

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0114

研究課題名(和文)細胞運動非依存的な脊索の自律的形態形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of cell movement independent morphogenetic mechanisms in notochord formation

研究代表者

安岡 有理 (Yasuoka, Yuuri)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：70724954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：幼生尾の液胞化した棒状支持組織としての脊索が、細胞内の液胞の膨圧と、脊索を覆う細胞外基質層(脊索鞘)の強度との釣り合いによって自己組織化されるという仮説(「液胞膨圧-脊索鞘強度平衡モデル」)を提唱した。このモデルを検証する一環として、脊索特異的細胞外基質要素の一つであるケラタン硫酸について、その生合成に必須の硫酸化酵素として、Chst3およびChst6を同定した。また、脊索動物における脊索構成要素の保存性を検討するため、頭索動物ナメクジウオを用いた発現解析を行った結果、caveolin, calumenin, leprecanなどが祖先的脊索構成要素として働いてきたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

【学術的意義】脊索は脊椎動物を含む脊索動物を特徴づける器官だが、その細胞生物学的な性質を俯瞰的にとらえた研究は少ない。本研究で提唱した「液胞膨圧-脊索鞘強度平衡モデル」は、これまでの知見を合理的にまとめた優れたモデルであり、今後その詳細な分子メカニズムの解明が期待される。また、ナメクジウオの遺伝子発現パターンを明らかにし、祖先的脊索構成要素の一部を明らかにできたのも大変意義深い。

【社会的意義】脊索遺残組織は椎間板髄鞘としてヒト成体にも存在し、その損傷は腰痛などの原因となる。また、椎間板髄鞘から生じる腫瘍(脊索腫)が希少疾患として知られている。本研究はこれらの疾患研究の基礎となりうる。

研究成果の概要(英文)：Notochord is defined as a vacuolated supporting organ of larval tail, which characterizes chordates. Here I proposed a self-organizing morphogenetic mechanism forming the notochord rod controlled by vacuolation, membrane trafficking, extracellular matrix formation, and cell proliferation; named "turgor pressure-sheath strength model." As a part of this model, I examined keratan sulfate biosynthesis in *Xenopus* embryos. Among carbohydrate sulfotransferase genes, chst3 and chst6 were identified as notochord-enriched genes. Loss of function analysis demonstrated that they were required for keratan sulfate synthesis in the notochord.

To examine evolutionary conservation of notochord components, I investigated expression patterns of notochord related genes in amphioxus embryos by in situ hybridization. The result suggests that caveolin, calumenin, leprecan, and so on have functioned as ancestral notochord components since chordate arose.

研究分野：進化発生学

キーワード：進化発生 収斂伸長運動 液胞 細胞外基質 ケラタン硫酸 ナメクジウオ ツメガエル ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊索は脊椎動物を含む脊索動物を特徴づける重要な器官であり、その発生過程が古くから研究されてきた。中でも、将来脊索を構成する背側中胚葉の細胞群が収斂伸長運動と呼ばれる細胞運動を起こし、前後軸方向に脊索を伸長させることは、カエル胚、ゼブラフィッシュ胚、ホヤ胚などを用いて精力的に研究されてきた。

しかし、収斂伸長運動を阻害した胚においても脊索細胞そのものは正常に分化し、棒状の支持組織を形成することも同時に明らかにされている (Sokol, 1996, *Curr Biol* 6:1456-67; Wallingford and Harland, 2001, *Development* 128:2581-92)。また、祖先的脊索動物である頭索動物 (ナメクジウオ) の胚発生では、そもそも背側中胚葉は収斂伸長運動を起こさず、原腸とともに陥入した背側中胚葉の正中に脊索が形成される。しかも、ナメクジウオの中胚葉形成パターンは、収斂伸長運動が阻害されたツメガエルの中胚葉形成パターンと酷似していることが示された (Onai et al., 2015, *Zool Lett* 1:29)。これらの知見は、収斂伸長運動とは独立した形態形成メカニズムが、脊索という組織の進化的根幹に存在することを示唆している。

脊椎動物の脊索細胞の主な特徴として、以下の点がこれまで明らかにされている。(a) 原腸胚以降ほとんど細胞分裂しない。(b) 他の中胚葉細胞に比べて、細胞死 (アポトーシス) が盛んに起こっている。(c) 周囲に細胞外基質でできた分厚い外壁 (脊索鞘) を形成する。(d) リソソーム様の液胞で満たされている。しかしながら、これらの知見は断片的であり、互いにどのように影響し合っているのか、胚発生の時系列に沿ってどのように制御されているのか、進化的な保存性がどこまであるのか、など統合的な理解には至っていない。そこで、本研究では脊索鞘の形成と脊索細胞の液胞化のダイナミクスに焦点を当てて、その構成的理解および進化的起源の解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、液胞膨圧と脊索鞘強度のつり合いをベースにした脊索の形態形成モデルの実証を目指す (図 1)。脊索細胞の液胞膨圧は、細胞内膜輸送や各種チャネルを介した浸透圧調節によって細胞内の液胞が大きくなり、強まると想定される。一方、脊索鞘は脊索細胞から分泌された細胞外基質が、糖鎖修飾や架橋形成を経てより強固になると考えられる。細胞分裂やアポトーシスの制御は、全体の細胞数を変化させ、脊索鞘と液胞の両方に影響を与える。これらのパラメータの相互関係を実験的に明らかにし、数理モデルとして統合する。

さらに脊索の形態形成メカニズムの進化的保存性を検討するため、ナメクジウオ胚を用いた実験を行う。これまで、ナメクジウオの脊索細胞も、脊索の前端および後端部分を除いて脊椎動物同様細胞分裂が止まっていることが示されている (Holland and Holland, 2006, *Evol Dev* 8:142-149)。一方で、脊椎動物とは異なりアポトーシスはほとんど起きていない (Bayascas et al., 2002, *Cell Death Differ* 9:1078-1089)。また、ナメクジウオの脊索は筋線維を豊富に含み、特異的なアクチン遺伝子の発現も報告されている (Suzuki and Satoh, 2000, *Dev Biol* 224:168-177)。しかし脊索鞘や液胞の形成に関わる知見は乏しいため、液胞形成・膜輸送・脊索鞘形成に関わる遺伝子の脊索における発現を調べ、進化的保存性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 脊椎動物の実験系として、脊索の発生過程に関わる遺伝子が数多く同定されており、外植体実験も容易なツメガエル胚を用いる。近年ゲノム編集技術を利用した遺伝子ノックイン法が確立されたので、脊索で特異的に発現する遺伝子群に蛍光タンパク質をノックインしたツメガエル系統を作成し、*in vivo* のタンパク質のライブイメージングを試みる。

(2) ツメガエル胚に各種阻害剤を作用させ、脊索の形態変化を観察する。実験には、lysyl oxidase 阻害剤 (bAPN)、caveolin 阻害剤 (genistein)、小胞体・ゴルジ体輸送阻害剤 (Brefeldin A)、H+ATPase 阻害剤 (Bafilomycin)、ケラタン硫酸分解酵素 (Keratanase) を用いた。

(3) 脊索と耳胞に顕著に観察される糖鎖修飾である高硫酸化ケラタン硫酸について、その合成経路に関わる酵素遺伝子群 (*b4gal t4*, *b3gnt*, *chst1*, *chst2*, *chst3*, *chst4*, *chst6*, *chst7*) のネ

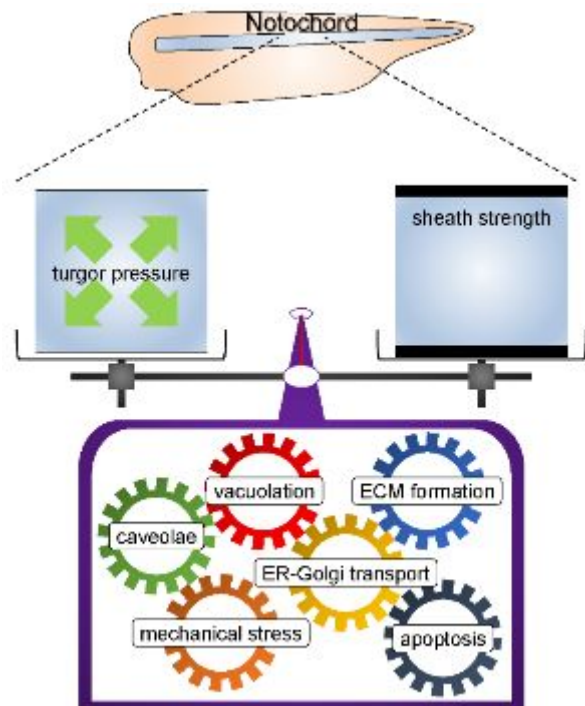


図 1: 液胞膨圧 脊索鞘強度平衡モデル

ツメガエル胚における発現パターンを in situ hybridization によって明らかにした。

(4)脊椎動物および尾索動物の脊索で特異的に発現する遺伝子群について、ナメクジウオのオーソログをクローニングし、その発現パターンを in situ hybridization によって明らかにした。

4. 研究成果

(1) ネットアイツメガエルノックインシステムを作成するため、Cas9 タンパク質と一本鎖ドナーDNA を受精卵に顕微注入した。その結果、脊索で発現する内在の遺伝子 (*brachyury2*, 図2) に FLAG タグを挿入し、ゲノム PCR および免疫染色にて検出することに成功した。多種の一本鎖ドナーDNA を用いた結果、gRNA と相補的かつホストゲノムとのホモロジー部位が非対称なものが最もノックイン効率がいいことを見出した。

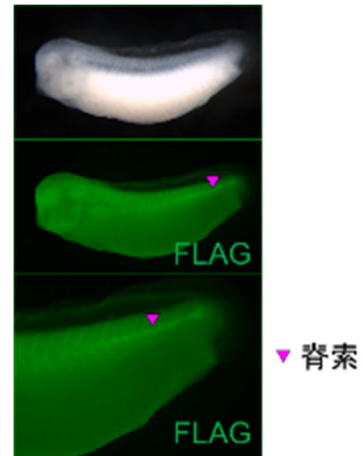


図2: *brachyury2* への FLAG タグのノックイン

(2) ツメガエル胚に各種阻害剤を作用させ、脊索の形態変化を観察したところ、既報文献通り lysyl oxidase 阻害剤 (APN) で脊索の屈曲が見られた (図3)。その他、caveolin 阻害剤 (genistein)、小胞体ーゴルジ間輸送阻害剤 (Brefeldin A)、H+ATPase 阻害剤 (Bafilomycin) については、胚への毒性が高く、有効な作用濃度・期間を決定しきれなかった。Keratanase については、胚外から暴露、割球内への顕微注入、胞胚腔への顕微注入を試みたが、いずれも内在の高硫酸化ケラタン硫酸を分解できなかった。



図3: APN 暴露による脊索形態異常

(3) 高硫酸化ケラタン硫酸の合成に関わる酵素の発現解析を行い、硫酸化酵素 Chst2、Chst3、Chst6 が脊索で強く発現し、Chst1、Chst4 が耳胞で強く発現していることを見出した。アンチセンスモルフォリノオリゴによる機能阻害実験を行った結果、Chst1 の機能阻害で耳胞の高硫酸化ケラタン硫酸が検出されなくなった一方、Chst3 または Chst6 の機能阻害で脊索の高硫酸化ケラタン硫酸が検出されなくなった。また、Chst3 の機能阻害で脊索の形態形成異常が見られた。これらの結果は、高硫酸化ケラタン硫酸がこれらの器官の形態維持に働いていることを示唆している。

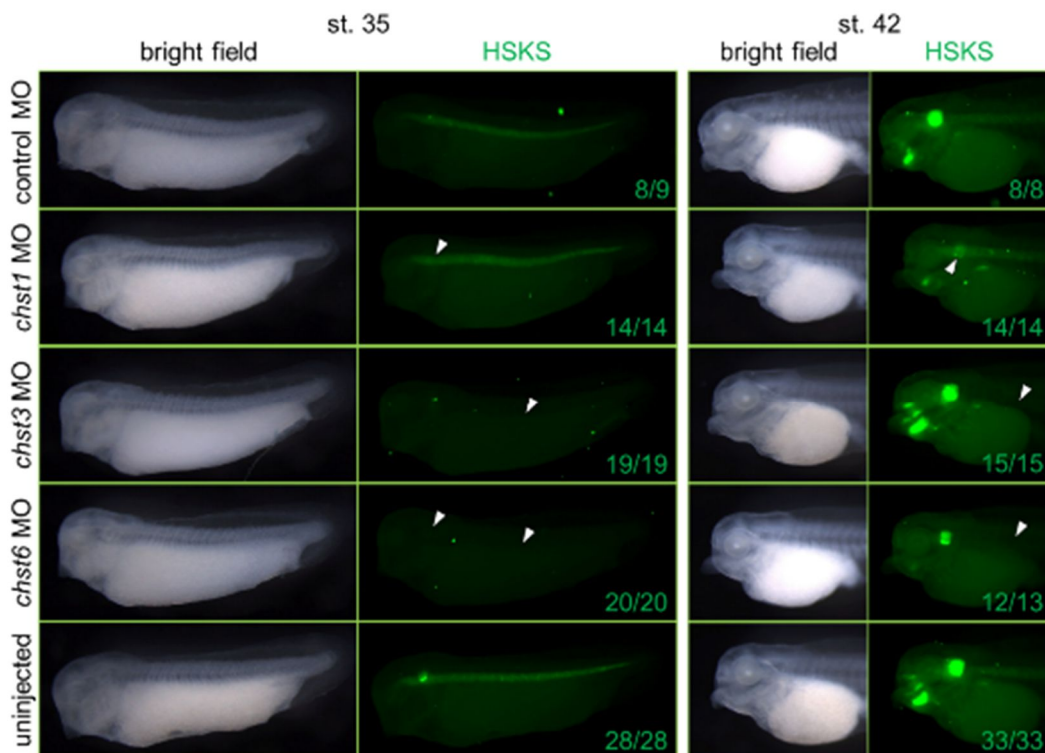


図4: *chst* 遺伝子の機能阻害による高硫酸化ケラタン硫酸 (HSKS) の合成異常

(4)ナメクジウオ初期胚発生に関わる遺伝子(*gooseoid*)について、ナメクジウオ胚を用いた *in situ hybridization* 実験に成功し、原腸胚では背側中胚葉、神経胚初期から中期以降は後方の脊索に主に発現することを明らかにした (Yasuoka et al., 2019 *Zool Lett* 5:27)。

さらに、フロリダナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*) の神経胚~幼生期の cDNA から、*caveolin*, *colA*, *col9*, *lox11/5*, *lox12/3/4*, *b4galt* (2 遺伝子), *b3gnt*, *chst* (4 遺伝子), *calumenin*, *copz*, *lamp1/2* (5 遺伝子), *slc38a7/8*, *leprecan* といった脊椎動物の脊索の細胞外基質形成や細胞膜輸送に関わる遺伝子のオースログをクローニングし、これらの遺伝子が脊椎動物同様脊索で発現するのかを、*in situ hybridization* で検討した (図 5)。

既報の通り、*colA* の発現は脊索および神経管に強く検出された。加えて、*col9* は初期神経胚で脊索に強い発現が見られ、後期神経胚から幼生期にかけては鰓裂に強い発現が見られた。*lysyl oxidase* 遺伝子のうち、*lox11/5* は一貫して脊索に発現する一方、*lox12/3/4* は初期から中期神経胚では内胚葉に発現し、後期神経胚から幼生期にかけて脊索にも発現が見られた。*leprecan* は神経胚期から一貫して脊索で発現し、*chst-like5* は脊索及び一部神経管(体幹部)に発現することが明らかとなった。*caveolin* は一貫して脊索で発現する中、後期神経胚で特に強い発現が見られるとともに、体幹部の表皮でも発現が見られた。コートマータンパク質をコードする *copz*

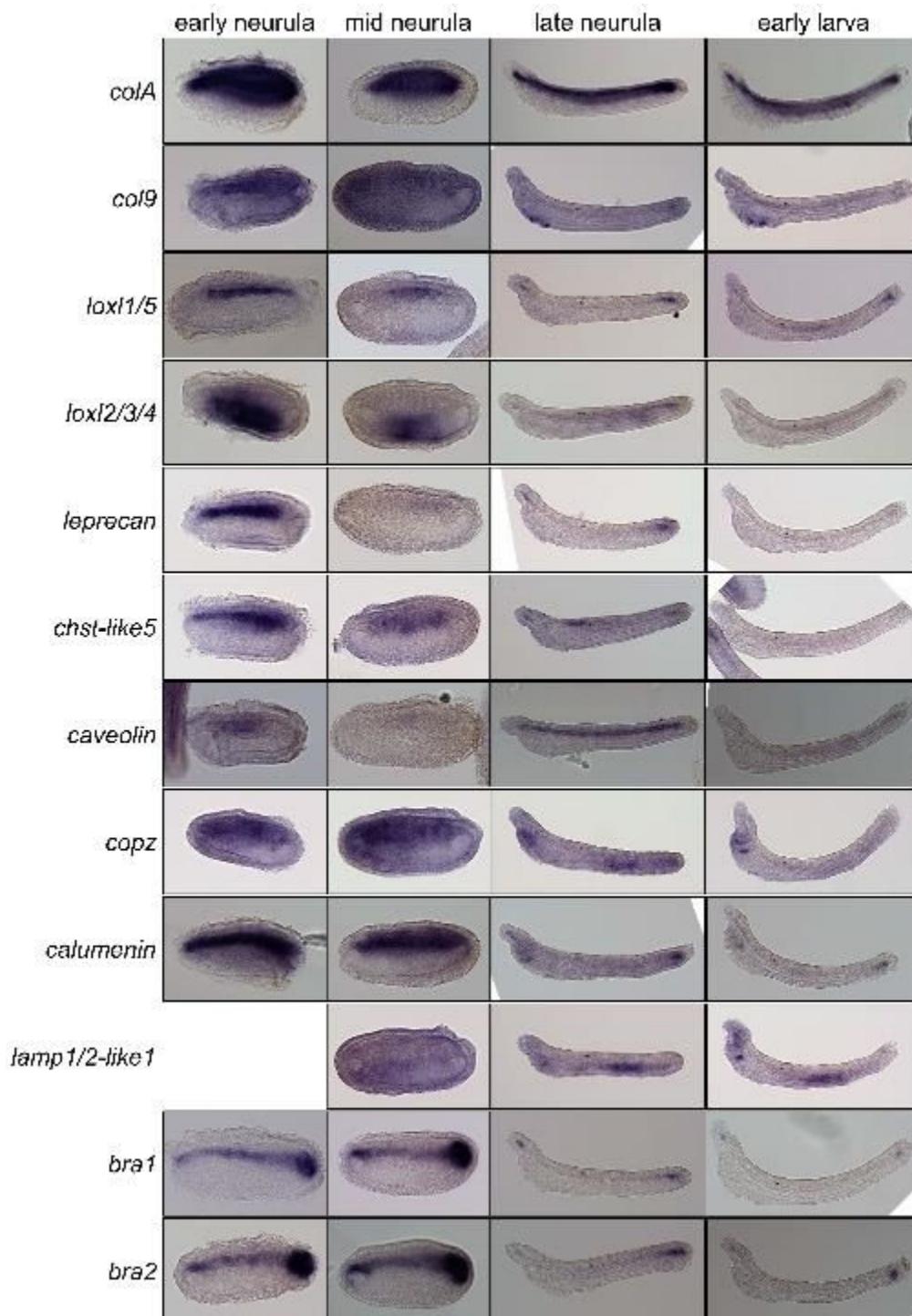


図 5 : ナメクジウオ胚を用いた脊索関連遺伝子の *in situ hybridization* 解析

は初期神経胚および中期神経胚で脊索に強い発現が見られるものの、その後は咽頭部と後方内胚葉に強い発現が見られた。ER 局在タンパク質をコードする *calumenin* は、一貫して脊索に強い発現が見られ、後期神経胚以降は咽頭部にも発現が見られた。リソソーム局在タンパク質をコードする *lamp1/2-like1* は、脊索での強い発現は見られず、後期神経胚から幼生期にかけて後方内胚葉と咽頭部で強い発現が検出された。また、脊索のマスター遺伝子である *brachyury* 遺伝子 (*bra1* および *bra2*) の脊索及び尾芽での明瞭な発現も既報通り検出された。

これらの結果は、caveola, coatomer, leprecan, keratan sulfate, lysyl oxidase などが脊索の祖先的構成要素として、脊索動物の出現時から脊索の形態形成に深く関わってきたことを示唆している(図6)。中でも細胞外基質形成に関わる遺伝子群(*col1A*, *lox11/5*, *leprecan*, *chst-like5*) の幼生期における発現は、細胞増殖している脊索前端と後端で強い一方、細胞増殖が停止した体幹部の脊索では弱かった。一方、脊索の物理的な耐久性を担う caveola を構成する caveolin は、体幹部でも一様に強い発現を示した。したがって、細胞増殖と連動した脊索遺伝子発現制御の存在が示唆される。また、*lamp1/2* 遺伝子の脊索での局在した発現が検出されなかったことから、脊索におけるリソソーム様オルガネラとしての液胞形成は脊索動物祖先ではまだ獲得されていなかった可能性が示された。今後は、ナメクジウオ胚への薬剤処理実験や遺伝子機能障害実験、詳細な細胞観察等を行うことで、「液胞膨圧-脊索鞘強度平衡モデル」に基づく細胞外基質形成と細胞膜輸送による脊索の形態形成機構が、脊索動物共通祖先に由来する普遍的なものか、より深い進化的考察が期待できる。

(5) 「液胞膨圧 脊索鞘強度平衡モデル」について総説を執筆した (Yasuoka, 2020, *Develop Growth Differ*, published online, DOI: 10.1111/dgd.12665)。本モデルを証明するために今後明らかにすべき課題として、定量的解析・数理的解析・進化比較解析の重要性を提案した。

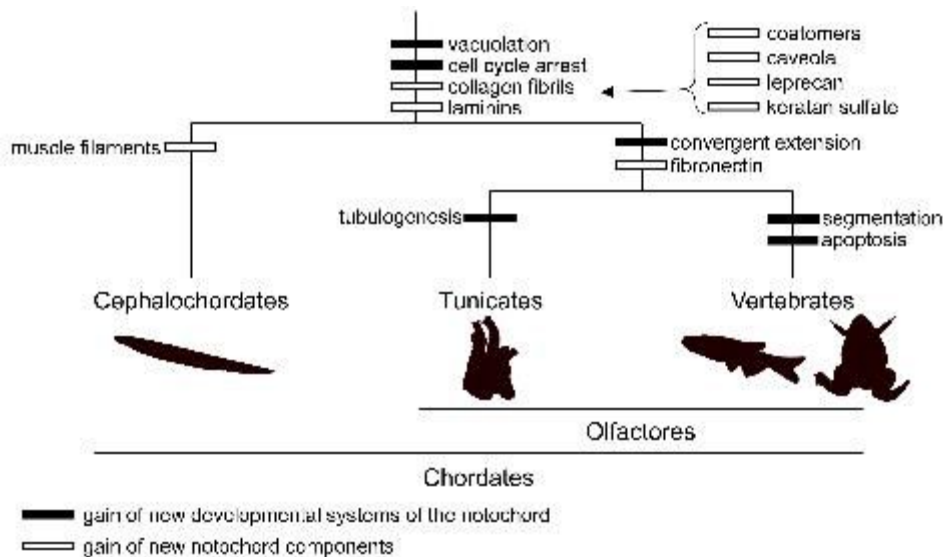


図6：本研究で明らかとなった脊索の祖先的構成要素と形態形成様式

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yasuoka Yuuri	4. 巻 0
2. 論文標題 Morphogenetic mechanisms forming the notochord rod: The turgor pressure sheath strength model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12665	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yasuoka Yuuri, Tando Yukiko, Kubokawa Kaoru, Taira Masanori	4. 巻 5
2. 論文標題 Evolution of cis-regulatory modules for the head organizer gene gooseoid in chordates: comparisons between Branchiostoma and Xenopus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40851-019-0143-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yasuoka Yuuri, Matsumoto Masahito, Yagi Ken, Okazaki Yasushi	4. 巻 37
2. 論文標題 Evolutionary History of GLIS Genes Illuminates Their Roles in Cell Reprogramming and Ciliogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 100 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/molbev/msz205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yasuoka Yuuri, Taira Masanori	4. 巻 2019
2. 論文標題 Microinjection of DNA Constructs into Xenopus Embryos for Gene Misexpression and cis-Regulatory Module Analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Protocols	6. 最初と最後の頁 pdb.prot097279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/pdb.prot097279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Mariko, Matsuo Megumi, Igarashi Kento, Haramoto Yoshikazu, Yamamoto Takayoshi, Yasuoka Yuuri, Taira Masanori	4. 巻 8
2. 論文標題 De novo transcription of multiple Hox cluster genes takes place simultaneously in early <i>Xenopus tropicalis</i> embryos	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio038422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.038422	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuoka Yuuri, Taira Masanori	4. 巻 -
2. 論文標題 The Molecular Basis of the Gastrula Organizer in Amphibians and Cnidarians	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproductive and Developmental Strategies. Diversity and Commonality in Animals (Book)	6. 最初と最後の頁 667 ~ 708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-4-431-56609-0_31	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satou Yumeko, Minami Kohei, Hosono Erina, Okada Hajime, Yasuoka Yuuri, Shibano Takashi, Tanaka Toshiaki, Taira Masanori	4. 巻 145
2. 論文標題 Phosphorylation states change Otx2 activity for cell proliferation and patterning in the <i>Xenopus</i> embryo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev159640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.159640	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Michiue Tatsuo, Yamamoto Takayoshi, Yasuoka Yuuri, Goto Toshiyasu, Ikeda Takafumi, Nagura Kei, Nakayama Takuya, Taira Masanori, Kinoshita Tsutomu	4. 巻 426
2. 論文標題 High variability of expression profiles of homeologous genes for Wnt, Hh, Notch, and Hippo signaling pathways in <i>Xenopus laevis</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 270 ~ 290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2016.12.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Minoru, Yasuoka Yuuri, Mawaribuchi Shuuji, Kuretani Aya, Ito Michihiko, Kondo Mariko, Ochi Haruki, Ogino Hajime, Fukui Akimasa, Taira Masanori, Kinoshita Tsutomu	4. 巻 426
2. 論文標題 Conservatism and variability of gene expression profiles among homeologous transcription factors in <i>Xenopus laevis</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 301 ~ 324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2016.09.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yasuoka Yuuri
2. 発表標題 Genome-wide Measurement for Fluctuation of Gene Regulatory Networks in <i>Xenopus</i> embryos
3. 学会等名 Xenopus Resources and Emerging Technologies Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuoka Yuuri, Satoh Noriyuki
2. 発表標題 Why was the notail gene lost in many vertebrate lineages?
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuoka Yuuri, Matsumoto Masayuki, Yagi Ken, Okazaki Yasushi
2. 発表標題 Evolutionary History of GLIS Genes Illustrates their Fundamental Roles in Cell Reprogramming and Ciliogenesis
3. 学会等名 21st Annual Meeting of the Society of Evolutionary Studies, Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuoka Yuuri
2. 発表標題 Fluctuation of GRN in <i>Xenopus tropicalis</i> embryos
3. 学会等名 12th Japan <i>Xenopus</i> Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuuri Yasuoka and Noriyuki Satoh
2. 発表標題 Complex evolution of brachyury paralogs during vertebrate notochord development
3. 学会等名 第46回内藤コンファレンス(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安岡有理、佐藤矩行
2. 発表標題 脊椎動物の脊索発生におけるBrachyuryパラログの複雑な進化
3. 学会等名 第20回日本進化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安岡有理
2. 発表標題 進化学の視点がリプログラミング研究にどう貢献できるか?
3. 学会等名 第10回EvoDevo青年の会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安岡有理
2. 発表標題 ネッタイツメガエル胚発生における転写因子一標的遺伝子関係の揺らぎ測定
3. 学会等名 第12回XCIJ首都圏支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuuri Yasuoka
2. 発表標題 Keratan sulfate produces “water bags” in embryos
3. 学会等名 第51回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安岡有理
2. 発表標題 Xenopus胚でCRISPRi (dCas9)は有効か？
3. 学会等名 第3回次世代両生類研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuuri Yasuoka and Noriyuki Satoh
2. 発表標題 Independent subfunctionalization of brachyury paralogs in vertebrate lineages
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuuri Yasuoka and Noriyuki Satoh
2. 発表標題 Independent subfunctionalization of brachyury paralogs in vertebrate lineages
3. 学会等名 The 29th CDB meeting
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安岡有理
2. 発表標題 細胞運動非依存的な脊索の自律的形態形成メカニズムを探る
3. 学会等名 第10回日本ツメガエル研究集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安岡有理
2. 発表標題 年に一度のサンゴ胚を用いた遺伝子機能解析
3. 学会等名 第3回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuuri Yasuoka and Noriyuki Satoh
2. 発表標題 Independent subfunctionalization of brachyury paralogs in vertebrate lineages
3. 学会等名 第50回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----