

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19370097

研究課題名（和文） 初期胚パターン形成におけるWntシグナル促進因子Tsh3の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of the Wnt signal promoting factor Tsh3 in early embryogenesis

研究代表者

笹井 芳樹（SASAI YOSHIKI）

独立行政法人理化学研究所 細胞分化・器官発生研究グループ グループディレクター

研究者番号：20283616

研究成果の概要：代表研究者らはアフリカツメガエルの系を用いて、核内ZnフィンガータンパクTsh3が初期胚体軸極性を制御する必須因子であることを見いだした。Tsh3の機能阻害では、背側体軸の形成が著しく阻害され、腹側化した胚が発生する。機能亢進及び機能阻害実験からWntシグナルを細胞内で活性化することが明らかになった。Luciferaseアッセイから、Tsh3はβ-cateninによる核内での標的遺伝子の発現活性化を促進することも判明した。タンパクレベルの解析から、Tsh3はβ-cateninに結合し、直接あるいは間接的にその活性を正に制御することがその機序であることも示唆された。Tsh3はsperm entryによって誘導された背側での弱いWntシグナル活性をブーストして、明確な体軸形成につなげる増幅系に関与している可能性が高い。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：Tsh3・Wnt・β-catenin・体軸形成・Znフィンガー・転写制御・胚発生・アフリカツメガエル

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物胚の背腹軸決定は初期胚のパター

ン形成で重要な役割を果たす。申請者らは初期胚の体軸形成の分子生物学的研究が最も

進んでいるアフリカツメガエル胚の系を用いて、体軸極性を制御する必須因子として核内タンパク Tsh3 (Teashirt-related 3) を同定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この因子の初期胚における機能と制御機序の詳細を明らかにすることである。特に背腹軸の形成および中枢神経系のパターン形成における Tsh3 の役割を、アフリカツメガエル胚を用いて解析する。また、Tsh3 が Wnt などのシグナル経路にどのように作用するかを解明する。それらを通して、初期発生におけるパターン制御の分子的機序を、細胞内因子と細胞外因子との相互作用の観点から解明する。

3. 研究の方法

中胚葉の背側化活性を有するシグナルには、Wnt や TGF- β (Nodal など) などが知られており、また BMP の抑制 (Chordin など) も背側化を促進する。予備的な検討から、Tsh3 は Nodal や BMP シグナルとは強く関係しないことが判明した。一方、Tsh3-MO の表現系は Wnt 阻害に類似している

Tsh3 と Wnt シグナル系因子との相互作用をタンパクレベルで検討し、免疫沈降実験から、*in vitro* において Tsh3 は作用点の候補となる Wnt の下流メディエーター (Tcf/LEF, Axin その他) と共沈降することが明らかを、系統的に解析し、それらの MO などと組み合わせた epistasis 解析から Tsh3 の Wnt シグナルへの作用点を検討した。

Tsh3 は神経特異的な発現を原腸胚後期以降に示し、その時期以降における Tsh3 の神経外胚葉での機能は興味深い。Tsh3-MO による外胚葉での機能阻害や RNA 微量注入による機能亢進実験を行うと

もに、Tsh3 と相補的な発現を頭部に示す XsalF との機能の比較を行った。

4. 研究成果

背腹軸の形成および中枢神経系のパターン形成における Tsh3 の役割を、アフリカツメガエル胚を用いて解析を行い、Tsh3-MO を中胚葉 (特に背側) にも作用させたところ、背側の発生が抑制され、胚全体が強く腹側化した。逆に Tsh3 の強制発現は胚を背側化した Tsh3 が Wnt の canonical シグナル経路にどのように作用するかを解明した結果、TOPflash レポーターによるルシフェラーゼアッセイで、Tsh3 は Wnt シグナルを増強し、Tsh3 の機能阻害では Wnt シグナルが減弱することを確認された。さらに、タンパク質レベルの解析から、核内因子 Tsh3 は Wnt シグナルカスケードの下流伝達因子である β -catenin に結合し、直接あるいは間接的にその活性を正に制御することがその機序であることも示唆された。Tsh3 の機能阻害実験から、Tsh3 は β -catenin が効率よく核内に蓄積するのに必須であることが判明した。さらに Tsh3 は Tcf3 と結合をすることが示され、 β -catenin \cdot Tcf3 複合体の安定化あるいは活性化を介して、Wnt シグナル下流での転写制御を強化することが示唆された。Tsh3 の Wnt シグナル促進活性で興味深いのは、それ自身の強制発現だけではごく弱い Wnt 様活性のみが認められるだけだが、弱い Wnt シグナルを共存させると、強いシグナル強化が認められる点である。即ち、Tsh3 の Wnt シグナル増強は、Wnt シグナルが一定以上あることが必要であり、弱いシグナルのアンプリファイアとして働くことが考えられた。

体軸形成での表現系と考え合わせると、Tsh3 は sperm entry によって誘導された背側での弱い Wnt シグナル活性をブーストして、

明確な体軸形成につなげる増幅系に関与している可能性が高いと考えられた。

また、Tsh3-M0による外胚葉での機能阻害やRNA微量注入による機能亢進実験を行い、Tsh3は中枢神経系の後方に必須の制御因子であることを明らかにした。このことは、Wntシグナルが後方化シグナルとして知られていることと高い整合性を示す。この活性は、胚の頭部に発現する別のZnフィンガー因子Xsa1Fと逆の関係であり、後者はWntシグナルと拮抗することが判っていること、またシヨウジョウバエでもSalとTshは拮抗関係が知られているため、制御モジュールの保存として興味深い。

さらに、Tsh3の研究の発展から、その他の初期胚に発現するZnフィンガータンパクを同定し、それが中胚葉誘導に必須であることを証明した。

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5件)

Arakawa, A., Matsuo-Takasaki, M., Takai, A., Inomata, H., Matsumura, M., Ikeya, M., Takahashi, K., Miyachi, Y., Sasai, N. and Sasai, Y., The secreted EGF-Discoidin factor xDel1 is essential for dorsal development of the *Xenopus* embryo. , *Developmental Biology*, 306, 160-169, (2007)、査読有

Onai, T., Matsuo-Takasaki, M., Inomata, H., Aramaki, T., Matsumura, M., Yakura, R., Sasai, N., and Sasai, Y., XTsh3 is an essential enhancing factor of canonical Wnt signaling in *Xenopus* axial determination. , *EMBO J*, 26,

2350-2360, (2007)、査読有

Ikeya M, Nosaka T, Fukushima K, Kawada M, Furuta Y, Kitamura T, Sasai Y. , Twisted gastrulation mutation suppresses skeletal defect phenotypes in *Crossveinless 2* mutant mice. , *Mech Dev.* , 125, 832-842, (2008)、査読有

Sasai, N., Yakura, R., Kamiya, D., Nakazawa, Y. and Sasai, Y. , Ectodermal Factor Restricts Mesoderm Differentiation by Inhibiting p53. , *Cell* 133, 878-890, (2008)、査読有

Inomata, H., Haraguchi, T. and Sasai, Y. , Robust Stability of the Embryonic Dorsal Axial Pattern Requires ONT1, a Secreted Scaffold for Chordin Degradation. , *Cell*, 134, 854-865, (2008)、査読有

[学会発表](計2件)

猪股秀彦、*Xenopus* ONT1 is novel secreted pro-BMP factor that restricts Chordin in axial development.、41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biology、2008年5月28日、徳島県郷土文化会館

笹井紀明、Ectodermal specification by a novel transcriptional modulator.、41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biology 2008年5月28日、徳島県郷土文化会館

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹井 芳樹 (SASAI YOSHIKI)

独立行政法人理化学研究所
細胞分化・器官発生研究グループ
グループディレクター
研究者番号：20283616