

平成22年6月1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19570220

研究課題名（和文） 脊索動物の進化を演出した新規獲得遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of newly acquired genes that directed the evolution of chordates.

研究代表者

藤原 滋樹 (FUJIWARA SHIGEKI)

高知大学・教育研究部自然科学系・教授

研究者番号：40229068

研究成果の概要（和文）：脊索動物特有の体の形をつくる遺伝子が、原始的な脊索動物ホヤにおいて機能しているかどうかを調べた。従来、胚発生にレチノイン酸を利用するのは脊椎動物だけと思われていた。本研究では、ホヤ胚においても、レチノイン酸が *Hox1* 遺伝子を活性化し、器官形成に貢献することを証明した。また脊索動物の特徴である背側神経管の形づくりに、増殖因子 Nodal が必須であることを証明した。Nodal は転写因子 Cdx を介して神経管の形づくりを制御することがわかった。

研究成果の概要（英文）：I analyzed the function of genes that were involved in the establishment of the chordate-specific body plan. Retinoic acid has been thought to function only in vertebrate embryos. In the present study, I demonstrated that retinoic acid contributed to organogenesis in the ascidian embryo, through the activation of the *Hox1* gene. I also demonstrated that the growth factor, Nodal, was required for morphogenesis of the dorsal neural tube, which was a chordate-specific feature. The transcription factor, Cdx, was revealed to mediate the Nodal signal and regulates neural tube formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：レチノイン酸, 発生・分化, 脊索動物, 進化, 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) カタユレイボヤは、ゲノム概要配列と膨大な EST および *in situ* 解析のデータを基盤として、今や生物学のさまざまな分野にお

けるモデル脊索動物の一角を占めている。ホヤのオタマジックシ型幼生は脊索動物の基本的な体制を単純なかたちで顕している。ホヤと脊椎動物には存在するが旧口動物には

存在しない遺伝子が、ホヤゲノム中には約2500ある (Dehal *et al.*, 2002, Science 298, 2157-2167)。これらの遺伝子の中には、進化の過程で、脊索動物らしい体制を獲得するために重要な貢献をした遺伝子が多数あると思われる。一方、分子系統学的解析の結果、ホヤは頭索動物より後で脊椎動物と分岐したことがわかってきた (Delsuc *et al.*, 2006, Nature 43: 965-968)。脊索動物の中でホヤのみに見られる生活史の特徴 (変態, 固着生活, 出芽など) は派生形質と考えられる。ホヤのみに存在する遺伝子はホヤ独特の生活史と関連する可能性がある。こういった遺伝子の機能を丹念に調べることが、進化の分子メカニズムを解き明かすために重要である。本研究の申請時点では、ウニやナメクジウオのゲノム情報がほとんどなく公開される予定であり、新口動物における体系的な比較ゲノム解析を行う基盤が整いつつあった。

(2) レチノイン酸は、咽頭鰓裂や四肢の形態形成、背側神経管のパターン形成、神経堤細胞の分化など脊索動物/脊椎動物に特徴的な形質の発現に重要な役割を演じている。私たちは、ホヤのレチノイン酸合成酵素 (*Raldh2*) と分解酵素 (*Cyp26*)、核内レチノイン酸受容体 (*RAR*) を同定してきた。本研究開始当初は、これらの遺伝子は脊索動物以外からは発見されていなかった。私たちは、これらの遺伝子を獲得したこと、転写因子である *RAR* が新たな標的遺伝子をリクルートしていく過程が、脊索動物/脊椎動物の進化に重要であったと考えた。そこで、cDNA マイクロアレイとオリゴチップを用いてカタユウレイボヤのレチノイン酸標的遺伝子を大規模に同定した。次の課題は、上記のレチノイン酸関連遺伝子群が胚における形態形成のどの過程にどう関わっているかを明らかにすることである。特に、遺伝子の機能を阻害したときに胚の形態や遺伝子発現にどのような異常があらわれるかを詳細に記述し、発生におけるレチノイン酸の必要性と役割を解明することであった。

(3) *Nodal* は、本研究開始当時には新口動物でのみ同定されていた。*Nodal* は脊索動物において中胚葉誘導や、脊索・側板中胚葉などにおける左右非対称性の確立に重要な役割を演じている。私たちが過去に行ったホヤ卵割期の網羅的 cDNA 解析において、*Nodal* の拮抗因子である *Lefty* が同定されていたので、本研究では、*Nodal* と *Lefty* のホヤにおける機能解析を行った。

## 2. 研究の目的

(1) レチノイン酸関連遺伝子 (*Raldh2*, *Cyp26*, *RAR*, およびレチノイン酸標的遺伝子) の機能解析: *Raldh2* と *RAR* の機能を阻害するか、

あるいは *Cyp26* を異所的に発現させてレチノイン酸シグナルを遮断した胚における遺伝子発現と形態異常を解析する。また、私たちがマイクロアレイ解析で同定したレチノイン酸標的遺伝子の異所的発現や機能阻害を行ったときの遺伝子発現と形態異常を解析する。

(2) 甲状腺ペルオキシダーゼ (*Tpo*) や甲状腺ホルモン受容体 (*THR*) の機能解析: *Tpo* と *THR* の機能阻害を行い、胚発生や変態における甲状腺ホルモンの役割を解析する。

(3) 背側神経管の形成と収束的伸長運動における *Nodal* と *Lefty* の機能解析: *Nodal* の機能阻害や異所的発現, *Nodal* に対する拮抗因子 *Lefty* の過剰発現や異所的発現によって *Nodal* シグナルを攪乱した場合の神経管形成や遺伝子発現を解析する。また, *Nodal* の機能を阻害し, 神経管や脊索における細胞極性の変化や収束的伸長を観察する。*Nodal* 標的遺伝子をオリゴチップで同定し, 標的遺伝子の機能解析を行う。*Lefty* に対する RNAi も行い, *Nodal* シグナルを調節する *Lefty* の役割も明らかにする。

(4) 上記の他, 新口動物/脊索動物で新規に獲得されたと思われる遺伝子をカタユウレイボヤのゲノムデータベースから同定し, それらの機能解析も順次行う。ただし, 網羅的・表面的な研究ではなく, 発生および進化に重要と思われる比較的少数の遺伝子に注目して徹底的に機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) レチノイン酸関連遺伝子の機能解析

① ホヤにおけるレチノイン酸標的遺伝子 *Hox1* の上流配列やイントロン領域を単離してレポーター遺伝子を作製した。欠失解析によって表皮および神経索における発現を支配するエンハンサーエレメントを同定し, *RAR* がエンハンサーに結合するかどうかがゲルシフト解析によって確かめた。

② *Raldh2* と *RAR* に関しては, 各遺伝子に特異的なモルフォリノオリゴ (MO) を顕微注入して機能阻害を行った。MO 注入胚における *Hox1* 遺伝子の発現や, 器官原基などの形態を観察した。

③ 背側正中線表皮は神経堤細胞の起源と考えられる。脊椎動物においては神経堤細胞の分化にレチノイン酸が必要であり, ホヤにおいても背側正中線表皮で *RAR* 遺伝子が発現する。脊索動物における神経堤細胞の進化を考える上で, この細胞における *RAR* の転写を調節するエンハンサーの機能を知ることは重要である。そこで, *RAR* 背側正中線表皮エンハンサーを同定し, 欠失実験やゲルシフト解析によって, このエンハンサーを活性化する

転写因子を突き止める実験を行った。

(2) *Nodal* は、卵割期の胚において、将来神経管の側方と腹側に位置する細胞で発現する。本研究では、以下の方法で *Nodal* の機能解析を行った。

① *Nodal* を過剰発現させて、神経管の形態形成と下流遺伝子の発現に対する影響を解析した。

② *Nodal* の拮抗因子である *Lefty* は、細胞外で *Nodal* と結合し、*Nodal* と受容体との結合を阻害する。本研究では *Lefty* を強制発現させて、神経管の形態形成と下流遺伝子の発現に対する影響を解析した。

③ マイクロアレイ解析によって、新規の *Nodal* の標的遺伝子の同定を試みた。

④ 私たちが発見した *Nodal* 標的遺伝子のうちのひとつ *Cdx* について機能解析を行った。ドミナントネガティブ型 *Cdx* を胚において過剰発現させて、神経管の形態形成に対する影響を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究によって、ホヤ胚の発生にレチノイン酸が必要であるという明白な証拠をはじめ得ることができた。

① ホヤの *Hox1* 遺伝子の 5' 上流域に表皮エンハンサーを同定した (図 1)。

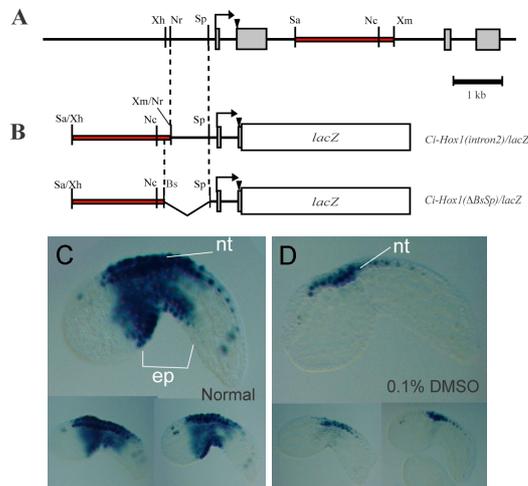


図 1: *Hox1* レポーター遺伝子の発現。(A) *Hox1* 遺伝子のエクソン/イントロン構造。(B) 二つのレポーター遺伝子 (ここでは上を a, 下を b とする)。(C) レポーター遺伝子 a は表皮と神経索の両方で発現した。(D) レポーター遺伝子 b は神経索のみで発現した。

このエンハンサー中に、転写因子であるレチノイン酸受容体 (RAR) が認識する配列 (RARE) に似た配列が見つかった (図 2A)。この配列を変異させると、正常胚の表皮における転写活性が失われた (図 2A, B, D)。またエンハンサーのレチノイン酸処理に対する応答も失われた (図 2A, C, E)。レチノイン酸合

成酵素の阻害剤 (citral と DEAB) で処理すると、正常胚におけるレポーター遺伝子の発現は失われた。

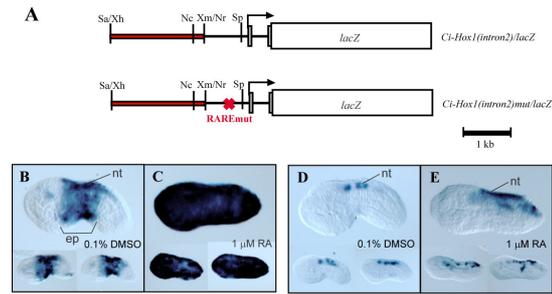


図 2: *Hox1* の発現に対する RARE の重要性。(A) 正常な *Hox1* レポーター遺伝子 (上) と、エンハンサー中の RARE に変異を導入したレポーター遺伝子 (下)。(B) 正常なエンハンサーは表皮と神経索で活性化された。(C) 正常なエンハンサーはレチノイン酸に反応して活性化された。(D) RARE を変異させたエンハンサーは神経索のみで活性化し、表皮では活性化しなくなった (B と比較)。(E) RARE を変異させたエンハンサーはレチノイン酸に反応しなくなった (C と比較)。

これらの結果は、正常胚における *Hox1* 遺伝子の発現にレチノイン酸が必要であることを意味する。ホヤゲノム中に正真正銘の RARE が発見されたのはこれが世界初である。ホヤにおいてレチノイン酸が機能して発生に関与しているという私たちの主張には懐疑的な意見が多かったが、この研究を通じて、ホヤ胚において実際にレチノイン酸が働いていることが明らかになった。【論文③】

*Hox1* の神経索エンハンサーは第二イントロンに存在することがわかった。このエンハンサーもまたレチノイン酸依存的であることがわかったが、RARE については現在探索中である。

② *Raldh2* と *RAR* に特異的なモルフォリノオリゴ (MO) を受精卵に顕微注入すると、表皮と神経索における *Hox1* の発現が消失した。

本研究とは独立に、笹倉靖徳博士 (筑波大学) によって偶然に *Hox1* 突然変異体を得られた。本研究では、笹倉研究室と共同で *Hox1* の機能解析を行うことになった。*Hox1* 変異体や *Hox1* 特異的 MO 注入胚においては、出水孔原基や咽頭鰓裂の形成に異常が生じる。本研究で *Raldh2* と *RAR* の MO を注入した胚においても、それと同様に出水孔原基の欠損が観察された。この結果は、レチノイン酸が *Hox1* の転写調節を通じて、正常な幼生と成体における形態形成に関与していることを示している。レチノイン酸がホヤの体づくりに必要であることを示すデータも、これが世界初である (論文投稿準備中)。

③ ホヤの背側正中線表皮は、脊椎動物の神経堤細胞と相同ではないかと考えられている。神経堤細胞の分化を制御するいくつかの転写調節因子の遺伝子がホヤの背側正中線

で発現しているからである。脊椎動物においては、神経堤細胞の分化にレチノイン酸が必要である。ホヤの背側正中線表皮においても *RAR* が発現している。

本研究では、*RAR* 遺伝子の 5' 上流域に、背側正中線表皮において転写を活性化するのに必要なエンハンサーを同定した。このエンハンサーの中には転写因子 *Msx* と *Sox* の結合配列が各 1 ヶ所あった。ホヤの背側正中線表皮系列の細胞においては、初期卵割期から *Msxb* と *SoxB1* がともに発現している。逆に、*Msxb* と *SoxB1* の両方が発現している細胞は、背側正中線表皮系列以外には存在しない。従って、この二つの転写因子が背側正中線表皮における *RAR* の転写活性化に関与する可能性が考えられた。

ゲルシフト解析を行って、これらの結合配列に実際に *Msxb* と *SoxB1* が結合することを確認した。これらの配列のどちらか一方が欠けた場合でも、エンハンサーは背側正中線表皮で活性化しなくなった。このことは、*Msxb* と *SoxB1* が両方とも機能することが、*RAR* の背側正中線表皮における発現に必要であることを意味する。脊椎動物においては、神経堤細胞の分化に *Msx1* と *SoxE* が必須である。このようなシステムの原型が、ホヤと脊椎動物の共通祖先に既に存在していた可能性が考えられた。【論文④】

(2) 背側に生じる管状の中樞神経系（神経管）は、脊索動物を特徴づける重要な形質の一つである。ホヤ胚の神経管形成における *Nodal* の役割を解明すべく、機能解析を行った。

① *Nodal* を過剰発現させたところ、神経管は閉じなくなり、前後方向の伸長も見られなくなった（図 3）。このような胚においては、*cdx* や *ZicL* などの遺伝子が異所的に発現していた（図 4）。【論文⑧】

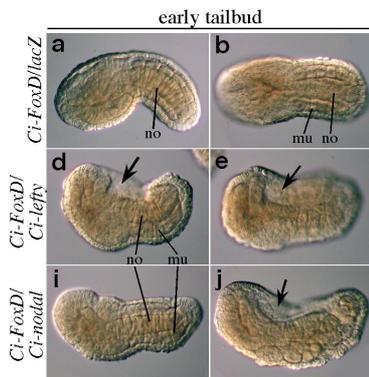


図 3 : *Nodal* の機能を攪乱した場合の神経管形成。(a, b) 対照実験で正常に発生している尾芽胚。(d, e) *Lefty* を異所的に発現させた尾芽胚。(i, j) *Nodal* を過剰発現させた尾芽胚。*Nodal* の機能が不足しても過剰でも神経管が閉じないという異常が生じた（矢印）。

② *Nodal* の拮抗因子である *Lefty* を異所的に発現させたところ、神経管は閉じなくなり、前後方向の伸長が見られなくなった（図 3）。このような胚の形態は *Nodal* が過剰のときと似ていた。しかし、*Lefty* の異所的発現の場合には、*cdx* や *ZicL* の神経管における発現は消失した（図 4）。【論文⑧】

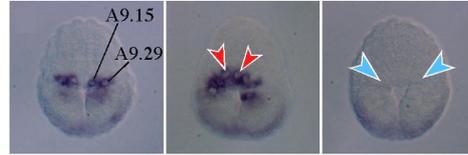


図 4 : *cdx* 遺伝子の発現。(左) 正常なう胚における *cdx* の発現。(中) *Nodal* を過剰発現させたう胚。本来 *cdx* を発現しない細胞でも *cdx* が発現するようになった（赤い矢尻）。(右) *Lefty* を異所発現させたう胚。*cdx* の発現が抑制された（青い矢尻）。

③ *Nodal* を過剰発現させた胚において発現が強くなる遺伝子と弱くなる遺伝子を、オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて網羅的に同定した。これらの中には、Type IV Collagen1/3/5, Laminin- $\alpha$ 5, Glypican3/5 などの細胞外マトリックス分子をコードする遺伝子や、 $\delta$ 1-Protocadherin-like のような細胞接着分子をコードする遺伝子が見られた（図 5）。これらの遺伝子の空間的発現パターンは、実際に *Nodal* や *Lefty* の過剰発現の影響を受けて変化していることがわかった。従って、これらのタンパク質が神経管の形づくりに直接関与することが示唆された。【論文②】

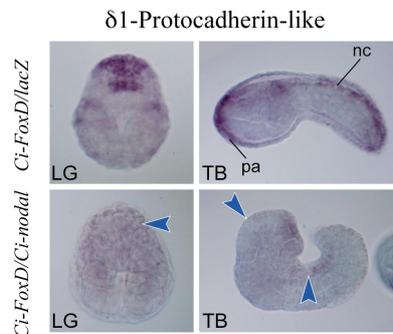


図 5 :  $\delta$ 1-protocadherin 遺伝子の発現。(上) 正常胚における発現。神経管の腹側の列にあたる細胞で発現している。(下) *Nodal* を過剰発現させた胚においては発現が抑制された（青い矢尻）。上下段とも、左がのう胚期、右が尾芽胚期。

④ *Nodal* の標的遺伝子として新たに *cdx* と *ZicL* を同定したのは、本研究が初めてである。どちらも転写調節因子をコードしており、神経管の側方および腹側における発現が *Nodal* によって活性化されることがわかった。*ZicL* が機能しないと *cdx* が発現しないことは、過去の研究でわかっている (Imai *et al.*, 2006, Science 312, 1183-1187)。そこで、*Nodal* に

よって活性化した *ZicL* の働きにより *cdx* の発現が活性化するという可能性と、*Nodal* によって *ZicL* と *cdx* の両方が直接活性化される可能性が考えられた。*cdx* 遺伝子の発現調節の仕組みについては、引き続き研究中である。

本研究では、*cdx* の cDNA に、転写抑制因子 *Engrailed* の転写抑制ドメインを連結したキメラ遺伝子を用いて“ドミナントネガティブ型 *Cdx*”を作製した。これを胚に導入したところ、*Nodal* の機能を阻害したときと同様に神経管の形づくりが異常になった (図6)。このことから、*Cdx* が *Nodal* の機能を仲介して、神経管形成を進める下流遺伝子の活性化に関わっていることが示唆された。【論文⑧】

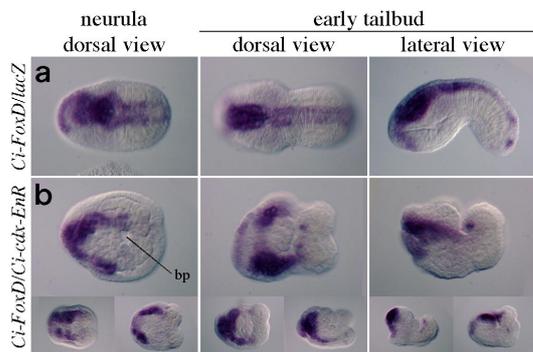


図6：ドミナントネガティブ型 *cdx* 遺伝子を発現させた胚における神経管形成。(上) 正常胚。神経管の細胞を *etr* 遺伝子の mRNA によって可視化した。*etr* を発現する細胞が背側正中線に集まって正常に神経管を形成している。(下) ドミナントネガティブ型 *cdx* を発現させた胚。*etr* を発現する細胞が正中線に集まらず、神経管が閉じなかった。胚の形態は *Nodal* の機能が攪乱されたときの胚の形態に似ていた。

### (3) まとめ

本研究では、脊索動物において新規に獲得された遺伝子の代表としてレチノイン酸合成酵素 *Raldh2*, レチノイン酸分解酵素 *Cyp26*, レチノイン酸受容体 (*RAR*), *Nodal*, *Lefty* などに注目して、その機能解析を行った。これらの遺伝子は、本研究の申請段階では、脊索動物からのみ報告されており、他の動物では発見されていなかった。しかし、本研究の遂行中に、上記の遺伝子のホモログが次々に冠輪動物 (軟体動物 *Lottia gigantea* と環形動物 *Capitella capitata*) のゲノムからも発見された。しかしながら、レチノイン酸や *Nodal* が関与する発生現象には、背側神経管の形づくりなど、脊索動物の体制を特徴づける構造に深く関わるものが多い。従って、本研究で扱った遺伝子は結果的に脊索動物特有のものではなかったが、得られた成果は脊索動物の進化の分子メカニズムを理解するために有益な情報となり得る。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕 (計9件)

- ① Kaneko, N., Katsuyama, Y., Kawamura, K. & Fujiwara, S. (2010) Regeneration of the gut requires retinoic acid in the budding ascidian *Polyandrocarpa misakiensis*. *Dev. Growth Differ.* vol. 52, pp. 457-468 (査読有) .
- ② Mita, K., Koyanagi, R., Azumi, K., Sabau, S.V. & Fujiwara, S. (2010) Identification of genes downstream of *Nodal* in the *Ciona intestinalis* embryo. *Zool. Sci.* vol. 27, pp. 69-75 (査読有) .
- ③ Kanda, M., Wada, H. & Fujiwara, S. (2009) Epidermal expression of *Hox1* is directly activated by retinoic acid in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Biol.* vol. 335, pp. 454-463 (査読有) . (<http://hdl.handle.net/10126/3349>)
- ④ Koyano, R., Ishida, S. & Fujiwara, S. (2009) Transcriptional regulation of the retinoic acid receptor in the dorsal midline epidermis in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Growth Differ.* vol. 51, pp. 777-786 (査読有) .
- ⑤ Kataoka, Y., Mishina, R. & Fujiwara, S. (2009) Mechanism of DNA replication-dependent transcriptional activation of the acetylcholinesterase gene in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Growth Differ.* vol. 51, pp. 841-850 (査読有) .
- ⑥ Nishiyama, A. & Fujiwara, S. (2008) RNA interference by expressing short hairpin RNA in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Growth Differ.* vol. 50, pp. 521-529 (査読有) . (<http://hdl.handle.net/10126/3057>)
- ⑦ Kawamura, K., Sugino, Y., Sunanaga, T. & Fujiwara, S. (2008) Multipotent epithelial cells in the process of regeneration and asexual reproduction in colonial tunicates. *Dev. Growth Differ.* vol. 50, pp. 1-11 (査読有) .
- ⑧ Mita, K. & Fujiwara, S. (2007) *Nodal* regulates neural tube formation in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Genes Evol.* vol. 217, pp. 593-601 (査読有) . (<http://hdl.handle.net/10126/524>)
- ⑨ Azumi, K., Sabau, S.V., Fujie, M., Usami, T., Koyanagi, R., Kawashima, T., Fujiwara, S., Ogasawara, M., Satake, M., Nonaka, M., Wang, H-G., Satou, Y. & Satoh, N. (2007) Gene expression profile during the life cycle of the urochordate *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* vol. 308, pp. 572-582 (査読有) .

〔学会発表〕(計18件)

- ① Ikeda, T., Fujiwara, S. & Kanda, M. (2009) Transcriptional regulation of *Hox1* by retinoic acid in the *Ciona intestinalis* embryo. 第32回日本分子生物学会年会, 12月11日(横浜)
- ② 石田聡美・小谷野竜介・藤原滋樹 (2009) カタユレイボヤ胚の背側正中線表皮におけるレチノイン酸受容体遺伝子の転写調節. 日本動物学会第80回大会, 9月17日(静岡)
- ③ Sasakura, Y., Kanda, M., Horie, T., Satoh, N. & Fujiwara, S. (2009) Transposon-mediated enhancer trap revealed the functions of *Hox1* during and after metamorphosis. The 5th International Tunicate Meeting, 6月22日(沖縄)
- ④ Kaneko, N., Katsuyama, Y., Kawamura, K. & Fujiwara, S. (2009) Regeneration of the gut requires retinoic acid in the budding ascidian *Polyandrocarpa misakiensis*. The 5th International Tunicate Meeting, 6月24日(沖縄)
- ⑤ Kanda, M., Wada, H. & Fujiwara, S. (2009) Epidermal expression of *Hox1* is directly activated by retinoic acid in the *Ciona intestinalis* embryo. The 5th International Tunicate Meeting, 6月24日(沖縄)
- ⑥ Mita, K., Koyanagi, R., Sabau, S., Azumi, K. & Fujiwara, S. (2009) Large scale analysis of Nodal-regulated genes in the *Ciona intestinalis* embryo. The 5th International Tunicate Meeting, 6月24日(沖縄)
- ⑦ 金子永基・川村和夫・藤原滋樹 (2008) ミサキマメイタボヤの再生におけるレチノイン酸の機能. 日本動物学会第79回大会, 9月7日(福岡)
- ⑧ 神田美幸・和田洋・藤原滋樹 (2008) レチノイン酸によるカタユレイボヤ *Hox1* 遺伝子の転写調節. 日本動物学会第79回大会, 9月5日(福岡)
- ⑨ Mita, K., Koyanagi, R., Azumi, K. & Fujiwara, S. (2008) Roles of Nodal signaling in the embryo of the ascidian *Ciona intestinalis*. The 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Jointly sponsored by the International Society of Developmental Biologists, 5月28日(徳島))
- ⑩ 三田薫・藤原滋樹 (2007) カタユレイボヤの神経管形成における Nodal シグナルの機能解析. 第30回日本分子生物学会年会, 12月11日(横浜)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 滋樹 (FUJIWARA SHIGEKI)  
高知大学・教育研究部自然科学系・教授  
研究者番号: 40229068

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし