

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：35309

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570244

研究課題名(和文)脊椎動物における体軸形成機構の進化発生学的研究

研究課題名(英文)An Evo-Devo study for mechanisms of body axis formation in vertebrates

研究代表者

竹内 雅貴 (TAKEUCHI, Masaki)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教授

研究者番号：00392019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

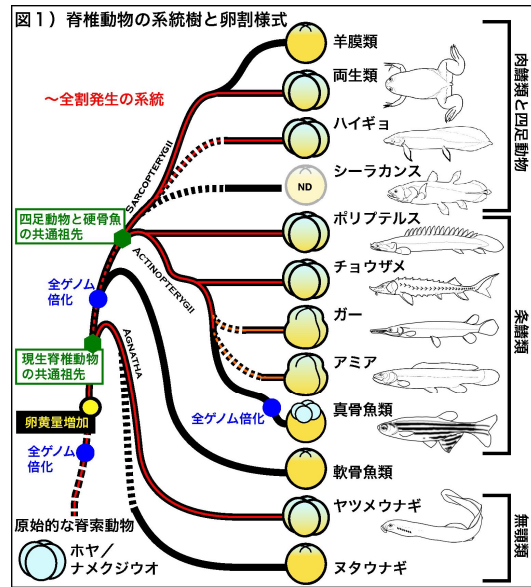
研究成果の概要(和文)：両生類の頭部形成において、siamoisホメオボックス転写因子は母性Wntシグナルの標的として必要とされる。これは両生類系統の特殊性と考えられていたが、本研究において、原始的条鰭類ポリプテルスのsiamois相同遺伝子dioskouroiを発見し、機能解析を行った。結果として、dioskouroiはポリプテルスの頭部形成のみならず、体軸形成と内胚葉分化に必要とされる事が明らかとなった。この結果は、siamois関連因子の機能獲得が硬骨魚類と四肢動物の共通祖先までさかのぼれる事を示す。各動物種におけるsiamois関連因子は、転写因子としての機能は同じでも胚発生における役割は多様化している。

研究成果の概要(英文)：Xenopus siamois is a homeobox gene coding for a transcriptional mediator of the dorsal Wnt signaling pathway and is necessary for the head formation. Despite its importance in Xenopus development, no siamois-related genes have been found in other taxa. In this study, I found a novel siamois-related gene, dioskouroi, in bichir. The bichir gene, which is different from siamois, plays roles in not only organizer formation but also endoderm differentiation endogenously. These results lead to a hypothesis that the siamois-related protogene in a common ancestor of bony fishes played central role in early embryogenesis. The protogene as a Wnt signal mediator might be derived into Xenopus siamois which play a role in head formation and bichir dioskouroi which play a role in endoderm differentiation.

研究分野：分子発生生物学・比較発生生物学

キーワード：脊椎動物 体軸 転写因子 条鰭類 ポリプテルス ホメオボックス 両生類

1. 研究開始当初の背景



初期発生はボディプランを確立する発生段階であり、その分子機構の理解は個体発生における遺伝情報の階層性をひもとく上で非常に重要である。特に、卵割に続く体軸形成と三胚葉形成、それに伴う原腸形成については、脊椎動物発生学における中心課題として多くのモデル生物で解析が進んでいる。その一方で、脊椎動物系統は多量の卵黄を獲得し保持様式を変化させた結果、全割/盤割の卵割様式や胚体外組織の有無、原腸形成時の組織配置などが多様化したと考えられる。初期発生の様式やそれを司る分子機構は、繁殖戦略や卵黄量の増減によって柔軟に変わりうると思われがちであるが、動物綱レベルではよく保存されており、脊椎動物全体という比較的マクロな視点で系統的に解釈する事が可能である。このように個体発生に重要で且つ系統的に多様と、一見相反する特質を併せ持つ脊椎動物初期発生がどのような進化過程で獲得されたのかは非常に興味深い。これまで、脊椎動物系統の根幹を成す初期発生様式は両生類様であると広く考えられてきた。なぜなら、両生類は原索動物と共通で、全割により生じたすべての細胞が初期三胚葉の一部へ分化し、胚体外組織を形成しないためである。しかしながら、“全割発生する両生類以外の

脊椎動物”についての分子発生的知見はほとんどなく、系統的に再考する必要があった。

研究代表者は、これまで *Xenopus* やゼブラフィッシュを用いた初期発生研究の経験を生かし、全割発生する原始的条鰭類ポリプテルスや無顎類ヤツメウナギの初期発生を解析してきた。特にポリプテルスの実験動物化については、飼育から実験技術の開発まで世界に先駆けて行ってきた。また、初期胚の EST 解析とデータベース化も行っており、初期発生研究のためのインフラとして非常に有用であった。ポリプテルスの Hox クラスターやいくつかの遺伝子配列から、真骨魚でみられる全ゲノム倍化はその分岐以後に起きた系統発生イベントであることが報告されている。真骨魚ではフグ・メダカなどで全ゲノム配列が決定されており、その祖先型ゲノムを持つ生物として比較ゲノムの観点からも注目されている。研究代表者は共同研究者と共にポリプテルスの全ゲノム解読を進めている段階であった。

2. 研究の目的

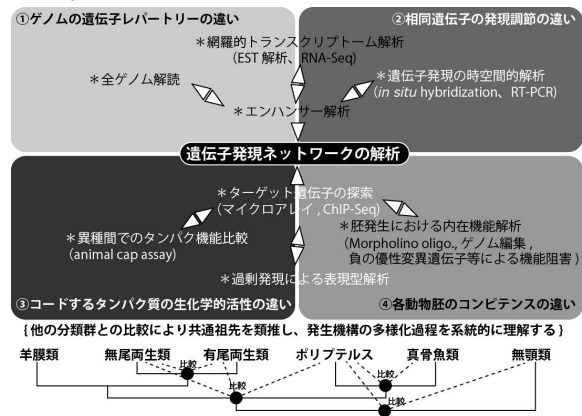
脊椎動物における初期発生機構の多様性を系統的に理解するため、従来のモデル生物との比較対象として鍵となるポリプテルスの初期発生を解析する。ポリプテルスは両生類様の全割で発生するが、両生類と異なり植物極側割球は内胚葉に分化せず胚体外組織となる。これは脊椎動物系統での根幹的な胚発生パターンであると考えられる。従って、その組織配置における体軸形成機構について、ポリプテルス *siamois* 関連因子の機能と *nodal* 発現制御機構を中心に、全ゲノム解析による遺伝子レポトリーや発現制御ネットワークの比較を交え解析する。この結果から初期発生多様化過程を推測し、脊椎動物原腸形成の統合的・俯瞰的理解を導き出す事を目的とした。

3. 研究の方法

真骨魚が全ゲノム倍化(WGD)を経た後に多様化した分類群である。ポリプテルスはそれ以前に分岐しており、条鰭類系統の祖先的ゲノムを持つと考えられる。従って、ポリプテルスの全ゲノムを解読し比較する事で、全ゲノム倍化によって真骨魚へもたらされた遺伝子レパートリーの変化を検出できる。さらに、ポリプテルスと両生類のゲノム比較により、条鰭類系統と四肢動物系統での遺伝子レパートリーの違いを知ることができる。これにより、単純にある発生機構の違いがある遺伝子を持つか持たないかの違いに起因する可能性を追求できると考えている(ゲノムが持つ遺伝子レパートリーの違い)。発生機構を調節する相同遺伝子がどの動物のゲノムにもある場合、その遺伝子の時空間的な発現の変化が発生機構の変化をもたらした可能性がある。注目すべき遺伝子発現を比較解析する事はもちろんの事、網羅的なトランスクリプトーム解析により責任遺伝子の候補探索ができる。さらに、cis 調節配列の違いに落とし込むべく、エンハンサーの比較解析を行う(相同遺伝子の発現調節の違い)。一方、ポリプテルスの発生機構における様々な遺伝子の役割を機能阻害等で解析し比較する事が遺伝子機能解析の中心となるが、この際に重要な点は、タンパク機能の差もしくは、胚のコンピテンスの差に注目する事である。タンパク機能の比較解析については、ツメガエル胚を用いた表現型解析と animal cap assay が簡便である。各動物種の相同遺伝子について、ツメガエル胚へ顕微注入し、表現型/マーカー遺伝子の発現などの効果の相違、もしくは相同性を解析する(コードされるタンパク質の生化学的活性の違い)。各動物種での胚のコンピテンส์比較については、同じ mRNA を各動物胚へ過剰発現する事により解析する。例えば、ポリプ

テルス胚 animal cap ツメガエル VegT mRNA を顕微注入すると内胚葉マーカーの発現が誘導できる。これは、ポリプテルス胚においては母性にも内胚葉領域にも発現しておらず、内在的には内胚葉分化へ機能しないと考えられる VegT が、異所的/異時的に発現した場合には内胚葉を誘導できる事を示す。つまり、胚のコンピテンスとしての VegT に対する反応性はポリプテルスでも *Xenopus* でも同じであり、ポリプテルス様の発生機構を持つ祖先から現生両生類系統で VegT の母性発現が獲得され、進化的に VMC が内胚葉の一部となったとの仮説を支持する。一方、ポリプテルスと *Xenopus* の siamois 関連遺伝子は、*Xenopus* 胚で同様の二次軸誘導活性を持つにもかかわらず、両動物胚発生における機能が異なると考えられる(各動物胚のコンピテンスの違い)。胚のコンピテンスの違いは、基本的に下流ターゲット遺伝子群の変化に起因すると考えられるため、最終的な目的として発現制御ネットワークの全体像を解析し比較する事が重要となる。

図2)



4. 研究成果

ポリプテルス EST データベースのクローンを *Xenopus* 胚へ異種過剰発現させ、その表現型から機能的にスクリーニングする手法により、*Xenopus* 胚で完全二次軸を誘導する因子として、ポリプテルスの siamois 関連遺伝子を単離した。この遺伝子を *dioskouroi*(以下、*dios*)と名付けた。

Xenopus siamois (以下、*sia*)と転写因子としての機能比較を行うため、転写抑制型・恒常的活性化型の *dios* コンストラクトを構築し、*Xenopus* 胚を用いて機能解析を行った。結果として、転写抑制型 *dios* は負の優勢変異体であり、*dios* は *sia* と同様に転写活性化因子である事がわかった。また、転写抑制型 *dios* の背側過剰発現は、転写抑制型 *sia* や *sia* ノックダウンと同様に頭部欠損胚の表現型を示した。さらに、*sia* ノックダウン胚の頭部欠損表現型は、*dios* の過剰発現により救済される。これらの結果は、*dios* がポリプテルスの遺伝子であるにも拘らず、*Xenopus* 胚においては *sia* と同じ分子機能を持つ事を示唆する。

Xenopus 胚発生における homeobox 転写因子 *Siamois* は、母性 Wnt シグナルの直接標的因子であり背側オーガナイザー形成に必要とされる。機能阻害すると頭部欠損を引き起こす重要な遺伝子であるが、これまで両生類以外の生物で類似の配列や機能を持つ遺伝子は見つかっていなかった。ポリプテルスにおいて *sia* と同じ機能を持つ *dios* が見つかった意味は非常に大きく、この遺伝子は系統的にすべての四肢動物と硬骨魚の共通祖先が持っていたが、現生の羊膜類と真骨魚類のゲノムから失われた事を示唆する。

Dios のポリプテルス胚発生における役割を解析するため、ポリプテルス胚で内在機能の疎外実験を行った。驚くべき事に、*dios* ノックダウン胚の表現型は、原腸形成の阻害による体軸形成異常であり、*Xenopus* 胚 *sia* ノックダウンの表現型とは著しく異なる。マーカー解析により、内胚葉分化が阻害されている事がわかった。従って、*Xenopus* 胚とは異なりポリプテルス胚では、*siamois* 関連遺伝子は体軸形成だけでなく内胚葉分化にも必要とされる事を示唆する。

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3件)

竹内 雅貴「体細胞の分化多能性獲得と、個体発生システムの関係性」川崎医療福祉学会誌、査読無、24(1), 2014, pp.135-136、
<http://www.kawasaki-m.ac.jp/soc/mw/journal/jp/>

竹内 雅貴「Evo-Devo : 進化発生生物学 ~形態進化を個体発生システムの変化として理解する~」川崎医療福祉学会誌、査読無、22(1), 2012, pp.127、
<http://www.kawasaki-m.ac.jp/soc/mw/journal/jp/>

Takechi M., Takeuchi M. (contributed equally as first authors), Ota G. K., Nishimura O., Mochii M., Itomi K., Adachi N., Takahashi M., Fujimoto S., Tarui H., Okabe M., Aizawa S., Kuratani S. 「An overview of transcriptome profiles identified in hagfish, shark, and bichir: Current issues arising from some nonmodel vertebrate taxa」*Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 査読有、15:316(7), 2011, pp.526-46、DOI: 10.1002/jez.b.21427

[学会発表](計7件)

Masaki Takeuchi, Shinichi Aizawa
「The Early Embryogenesis of *Polypterus* (bichir) ~Insights into the Origin and Evolution of Developmental Mechanisms in Vertebrates~」CDB Symposium, 2012年3月4日、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター(兵庫県・神戸市)

竹内 雅貴、「Evo-Devo : 進化発生生物学 ~形態進化を個体発生システムの変化として理解する~」川崎医療福祉学会、2012年6月13日、川崎医療福祉大学(岡山県・倉敷市)

Masaki Takeuchi, Shinichi Aizawa
「Developmental Roles of *siamois*-related Gene in a Basal Actinopterygian: Functional and Evolutionary Implications」The 46th Annual Meeting for the

Japanese Society of Developmental Biologists (cosponsor: the Asia-Pacific Developmental Biology Network)、2013年5月29日、くにびきメッセ(島根県・松江市)

竹内 雅貴「脊椎動物における初期発生システムの進化 -原始的条鰭類ポリプテルスの胚発生から考察する-」
第7回日本ツメガエル研究集会、
2013年9月24日、秋吉台国際芸術村
(山口県・美祿市)

竹内 雅貴, 相沢慎一「原始的条鰭類ポリプテルスの胚発生における siamois 関連遺伝子の役割とその進化的考察」日本動物学会第84回大会、
2013年9月26日、岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

竹内 雅貴「体細胞の分化多能性獲得と、個体発生システムの関係性」
川崎医療福祉学会 第46回研究集会、
2014年6月11日、川崎医療福祉大学
(岡山県・倉敷市)

竹内 雅貴「脊椎動物初期発生の多様性における有尾両生類の位置づけ」
イベリアトゲイモリ研究集会、2014年12月4日、鳥取大学医学部(鳥取県・米子市)

〔その他〕

ホームページ等

Vertebrate Time Capsule
(<http://transcriptome.cdb.riken.go.jp/vtcap/>)
The Rising Generation of Evo-Devo Biologist
(<http://www.evo-devo.net/posters.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 雅貴 (TAKEUCHI Masaki)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教授

研究者番号：00392019