分解能システムと捉えることができる。そのため次の４つの階層に分割して計画を立てた（図 2）。

a) 細胞内の振動発生のメカニズム

研究開始時までに我々は、転写因子のネガティブフィードバックループが振動発生の中心的なメカニズムであることを明らかにしていた。しかし、振動発生のメカニズムの全体像は不明であったので、その解明を試みた。特に、転写以外の制御については全く不明であったので、翻訳制御などの関与にも着目した。

b) 細胞間での振動位相の一致

未分節中胚葉では近隣細胞間では遺伝子発現振動は同期している。例えば細胞分裂によって振動の位相は近隣細胞からずれるが、数サイクルの後に位相が再び一致することが報告されている。細胞間シグナルである Notch シグナルが同調性に関わっていると考えられているが詳細は不明であった。本研究では同調性の

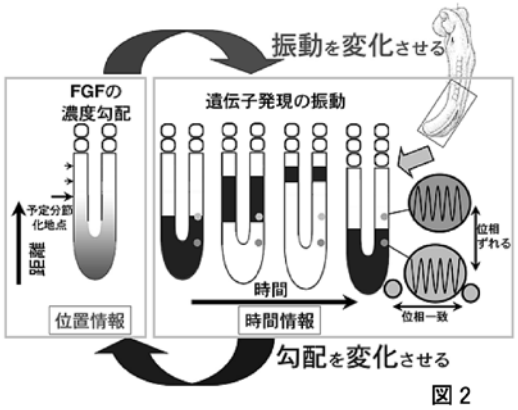

図 2

メカニズムの解明を目指した。

c) 振動の周期／位相が位置情報に依存してずれること

未分節中胚葉の前後方向には振動の位相が少しずつずれており、相対的な細胞位置が前にずれるにしたがって、振動の位相が遅れる。そのため未分節中胚葉全体の遺伝子発現は、波状の変化をするように観察される。これより未分節中胚葉の細胞は、その相対的位置によって振動の周期／位相を変化させていることが示唆される。未分節中胚葉における位置情報として FGF の濃度勾配が使われていることが知られているので、FGF シグナルが振動に与える影響を解析することを計画した。

d) 振動の時間周期性が位置情報として固定され、等間隔パターンが形成されること。

遺伝子発現振動の時間情報と拡散因子の濃度勾配の位置情報が統合され、等間隔パターンが形成されるので、そのメカニズムの解明を目指した。これによって時間制御を利用した形づくりの原理が明らかになると期待される。

具体的な計画として下記の５つを計画した。

１）*Hes7* の転写時間を延長させたノックインマウスの作製（**階層 a**）

Hes7 遺伝子の 3'-UTR に大きなイントロン（5kb、10kb、20kb）を挿入し、時間遅れを延長させ、振動周期を長くすることを試みる。転写時間、振動周期、体節の大きさおよび体節数を観察する。

２）*Nrarp* ノックアウトマウスの作製（**階層 a**、**b**）

Notch シグナルのフィードバックインヒビターをコードする *Nrarp* をノックアウトし、Notch シグナル強度を変化させることと、Nrarp のフィードバックループの役割を解析する。

３）*Hes7* の転写後調節（**階層 a**）

シミュレーション結果と実験結果の相違から Hes7 が転写後調節を受けることが予測される。*Hes7* 3'-UTR に結合する小分子 RNA または RNA 結合タンパクを探索する。時間遅れにも寄与する可能性がある。

４）FGF シグナルが振動に及ぼす影響の解析（**階層 c**）

i) 振動が FGF シグナルの濃度勾配に与える影響

ii) FGF シグナルが振動に与える影響

５）FGF シグナルの活性領域を時間軸に沿って正確に計測する（**階層 d**）

FGF ／ MAP キナーゼ系の不連続性がどのステップで獲得されるかを特定するために、各ステップでの活性を時空間的に定量する。ステップの特定ができればシステム同定が可能である。ゼブラフィッシュを使ってリン酸化 Erk の局在を計測することを、振動分子を時間マーカーとして用いておこなう。

＜研究期間の成果＞

我々は未分節中胚葉における遺伝子発現の振動は、転写因子 Hes7 のネガティブフィードバックループを中心とするメカニズムによって発生するというモデルを提案した（図 3）。これに基づいてシミュレーションをおこない、遺伝学的あるいは薬理学的な実験の結果と比較することによってモデルを検証し、分子振動のメカニズムの理解を試みた。

１）*Hes7*の転写時間を延長させたノックインマウスの作製（**階層 a**）

我々のモデルでは、*Hes7* の転写から Hes7 が自身の転写を抑制するまでの“時間遅れ”が必須であり、振動周期は“時間遅れ”の長さに依存することが予測された。例えば、時間遅れを 40 分から 60 分に 20 分間延長すると振動周期が十数分長くなることが予測されている（図 4）。我々は *Hes7* 遺伝子の 3’ -UTR にイントロンを導入することによって *Hes7* 遺伝子の転写時間を延長することを試みた。RNA ポリメラーゼの mRNA 合性速度は 1.2-1.5kb/分程度考えられているので、約 20kb の挿入配列により、15 分程度の転写時間の延長が見込まれ、時間遅れを長くすることが期待できる。挿入するイントロン配列はヒトのジストロフィン遺伝子から借用した。また挿入するイントロンの大きさを段階的に 5kb、10kb、20kb の３種類とした。

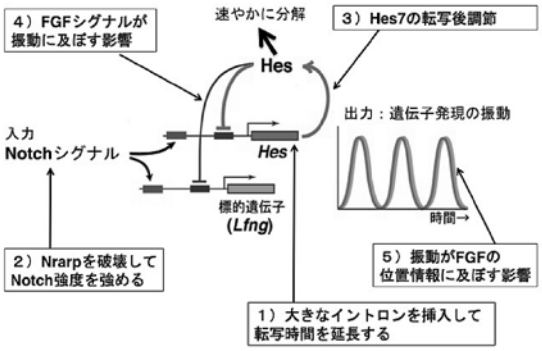

図 3

振動周期が延長した場合、体節のサイズが大きくなることが考えられるが、体節数および椎骨数が減少する表現型と、同じ体節数および椎骨数であるが発生時間が延長する表現型の２つの可能性が予想された。ノックインマウスは既に完成したが、ノックインアリルからの *Hes7* の発現量が減少するために、Hes7 ノックアウトマウスに類似した表現型を示した。そのため解析をおこなうことができなかった。現在、3’ -UTR にイントロンを導入するのではなく *Hes7* が持っているイントロン（2nd intron）に挿入配列を導入したノックインマウスを新たに作製している。

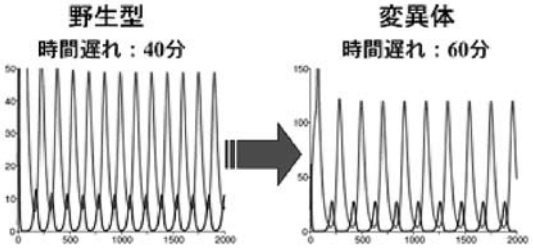

図 4

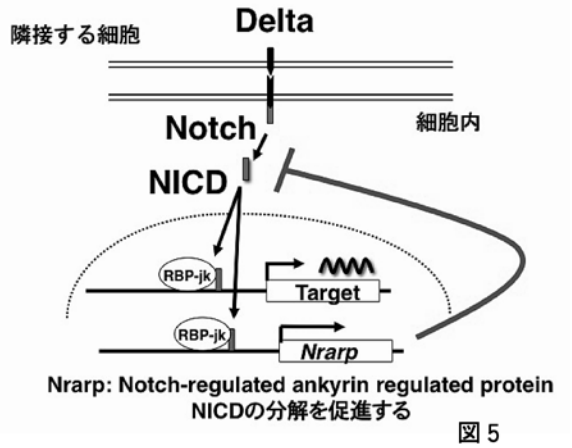

図 5

2）*Nrarp*ノックアウトマウスの作製（**階層a、b**）

細胞膜表面に局在する膜タンパク Notch は、隣接する細胞の膜タンパクである delta と結合することにより、細胞内ドメイン（NICD）が切断され核に移行する。そして NICD が転写活性化因子として働き、下流遺伝子の転写を促進する。Notch シグナル系シグナル分子のノックアウトマウスの多くが体節形成に異常を示すことから、体節形成には Notch シグナルが必須であることが知られていた。また未分節中胚葉には Notch および delta が強く発現している。我々の遺伝子発現振動のモデルでは、入力である Notch シグナルがフィードバックループを含む回路によって時間情報を持つ振動に変換される。Notch シグナルの下流遺伝子のひとつに Nrarp がある。Nrarp は NICD に結合し、NICD の分解を促進することから、Nrarp は Notch シグナルのフィードバックインヒビターであると位置づけることができる（図 5）。Notch 強度を遺伝学的に変化させるため、および Nrarp のフィードバックループの役割を解析するために、***Nrarp*** ノックアウトマウスの作製と解析をおこなった。

i) 振動周期は Notch シグナル強度に依存して微調整される。

我々のモデルに基づいて、Notch シグナル強度のパラメータを変化させてシミュレーションをおこなったところ、振動周期は Notch シグナル強度に依存して変化することが明らかになった。Notch シグナル強度を 2 倍にすると数分程度の周期の延長があると予測された（図 6）。*Nrarp* ノックアウトマウス胚の未分節中胚葉では Notch 強度が約 2 倍に増加しており、マイクロアレイ解析の結果などから、それ以外のシグナル形には変化がないことが明らかになった。すなわち、*Nrarp* ノックアウトマウス胚では Notch シグナルが特異的に増強されている。そのときに、体節形

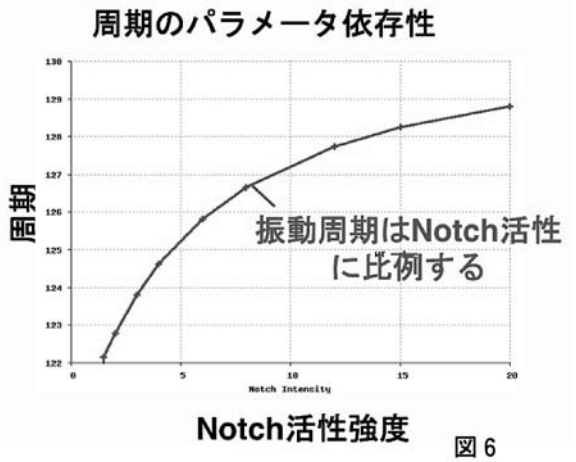

図 6

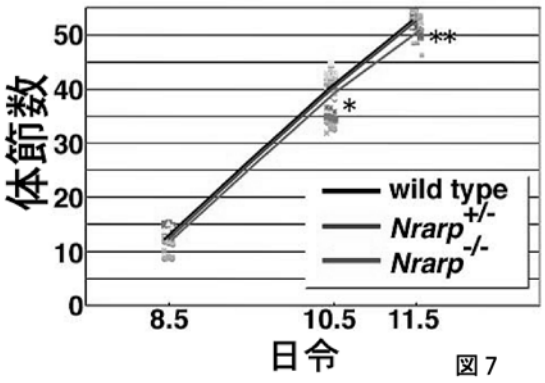

図 7

成周期は約 5 分延長していた（野生型の周期：約 106 分、*Nrarp* ノックアウトマウスの周期：約 111 分）（図 7）。野生型では腰椎数は 6 個であるが、*Nrarp* ノックアウトマウスは 5 個に減少しており、総椎骨数も 2 個少なかった（図 8）。また、Notch 阻害剤を妊娠マウスに与えると、胚の体節形成周期が数分程度短縮されるという結果を得た。さらに *Nrarp* ノックアウトマウスに Notch 阻害剤を与えると、周期の延長がもとに戻るという結果を得た。これらはシミュレーションで予測された結果と一致している。したがって我々は、振動周期は Notch シグナル強度に依存して微調整されることを明らかにした。

ii) Nrarp のフィードバックループは振動のロバスト性に必須である。

発生現象は、外部環境からのかく乱や生体内のノイズに抗って正確な形態形成を営む必要があるために、非常にロバストな生命現象であることが予測される。特に体節形成を制御する遺伝子発現の振動は、ノイズを多く含む現象といわれている転写に基づいていることから、転写に由来するノイズに対してロバストなしくみがあると予想される。*Nrarp* ノックアウトマウス胚では、Notch-Nrarp のフィードバックループを欠いている。我々のモデルを使ったシミュレーションでは、この状態でも振動は発生する。野生型のモデルで振動回路にノイズを加えても、振動の周期や振幅に大きなばらつきは見られないが、*Nrarp* ノックアウトマウスのモデルでは、ノイズを加えた場合、振動の周期、振幅に大きなばらつきが見られた。このことから Nrarp のネガティブフィードバックループは振動のロバスト性に必須であることを予測した。

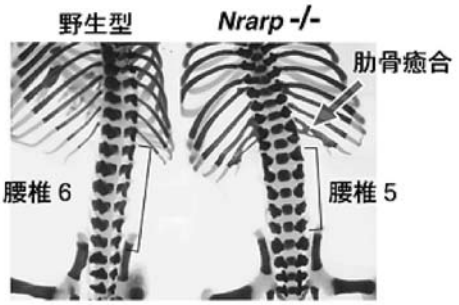

図 8

Nrarp ノックアウトマウスの脊椎骨や肋骨はおおむね正常な形態を保っているが、やや不整な形態を示す部分もある（図 8）。また、Notch 阻害剤で Notch 強度を下げても不整な形態は改善されないので、この原因は Notch 強度が強いためではなく、Nrarp のフィードバックループが欠如していることであると推察された。体節形成期に種々のかく乱を与えると、遺伝子発現の振動、体節

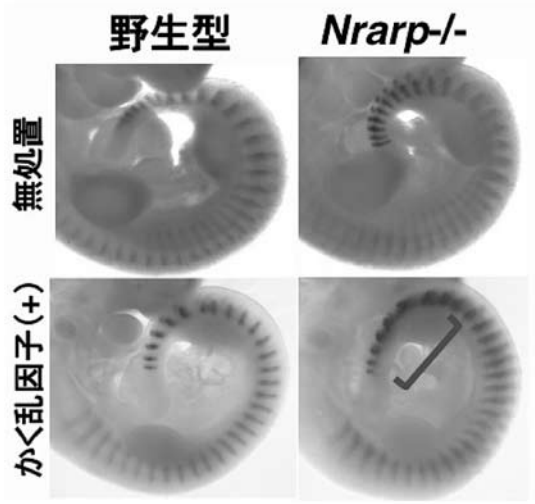

図 9

の等間隔パターン、椎骨や肋骨のパターンが乱れたので、Nrarp のフィードバックループは振動および体節形成のロバスト性に必須であることが明らかになり、モデル／シミュレーションの結果が検証された。

3）*Hes7*の転写後調節（**階層a**）

Hes7 の時空間的発現パターンの解析とシミュレーション結果との差異から、*Hes7* の 3' -UTR に小分子 RNA または RNA 結合タンパクが結合することを推測した。これらはモデルの中の “時間遅れ” と mRNA の不安定性に寄与していることが予想される。

i) *Hes7*の3'-UTRに結合する可能性のあるmicro RNAをデータベースサーチによって検索し、いくつかの候補をあげた。いくつかの候補のうち、発現パターン解析で未分節中胚葉に発現しているmicroRNAのひとつを候補とし、ノックアウトマウスを作製した。すでに作製を終え、現在解析中である。

ii) 振動している遺伝子*Hes7*、*Lfng*および振動しない遺伝子*FGF8*のmRNAの3'-UTRにそれぞれ結合するRNA結合タンパクを探索した。mRNAの3'-UTRにタグを付加し細胞抽出液と混合して、結合するタンパクを網羅的に解析した。現在までにいくつかのそれぞれいくつかのタンパクが特異的に結合していることを明らかにしている。これに関して現在解析中である。特にmRNAの不安定性に焦点を絞っている。

Hes7 タンパクが何らかの修飾をうけ、核移行、二量体化が制御されて、モデルの中の“時間遅れ”に寄与している可能性がある。

iii) Hes7タンパクの修飾および、Hes7タンパクと相互作用するタンパクの探索をおこなっている。また種々の代謝物と遺伝子発現の振動との関連も探索している。

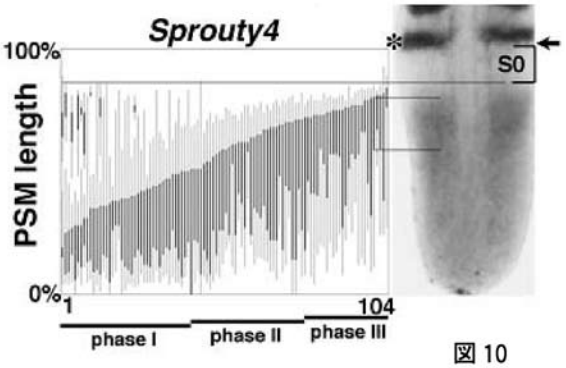

図 10

4）FGFシグナルが振動に及ぼす影響の解析（階層c）

i) 振動がFGFシグナルの濃度勾配に与える影響

位置情報を担うと考えられている FGF シグナルの下流因子であり、同時に FGF シグナルの抑制因子、すなわちフィードバックインヒビターとして多くの分子が知られている。それらのうち、発現が Hes7 に依存して振動する分子を同定し、遺伝子発現の振動の時間情報を FGF シグナル活性に伝える仲介因子の候補として探索した。

我々は多くの FGF シグナル系のフィードバックインヒビターのうち、*Sprouty4* の発現がマウスの PSM において振動していることを発見した。Sprouty4 の発現の振動は Hes7 などの他の Notch シグナル系の振動分子の発現と同調して振動していること、同時に体節形成周期と一致して振動していることを見いだした（図 10）。*Sprouty4* のプロモーター活性を Hes7 が抑制すること、*Sprouty4* の発現振動は *Hes7* ノックアウトマウスや *Hes7* を強制発現させたトランスジェニックマウスで見られなくなることから、*Sprouty4* の発現振動は Hes7 を中心的なメカニズムとする遺伝子発現の振動に依存して振動していることを明らかにした。また、ゼブラフィッシュの PSM では *Sprouty4* の発現振動は見られなかったため、この現象は進化的には保存されておらず、ゼブラフィッシュでは異なるメカニズムが存在することが示唆された。これらの結果から Sprouty4 が遺伝子発現の振動の時間情報を FGF シグナル活性に伝える仲介因子の候補となり得ることを明らかにした。図 11 に想定する作用メカニズムを記す。すなわち、PSM 前端では FGF シグナル活性の限界点が予定分節地点を決めると考えられているが、そこで FGF シグナルを周期的に抑制することによって、FGF シグナル活性の限界点を、時空間的に離散的に変化させると考えられる。それによって体節の等間隔パターンが形成されると考えられた。

ii) FGFシグナルが振動に与える影響

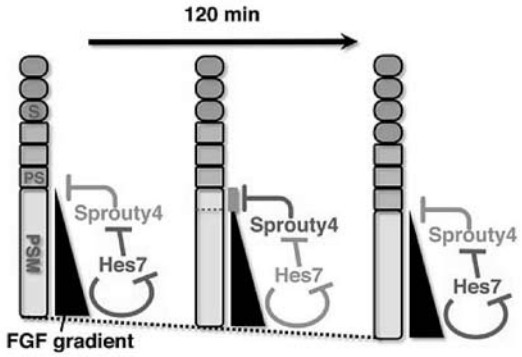

図 11

未分節中胚葉における遺伝子発現の振動は、後方では周期が速く、細胞の相対的な位置が前方にずれるにしたがって周期が遅くなると考えられており、そのため前方の細胞ほど位相が遅くなるので全体としては波状の発現変化に見える（図 2）。一方で FGF シグナル強度は前方ほど弱くなるので、FGF シグナルが振動周期／位相に影響を与えている可能性が考えられる。ゼブラフィッシュを利用して FGF シグナルが振動に及ぼす影響を解析中である。

5）FGFシグナルの活性領域を時間軸に沿って正確に計測する（**階層d**）

FGF の連続した空間情報から不連続性が生みだされるメカニズムを明らかにするために、FGF シグナル系の各ステップでの

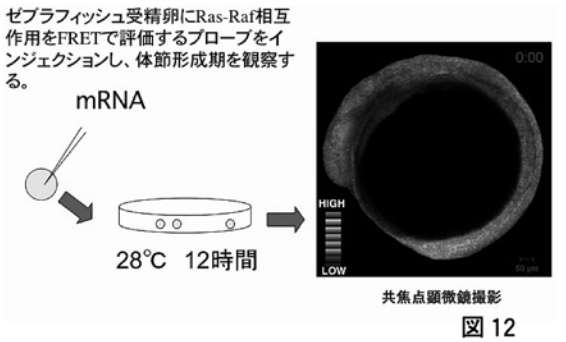

図 12

分子発現および局在を時空間的に定量化することを試みている。ras/raf の相互作用を検出する Raichu プローブを用い、ゼブラフィッシュ胚で KAP キナーゼ活性を観察したところ、連続的に変化することを示唆するデータを得た（図 12）。さらに下流のリン酸化 Erk の核局在を計測したところ、不連続なパターンを示唆するデータを得た（図 13）。これらから、分子振動の時間情報と、FGF の濃度勾配の空間情報とが統合されるのは FGF/MAP キナーゼ経路の raf より下流で Erk より上流であることが示唆されたので、現在検証中である。また、この結果をもとに数理モデルを設定し、数理解析をおこなっている。

＜国内外での成果の位置づけ＞

1970 年代から、体節原基に振動体が存在し、それを利用して体節の等間隔パターンが形成されることが理論生物学的に予測されていたが、実体は不明であった。1997 年にフランスの Pourque らのグループによって体節原基での遺伝子発現の振動が発見され、以後、この振動現象は時空間的パターン形成のモデルとして、分子レベルでさかんに研究されるようになった。申請者らは、分子振動の中心的な分子 Hes7 を同定し、分子振動のメカニズムを明らかにし、さらに計算機シミュレーションと遺伝子改変マウスの作製によってそれを検証した。したがって本研究は我々の研究成果の基づく独自のものである。

ゲノム情報の解析から、本研究で扱う現象に関与しうる分子を網羅的に列挙し、遺伝学的解析によって実際に関与する分子を特定することが可能と考えられる。また個々の分子の相互作用も遺伝学的あるいは生化学的解析で解明可能である。しかし、本研究で扱う生命現象は、多くの分子が関与する動的な現象であるため、個々の分子の静的な相互作用を解析するだけでは解明できないものである。本研究はシミュレーションと実験を相互にフィードバックさせることによって、動的な現象をとらえることを特色とする。この手法は刻々と形態が変化する生物発生などの研究に適していると考えられるが、国内外で類似した研究はほとんどなく、本研究は独創的なものである。

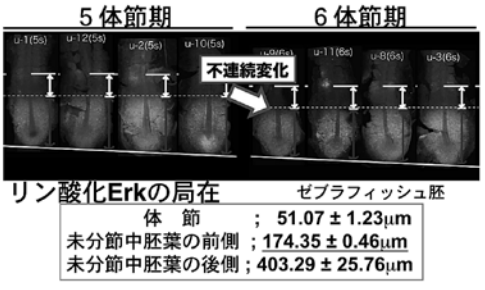

図 13

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

Hes7 3' -UTR に大きなイントロンを挿入するノックインマウスなど、マウスの遺伝学的実験は予想して結果が得られない場合が多い。本研究において立案当初はマウスをモデル動物としていたが、実験の容易さなどを考慮してゼブラフィッシュも平行して用いることにした。その結果、大きく発展した部分がある。しかしゼブラフィッシュはゲノム情報が十分でないために解析が難しい部分もある。

＜今後の課題、展望＞

現在進行中の実験計画について迅速に研究をすすめる。

本研究はシミュレーションと実験を相互にフィードバックさせることによって、動的な現象をとらえることを特色としているが、本領域の班員である京都大学情報学研究科の石井信教授および奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科の作村諭一准教授と共同研究をおこなうことによって、これまで多大な相乗効果を産んできた。我々がおこなった実験の結果をもとにモデルをたて、それに基づいたシミュレーションをおこなった。また、シミュレーションから予想される分子系路や分子機構を遺伝子改変動物の作製などによって我々のグループが実験的に証明した。シミュレーションは主に石井／作村グループが担当するが、完全な分業ではなく頻繁に議論することによってすすめてきたが、今後、引き続き密な議論を通して成果をあげていきたい。特に作村諭一准教授は同じ大学に所属するので緊密な連携は容易に達成できる。これらのステップを繰り返すことによって、情報科学と実験生物学の融合を目指す。

これまでは分子振動を転写のレベルから解析していたが、翻訳や mRNA、タンパクの安定性のレベルの調節も解析する必要があり、そのためには振動分子やそれをコードする mRNA に結合する分子を網羅的に解析する必要がある。そのため本領域の班員である産業技術総合研究所の夏目徹博士と共同研究を開始したが、引き続き共同研究を進めていく。

また、分子や活性の時空間的分布を詳細に測定することが、動的な生命現象の解明には必須である。本領域の班員である京都大学医学研究科の中村岳史講師と共同研究を行い、これの達成を試みてきた。現在までに、位置情報を規定している FGF シグナルの活性を個体レベルで可視化することによって、時空間的分布を解析してきた。引き続き分子や活性の時空間的分布を計測する努力を続け、これを数理解析等につなげていき、生命現象の動作原理の理解を試みる。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1）論文／プロシーディング

1. 0905211552
Hayashi, S., Shimoda, T., Nakajima, M., Tsukada, Y., Sakumura, Y., Dale, J.K., Maroto, M., Kohno, K., Matsui, T., Bessho, Y.: Sprouty4, an FGF inhibitor, displays cyclic gene expression under the control of the notch segmentation clock in the mouse PSM, PLoS ONE, 4, e5603 (2009).
2. 0912011430
Ferjentsik, Z., Hayashi, S., Dale, J.K., Bessho, Y., Herreman, A., De Strooper, B., del Monte, G., de la Pompa, J.L., Maroto, M.: Notch is a critical component of the mouse somitogenesis oscillator and is essential for the formation of the somites, PLoS Genet., 5, e1000662 (2009).
3. 0601271419
Hirata, H, Bessho, Y, Kokubu, H, Masamizu, Y, Yamada, S,

Lewis, J, and Kageyama, R.: Instability of Hes7 protein is crucial for the somite segmentation clock, Nature Genet., 36, 750-754 (2004).

2）学会発表

1. 別所康全 , 体節分節化のロバスト性を担うフィードバックループ , 第 82 回日本生化学会大会 , 2009.10, 神戸
2. 別所康全 , 体節形成周期の制御機構 , 第 114 回日本解剖学会総会 , 2009.3, 岡山
3. 別所康全 , 時間制御を利用した形態形成 , 第 113 回日本解剖学会総会 , 2008.3, 大分
4. Bessho Y., The mechanism of the biological clock that controls animal development, International Joint Symposium Frontier In Biomedical Sciences: From Genes to Applications, 2008.11, Yogyakarta
5. 別所康全 , 生物の形づくりを制御する分子振動, 第 2 回 SICE 生物制御システム調査研究会 , 2008.1, 京都
6. Bessho Y., The mechanism of the biological clock that controls animal development, NAIST Global COE International Symposium Developmental Biology, 2008.1, Nara
7. Bessho Y., The mechanism the biological clock that controls animal development, NAIST The 21st century COE Program International Symposiun, 2007.1, Nara
8. Shimoda T., Matsui T., Bessho Y., The biological clock generates repetitive patterns in mouse development, 8th KRIBB-KU-NAIST Symposium, 2006.11, Seoul
9. 別所康全 , 2 時間を刻む生物時計 ～時間制御を利用した形づくり～ , 関西眼科先進医療研究会 , 2006.10, 大阪
10. 別所康全 , 2 時間を刻む生物時計 , 第 25 回分子病理学会 2006 年東京シンポジウム , 2006.8, 東京
11. Bessho Y., The segmantation clock generates metameric patterns in mouse development, NAIST-CDB International Symposium Frontiers in Developmental Biology, 2005.11, Gyeongju
12. Bessho Y., The segmantation clock generates metameric patterns in mouse development, 7th Northeastern Asia Symposium on Biotechnology, 2005.12, Nara

3）図書

1. Maroto M, Iimura T, Dale JK, Bessho Y, bHLH proteins and their role in somitogenesis, Somitogenesis; Advances in experimental medicine and biology, vol. 638 (ed. Maroto, M. and Whittock, N. V.), 124-139, 2008,