

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570214

研究課題名（和文）脊索動物におけるレチノイン酸依存的発生制御機構の進化

研究課題名（英文）Evolution of retinoic acid-dependent developmental regulatory system in 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）：ホヤ胚における *Hox1* 遺伝子の発現をレチノイン酸が活性化することを証明した。また、ホヤ幼生の器官形成にレチノイン酸と *Hox1* が必要であることを証明した。オタマボヤはホヤと近縁なのにレチノイン酸合成酵素や受容体を持たない。本研究では、オタマボヤとホヤの両者がレチノイン酸に依存せず *Hox1* の転写を活性化する仕組みをもつことを発見した。オタマボヤがレチノイン酸を失って絶滅しなかったのは、共通祖先がレチノイン酸依存的／非依存的な転写活性化機構の両方を備えていたからと思われる。

研究成果の概要（英文）： We demonstrated that retinoic acid activates expression of the *Hox1* gene in ascidian embryos. We also showed that retinoic acid and *Hox1* contributed to organogenesis of ascidian larvae. The larvacean *Oikopleura dioica* does not have retinoic acid synthase and retinoic acid receptor in their genome, even though it is a close relative of ascidians. We found in the present study that both larvaceans and ascidians have retinoic acid-independent mechanism to activate transcription of *Hox1*. We hypothesized that the common ancestor of larvaceans and ascidians had both retinoic acid-dependent and independent pathways for the *Hox1* activation. Larvaceans are thought to have survived the loss of retinoic acid-related genes, probably because they had two redundant pathways.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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, *Hox1*, 進化, 遺伝子発現制御, 脊索動物

1. 研究開始当初の背景

(1) 脊椎動物を特徴づける体の構造（背側神経管・咽頭鰓裂・神経堤細胞・四肢など）が作られるためにはレチノイン酸が必要である。レチノイン酸関連遺伝子（合成酵素・

分解酵素・受容体）は冠輪動物にも存在するが、胚発生に大きな寄与をするのは脊索動物においてのみである。原始的な脊索動物であるホヤの幼生が示す単純な脊索動物的特徴は、ナメクジウオのような祖先から単純化し

たものと考えられる(図1参照)。そのため、脊索動物的な形態を作るために最低限必要な発生制御機構のエッセンスを解明するために、ホヤは格好の材料である。

(2) 脊椎動物においては、レチノイン酸受容体(RAR)が、主として *Hox* 遺伝子を制御することによって体づくりを支配している。しかし、ホヤの RAR や *Hox* の機能阻害は過去に何度も試みられたものの、目立った表現型は得られていなかった(例えば Imai et al. 2006 Science 312, 1183-1187; 首都大学・西駕秀俊教授の私信)。また、ホヤに近縁なオタマボヤのゲノムには、RAR とレチノイン酸合成酵素(Raldh2)をコードする遺伝子が存在しない(Cañestro et al. 2006 Evol Dev 8, 394-406)。研究開始当時、ほとんどの研究者は、レチノイン酸はホヤの胚発生に大した貢献をしていないと考えていた(Cañestro & Postlethwait 2007 Dev Biol 305, 522-538)。

2. 研究の目的

本研究では以下の3つの目標を設定した。

(1) 正常胚におけるホヤの *Hox1* 遺伝子の転写活性化にレチノイン酸が必要であることを証明する。

→ホヤの胚をレチノイン酸で処理するとさまざまな形態異常が生じることは古くから知られていた。しかし、内在性の遺伝子発現にレチノイン酸が“必要”であるという証拠はこれまでなかった。そこで、本研究では、ホヤ *Hox1* の正常な発現がレチノイン酸によって活性化しているかどうかを調べた。

(2) *Hox1* がホヤの組織分化や器官形成に必須であることを証明する。

→従来の研究では、ホヤの胚発生に *Hox1* が重要な貢献をしているという証拠はなかった。レチノイン酸が *Hox1* の転写を活性化するとしても、*Hox1* が胚発生において何の役にも立っていないのだとしたら、「レチノイン酸がホヤの胚発生に必要な」という私たちの主張にも根拠がなくなる。そこで、*Hox1* がホヤの胚発生における組織分化や器官形成に必須であることを示す実験を行った。

(3) オタマボヤにおける *Hox1* の転写を活性化するエンハンサーを同定し、ホヤ *Hox1* のエンハンサーと比較する。

→オタマボヤは、そのゲノム中に RAR や Raldh2 をコードする遺伝子を持たないのに、ホヤとよく似たパターンで *Hox1* が発現する。しかも、オタマボヤ胚をレチノイン酸で処理しても *Hox1* の発現パターンは影響を受けないし、胚発生にも大きな異常が見られない。このことは、オタマボヤ胚の発生がレチノイン酸と無関係に進むことを示す。本研究では、ホヤとオタマボヤの共通祖先がどのように

して *Hox1* の転写を活性化させていたのかを探ることを試みた。私たちは「共通祖先が *Hox1* の転写を活性化するために、レチノイン酸依存的な経路と非依存的な経路とを redundant に働かせていた」という仮説を立てた。そうであれば、オタマボヤにおいてレチノイン酸を使う経路が失われても、*Hox1* の正常な発現が損なわれず、オタマボヤが絶滅しなかったことを説明できる。そのため、本研究では、下記の2つの研究を行った。

① オタマボヤの *Hox1* の上流配列をレポーター遺伝子に連結してホヤ胚に導入し、レチノイン酸非依存的に発現するかどうかを調べた。もしも共通祖先が備えていたレチノイン酸非依存的な活性化経路をホヤが保持していれば、オタマボヤ *Hox1* エンハンサーがホヤ胚において活性化するはずである。

② ホヤ *Hox1* のエンハンサーの中に、レチノイン酸非依存的に転写を活性化するエレメントがあるかどうかを探索した。ホヤはレチノイン酸依存的な活性化経路を保持していると思われるが、上の①の実験でレチノイン酸非依存的に *Hox1* の発現を活性化できる転写活性化因子の存在が示唆されれば、今度は、ホヤ *Hox1* のエンハンサー中にそれに応答するエレメントが残っているかどうかを調べる必要がある。

3. 研究の方法

(1) ホヤ *Hox1* の転写活性化にレチノイン酸が必要であることを証明

① ホヤ *Hox1* の神経索エンハンサーが約 3 kb の第二イントロン中にあることはわかっていた。そこで、このイントロンを lacZ 翻訳領域に連結し、レポーター解析を行った。段階的な欠失や部位特異的の点突然変異によってエンハンサーエレメントを同定し、ゲルシフト解析によって、そのエレメント内に核内レチノイン酸受容体 RAR の結合配列があるかどうかを探った。

② RAR と Raldh2 に特異的なアンチセンスモルフォリノオリゴを受精卵に顕微注入し、その胚における *Hox1* の発現を調べた。

(2) ホヤの組織分化や器官形成における *Hox1* の役割の解明

① 連携研究者の笹倉靖徳博士の研究室で、偶然に *Hox1* の挿入突然変異体を得られた。そこで、この突然変異体の表現型を解析した。また、*Hox1* に特異的なモルフォリノオリゴを受精卵に顕微注入し、その影響が突然変異の表現型と一致することを確認した。

② RAR と Raldh2 に特異的なモルフォリノオリゴを顕微注入した胚において、①の研究で観察されたのと同様の表現型が得られる

かどうかを確認した。また、*RAR*や*Raldh2*をモルフォリノオリゴでノックダウンすると同時に*Hox1*を発現させて、異常な表現型をレスキューすることを試みた。

(3) オタマボヤ *Hox1* のレポーター解析

① オタマボヤ *Hox1* の転写開始点上流の配列を *lacZ* に連結してホヤ胚に導入した。転写活性が見られた場合には、段階的な欠失実験を行なってエンハンサーエレメントを短い領域に絞り込んだ。

② ホヤ *Hox1* の神経索における発現は、レチノイン酸の機能を阻害しても完全に失われない。そこで、レチノイン酸に依存しない *Hox1* エンハンサーがホヤにもあるかどうか、レポーター解析によって探索した。

4. 研究成果

(1) ホヤ胚の中枢神経系（神経索）における *Hox1* の転写はレチノイン酸によって活性化される（論文①）。

ホヤ *Hox1* の神経索エンハンサーは約 3 kb の第二イントロンにある（図 1A, B）。胚をレチノイン酸で処理すると、このエンハンサーは中枢神経系全体で異所的に活性化する（図 1A, C）。段階的な欠失実験の結果、神経索のエンハンサーはイントロン中央部の 500 塩基対程度の領域に絞り込めた（図 1A~G）。この領域の塩基配列は、カタユレイボヤと、近縁のユレイボヤとの間で保存されていることもわかった（図 1H）。

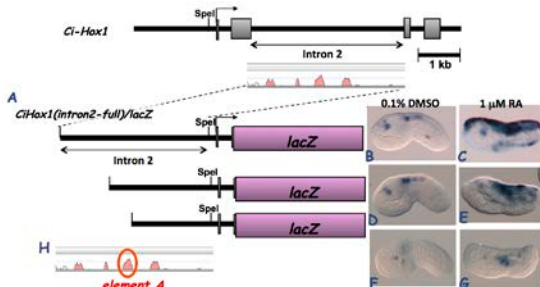


図 1

この領域 (Element A) には、RAR 結合部位 (RARE) と思われる配列があった（図 2 の赤い×印）。3 kb のイントロンからこの領域のみを欠失させたり、RARE に点突然変異を導入すると（図 2A），神経索における発現が弱くなり、レチノイン酸にも応答しなくなった（図 2B）。この RARE には、実際にホヤの RAR タンパク質が結合することをゲルシフト解析によって確かめた（図は示さない）。

Raldh2 と *RAR* に特異的なアンチセンスモルフォリノオリゴを注入した胚では、内在性の *Hox1* の発現が弱くなった（図 3）。以上のことから、ホヤの神経索における *Hox1* の発現はレチノイン酸によって活性化するとい

うことがわかった。

ホヤ胚において、正常な遺伝子の発現にレチノイン酸が必要であることを証明した研究は、本研究以外にはない。

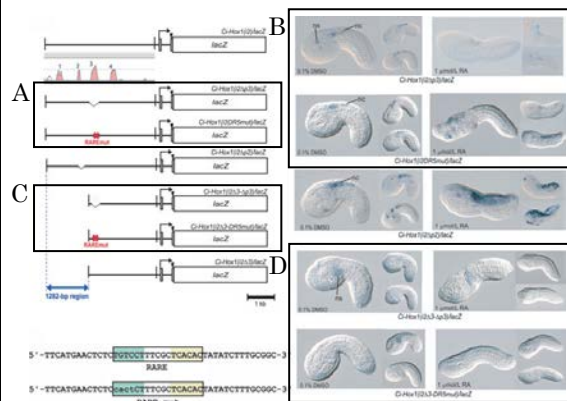


図 2

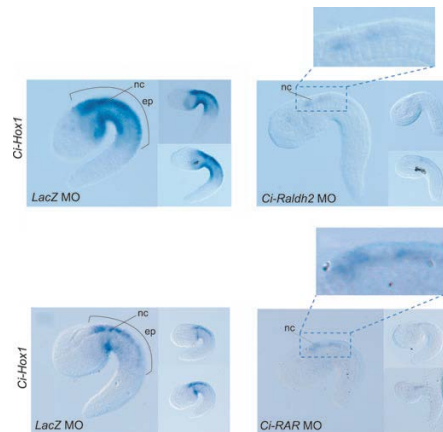


図 3

(2) 表皮で発現する *Hox1* がホヤの出水孔原基、咽頭鰓裂、体壁筋などの形成に必須である（論文②）。

ホヤの表皮における *Hox1* の発現がレチノイン酸によって活性化されることは、私たちの以前の研究でわかっていた。本研究では、その *Hox1* が機能しないと、胚（〜幼生）の体幹部に生じるはずの出水孔原基の形成が不全となることがわかった。

連携研究者の笹倉靖徳博士は、トランスポゾン *Minos* を利用して多数の挿入突然変異体を作出したが、偶然、その中に *Hox1* 遺伝子の突然変異体を発見した。変異体の幼生には出水孔原基ができなかった。*Hox1* に特異的なアンチセンスモルフォリノオリゴを受精卵に注入すると、そこから生じた幼生にも出水孔原基ができなかった（図 4）。モルフォリノオリゴと同時に、*Hox1* を表皮で発現させると、出水孔原基が正常に生じた（図 4）。しかし、間充織や中胚葉、中枢神経系で *Hox1* を発現させても、異常な表現型はレスキューされなかった（図は示さない）。これらのこ

とから、表皮で発現する *Hox1* が出水孔原基の形成に必須であることがわかった。

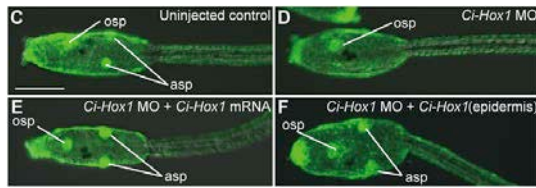


図 4

Raldh2 に特異的なモルフォリノオリゴを注入した胚においても、出水孔原基が生じなかった (図 5)。*Raldh2* 特異的モルフォリノオリゴを注入した胚の表皮で *Hox1* を発現させると、出水孔原基が正常に形成された (図 5)。同様の表現型は *RAR* にこのことは、レチノイン酸が機能しないと表皮において *Hox1* が発現せず、その結果として出水孔原基ができないということを意味する。

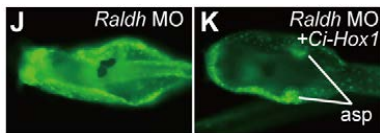


図 5

幼生が変態した後の形態を観察すると、*Hox1* の変異体や *Hox1* モルフォリノオリゴを注入した個体では、出水孔の筋肉と体壁筋、および咽頭裂が形成されなかった (図は示さない)。これらの表現型も、*Hox1* を発現させることによってレスキューできた (図は示さない)。

外部から過剰に投与したレチノイン酸がホヤの器官形成に悪い影響を及ぼすことは古くから知られているが、正常な器官形成にレチノイン酸と *Hox1* が必要であることは、本研究が世界で初めて証明した。

(3) ホヤとオタマボヤにおける *Hox1* エンハンサーの比較解析 (論文未発表)

私たちは、ホヤとオタマボヤの共通祖先が、*Hox1* の転写を活性化するために、レチノイン酸依存的な経路と非依存的な経路の二つを兼ね備えていたという仮説を立てた。この二つの経路は *redundant* であり、どちらか一方が働けば *Hox1* が正常に発現すると考えた。オタマボヤは *Raldh2* や *RAR* などの遺伝子を失ったが、レチノイン酸に依存しない経路を持っていたために *Hox1* の発現パターンには影響を受けなかった。そうだとしたら、そのレチノイン酸非依存的な *Hox1* 活性化経路がホヤにも保存されているかも知れない。

本研究では、まずオタマボヤ *Hox1* の転写開始点上流約 3.6 kb を *lacZ* に連結したプラスミドを入手し、これをホヤ胚に導入した。

レポーター遺伝子は、ホヤの *Hox1* と似たパターンで胚の神経索において発現した (図 6)。このレポーター遺伝子を導入した胚をレチノイン酸で処理しても、*lacZ* の発現する領域に変化はなく、異所的な発現は見られなかった (図 6)。

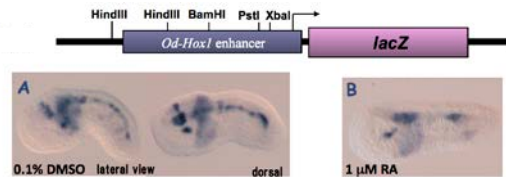


図 6

次に、オタマボヤの上流配列を、上流側から段階的に欠失させ、エンハンサーの転写活性を調べた。その結果、図 7 のオレンジ色の矢印で示した領域が、ホヤ胚の神経索における転写活性化に必要なエンハンサーエレメントであることがわかった。

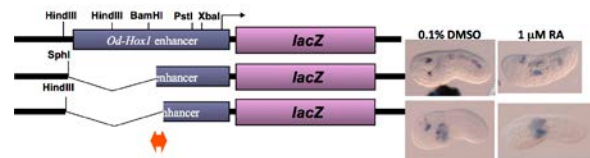


図 7

これらの結果から、オタマボヤ *Hox1* の上流配列にはホヤ胚の神経索において活性化するエンハンサーが含まれていることがわかった。また、このエンハンサーを活性化する転写調節因子が *RAR* ではない (レチノイン酸が転写を活性化しているのではない) ことも示唆された。

この研究でもう一つわかったことは、神経索においてレチノイン酸と無関係に (オタマボヤの) *Hox1* 遺伝子の発現を活性化する転写活性化因子をホヤが持っているということである。それでは、その転写活性化因子は、ホヤ *Hox1* の神経索における転写も活性化しているだろうか。そこで、本研究では、成果の (1) で触れたホヤ *Hox1* の中枢神経系エンハンサーにあらためて注目した。

図 2 に示した実験では、3 kb の第二イントロンから *RARE* を欠失させたり、*RARE* 配列に点突然変異を導入すると、神経索における *lacZ* レポーター遺伝子発現は弱くなったが、完全には消えなかった (図 2A, B)。このとき、胚をレチノイン酸で処理しても *lacZ* の異所的な活性化は見られなかった。一方、第二イントロンの配列のうち、*RARE* より上流側を大きく欠失させた状態で *RARE* に突然変異を導入すると、*lacZ* の発現は完全に消失した (図 2C, D)。また、レチノイン酸処理をしても *lacZ* の発現は全く活性化しなかった。このことは、ホヤ *Hox1* 遺伝子の第二

ントロンの 5' 側の配列が、レチノイン酸に依存しない神経索エンハンサーとして機能することを示唆した。

本研究では、オタマボヤ *Hox1* の上流配列に含まれる神経索エンハンサーと、ホヤ *Hox1* の第二イントロンに含まれるレチノイン酸非依存的エンハンサーとが、同じ転写調節因子によって活性化するかどうかは突き止められなかった。今後、二つのエンハンサーの配列の比較や、候補となる転写調節因子の機能解析を通じて、両者の転写活性化機構が共通なのかどうかを解明したい。また、現在は、オタマボヤ胚にレポーター遺伝子を導入して発現を調べる実験は技術的に困難である。しかしオタマボヤとホヤの胚を用いたエンハンサー機能の比較解析は是非行いたいので、オタマボヤ研究者と協力して、オタマボヤへの遺伝子導入の実験系を確立し、本格的な比較解析を行いたい。

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 8 件)

- ① Kanda, M., Ikeda, T. & Fujiwara, S. (2013) Identification of a retinoic acid-responsive neural enhancer in the *Ciona intestinalis Hox1* gene. *Dev. Growth Differ.* Vol. 55, pp. 260-269. (査読有)
doi: 10.1111/dgd.12033
- ② Sasakura, Y., Kanda, M., Ikeda, T., Horie, T., Kawai, N., Ogura, Y., Yoshida, R., Hozumi, A., Satoh, N. & Fujiwara, S. (2012) Retinoic acid-driven *Hox1* is required in the epidermis for forming the otic/atrial placodes during ascidian metamorphosis. *Development* Vol. 139, pp. 2156-2160. (査読有)
doi: 10.1242/dev.080234
- ③ Tatzuke, Y., Sunanaga, T., Fujiwara, S. & Kawamura, K. (2012) RACK1 regulates mesenchymal cell recruitment during sexual and asexual reproduction of budding tunicates. *Dev. Biol.* Vol. 368, pp. 393-403. (査読有)
doi: 10.1016/j.ydbio.2012.06.006
- ④ Fujiwara, S., Isozaki, T., Mori, K. & Kawamura, K. (2011) Expression and function of *myc* during asexual reproduction of the budding ascidian *Polyandrocarpa misakiensis*. *Dev. Growth Differ.* Vol. 53, pp. 1004-1014. (査読有)
doi: 10.1111/j.1440-169X.2011.01312.x

- ⑤ Tassy, O., Dauga, D., Daian, F., Sobral, D., Robin, F., Khoueiry, P., Salgado, D., Fox, V., Caillol, D., Schiappa, R., Laporte, B., Rios, A., Luxardi, G., Kusakabe, T., Joly, J. S., Darras, S., Christiaen, L., Contensin, M., Auger, H., Lamy, C., Hudson, C., Rothbacher, U., Gilchrist, M., Makabe, K. W., Hotta, K., Fujiwara, S., Satoh, N., Satou, Y. & Lemaire, P. (2010) The ANISEED database: digital representation, formalization and elucidation of a chordate developmental program. *Genome Res.* Vol. 20, pp. 1459-1468. (査読有)
doi: 10.1101/gr.108175.110
- ⑥ Tetsukawa, A., Nakamura, J. & Fujiwara, S. (2010) Identification of chondroitin/dermatan sulfotransferases in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* Vol. 157, pp. 205-212. (査読有)
doi: 10.1016/j.cbpb.2010.06.009
- ⑦ 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)
doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01184.x

[学会発表] (計 13 件)

- ① 藤原滋樹・笹倉靖徳・神田美幸 (2012) 「ホヤの発生学」フォーラム 2012/衛生薬学・環境トキシコロジー, 10月26日(名古屋・招待講演)
- ② Kanda, M., Cañestro, C., Ikeda, T. & Fujiwara, S. (2012) 「Transcriptional regulatory mechanism of the *Hox1* gene in *Ciona intestinalis* and *Oikopleura dioica*」Asia-Pacific Developmental Biology Conference, 10月6日(台北市, 台湾)
- ③ 中村惇・藤原滋樹 (2012) 「カタユウレイボヤ胚におけるグリコサミノグリカン硫酸転移酵素の機能解析」日本動物学会第83回大会, 9月15日(大阪)
- ④ Kanda, M., Cañestro, C. & Fujiwara, S. (2012) 「Transcriptional regulatory mechanism of *Hox1* gene in urochordates」BSCB/BSDB/JSDB Joint Spring Meeting, 4月17日(Coventry市, イギリス)
- ⑤ Nishioka, M. & Fujiwara, S. (2011) 「Devising a gene silencing method in *Ciona intestinalis*」第34回日本分子生物学会年会, 12月13日(横浜)
- ⑥ 磯崎崇臣・森京子・川村和夫・藤原滋樹

(2011)「ミサキマメイタボヤの無性生殖における *myc* 遺伝子の発現と機能」日本動物学会第 82 回大会, 9 月 22 日 (旭川)

- ⑦ 川島大典・三田薫・藤原滋樹 (2010)「カタユウレイボヤ胚の神経管形成における *cdx* 遺伝子の役割」日本分子生物学会第 33 回年会, 12 月 9 日 (神戸)
- ⑧ 笹倉靖徳・神田美幸・池田拓・堀江健生・河合成道・小椋陽介・吉田麗子・保住暁子・佐藤矩行・藤原滋樹 (2010)「脊索動物ホヤの表皮においてレチノイン酸 → *Hox1* カスケードは otic placode 相同器官の形成に必須である」日本分子生物学会第 33 回年会, 12 月 8 日 (神戸)
- ⑨ 堀川陽輔・石田聡美・藤原滋樹 (2010)「カタユウレイボヤ胚における動物半球特異的遺伝子のエンハンサー解析」日本分子生物学会第 33 回年会, 12 月 7 日 (神戸)

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

笹倉 靖徳 (SASAKURA YASUNORI)
筑波大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号： 10400649