

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82648

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657153

研究課題名(和文) 咽頭弓の分節性に着目した新たな生物時計の探索

研究課題名(英文) An approach for finding of novel biological clock focusing on the segmentation of the pharyngeal arch

研究代表者

高田 慎治 (TAKADA, Shinji)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60206753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：咽頭弓の分節構造形成には、咽頭内胚葉および外胚葉で発現するRipply3 というアダプター因子が必要であり、この因子は新たに分節化が起きる咽頭内胚葉の後方部においてダイナミックな発現変化を繰り返す。本研究では、まず、Ripply3転写開始点上流にEGFPを繋げた融合遺伝子を持つトランスジェニックマウスを作成し、Ripply3の発現に十分な転写制御領域を明らかにした。さらに、培養細胞ならびに上記融合遺伝子を導入したRipply3変異体マウスの解析から、Tbx1とRipply3を介した負のフィードバックが咽頭弓分節形成における周期的な遺伝子振動を生み出す上で重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The segmentation of pharyngeal arches requires Ripply, encoding an adaptor protein, which is expressed in the pharyngeal endoderm and ectoderm. Ripply3 is periodically expressed in caudal end of developing pharyngeal endoderm, where segmental morphogenesis takes place repeatedly. In this study, we identified a promoter element required for periodical expression of Ripply3 at the caudal end of pharyngeal endoderm by generating transgenic mice carrying Ripply3 promoter-EGFP fusion gene. We also showed that a feedback regulatory loop composed by Tbx1 and Ripply3 is critical for generating this periodicity by reporter analyses using culture cells and Ripply3 knock out mouse embryos. These results strongly suggest that a feedback interaction between Tbx1 and Ripply3 is important for periodical gene expression during segmentation of the pharyngeal endoderm, which has a slower periodicity than that in the segmentation of somites.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：形態形成 分節形成 分子時計 咽頭弓

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする生物には、概日リズムをはじめとする時間周期性を持つ現象が存在する。発生現象の中では、脊椎動物の体節の形成過程で周期的な遺伝子の発現振動が観察され、体節の分節構造の形成に関与することが明らかにされている。体節の周期性は転写抑制因子Hairy(Hes)を中心とするネガティブフィードバック経路により規定され、マウスでは2時間周期で振動が起きる。興味深いことに、Hairy(Hes)の発現振動は体節の分節化ばかりでなく、神経細胞やES細胞の分化をも制御することが示されつつあり、遺伝子発現の時間的振動が、生命現象のさまざまな局面において重要であることが次第に明らかになってきた。

では、生物には、すでに知られている時間周期の形成機構の他にも、時間周期性すなわちリズムを生み出す分子機構が存在するのだろうか。もしあるとしたら、その生理的意義はどのようなものであろうか。これまでに解明が進んでいる時間周期の形成機構を考えてみると、その基盤となるのはネガティブフィードバックによる制御である。脊椎動物の体節形成機構を考えてみた場合、転写抑制因子であるHairy (Hes)による自身の転写の抑制というネガティブフィードバックが動物種に固有の体節形成周期を生み出す上で重要である。周期性を伴わない生命現象においては、ネガティブフィードバックはフィードバックループを構成する因子の量を安定に維持することに働く。すなわち構成因子の量が揺らいでも、ネガティブフィードバックによりその変化は補償される。しかしながら、フィードバックループの構成因子の合成や分解の速度がある程度速くなると、構成因子の量はダイナミックに振動を続ける。生物ゲノム中には抑制反応に関わる数多くの遺伝子がコードされていることを考えれば、その中には未知の周期的振動を生み出すネガティブフィードバックに関わるものがあるかもしれない。

さて、新たな時間周期的制御を見いだすことを試みる上では、その制御による結果が明瞭であることが望まれる。発生過程においては、体節は時間周期的に明瞭な分節構造が形作られ、Hairy(Hes)を中心とする分節周期の形成機構が明らかにされた。脊椎動物の初期発生過程では体節の他に時間経過にしたがって分節構造が一つずつ形成されることが知られている組織として咽頭弓があげられる。咽頭弓は魚類の鰓に起源をもつ組織であり、脊椎動物の発生過程で一過的に形成される。ほ乳類では5対の咽頭弓が頭部側から順次発生するが、各咽頭弓の形成に要する時間は12時間よりやや長く、体節の分節周期や概日周期とは明らかに異なる。実際、体節の周期形成に関わるHairy(Hes)やNotchシグナルの関連因子が周期的に発現することは咽頭弓では観察されておらず、それらの変異

体においても咽頭弓の分節性に異常は認められない。従って、咽頭弓の分節性を生み出す分子基盤は体節のものとは異なるものであり、その解明は、生物における新たな時間制御機構の発見につながる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究開始時において、我々はマウスの咽頭弓の分節形成にRipply3というアダプタータンパク質をコードする遺伝子が必要であることをノックアウトマウスを作成することにより明らかにしていた。さらに興味深いことに、この遺伝子は各咽頭弓の形成に呼応して発現変化を繰り返すことを示唆する結果を得ていた。このような発現変化を示す遺伝子の報告はそれまでになかったことから、本研究では、咽頭弓におけるRipply3の発現変化に着目し、その制御機構の解明し、咽頭弓における遺伝子発現の時間制御機構を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 咽頭弓領域におけるRipply3の発現変動の解析

我々はRipply3が咽頭弓の分節構造の形成に必要であること明らかにするとともに、その時空間的発現パターンを *in situ* hybridization法を用いてこれまで解析してきた (図1)。マウスの場合、4ないし5対の咽頭弓が、発生の進行とともに頭側から尾側に向かって順次作られて行くが、各咽頭弓は内胚葉と外胚葉が接した咽頭嚢と呼ばれる構造によって区切られており、おそらく咽頭嚢の周期的な形成が咽頭弓の構造的周期性のもととなっている。Ripply3は咽頭嚢ならびに最も未分化な尾側の咽頭内胚葉と咽頭外胚葉で発現する。このうち、尾側の内胚葉と外胚葉での発現が最も強く、興味深いことにこの領域での発現は各咽頭弓の形成のタイミングに呼応するかのよう発現の強弱を繰り返していることが *in situ* hybridizationによる解析から示唆されている。

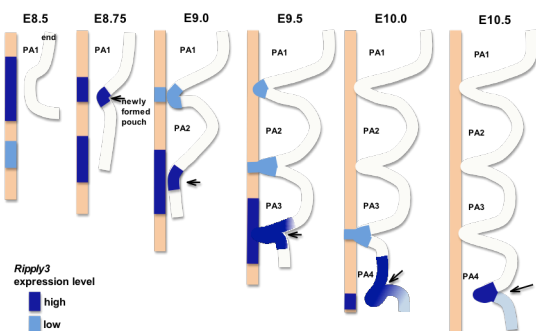


図1 咽頭弓における Ripply3 の発現の模式図 (胎生 8.5 日から 10.5 日)

そこで、このRipply3の時間的な発現変化をタイムラプス観察により直接的に明らかにし、その時間的な発現変化を生み出す分子メカニズムを解明する目的で、すでにRipply3の転写開始点上流の配列にGFPを繋げた融合遺伝子を作成し、それを用いてトランスジェニックマウスを作成した。まず、トランスジェニックマウスがゲノム中に組み込まれかつ子孫に伝達されることが確認できている複数の系統のトランスジェニックマウスを観察し、Ripply3遺伝子の本来の時空間的な発現パターンを再現し、かつGFPの発現量が最も高い系統を選別した。次に、この系統由来の胚を蛍光顕微鏡下でタイムラプス観察し、Ripply3の発現変動を解析した。

(2) Ripply3 の時間的な発現変化の制御機構の解析

① Ripply3 の時間的な発現変化に関わる因子の探索

我々は研究開始時にすでにRipply3の転写開始点上流の配列内にいくつかの転写調節因子の結合候補配列を見いだしている。そこで、そのような因子が実際にRipply3遺伝子の発現制御に関わるかどうかを、培養細胞系を用いたレポーターアッセイなどにより明らかにした。

② Ripply3 の時間的な発現変動の分子機構の解析

上記①で同定した因子が実際にRipply3遺伝子の時間的な発現変動を引き起こすかを検討した。特に、このような時間的な変動の要因としてRipply3に関わるネガティブフィードバック制御が想定されることから、同定した転写調節因子とRipply3の機能的相互関係に焦点を当てて解析した。基本的な解析は培養細胞を用いて進めたが、咽頭弓の分節過程においても同様な相互関係が見られるかどうかを検討するため、Ripply3変異マウスにおけるトランスジェニックの発現も検討した。そのために、トランスジェニックマウスとRipply3変異マウスを交配させ、トランスジェニックが導入された変異体マウスを樹立した。

(3) ゼブラフィッシュ Ripply3 変異体の樹立

マウスの咽頭弓においてRipply3の役割と制御機構の解析が進んだことから、他の脊椎動物においても同様なことが起きているかを調べることにした。近年、ゼブラフィッシュにおいてはTALENやCrisper等のゲノム編集技術により特定の遺伝子の変異体を人為的に作成する方法が確立していることから、本研究においてはTALENによりゼブラフィッシュRipply3変異体の樹立を試みた。

4. 研究成果

Ripply3の時間的な発現変化を生み出す分子メカニズムを解明する目的で、Ripply3の転写開始点上流の配列にEGFPを繋げた融

合遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成した。このトランスジェニックマウスを用いてRipply3の発現解析を行った結果、本トランスジェニックマウスの作成に用いた転写開始点上流6 kbの配列が咽頭弓におけるRipply3の発現には十分であることが明らかになった。

一方、培養細胞を用いたレポーターアッセイではこの上流6 kbの配列からの転写がTbx1により活性化され、さらにそれがRipply3により抑制されることが示された。このことは、Ripply3による負のフィードバックが自身の周期的な発現を生み出す可能性が示唆されている。そこでこのフィードバックが上流6 kbの配列を介して行われているかを調べるため、このトランスジェニックマウスとRipply3変異体を交配し、トランスジェニックを持つRipply3変異体を作成し、そこにおけるEGFPの発現を調べた。その結果、EGFPの発現期間が長くなり発現量も高まっていた。以上の結果は、Ripply3を介した負のフィードバックが咽頭弓におけるRipply3の発現に関わることを直接示すものであり、Tbx1とRipply3を介した負のフィードバックが咽頭弓における周期的な遺伝子振動を生み出すものと考えられた。

さらに、咽頭弓におけるRipply3の役割と発現制御が異なる種においても保存されているかどうかを検討するために、TALEN法によりゼブラフィッシュのRipply3変異体の作成にも成功した。これにより、複数の脊椎動物において咽頭弓における遺伝子振動機構を解析する基盤が確立できた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Kimura T, Nagao Y, Hashimoto H, Yamamoto-Shhiraishi Y, Yamamoto S, Yabe T, Takada S, Kinoshita M, Kuroiwa A, Naruse K (2014) Leucophores are similar to xanthophores in their specification and differentiation processes in medaka **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** in press (査読有)
- ② Hisano Y, Ota S, Takada S, Kawahara A. (2013) Functional cooperation of spns2 and fibronectin in cardiac and lower jaw development. **Biol Open**. 2, 789-794 (査読有)
- ③ Takahashi Y, Yasuhiko Y, Takahashi J, Takada S, Johnson RL, Saga Y, Kanno J. (2013) Metameric pattern of intervertebral disc/vertebral body is generated independently of Mesp2/Ripply-mediated rostral-caudal patterning of somites in the mouse embryo. **Dev Biol**. 380,172-184 (査読有)
- ④ Chiu CH, Chou CW, Takada S, Liu YW. (2012) Development and fibronectin signaling

requirements of the zebrafish interrenal vessel. **PLoS One.** 7(8):e43040. (査読有)

- ⑤ Yabe T. & *Takada S. (2012) Mesogenin causes embryonic mesoderm progenitors to differentiate during development of zebrafish tail somites. **Dev. Biol.** 370, 213-222 (査読有)
- ⑥ Chen, Q Takada, R., & *Takada S. (2012) Loss of Porcupine impairs convergent extension during gastrulation in zebrafish. **J. Cell Sci.** 125, 2224-2234 (査読有)
- ⑦ Okubo, T., Kawamura, A., Takahashi, J., Yagi, H., Morishima, M., Matsuoka, R., & Takada S. (2011) Ripply 3, a Tbx repressor, is required for development of the pharyngeal apparatus and its derivatives in mice **Development** 138, 339-348 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Okubo T & Takada S. Negative feedback regulation of Ripply3 for own promoter during pharyngeal arch development 第47回日本発生生物学会 May 27-30, 2014 ウィンク愛知 愛知県名古屋市
- ② Wanglar C., Yabe, T. & Takada S. Molecular mechanisms underlying segmentation border formation in zebrafish somitogenesis, The 19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting September 20, 2013, 仙台市情報産業プラザ 宮城県仙台市
- ③ Wanglar C., Yabe, T. & Takada S. Molecular mechanisms underlying segmentation border formation in zebrafish somitogenesis, 第46回日本発生生物学会 May28-31, 2013, くびきメッセ 島根県松江市
- ④ Takada S. Jagged is required for epithelial reorganization. Cell Symposium “Biology at the interface”, September 29, 2011, RIKEN CDB 兵庫県神戸市
- ⑤ Takada S. Jagged/Notch directs epithelial morphogenesis. The 5th Asia and Oceania Zebrafish Meeting, August 27, 2011, Beijing China
- ⑥ Tsunokuni, H., Akanuma, T. & Takada S. Jagged/Notch directs epithelial reorganization. The 7th European Zebrafish Meeting, July 7, 2011, Edingburgh, UK

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/cib2/>

http://www.nibb.ac.jp/sections/developmental_biology/takada/

<http://zfin.org/ZDB-LAB-050728-1>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 慎治 (TAKADA, Shinji)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60206753