

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23247037

研究課題名(和文)脊椎動物における軸・胚葉形成の比較発生

研究課題名(英文)Ontogeny and phylogeny of A-P axis and germ layer formation in amniotes

研究代表者

相沢 慎一(Aizawa, Shinichi)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：60073011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,400,000円

研究成果の概要(和文)：軸・胚葉形成は動物の体造りにもっとも根本となる発生過程である。羊膜類ではマウス、ニワトリでその分子機構の解明が進んだが、羊膜類での基本機構と哺乳類、鳥類発生のためのデフォルメの機構を統合的に理解する視点は得られていない。これを明らかにするため、真獣類ウサギ、ブタ、スンクス、爬虫類スッポン、ゲッコー、有袋類オポッサムについて動物飼育、胚採取条件を確立し、分子マーカーを用い比較発生解析し、羊膜類での軸・胚葉形成機構の原型と変遷について興味ある知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Anterior-posterior (A-P) axis determination and germ-layer formation are most fundamental steps in animal development. In amniotes their mechanisms have been studied in mouse and chick. The mechanisms are so diverged between them that no consensus has been established about the prototype in amniotes and the divergences in mammal and avian. To examine the question, comparative analyses were made in eutherian (mouse, rabbit, pig, Suncus), reptile (gecko, turtle), avian (chick, quail), and metatherian (opossum). The studies have revealed unexpected phylogenetic changes in amniote A-P axis and germ layer formation.

研究分野：生物学

キーワード：前後軸形成 羊膜類 マウス ニワトリ スッポン ゲッコー オポッサム 真獣類

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物での軸、胚葉形成の分子機構については各綱のモデル動物、すなわちマウス、ニワトリ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュでの解析が進捗していた。しかしこれらの動物での機構を統合的に理解する視点への手がかりは得られていなかった。他方分子生物学的手法、ゲノム解析が進捗し、非モデル動物での比較発生学的解析が可能となった。

2. 研究の目的

羊膜類での前後軸、胚葉形成の分子機構—そのプロトタイプと各動物でのデフォルメの機構を検討する目的で、真獣類(マウス、ウサギ、ブタ、ジャコウネズミ)、爬虫類(スッポン、ゲッコウ)、有袋類(オポッサム)について、各動物の飼育条件、胚発生条件、特定時期の胚採取法を確立し、比較発生学的解析を行う。

3. 研究の方法

哺乳類マウス、鳥類ニワトリ、ウズラについては確立されている実験系により、遺伝子の発現、機能解析を行った。真獣類ジャコウネズミ、爬虫類スッポン、有袋類オポッサムについては動物を国内、国外より導入し、飼育、交配環境を確立し、ついで胚発生状況を確認し、特定時期での胚採取法を確立した。真獣類ウサギ、ブタについては農業試験研究所徳永、大西博士に動物飼育、交配、胚採取を依頼し、これを定期的に行うための連携法を樹立した。ゲノム情報に基づき比較分子発生学的解析のため、各動物で各遺伝子のオルソログを同定単離した。

4. 研究成果

(1) マウスにおける前後軸、胚葉形成
マウスにおいて前後軸形成は、受精後 E5.25 日に遠位臓側内胚葉(DVE)に一連のヘッドオーガナイザー(HO)遺伝子が発現する細胞が出現することにより始まることを確定した。DVE 細胞はその後将来の吻側に移動して AVE を形成、その後反対側のエピプラストに原条が形成され胚葉形成がおこる。DVE, AVE での各 HO 遺伝子の発現パターン変化を免疫染色により明らかにした。Otx2 がもっとも広く発現し、その吻側境界に Dkk1 が発現、その内部に Cer1, Lefty などの発現がおこる。マウス胚では Nodal がエピプラストの未分化性の維持、DVE, AVE の形成に重要な役割を果たすことが知られている。また胚体外外胚葉(ExEc)が、BMPs, Nodal 成熟化酵素を発現して、エピプラストの未分化性の維持、DVE, AVE の形成に重要な役割を果たすことが知られている。DVE の動く方向が将来の前を決め、そのメカニズムに興味を持たれているが、Otx2 の発現が E5.25 に非対称におこることがトリIGGERとなること、E5.25 以前に他の HO 遺伝子に非対称性は認められないこ

とを示した。

(2) 真獣類における前後軸、胚葉形成
cup 型の形態をとるマウスと異なり他の真獣類胚は爬虫類、鳥類胚同様 disc 型の形態をとる。またげっ歯類の多く、げっ歯類にもっとも近縁なウサギ、を含め大半の真獣類胚は、マウスで前後軸、胚葉形成に必須の役割を果たすといわれる ExEc を形成しない。ウサギ胚での前後軸、胚葉形成の比較分子解析を行ったところ、胚の形態、ExEc の欠損に関わらず DVE→AVE 形成は保存されていた。このことはマウスでの DVE, AVE 形成における ExEc の役割について疑問を投げかけるもので、今後の重要な検討課題である。AVE 形成はブタ、スンス胚でも共通に認められ、前後軸形成が AVE 形成によっておこることは真獣類に保存された機構と考えられる。Nodal をこの時期の胚発生に用いること、AVE で HO 遺伝子の発現は Otx2 の発現領域内に Dkk1 を最吻側部として起こることも真獣類に保存された機構であった。しかし AVE の形成様式はブタ、スンス胚では異なり、真獣類における AVE 形成の基本機構についてはさらなる検討を必要とする。また BMP のこの時期の胚発生における役割、Nodal 勾配の果たす役割についても、今後の検討を要する。

(3) 鳥類における前後軸、胚葉形成

ニワトリにおける前後軸の形成は stage X に一連の trunk organizer (TO) 遺伝子を発現するカラーの鎌、PMZ (posterior marginal zone) の形成によって後ろから始まるといわれている。また、原条形成直前の Stage XII に hypoblast は HO 遺伝子の一部を発現し、AVE に相同な構造との提案がある。内中胚葉形成に先立つこの時期 Nodal, Bmps の発現は認められず、マウスと異なってこの時期の胚発生に Nodal, Bmp は働かないと考えられている。これらのことをニワトリ胚、ウズラ胚で確認した。

(4) 爬虫類胚における前後軸、胚葉形成

真獣類胚、鳥類胚で 3 胚葉の形成は原条の形成によって起こるが、爬虫類胚は原条を形成せず、3 胚葉の形成は原口による。すなわち、原条は真獣類に至る系譜と鳥類に至る系譜で独立に獲得された。ワニ類に次いで鳥類に近縁なカメ類スッポンでの解析では、分子的にもカラーの鎌に相当する germ wall cells は存在せず、カラーの鎌、PMZ (posterior marginal zone) で発現する遺伝子は posterior marginal epiblast (PME) で発現していた。すなわちカラーの鎌と PMZ は PME に由来し、主竜類で獲得されたと想定される。双弓類でもっとも鳥類に遠縁なゲッコウの解析によると、スッポン PME で発現する遺伝子の大半はゲッコウ PME で発現せず、これらの遺伝子の PME での発現は有鱗類分岐後、主竜類で獲得されたと考えられる。Hypoblast での幾つかの

HO 遺伝子の発現も、ズッポンでは認められ
たが、ゲッコウではその大半が認められず、
原条同様真獣類と鳥類に至る系譜で独立に
獲得されたと考えられる。Nodal, Bmp シグナ
ルをこの時期の発生に用いないことは、鳥類
を含めた爬虫類に共通であった。

(5) 有袋類における前後軸、胚葉形成
真獣類胚は内部細胞塊を(ICM)を経てエピプ
ラスト、ハイポプラストを生じる。これに対
し爬虫類、鳥類は ICM を形成しない。有袋類
も ICM を形成せず、そのエピプラスト、ハイ
ポプラスト形成様式は爬虫類に類似する。
Nodal を囊胚形成前の発生に用いることは
ICM の形成と密接に関連していることが想
定される。実際有袋類胚では爬虫類胚同様、
囊胚形成前には Nodal の発現が認められな
かった。また HO 遺伝子の hypoblast での発現
も認められず、TO 遺伝子の発現大半の発現
も認められず、内中胚葉形成に関わる遺伝子
の発現が囊胚形成とともに blastoporal plate で
認められた。

本研究によりゲッコウ胚とオポッサム胚は、
羊膜類における前後軸形成、胚葉形成の原型
を顕していることが示唆された。両動物に
ついては動物実験施設での定常的な飼育、胚
採取のための条件を確立している。胚培養法、
仮親での発生法、卵凍結法などの生殖工学技
術を開発し、Cas/Crisper などによる 遺伝子
操作法を樹立して、前後軸、胚葉形成におけ
る遺伝子機能の解析を行うことが今後の課
題である。

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 13 件)

- (1) Hoshino, H., Shioi, G. and Aizawa, S. (2015).
AVE protein expression and visceral
endoderm cell behavior during
anterior-posterior axis formation in mouse
embryos: Asymmetry in OTX2 and DKK1
expression. *Dev. Biol.*, in press. (査読有). doi
10.1016/j.ydbio.2015.03.023.
- (2) Kurokawa, D., Ohmura, T., Sakurai, Y., Inoue,
K., Suda, Y. and Aizawa, S. (2014). Otx2
expression in anterior neuroectoderm and
forebrain/midbrain is directed by more than
six enhancers. *Dev. Biol.* 387(2), 203-213.
(査読有). doi 10.1016/j.ydbio.2014.01.011.
- (3) Abe, T., Aizawa, S. and Fujimori, T. (2013).
Live imaging of early mouse embryos using
fluorescently labeled transgenic mice.
Methods Mol Biol. 1052, 101-108. (査読有).
doi 10.1007/7651_2013_20.
- (4) Abe, T., Sakaue-Sawano, A., Kiyonari, H.,
Shioi, G., Inoue, K., Horiuchi, T., Nakao, K.,

Miyawaki, A., Aizawa, S. and Fujimori, T.
(2013). Visualization of cell cycle in mouse
embryos with Fucci2 reporter directed by
Rosa 26 promoter. *Development* 140,
237-246. (査読有). doi 10.1242/dev.084111.

- (5) Kurokawa, D., Ohmura, T., Akasaka, K. and
Aizawa, S. (2011). A lineage specific
enhancer drives Otx2 expression in teleost
organizer tissues. *Mech. of Dev.* 128, 653-661.
(査読有). doi 10.1016/j.mod.2011.11.001.
- (6) Shioi G, Kiyonari H, Abe T, Nakao K,
Fujimori T, Jang CW, Huang CC, Akiyama H,
Behringer RR, Aizawa, S. (2011). A mouse
reporter line to conditionally mark nuclei and
cell membranes for in vivo live-imaging.
Genesis 49, 570-578. (査読有). doi
10.1002/dvg.20758.
- (7) Abe T, Kiyonari H, Shioi G, Inoue KI, Nakao
K, Aizawa, S., Fujimori T. (2011).
Establishment of conditional reporter mouse
lines at ROSA26 locus for live cell imaging.
Genesis 49, 579-590. (査読有). doi
10.1002/dvg.20753.

他

〔学会発表〕(計 23 件)

- (1) 梶川絵理子
「Anterior-posterior (A-P) axis formation in
soft-shelled turtle and gecko. スッポンとヤ
モリにおける前後軸形成」第 48 回日本発
生生物学会大会、2015 年 6 月 3 日~4 日
つくば国際会議場、茨城県つくば市
- (2) 山本大輔
「Anterior-Posterior Axis Formation in the
marsupial, *Monodelphis domestica*. 有袋類
ハイイロジネズミオポッサムにおける前
後軸形成機構の解析」第 48 回日本発生
生物学会大会、2015 年 6 月 3 日~4 日つ
くば国際会議場、茨城県つくば市
- (3) 相沢慎二
「爬虫類における前後軸形成」日本動物学
会 第 85 回 仙台大会 2014、2014 年 9
月 11 日、東北大学川内北キャンパス、宮
城県仙台市
- (4) 大村朋美
「Otx2 expression in anterior neuroectoderm and
forebrain/midbrain is directed by more than six
enhancers.」第 47 回日本発生生物学会、2014
年 5 月 28 日~29 日、ウインクあいち、愛知
県名古屋
- (5) 星野秀治
「OTX2 and DKK1 Exhibit the Earliest
Asymmetric Expression in Distal Visceral
Endo- derm. OTX2 と DKK1 は Distal
Visceral Endoderm において最も早く非対
称に発現する遺伝子である」第 47 回日本
発生生物学会、2014 年 5 月 28 日~29 日、
ウインクあいち、愛知県名古屋市
- (6) 梶川絵理子

「Anterior-posterior (A-P) axis formation in soft-shelled turtle and gecko. スッポンとヤモリにおける前後軸形成」第47回日本発牛生物学会、2014年5月28日～29日、ウヰンクあいち、愛知県名古屋市

(7) 吉田道生

「Comparative gene expression analysis in anterior-posterior axis formation of non-rodent mammals. 非齧歯類哺乳動物の前後軸形成における遺伝子発現の比較解析」第47回日本発牛生物学会、2014年5月28日～29日、ウヰンクあいち、愛知県名古屋市

他

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相沢 慎一 (AIZAWA SHINICHI)

独立行政法人理化学研究所・

ライフサイエンス技術基盤研究セン

ター・研究員

研究者番号：60073011