

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770223

研究課題名(和文)二つの形成体因子ChordinとNogginの協調的な背腹軸パターンの安定化

研究課題名(英文)Robust stability of dorsal-ventral patterning by coordination of Chordin and Noggin

研究代表者

猪股 秀彦 (INOMATA, HIDEHIKO)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：60372166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の背腹軸は、オーガナイザーから分泌される二つの背側化因子Chordin、Nogginの濃度勾配に従って構築される。しかし、これらは同じBMP阻害活性を保持しており、何故二種類の分子が背腹軸形成に必要な明らかにされていない。本研究課題では、これら二つの分子が胚内で異なる空間分布を示すことを明らかにした。Chordinは分解速度が早く急勾配を形成するが、Nogginは分解速度が遅く緩勾配を形成する。さらに、Chordinの分解を介して、胚サイズ依存的にChordinの濃度勾配が適切に制御されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dorsal-ventral patterning of vertebrates is mainly regulated by two dorsalizing factors, Chordin and Noggin. However, it is not clear why two different proteins, which have the same anti-BMP activity, are needed for D-V axis formation. In the present study, we reveal that Chordin and Noggin show different distribution in the embryo. Having high degradation rate, Chordin proteins form steep gradient, while Noggin proteins, which are very stable, form shallow gradient in vivo. Furthermore, Chordin gradient is properly shaped according to the size of the embryo via Chordin degradation.

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：スケーリング 背腹軸 数理モデル アフリカツメガエル 頑強性 再構成

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の背腹軸は、オーガナイザーから分泌される背側化因子（主に Chordin と Noggin）の濃度勾配に従って構築される。しかし、これら二つのタンパク質はいずれも BMP 阻害活性を有しており、何故同一の生理活性をもつ二つの分子が背腹軸形成に必要か明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者は、これら二つの分子が胚内において異なる空間分布を示し、背腹軸形成過程において異なる制御機序に参与している可能性を考えた。濃度勾配の形状は、主に産生・拡散・分解の3要素によって制御されている。そこで、Chordin と Noggin の産生・拡散・分解を胚内で定量し、各々のタンパク質が胚内においてどのように分布しているか検討した。

3. 研究の方法

発生過程は複数の異なるイベントが同時に進行し、かつそれらの現象は時々刻々と動的に変動している。このような複雑な発生システムを定量的に理解するには、適度に発生システムを単純化し、定量する必要がある。申請者は、濃度勾配の形状を規定する産生・拡散・分解を定量するために、濃度勾配を胚内に人工的に再構成し、Chordin および Noggin が胚内に分布する過程を定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) 背腹軸の再構築

発生過程において、濃度勾配の形状を規定する産生・拡散・分解は各々が動的に変動する。従って、背側化因子の濃度勾配形状が変化して胚が背側化する可能性として、産生の上昇、拡散の促進、分解の低下、あるいはこれらの組み合わせが考えられる。このように、3つの要素が変動する条件下において、定量的な解析は困難を伴う。そこで、人工的に産生量が一定の濃度勾配を胚内に作成し、背腹軸の再構築系の開発を試みた。

背腹軸を再構成するには、内因性の濃度勾配を消去する必要がある。β Catenin は背側化因子の産生細胞であるオーガナイザーの形成を誘導することが知られており、2細胞期にβ Catenin を MO（モルフォリノアンチセンスオリゴ）で阻害することにより、濃度勾配が存在しない腹側だけの胚を作り出す事ができる。さらに、内因性の Chordin、Noggin の発現を阻害するために各々の MO も同時にインジェクションした（図1）。この、β CN-MO（β Catenin/Chordin/Noggin-MO）をインジェクションした胚を用いて、8細胞期の1割球に Chordin または Noggin の mRNA をインジェクションし、人工的にモルフォゲン産生細胞を局所に形成した。この条件下では、モルフォゲンの産生量をインジェクションする

mRNA 量で制御することができる。

実際に、本手法を用いて濃度勾配を再構成すると、適量の Chordin mRNA によって、野生型と同等の背腹軸が再構築された。一方、少量の Noggin mRNA を用いて背腹軸を再構成すると、胚全体が背側化された。さらに、Chordin の産生量を2～4倍に増大させても、胚は Noggin のように胚全体が背側化されず、正しい背腹パターンを維持した。従って、Chordin と Noggin は拡散速度または分解速度が大きく異なり、異なる形状の濃度勾配を胚内に形成している可能性が示された。

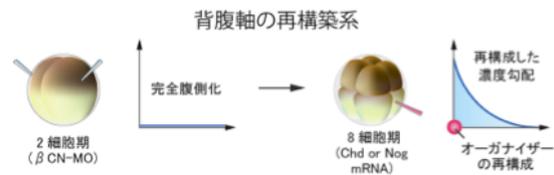


図1. 背腹軸の再構築系

(2) 拡散の定量

Noggin 濃度勾配が胚全体を背側化する理由として、Chordin に比べて Noggin の拡散速度が大きく、速やかに胚の中を拡散し胚全体を背側化している可能性が考えられる。そこで、Chordin と Noggin に各々 mEGFP を付加し、分泌タンパク質が細胞間隙で可視化できるようにした。これらのタンパク質を用いて、FRAP 法（光褪色後蛍光回復法）または FCS 法（蛍光相関分光法）により、拡散速度の定量を行った（図2）。その結果、予想に反して Noggin の拡散速度は Chordin に比べて非常に遅いことが判明した。従って、Chordin と Noggin の空間分布の差異は、拡散速度の違いに起因しないことが明らかとなった。

(3) 分解の定量

In vivo の環境下において、分泌タンパク質の分解量を定量的に解析する系の開発を行った。His-tag を C 末端に付加した Chordin および Noggin を HEK293 細胞にトランスフェクションし、培養上清に分泌したタンパク質を His-tag を用いて精製した。その後、等量の精製タンパク質を胎胚期の胞胚腔にインジェクションした。インキュベーション後、C 末端抗体を用いて免疫沈降し、N 末端抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。この方法により、全長のタンパク質のみを検出することができる（分解されたタンパク質は検出されない）。

実際に、Chordin および Noggin タンパク質の胚内における安定性を定量したところ、Chordin タンパク質は30分以内に半量のタンパク質が分解されるが、Noggin タンパク質は6時間経っても安定であった（図2）。先行研究において、Chordin を分解する Chordin 分解酵素と、この酵素に直接結合し分解活性を阻害する Sizzled の存在が知られている。

そこで、胚内における Chordin 分解が主に Chordin 分解酵素によって担われているか検討するために、Sizzled 過剰発現下において同様に Chordin の分解量を定量した。その結果、Noggin と同様に 6 時間経っても Chordin タンパク質は安定であった。

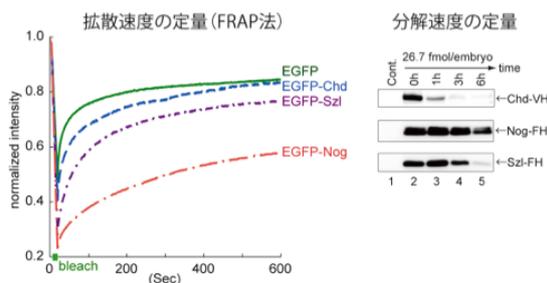


図 2. 拡散速度と分解速度の定量

(4) Chordin 濃度勾配を Noggin 型に

上述で得られた結果から、Chordin は胚内において速やかに分解され、その結果、急な濃度勾配を胚内に形成している可能性が高い。一方、Noggin は非常に安定であるため、分解されずに遠方まで拡散し、胚全体を背側化していると考えられる。そこで、この仮説を検証するために Sizzled 過剰発現下、または Sizzled 抑制下で背腹軸の再構築系を用いて Chordin の濃度勾配形状の評価を行った。その結果、Chordin の産生量が一定にもかかわらず、Sizzled 過剰発現下では Noggin と同様に緩勾配を形成し、胚全体を背側化した。一方、Sizzled 抑制下では Chordin の分解が促進され、Chordin は非常に急な勾配を形成し、胚の大部分は腹側領域になった。

(5) Chordin の分解を介したスケーリング

以上の結果から、発生過程において Chordin タンパク質は非常に不安定であり、濃度勾配の形状が Sizzled タンパク質の量によって動的に制御されている可能性が考えられる。一方、Noggin タンパク質は分解されにくく、形成された濃度勾配は安定に維持される可能性が高い。これらの結果は、Chordin タンパク質が Noggin に比べ即応性に優れ、臨機応変に勾配形状を変化できる可能性を示している。

アフリカツメガエル胚の背腹軸形成は頑強性が保たれている事が知られている。例えば、st 8~9 の時期に卵を背側と腹側領域に半割にすると、背側半割胚からは半分のサイズのオタマジャクシが発生することが知られている。これは、空間サイズ依存的に背側化因子の濃度勾配の傾きが制御され、適切な濃度勾配の形状を再構成できることを示している。そこで、申請者は上述した研究結果から、Chordin の即応性を利用して空間サイズ依存的に濃度勾配の形状を制御している可能性を考えた。Chordin の即応性は、

Chordin の分解を介して担われており、分解速度は Sizzled タンパク質の濃度によって制御されている。従って、スケーリングが保証されるには、胚サイズ依存的に Sizzled タンパク質の濃度が制御される必要がある。

Sizzled の発現は BMP によって正に制御されており、Chordin の拡散は BMP を阻害するため、Sizzled の発現を抑制する。一方、Sizzled は Chordin の分解を抑制するため、Chordin がより遠方まで拡散できるように促す。しかし、Chordin が遠方まで拡散すると Sizzled の発現は抑制されてしまい、結果的に Chordin と Sizzled は互いにネガティブフィードバックを形成している。背側半割胚では、野生胚に比べ腹側領域 (Sizzled 発現領域) が減少しているため、Sizzled の蓄積量は少なく、Chordin は不安定化し急な勾配を形成する。その結果、胚サイズに適した Chordin 濃度勾配が形成されると考えられる (図 3. スケーリングモデル)。

そこで、スケーリングモデルの妥当性を検証するために、胚サイズの減少に伴い Chordin が不安定化するか検証を行った。背腹軸の再構築系を用いて胚サイズを減少させたところ、スケーリングモデルで予想されたように、Chordin の産生量が一定にも関わらず、空間サイズの減少に伴い Chordin のタンパク量は減少した。

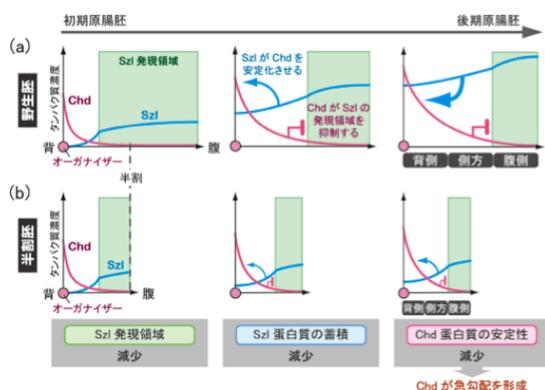


図 3. スケーリングモデル

(6) 総括

本研究課題では、同じ生理活性 (BMP 阻害活性) を示す Chordin と Noggin が、胚内で異なる空間分布を示す事を明らかにした。また、Chordin は分解を介して空間サイズ依存的に濃度勾配を変動し、胚サイズに適した背腹パターンを形成することを明らかにした。

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2件)

- ①. Inomata H, Shibata T, Haraguchi T, Sasai Y. Scaling of dorsal-ventral patterning by embryo size-dependent degradation of Spemann's organizer signals. *Cell*. (2013) 153, 1296-1311. 査読有
DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.004
- ②. 猪股秀彦, 柴田達夫, サイズの発生学、**生物物理誌** (2014)、313号、査読有

[学会発表] (計5件)

- ①. Inomata H, Shibata T, Sasai Y. Scaling of dorsal-ventral patterning by embryo size-dependent degradation of Chordin. 第51回 **日本生物物理学会** (Oct 28, 2013)
- ②. Inomata H, Shibata T, Haraguchi T, Sasai Y. Scaling of Dorsal-Ventral Patterning by Embryo Size-Dependent Degradation of Spemann's Organizer Signals. 第46回 **日本発生生物学会** (May 28, 2013)
- ③. 猪股秀彦. 動物胚の相似性を保証する発生場スケーリングの制御機序、第5回 **定量生物学の会** (Nov 25, 2012)
- ④. Inomata H, Shibata T, Haraguchi T, Sasai Y. Long-Range Regulation of Chordin Degradation via Sizzled Accumulation Directs Robust Self-Shaping of Embryonic Dorsal-Ventral Pattern. **The 14th International Xenopus Conference**. Giens Peninsula, France (Sep 10, 2012)
- ⑤. Inomata H. Scaling of Dorsal-Ventral Patterning. **Open Symposium in Hiroshima University** 'New insight into theoretical biology' (Sep 6, 2012)

[その他]

ホームページ等

http://www.cdb.riken.jp/jp/02_research/0202_creative33.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪股 秀彦 (INOMATA HIDEHIKO)

独立行政法人理化学研究所・体軸動態研究
チーム・チームリーダー

研究者番号：60372166