

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440111

研究課題名(和文)HOX遺伝子は消化管の部域間サイズバランスを制御する

研究課題名(英文)HOX genes regulate size balance between regions of digestive tract

研究代表者

村上 柳太郎(MURAKAMI, RYUTARO)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40182109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエ胚の中腸は内胚葉性の上皮と、内臓中胚葉由来の内臓筋からなり、4つのチェンバーに分かれる。内臓中胚葉にはHOX遺伝子 Scr, Antp, Ubx, abd-A が、体節と類似したパターンで発現している。本研究では、これらのHOX遺伝子が、中腸の発生で果たす役割と、その機構について解明することを目的としている。中腸の4つのチェンバーに特異的な上皮分化マーカーの発現を指標としてHOX遺伝子の作用を調べたところ、中腸前方で発現するAntpは、中腸上皮の細胞分化を誘導するのではなく、EGFRおよびDppシグナル経路を介して第1と第2チェンバーの大きさを制御していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The midgut of Drosophila embryo consists of endodermal epithelium and visceral mesoderm, and transiently forms four chambers during development. HOX genes, Scr, Antp, Ubx, and abd-A, are expressed in the midgut visceral mesoderm. We have studied role of HOX genes in the development of midgut chambers by use of chamber-specific epithelial differentiation markers. It was found that except for differentiation of the 2nd chamber, HOX genes are not required for chamber-specific epithelial differentiation itself. Antp, which is expressed at the boundary between the 1st and 2nd chambers, regulates size of the both chambers. Antp activity was found to be mediated by EGFR signaling pathway, and all the phenotypes caused by genetic modification of Antp activity were all associated with changes in dpp expression.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：HOX genes Drosophila midgut visceral mesoderm size control Dpp EGFR

1. 研究開始当初の背景

(1) ショウジョウバエ中腸は内胚葉性上皮と、それを裏打ちする内臓中胚葉から構成される。胚中期の中腸は4つのチェンバーに分かれており、上皮は各チェンバーに特有な細胞分化を示す。一方内臓中胚葉では HOX 遺伝子である *Scr*, *Antp*, *Ubx*, *abd-A* が体節部と類似したパターンで発現する。HOX 遺伝子は各体節のアイデンティティ決定に関わることから、中腸においても部域分化の制御に関わると予想されてきた。

(2) 中腸第2チェンバーの内臓中胚葉で発現する *Ubx* は、分泌性シグナル因子 Dpp を介して直下の内胚葉性上皮に作用し、第2チェンバー特異的な細胞分化を誘導することが古くから知られている。他のチェンバーについては細胞分化の指標となるマーカー遺伝子の知見が少なく、研究が途絶えていた。

(3) 我々は数年前から中腸の部域特異的分化マーカー遺伝子を多数同定しており、それらを用いて中腸における HOX 遺伝子の役割を研究してきた。その過程で、中腸の各チェンバーの細胞分化が、対応する位置の内臓中胚葉で発現する HOX 遺伝子の影響を受けることが、各 HOX 遺伝子の突然変異と強制発現胚の表現型から明らかとなった。

(4) 各 HOX 遺伝子の表現型は単純なものではなく、他の HOX 遺伝子や、さまざまな内臓中胚葉遺伝子の発現変化を伴った複雑なものだった。その理由は、HOX 遺伝子間にも、また HOX 遺伝子の標的と考えられる *dpp* や *wg* などのシグナル因子間、さらには内臓中胚葉と内胚葉性上皮の間にも、何重もの相互作用が存在するからである。

(5) このような複雑さを回避するため、内臓中胚葉を取り去って全ての HOX が働かない状態での中腸上皮の分化を調べる実験を始めたところ、*Ubx* に依存する第2チェンバー以外では、上皮の細胞分化そのものは、HOX 遺伝子に依存しない可能性が示唆された。この結果を受けてこれまでの HOX 変異の表現型を詳細に再検討した結果、その多くが、チェンバーの大きさの変化として理解できると考えるに至った。

(6) HOX 遺伝子メンバーである *Antp* 等が、中腸各部域の細胞分化ではなく、大きさのバランス(サイズバランス)を制御していることを示唆する予備的結果も得られた。これらの結果は多細胞動物の形作りにおける HOX の普遍的な意義を示している可能性が高く、本研究計画を立案する出発点となった。

2. 研究の目的

中腸の内臓中胚葉で発現する HOX 遺伝子群の役割を明らかにすることが、本研究の目的である。HOX 遺伝子は転写因子であり、内臓中胚葉の細胞内でのみ働いているが、その作用は中腸の主要な構成組織である内胚葉性上皮に及ぶ。これは内臓中胚葉から何らかの分泌性シグナル因子が作用しているこ

とを強く示唆しており、本研究では内臓中胚葉と上皮間で働く細胞間シグナル伝達系の解明も目的としている。さらに、HOX 遺伝子が関わる表現型で、中腸チェンバーのサイズが変化するが、これが細胞分裂や細胞死など、細胞レベルの動態についても明らかにし、HOX 遺伝子の作用機構を解明する。

3. 研究の方法

解析は中腸第1/第2チェンバーの境界部で発現する *Antp* を重点的に行った。他の HOX 遺伝子と *dpp* 等についても突然変異・遺伝子強制発現胚について同様な実験を行った。

(1) 中腸の各チェンバーを構成する上皮細胞の数(前後方向に並ぶ細胞数)及び細胞分裂中の細胞数を計測するため、核を Sytox Green および抗リン酸化ヒストン抗体で染色し、レーザー顕微鏡で観察した。

(2) 内臓中胚葉が生じない *jeb* 突然変異胚、及び、内臓中胚葉に *reaper* 遺伝子を強制発現してアポトーシスを誘導した胚で、中腸の形態形成と細胞分化を調べた。

(3) 内臓中胚葉の HOX の作用を上皮に伝える分泌性シグナル因子とシグナル伝達経路を同定するため、既知のシグナル系因子の発現、変異体の中腸表現型を指標として網羅的スクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ胚の中腸は4つのチェンバーに分かれており、第1と第2チェンバーにまたがる狭い領域の内臓中胚葉で *Antp* が発現し、その後方に *Ubx* が第2チェンバーにほぼ対応する範囲で発現する。第1チェンバーと第2チェンバーの上皮マーカーを利用して *Ubx* 突然変異の表現型を再検討した結果、*Ubx* 突然変異では第2チェンバーが縮小し、それと相補的に第1チェンバーが拡大することがわかった。これは中腸の第1・第2チェンバー間で、上皮の部域分化というレベルでも後方優位性が働いていることを意味する。

(2) *Antp* 突然変異胚では第2チェンバーが小さくなり、それと相補的に第1チェンバーが拡大した。これは(1)から想定される後方優位的な反応ではなく、意外にも *Ubx* 突然変異と類似した表現型である。GAL4-UAS システムによる *Antp* の強制発現胚では、突然変異とは反対に第1チェンバーが小さくなり、第2チェンバーが相補的に拡大した。

(3) 中腸では、後方優位性など HOX 遺伝子間の相互作用に加えて、HOX によって作られる Dpp や Wg などの細胞間シグナル因子との相互作用もある。さらには内胚葉性上皮と内臓中胚葉との間にも相互作用があり、複雑なフィードバック経路が錯綜している。さまざまな表現型をより単純に理解できるように、遺伝的に(*jeb* 突然変異)、および、人為的遺伝子操作(アポトーシス誘導)によって内臓中胚葉を除去し、中腸上皮の分化を調べた。従来

は、*Ubx* が *Dpp* を介して第 2 チェンバーを誘導することから、他の HOX 遺伝子も同様に上皮の部域特異的分化を誘導するだろうと長く信じられてきたのだが、本研究のいずれの手法で内臓中胚葉を除去した場合も、第 2 チェンバー特異的分化は消失したが、第 1、第 3、第 4 チェンバー上皮の部域特異的分化は、正常になされることがわかった。この結果は、内臓中胚葉で発現する HOX 遺伝子が中腸の部域分化を誘導する、という従来の見解は *Ubx* 以外の HOX 遺伝子には当てはまらず、それぞれの HOX 遺伝子が独自の機能を担っていることを明白に示している。内臓中胚葉のない中腸は、形態形成が大きく損なわれており、各チェンバーの大きさなど形態的な解析はできなかった。これらの結果を受けて、これまで行ってきた HOX 突然変異、HOX 強制発現の表現型を再検討すると、*Dpp* が誘導する第 2 チェンバーの分化を除くと、どの表現型も、チェンバーの大きさの変化として捉えることができる。(2) における *Antp* 遺伝子の活性による第 1/第 2 チェンバーの大きさの変化について、そのメカニズムを以下の実験で検討した。

(4) 中腸を構成するのは内臓中胚葉から生じる内臓筋と、内胚葉由来する上皮であるが、内臓筋の組織としてのマスは小さく、上皮が中腸の大半を占めている。したがって、チェンバーの大きさを決める要因としては、上皮細胞の大きさ、形態と数が重要である。大きさの変化が、細胞分裂や細胞死による可能性を検討するために、チェンバーの形態的識別な容易な *Antp* 強制発現胚の中腸で、チェンバーごとの上皮細胞の数と大きさ、細胞分裂頻度、アポトーシスの有無を調べた。細胞の形や大きさは野生型と差がなく、アポトーシスは殆ど観察されず、細胞分裂の局在性も認められなかった。*Antp* 強制発現では、第 1 チェンバーが小さくなり、構成細胞数は、それに対応して少なかったが、第 2 チェンバーが相補的に拡大し、細胞数も多くなっていた。いずれの場合も第 1 と第 2 チェンバーの細胞数の合計は野生型と差がなかった。これらの結果は、チェンバーの大きさの変化は、第 1 チェンバーと第 2 チェンバー境界の位置、つまり、*Ubx-Dpp* によって分化誘導される第 2 チェンバーの前方境界が、本来の第 1 チェンバーの領域内まで前方にシフトしたことを示している。*Antp* 強制発現胚で、*dpp* の発現を見ると、本来は第 2 チェンバーの領域に限定されている *dpp* が、中腸の広い範囲に拡大していることがわかった。

(5) *abd-A* の突然変異では、本来の第 3・第 4 チェンバーの分化マーカーが消失して、第 2 チェンバーの分化マーカーが拡大する。この突然変異は典型的な後方優位の表現型と看做されて来たが、この表現型は *dpp* の発現領域の後方への拡大を伴っていた。これらの結果は、*Antp* と *abd-A* のいずれもが、*dpp* の発現変化を介して、第 2 チェンバーの範囲を変

化させていることを示唆している。

(6) *Antp* と *abd-A* のいずれもが *dpp* の発現に影響していることがわかったが、正常胚での *dpp* 発現は *Antp* と *abd-A* とも重なっていない。*abd-A* の場合は、後方優位性によって *Ubx* を抑制し、それが結果的に *dpp* の発現抑制を引き起こすとも考えられるが、*Antp* の場合は、何らかの分泌性シグナル因子を介して *dpp* 発現に影響していると考えられる。そこで、既知の分泌性シグナル因子を対象として、中腸での発現、突然変異の中腸での表現型を指標として *Antp* の下で働くシグナル因子の同定を試みた。

(7) 中腸で発現するシグナル因子として、*argos* が同定された。*argos* は EGFR 経路で、細胞外のリガンドの作用を抑制すると考えられている。胚の中腸では内臓中胚葉全体で発現していた。*argos* 突然変異で中腸の形態を調べたところ、第 1 チェンバーの縮小と、第 2 チェンバーの相補的拡大が見られ、*Antp* 強制発現胚と類似した表現型だった。これは *Antp* が EGFR 経路の活性を強めていることを示唆する。次に EGFR 経路のさまざまな因子の突然変異・強制発現を検討した。EGFR の活性を失った突然変異胚では、*argos* 変異とは逆に第 1 チェンバーが拡大した。活性型 EGFR の強制発現では第 1 チェンバーが縮小した。EGFR 経路の下流で働く RAS の恒常活性型の強制発現も同様の表現型を引き起こした。これらの結果は *Antp* が EGFR 経路の活性化、あるいは脱抑制に関わることで、中腸チェンバーの大きさを制御していることを示唆する。そこで、*Antp* の制御を直接受ける EGFR 関連シグナル因子の探索を行っているが、現在まで同定に至っていない。

(8) これまでに得た *Antp* および EGFR 経路因子の中腸における表現型は、いずれも第 1 チェンバーと第 2 チェンバーの大きさを、互いに相補的に変化させるものだった。第 2 チェンバーの分化に関しては、本研究でも詳細な研究を行っており、従来の見解と同じく、*Ubx* が転写活性化する *dpp* が第 2 チェンバー上皮に作用して、分化誘導する、という結論が得られている。これまで *Antp* と EGFR 経路因子に関して得られた結果は、*dpp* の発現、あるいは *Dpp* タンパクの活性を調節することで、第 2 チェンバーとして分化する領域の前方境界の位置を動かす、という解釈が可能である。そこで、*Antp* と EGFR 経路因子の突然変異胚と、強制発現胚で、内臓中胚葉における *dpp* 発現を調べた。その結果は、第 1/第 2 チェンバーの大きさを変える全ての場合で、*dpp* の発現が変化していることが明らかとなった。第 2 チェンバーの拡大は常に *dpp* 発現領域の拡大を伴っており、第 2 チェンバーの縮小は、*dpp* 発現領域の縮小を伴っていた。

(9) これまでの結果より、ショウジョウバエ胚の中腸内臓中胚葉で発現する複数の HOX 遺伝子の中で、*Ubx* は分泌性シグナル因子 *Dpp* を介して中腸上皮の部域分化を誘導してい

るが, *Antp* は, 上皮の分化を直接誘導しては
おらず EGFR と Dpp のシグナル経路を介して,
中腸チェンバーの大きさ, 言い換えれば, 中
腸の形態を調節している, という結論が得ら
れた。このような, サイズの調節という働き
は, 他の器官形成で働いている HOX 遺伝子に
も一般化できる作用であることが予想され
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 0 件)

〔学会発表〕(計 13 件)

Izumi Tanoue 他 (Ryutaro Murakami), Role
of a HOX gene *Antp* in the midgut of
Drosophila embryo, 3rd Asia-Pacific
Drosophila Research Conference, 2015 年 5
月 11-14 日, Beijing, China

田上和 他 (村上柳太郎), ショウジョウ
バエ胚中腸における HOX 遺伝子 *Antp* の働き,
第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月
25-27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Yuichi Yoshimura 他 (Ryutaro Murakami)
Role of HOX genes in the pattern formation
of *Drosophila* midgut, 第 47 回日本発生生
物学会, 2014 年 5 月 27-30 日, ウィンク愛知
(愛知県名古屋市)

田上和 他 (村上柳太郎), ショウジョウ
バエ中腸における HOX 遺伝子 *Antp* の働き,
第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月
3-6 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸
市)

Keita Fujimoto 他 (Ryutaro Murakami),
The HOX gene *Antp* in the visceral mesoderm
regulates size balance between 1st and 2nd
midgut chambers, 第 46 回日本発生生物学会,
2013 年 5 月 28-31 日, くにびきメッセ (島根
県松江市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 柳太郎 (MURAKAMI RYUTARO)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40182109

(2) 研究分担者

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし

研究者番号: