

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570214

研究課題名（和文） 脊索-神経相互作用による脊索動物体制進化の分子基盤

研究課題名（英文） Notochord-Neuron interaction during the chordate evolution.

研究代表者

高橋 弘樹 (HIROKI TAKAHASHI)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・助教

研究者番号：40283585

研究成果の概要（和文）：

脊索と神経管は脊椎動物体制における中軸器官であると同時に、脊索動物を特徴づける最も重要な形質である。我々は脊索動物体制進化の道筋を解き明かすために尾索動物ホヤを用いて脊索特異的に発現するフィブリノーゲン様分子が神経細胞における Notch シグナルと協調して神経細胞分化・形成に働くことを明らかにした。このことは脊索-神経相互作用による脊索動物体制進化の分子基盤の解明につながる。

研究成果の概要（英文）：

The midline organ notochord and its overlying dorsal neural tube are the most prominent features of the chordate body plan. Although molecular mechanisms involved in the dorsal patterning of the nervous system have been studied extensively in vertebrate embryos, none of the genes that are expressed specifically in notochord cells have been shown to function in this process. Here, we report a gene in the urochordate *Ciona intestinalis* encoding a fibrinogen-like protein that plays a pivotal role in the notochord-dependent dorsal positioning of neuronal cells. Therefore, it is highly likely that the interaction of the notochord-based fibrinogen-like protein and the neural tube-based Notch signaling is essential for the dorsal patterning of the nervous system or for the establishment of the chordate body plan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：進化発生

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：脊索 神経 発生 進化

1. 研究開始当初の背景

中軸中胚葉である脊索は体軸伸長において働くのみならず、神経誘導や神経管形成過程においても重要な役割を果たしていると考えられている (Jessell, 2000; Wilson and Maden, 2005)。脊索を中心として、その脊側には中空の神経管、両側面には体節が存在する。このような中軸構造の背腹軸に沿ったパターン形成には脊索からの誘導が必要であると考えられているが、その分子基盤は明らかにされていない点が多い。また、これまでに T-box 転写因子である *Brachyury* 遺伝子は脊索動物の共有派生形質である脊索の形成において鍵となる遺伝子であることが明らかにされている (Smith, 1999; Satoh, 2003)。*Brachyury* 遺伝子が担う脊索形成機能を獲得する変遷を明らかにすることは、脊索動物門誕生の分子的基盤の一端を明らかにすることに繋がる。そこで、脊索-神経相互作用が担う脊索動物体制 (ボディープラン) 進化プロセスの分子基盤を解明することを目的とする、本申請研究計画を提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究は脊索-神経相互作用による脊索動物体制 (ボディープラン) 進化の分子基盤を解き明かすことを目的とする。具体的には尾索動物ホヤで明らかしてきた、*Brachyury* 遺伝子のターゲット遺伝子群 450 遺伝子の新口動物の各生物種における相同遺伝子の比較ゲノム解析と分子機能解析を行い、脊椎動物型の脳を持った脊索動物の誕生に関わる遺伝子ネットワー

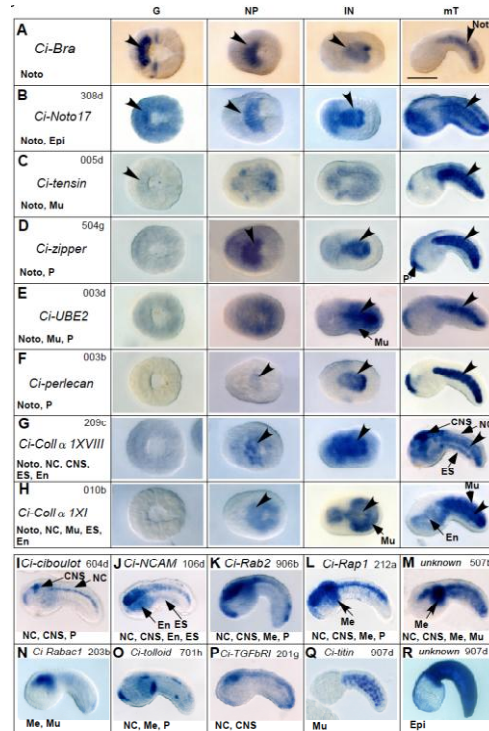
クの解明、さらに、我々ヒトがどこから来たのか? という地球上で人間が由来した変遷について新しい世界観を得ることに繋がる基盤研究を展開する。

3. 研究の方法

- (1) 脊索-神経相互作用の分子基盤の確立 (比較ゲノムワイドアプローチ)
- (2) 脊索-神経相互作用を担う分子機能の解析 (実験発生物学的アプローチ) からなる 2 つの研究手法で研究課題に取り組んだ。

4. 研究成果

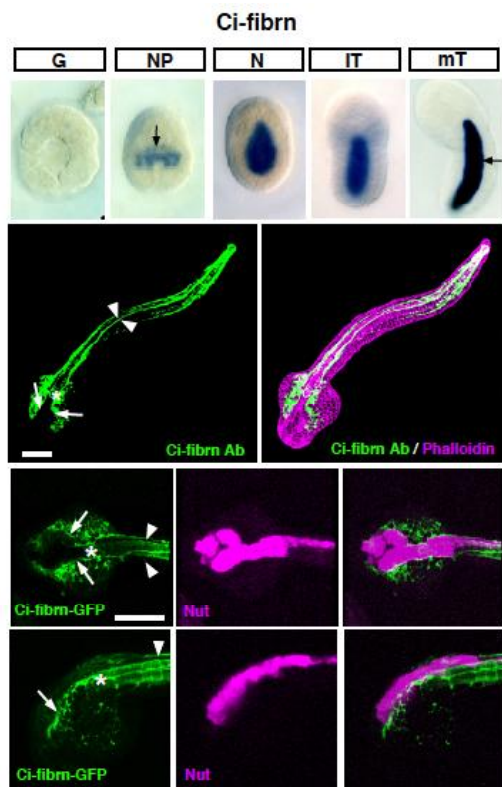
(1) 神経-脊索相互作用の分子基盤の確立



(図 1) *Brachyury* のターゲット遺伝子群 中軸中胚葉である脊索は体軸伸長において働くのみならず、神経誘導や神経管形成過程においても重要な役割を果たしていると考えられている (Jessell, 2000; Wilson and Maden, 2005)。これまでに尾索動物ホヤを用

いて、*Brachyury* 遺伝子のターゲット遺伝子群 450 遺伝子を明らかにし、ホヤの脊索形成過程の分子機構を解析してきた (Takahashi, et al. 1999; Hotta et al. 2000; Hotta, et al. 2007)。さらに、脊索形成に必須である *Brachyury* 遺伝子のターゲット遺伝子群のうち脊索に発現する遺伝子が 42 遺伝子、神経系に発現する遺伝子が 239 遺伝子も存在することが新たに明らかになった (Hotta, et al. 2008)。また、脊索特異的に発現する遺伝子のモルホリノアンチセンスオリゴ (MO) によるノックダウン機能阻害実験の結果から、脊索形成に異常がみられるのみならず神経形成過程に異常が現れる遺伝子が数多く明らかになり、脊索-神経相互作用の分子の実体が明らかになった (図 1)。

(2) 神経形成における脊索の役割



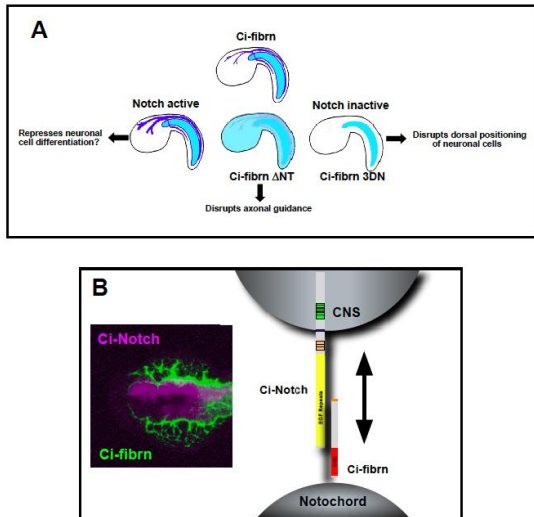
(図 2) fibrinogen-like 蛋白質の局在
脊索動物の発生過程において、脊索は体軸伸長において働くのみならず、神経誘導や神経

管形成過程においても重要な役割を果たしていると考えられているが、その分子メカニズムについては明らかにされていない点が多い。これまでに、我々はホヤの Ci-fibrn (Ci-Fibrinogen-like) の mRNA は脊索細胞のみに特異的に発現することを脊索動物で初めて明らかにしている。興味深いことに Ci-fibrn タンパク質の局在を Ci-fibrn 抗体と GFP 融合タンパク質を用いて調べたところ、脊索細胞および脊索細胞外の表皮感覚細胞および中枢神経細胞に沿った繊維状の構造に局在することが明らかになった (図 2)。

(3) 神経-脊索相互作用を担う分子の機能解析

シ ョ ウ ジ ョ ウ バ エ の Scabrous (fibrinogen-like protein) は遺伝学的な解析から感覚神経細胞分化に Notch と協調して働くことが示唆されているが、その脊索動物ホモログの発生過程における役割は解析されていない。これまでに、尾索動物ホヤの *Brachyury* の標的遺伝子である *Ci-fibrn* の mRNA は脊索細胞のみに特異的に発現することを脊索動物で初めて明らかにした。Ci-fibrn 蛋白質の局在を Ci-fibrn:EGFP 融合蛋白質あるいは Ci-fibrn 抗体を作製して調べたところ、脊索鞘に加えて脊索細胞外の脊側神経細胞の軸索に沿って繊維状に伸びて局在することが明らかになった。そこで、Notch と Scabrous のホモログである Ci-fibrn の関係を解析すると、Notch シグナルによって Ci-fibrn タンパク質の局在そのものが変化することが明らかになった。また、培養細胞を用いた免疫沈降実験から Notch の細胞外ドメインと Ci-fibrn の C 末端部分が結合することが示された。さらに、Notch シグナルを阻害すると同時に Ci-fibrn の変異

体を発現させると幼生期では、頭部において神経細胞の分化異常、尾部において神経軸索の走行異常が観察された。このことから、脊索動物 Ci-Notch と Ci-fibrn は、神経細胞分化・形成において協調的に働くことが示唆された。



(図3) Ci-fibrn と Ci-Notch の相互作用

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 6 件)

- ① Yamada, S., Ueno, N., Satoh, N. & Takahashi, H. *Ciona intestinalis* Noto4 contains a phosphotyrosine interaction domain and is involved in the midline intercalation of notochord cells. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 11-18 (2011). (査読有)
- ② Endo, T., Ueno, K., Yonezawa, K., Mineta, K., Hotta, K., Satou, Y., Yamada, L., Ogasawara, M., Takahashi, H., Nakajima, A., Nakachi, M., Nomura, M., Yaguchi, J., Sasakura, Y., Yamasaki, C., Sera, M., Yoshizawa, A., Imanishi, T., Taniguchi, H. & Inaba, K. CIPRO 2.5: *Ciona intestinalis* Protein Database, a unique integrated repository of large-scale omics data, bioinformatic analyses, and curated annotation,

with user rating and reviewing functionality. *Nucleic Acids Res.* 38, D807-814 (2011). (査読有)

- ③ Takahashi, H., Hotta, K., Takagi, C., Ueno, N., Satoh, N. & Shoguchi, E. Regulation of notochord-specific expression of *Ci-Bra* downstream genes in *Ciona intestinalis* embryos. *Zool. Sci.* 27, 110-118 (2010). (査読有)
- ④ Terakubo, H., Nakajima, Y., Sasakura, Y., Horie, T., Konno, A., Takahashi, H., Inaba, K., Hotta, K. & Oka, K. Novel peripheral neuron network in the tunic of normal ascidian revealed by confocal laser scanning and transmission electron microscopies. *Dev. Dynamics.* 239, 2278-2287 (2010). (査読有)
- ⑤ Yamada, S., Hotta, K., Yamamoto, T.S., Ueno, N., Satoh, N. & Takahashi, H. Interaction of notochord-derived fibrinogen-like protein with Notch regulates the patterning of the central nervous system of *Ciona intestinalis* embryos. *Dev. Biol.* 328, 1-12 (2009). (査読有)
- ⑥ Hotta, K., Takahashi, H., Satoh, N. & Gojobori, T. *Brachyury*-downstream gene sets in a chordate, *Ciona intestinalis*: Integrating notochord specification, morphogenesis and chordate evolution. *Evo. Dev.* 10, 37-51 (2008). (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Takahashi, H., Hotta, K., Takagi, C., Ueno, N., Satoh, N. & Shoguchi, E. "Regulation of notochord-specific expression of *Ci-Bra* downstream genes in *Ciona intestinalis* embryos." The 16th International Conference of the International Society of Differentiation, From Stem Cells to

Organisms 2010, November 15-18, 2010, Nara, Japan.

- ②日本比較内分泌学会第 35 回大会, 2010 年 11 月 19 日, ナメクジウオカルシトニンからみたカルシトニンファミリーの進化機構. 関口俊男、高橋弘樹、小笠原道生、佐竹炎. 静岡
- ③日本動物学会第 81 回大会, 2010 年 9 月 23 日, ホヤ幼生末梢神経から被囊内へ伸びた突起が形成するネットワーク構造の解析. 堀田耕司、寺久保洋、中島陽子、紺野在、堀江健生、高橋弘樹、笹倉靖徳、稲葉一男、岡浩太郎. 東京
- ④ Terakubo, H., Takahashi, H., Nakajima, Y., Sasakura, Y., Horie, T., Hotta, K. & Oka, K. The structure and evolution of caudal epidermal neurons in ascidian larva. 5th International tunicate Meeting 2009, June 21-25, Okinawa, Japan.
- ⑤日本動物学会第 80 回大会, 2009 年 9 月 17 日, カタユウレイボヤ脊索遺伝子 (Ci-Noto4) は脊索鞘の形成に関与する. 山田成宏、上野直人、佐藤矩行、高橋弘樹. 静岡
- ⑥Takahashi, H., Brachyury-downstream notochord genes in the chordate evolution. Guest Speaker Seminar, Sars International Center for Marine Molecular Biology, October 27-29, Bergen, Norway.
- ⑦Yamada, S., Hotta, K., Yamamoto, T.S., Ueno, N., Satoh, N. & Takahashi, H. Interaction of notochord-derived fibrinogen-like protein with Notch regulates the patterning of the central nervous system of *Ciona intestinalis* embryos. The 8th NIBB-EMBL joint Meeting, Evolution: Genomes, Cell Types and Shapes 2008, November 21-28, Okazaki, Japan.

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/morphgen/summary/hoya.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 弘樹 (HIROKI TAKAHASHI)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・助教
研究者番号：40283585