

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20770178  
 研究課題名（和文） ホヤ胚誘導における空間的、時間的応答能制御機構の解析  
 研究課題名（英文） Temporal and spatial regulation of competence in ascidian embryonic induction

研究代表者 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

## 研究成果の概要（和文）：

原索動物であるホヤを用いて、同一誘導シグナルに対してシグナル受容細胞が異なる応答をし、違う組織を作り出す機構を解析した。その結果、受精卵内で将来の後方にのみ局在する母性因子 PEM が、前方と後方で異なる応答能制御因子の発現を導きだし、これら制御因子が誘導シグナルと協調しつつ、その制御因子の種類に応じてそれぞれの組織特異性を作り出すことを明らかにした。また、この応答能が時間の経過とともに失われる機構を明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Molecular mechanisms by which signal-receiving cells respond to the same inductive signal differently to make different tissue types in development were analyzed using ascidian embryos. We found that posteriorly-localized maternal PEM makes different competence factor expression between the anterior and posterior regions of the embryo and that these region (or cell)-specific competence factors in cooperation with the inductive signal generate different tissue types. In addition, we identified FoxB as a factor responsible for the loss of competence to the above inductive signal.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

## 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：初期発生、ホヤ、誘導、応答能

## 1. 研究開始当初の背景

近年の研究により、動物の発生過程では、限られた数のシグナルが何度も時間と場所を変えて利用されながら、それでいて異なる

結果が生み出されていることがわかってきている。これは、同一のシグナルを受け取ったとしても、応答細胞ごとにあらかじめ反応の仕方（応答能）が異なるようプログラムさ

れているためである。したがって、発生における細胞の多様化を理解するためには、このような応答能自体に焦点を当てた解析が重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

ホヤ胚発生において観察される誘導的細胞間相互作用の中で、同一シグナルに対する応答能の空間的かつ時間的違いに着目し、この現象を制御する分子メカニズムについて理解を押し進める。具体的な目的としては、

(1) マボヤ胚の脊索/間充織誘導において、誘導シグナルである FGF (繊維芽細胞成長因子) と、細胞の応答能を制御している内在因子である FoxA と ZicN (脊索)、または Macho-1 (間充織) が、どのように相互作用してそれぞれの組織特異性を生み出すのかを明らかにし、両者を比較することにより、応答能の違いが異なる組織を作り出す分子的メカニズムを理解する。

(2) 誘導時における胚の前方 (脊索) と後方 (間充織) での応答能の違いが、この時期までの胚発生過程でどのようにして生じてくるのか、その分子メカニズムを、卵内に局在する PEM と呼ばれる因子の機能に着目して明らかにし、応答能の空間的違いがどのように生み出されるのかを理解する。

(3) 脊索誘導において、FGF に対する応答能が一定時間後に応答細胞で失われる現象についてその分子メカニズムを明らかにし、応答能の時間的制御が胚発生に果たす役割を理解する。

## 3. 研究の方法

(1) 脊索・間充織誘導の結果、FGF シグナルとそれぞれの内在性応答能制御因子がどのように協調して、脊索特異的遺伝子 *brachyury* と間充織特異的遺伝子 *twist-like* の転写を促すのかを、それぞれの遺伝子の転写調節領域の解析を行うことで明らかにする。

(2) 胚後方に局在する PEM が、脊索 (前方) 誘導における内在性応答能制御因子の転写を抑制することで、前後の応答能の違いを作り出しているというモデルを強固なものにするため、PEM がどのような分子機構で転写抑制をするのかを調べる。

(3) これまでの結果から、脊索誘導分化カスケードのうち MAPK の活性化から *brachyury* 遺伝子の発現にいたるまでの段階が応答能喪失に関わっていると推察される。したがって、*brachyury* 遺伝子の発現を抑制する因子の活性化により応答能喪失が起こるという可能性を検証する。特に、その抑制因子が FoxB であるか否か、またそうであった場合、どのような分子機構で抑制するのかを明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) 脊索誘導においては細胞内外からの情報が *brachyury* 遺伝子の転写調節領域上で統合されることがわかっていた。すなわち、FGF シグナルにより活性化される Ets 転写因子と脊索誘導における応答能制御因子である FoxA と Zic の3者がそれぞれ *brachyury* 遺伝子の転写調節領域上に結合する。本研究では、間充織誘導において、単離した間充織特異的遺伝子である *twist-like* 転写因子遺伝子の転写調節領域約 1.1kb が、内在の *twist-like* 遺伝子の発現を再現するのに十分であることを示した。さらに deletion 解析により、約 100b 長の領域が間充織特異的な発現に必要であることを示し、その領域内にゲルシフトアッセイ法により Ets と *macho-1* タンパク質がそれぞれ結合する配列が存在することを確かめた。したがって、脊索誘導と間充織誘導では共に、組織特異的遺伝子の転写調節領域上で細胞内外からの情報が統合されることが示唆された。

(2) PEM タンパク質は、その C 末端部分に、一般的な転写抑制因子である *groucho* が結合する WRPW 配列を持つが、この配列および *groucho* が、応答能の前後での違いを作り出す原因となっている転写抑制活性には関与しないことが示唆された。その代わりに、PEM は胚後方において、*beta-catenin* の核移行を制御することで、脊索誘導における応答能制御因子である FoxA/ZicN の転写を抑制していることを明らかにした。

(3) 脊索誘導における応答能喪失のメカニズムとして、FoxB が FGF シグナルによる脊索特異的遺伝子 *brachyury* の発現誘導を抑えていることを明らかにした。FoxB は脊索誘導におけるデフォルト運命である神経索細胞で発現する因子であること、FGF は脳誘導のために神経索細胞でも発現していることから、FoxB による応答能喪失は、神経索細胞系列での異所的な脊索誘導を抑制していると考えられる。さらに、FoxB は転写抑制因子として働くこと、*brachyury* 遺伝子の転写調節領域に直接結合することを明らかにした。したがって、脊索誘導における応答能喪失のモデルとして、応答能喪失期が訪れる頃になると FoxB が発現しはじめ、この FoxB が直接 *brachyury* 遺伝子の転写調節領域上に結合することで転写を抑制し、たとえ FGF シグナルに曝されたとしても *brachyury* 遺伝子の転写が抑えられたままである、というシナリオが考えられるに至った。

## 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 4 件)

① Kumano, G., Kawai, N. and Nishida, H. (2010). Macho-1 regulates unequal cell divisions independently of its function as a muscle determinant. *Dev. Biol.* in press. 査読あり

② Kobayashi, M., Takatori, N., Nakajima, Y., Kumano, G., Nishida, H. and Saiga, H. (2010). Spatial and temporal expression of two transcriptional isoforms of *Lhx3*, a LIM class homeobox gene, during embryogenesis of two phylogenetically remote ascidians, *Halocynthia roretzi* and *Ciona intestinalis*. *Gene Expr. Patterns* 10, 98-104. 査読あり

③ Niwano, T., Takatori, N., Kumano, G. and Nishida, H. (2009). Wnt5 is required for notochord cell intercalation in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biol. Cell* 101, 645-659. 査読あり

④ Kumano, G. and Nishida, H. (2009). Patterning of an ascidian embryo along the anterior-posterior axis through spatial regulation of competence and induction ability by maternally localized PEM. *Dev. Biol.* 331, 78-88. 査読あり

〔学会発表〕 (計 15 件)

① Kumano, G. Spatial and temporal regulation of competence to respond to the FGF signal in ascidian embryonic induction. Special seminar in National Tsing Hua University-Osaka University Life Science Student Activity Fair 2009, Taiwan May 12, 2009.

② 熊野岳。ホヤ胚誘導における時間的・空間的応答能制御機構の解析。日本発生生物学会秋季シンポジウム、静岡、2009年11月27～29日。

③ 児玉仁、根来延枝、熊野岳、西田宏記。マボヤ初期発生におけるTwist-like遺伝子の発現・機能解析。第80回日本動物学会、静岡、2009年9月17日～20日。

④ 藤川徹也、熊野岳、西田宏記。マボヤ胚発生における発生運命と細胞分裂回数との関係。第80回日本動物学会、静岡、2009年9月17日～20日。

⑤ Mugitani, M., Nishide, K., Kumano, G. and Nishida, H. Left-right asymmetry of ascidian larvae is determined by rotation of the whole embryos within the vitelline membrane. 16th International Society of Developmental Biologists Congress, Edinburgh, Scotland, United

Kingdom, Sep. 6-10, 2009.

⑥ Hashimoto, H., Enomoto, A., Kumano, G. and Nishida, H. Molecular basis of attenuation of competence to respond to FGF signal in ascidian notochord induction. 16th International Society of Developmental Biologists Congress, Edinburgh, Scotland, United Kingdom, Sep. 6-10, 2009.

⑦ Kumano, G. and Nishida, H. Patterning of an ascidian embryo along the anterior-posterior axis through spatial regulation of competence and induction ability by PEM. 5th International Tunicate Meeting, Okinawa, Japan, June 21-25, 2009.

⑧ Negishi, T., Kumano, G. and Nishida, H. Screening for the proteins interacting with PEM sheds light on the Plk1. 5th International Tunicate Meeting, Okinawa, Japan, June 21-25, 2009.

⑨ Hashimoto, H., Enomoto, A., Kumano, G. and Nishida, H. Molecular basis of attenuation of competence to respond to FGF signal in ascidian notochord induction. 5th International Tunicate Meeting, Okinawa, Japan, June 21-25, 2009.

⑩ Takatori, N., Kumano, G., Saiga, H. and Nishida, H. Wnt-dependent asymmetric partitioning of Not mRNA segregates mesoderm and endoderm fates in ascidian embryos. 5th International Tunicate Meeting, Okinawa, Japan, June 21-25, 2009.

⑪ Hashimoto, H., Enomoto, A., Kumano, G. and Nishida, H. Molecular basis of loss of competence to the FGF signal in ascidian notochord induction. 第42回日本発生生物学会、新潟、2009年5月28日～31日。

⑫ Kobayashi, M., Takatori, N., Nakajima, Y., Kumano, G., Nishida, H. and Saiga, H. Analysis of the expression of *Lhx3* genes in two ascidian species, *Halocynthia roretzi* and *Ciona intestinalis*. 第42回日本発生生物学会、新潟、2009年5月28日～31日。

⑬ Nishida, H., Prodon, F., Takatori, N., Kim, G.J. and Kumano, G. Polarization of embryonic cells by prelocalized factors and external signals in ascidians. CDB symposium 2009, Shape and Polarity, Kobe, Japan, March 23-25, 2009.

⑭ Takatori, N., Kumano, G., Saiga, H. and Nishida, H. Wnt segregates mesoderm and endoderm fates via asymmetric inheritance of

Not mRNA in ascidian embryo. CDB symposium 2009, Shape and Polarity, Kobe, Japan, March 23-25, 2009.

⑮ 高鳥直士、熊野岳、西田宏記。発生運命決定にかかわるRNAのWnt依存的な非対称分配機構の解析。第79回日本動物学会、福岡、2008年9月5-7日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし