

研究種目：基盤研究（S）  
研究期間：2004～2008  
課題番号：16107005  
研究課題名（和文） 局在 mRNA と誘導的細胞間相互作用によるホヤ胚発生の制御  
研究課題名（英文） Control of embryogenesis of ascidians by localized mRNAs and embryonic induction

研究代表者  
西田 宏記（NISHIDA HIROKI）  
大阪大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：60192689

## 研究成果の概要：

ホヤは近年、発生過程の詳細な記述、ゲノムプロジェクトの完了などにより、発生生物学における新たなモデル動物として注目を集めている。本研究ではマボヤの初期発生を司るしくみの理解をさらに押し進めるため、卵内で局在している mRNA について詳細かつ網羅的な解析を行った。また、32 細胞期あたりから始まる誘導的細胞間相互作用について、シグナルに対する応答能を制御する因子、そして誘導によって引き起こされる非対称細胞分裂の制御メカニズムを解析した。

## 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費       | 合計          |
|---------|------------|------------|-------------|
| 2004 年度 | 26,000,000 | 7,800,000  | 33,800,000  |
| 2005 年度 | 13,600,000 | 4,080,000  | 17,680,000  |
| 2006 年度 | 13,600,000 | 4,080,000  | 17,680,000  |
| 2007 年度 | 13,600,000 | 4,080,000  | 17,680,000  |
| 2008 年度 | 13,700,000 | 4,110,000  | 17,810,000  |
| 総計      | 80,500,000 | 24,150,000 | 104,650,000 |

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：胚発生、脊索動物、ホヤ、母性 mRNA、局在 RNA、胚誘導、  
繊維芽細胞成長因子、脊索

## 1. 研究開始当初の背景

ホヤの胚発生は古くから研究されているが、近年、発生過程の詳細な記述、初期発生のしくみの理解度の高さ、ゲノムプロジェクトの完了などにより、発生生物学における新たなモデル動物として注目を集めて始めていた。

## 2. 研究の目的

下等脊索動物であるマボヤ (*Halocynthia roretzi*) の受精卵は、オタマジャクシ幼生へと発生する。卵は細胞分裂によって表皮、神経系、脊索、筋肉、間充織、内胚葉などの限られた種類の細胞タイプを作り出すが、その過程で細胞の発生運命がどのようなしくみで決定されるのかを解明することを目的とする。本研究ではマボヤの初期発生を司るし

くみの理解を押し進めるため、1. 受精卵細胞質内で局在している母性の因子、特に卵内で局在している母性 mRNA について詳細かつ網羅的な解析を行う、2. 受精後 32 細胞期あたりからスタートする誘導的細胞間相互作用について、シグナルに対する応答能を制御する因子、そして誘導によって引き起こされる非対称細胞分裂の制御メカニズムを解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

前述の目的を達成するために、既存の cDNA プロジェクトやゲノムプロジェクトのデータを活用し、顕微胚操作（細胞質移植、割球単離、再結合）と分子生物学（遺伝子強制発現、ノックダウン、制御領域解析、抗体作成）、細胞生物学的技術（イメージング、タイムラプスビデオ）を使い解析を行った。

### 4. 研究成果

この研究を通じてあげてきた成果には、以下のようなものがある。研究が進むにつれて、卵内で局在している mRNA が誘導的細胞間相互作用にも関わっていることがわかってくるなど、この大きな二つのテーマが有機的に合流し始めたという経緯もあり、研究の展開がおもしろくなった。

#### (1) 母性の局在因子、特に卵内で局在している mRNA の解析

卵後極に局在している 9 種の *postplasmic RNAs* の機能解析をひととおり完了した。さらにその中で *POPK-1*, *PEM*, *Wnt5* に関して詳細な解析を行い、以下のようなことがわかった。卵後極に局在している *POPK-1* mRNA とその蛋白が卵割期の Centrosome-attracting body の適切な形成に関わると共に、母性 mRNA がそこに濃縮されるのに関わっていた。

もうひとつの *postplasmic RNAs* である *PEM* mRNA とその蛋白が、その局在位置に向かって中心体を引き寄せることにより卵割期に起こる不等卵割を制御していることがわかった。また、*PEM* mRNA とその蛋白はホヤにおける生殖細胞系譜での転写抑制に関わっていることが判明した。*PEM* は卵割面の制御と生殖細胞系譜での転写抑制のデュアルファンクションを果たしており、*PEM* のドメイン解析の結果これらの 2 つの機能はタンパク質の別々の部位によって担われていることがわかりつつある。

さらに、*Wnt5* mRNA とその蛋白は、中胚葉と内胚葉の運命分離に関わっている。その

際、*Not* mRNA が中胚葉側の娘細胞に非対称に分配される。16 細胞期の内中胚葉の核内で *Not* mRNA の転写が起り、核が将来の中胚葉側に移動していき、核膜崩壊と共に mRNA が細胞質に放出され、mRNA をそこに置き去りにして、分裂装置が細胞中央に戻るといふ mRNA の非対称分配の新しいしくみを発見した。

#### (2) 誘導的細胞間相互作用における応答能の制御と非対称細胞分裂の制御

脊索誘導における細胞内応答能因子は、ザイゴティックに発現してくる *Zic* と *FoxA* であることが判明した。次に、脊索誘導における脊索特異的キー遺伝子である *Brachyury* 遺伝子の発現制御領域に *Ets*, *Zic*, そしておそらく *FoxA* の結合配列があり、細胞外からの誘導情報と応答能因子の情報は、*Brachyury* 遺伝子の発現制御領域上で統合されることがわかった。脳誘導と間充織誘導における応答能因子は、それぞれ *GATA* と *macho-1* であることが示知られているので、これによって、3 種の誘導における応答能を制御している因子が全て明らかとなった。このように、ホヤ胚における初期胚誘導の全体像を包括的に理解することが可能となったことは、特筆に値する。全ての因子は、転写因子であったことが興味深い。

間充織誘導においては、内胚葉からの FGF が作用する方向が間充織/筋肉細胞の非対称分裂の方向性を決定するのに重要であることを実験的に明らかにした。脊索/神経索前駆細胞の非対称細胞分裂のしくみはやや複雑で、FGF 誘導シグナルと動物半球から来るアンタゴニスティックなシグナルによる細胞極性化によって引き起こされることが明らかになった。脊索誘導における応答能の時間的消失についても解析したところ、それは抑制型の転写因子である *FoxB* の遺伝子発現によってもたらされることがわかった。

### 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 26 件)

1. Niwano, T., Takatori, N., Kumano, G., and Nishida, H. Wnt5 is required for notochord cell intercalation in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biol. Cell* (2009) 101, 645-659. 査読有り
2. Kumano, G., and Nishida, H. Patterning of

- an ascidian embryo along the anterior-posterior axis through spatial regulation of competence and induction ability by maternally localized PEM. **Dev. Biol.** (2009) 331, 78-88. 査読有り
3. Prodon, F., Hanawa, K., and Nishida, H. Actin microfilaments guide the polarized transport of nuclear pore complexes and the cytoplasmic dispersal of *Vasa* mRNA during GVBD in the ascidian *Halocynthia roretzi*. **Dev. Biol.** (2009) 330, 377-388. 査読有り
  4. Lemaire, P., Smith, W. C., and Nishida, H. Ascidians and the plasticity of the chordate developmental program. **Curr. Biol.** (2008) 18, R620–R631. 査読有り
  5. Prodon, F., Sardet, C., and Nishida, H. Cortical and cytoplasmic flows driven by actin microfilaments polarize the cortical ER-mRNA domain along the a-v axis in ascidian oocytes. **Dev. Biol.** (2008) 313, 682-699. 査読有り
  6. Negishi, T., Takada, T., Kawai, N., and Nishida, H. Localized PEM mRNA and protein are involved in cleavage plane orientation and unequal cell divisions in ascidians. **Curr. Biol.** (2007) 17, 1014–1025. 査読有り
  7. Matsumoto, J., Kumano, G., and Nishida, H. Direct activation by Ets and Zic is required for initial expression of the *Brachyury* gene in the ascidian notochord. **Dev. Biol.** (2007) 306, 870-882. 査読有り
  8. Kim, G. J., Kumano, G., and Nishida, H. Cell fate polarization in ascidian mesenchyme/muscle precursors by directed FGF signaling and role for an additional ectodermal FGF antagonizing signal in notochord/nerve cord precursors. **Development** (2007) 134, 1509-1518. 査読有り
  9. Kumano, G., Yamaguchi, S., and Nishida, H. Overlapping expression of FoxA and Zic confers responsiveness to FGF signaling to specify notochord in ascidian embryos. **Dev. Biol.** (2006) 300, 770–784. 査読有り
  10. Miyazaki, Y., Nishida, H., and Kumano, G. Brain induction in ascidian embryos is dependent on juxtaposition of FGF9/16/20-producing and -receiving cells. **Dev. Genes Evol.** (2007) 217, 177-188. 査読有り
  11. Nakamura, Y., Makabe, K. W., and Nishida, H. The functional analysis of *Type I postplasmic/PEM* mRNAs in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. **Dev. Genes Evol.** (2006) 216, 69-80. 査読有り
  12. Nakamura, Y., Makabe, K. W., and Nishida, H. POPK-1/Sad-1 kinase is required for the proper translocation of maternal mRNAs and putative germ plasm at the posterior pole of the ascidian embryo. **Development** (2005) 132, 4731-4742. 査読有り
  13. Taniguchi, K., and Nishida, H. Tracing cell fate in brain formation during embryogenesis of the ascidian *Halocynthia roretzi*. **Dev. Growth Differ.** (2004) 46, 163-180. 査読有り
  14. Akanuma, T., and Nishida, H. Ets-mediated brain induction in embryos of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. **Dev. Genes Evol.** (2004) 214, 1-9. 査読有り

[学会発表] (計 47 件)

招待講演

1. Hiroki Nishida 2010 年 3 月 15-17 日 :  
How do embryos count the cell division rounds in each tissue lineage?: An ascidian case. 国際シンポジウム”Cell cycle and development(京都)
2. Hiroki Nishida 2009 年 6 月 21-25 日 :  
Establishment of embryonic axes and regionalization along the axes: Polarity in organisms and cells. 5th International Tunicate Meeting (基調講演、那覇)
3. Hiroki Nishida 2009 年 3 月 23-25 日 :  
Polarization of embryonic cells by prelocalized factors and external signals in ascidians. The CDB Symposium 2009 "Shape and Polarity" (神戸)
4. 西田宏記 2008 年 12 月 6 日 :  
ホヤ胚発生における胚と細胞の極性化  
国際高等研究所セミナー (奈良)
5. Hiroki Nishida 2008 年 1 月 6 日-9 日 :  
Cleavage pattern control and germ cell specification by localized maternal mRNA in ascidian embryos. Swiss-Japan Joint Meeting (Swiss, Arosa)
6. Hiroki Nishida 2006 年 4 月 24-26 日 :  
Notochord formation in ascidian embryos. 1st Meeting Italy-Japan on “VERTEBRATE ORGANOGENESIS” (Italy)
7. Hiroki Nishida 2005 年 9 月 3-7 日 :  
Role of localized maternal mRNAs in eggs of a basal chordate, the ascidian *Halocynthia roretzi*. 15th International Congress of Developmental Biology (Sidney)
8. Hiroki Nishida 2005 年 7 月 9-13 日 :  
Culture, cleavage pattern, and gastrulation

of *Oikopleura dioica*. 3rd International Tunicate Meeting (Santa Barbara)

9. Hiroki Nishida 2005 年 4 月 1-6 日 :  
Role of localized maternal mRNAs in eggs of a basal chordate, the ascidian *Halocynthia roretzi*. International Congress of Experimental Biology (San Diego)

[図書] (計 3 件)

1. 西田宏記, 他 細胞周期フロンティア (共立出版) 2010 年、共著、印刷中
2. 西田宏記, 他 研究をささえるモデル生物 (化学同人) 2009 年、共著、262 ページ (104-106 ページ)
3. 西田宏記, 他 神経系の多様性: その起源と進化 (培風館) 2007 年、共著、248 ページ (133-173 ページ)

[その他]

ホームページ等

[http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio\\_web/lab\\_page/nishida/index.html](http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/nishida/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 宏記 (NISHIDA HIROKI)  
大阪大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 60192689

(2) 研究分担者

熊野 岳 (KUMANO GAKU)  
大阪大学・大学院理学研究科・助教  
研究者番号: 80372605

(3) 連携研究者

なし。