

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770227

研究課題名（和文） 転写因子 FoxQ2 による二次軸形成抑制機構

研究課題名（英文） Analysis of FoxQ2 function suppressing the secondary axis formation

研究代表者

谷口 俊介 (YAGUCHI SHUNSUKE)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：00505331

研究成果の概要（和文）：神経外胚葉が二次軸形成因子に対して抵抗性を持つメカニズムを明らかにするため、ウニ胚を用いて神経外胚葉特異的転写因子である FoxQ2 の下流因子の機能解析を行った。その結果、FoxQ2 阻害胚のマイクロアレイにより転写調節因子である Fez を単離した。その機能阻害実験の結果により、二次軸形成因子の一つである BMP2/4 シグナルを Fez が細胞内で抑制することにより、神経外胚葉が非神経外胚葉に分化することを防いでいることを明らかにした。また、発生時間をずらして詳細に解析することで、このイベントは間充織胞胚期に行われていることが明らかになった。さらに、このことは神経外胚葉の Specification に必要な FoxQ2 がその下流因子の一つを利用して非神経外胚葉化シグナルを抑制し、自身の領域サイズを維持していることを示している。

研究成果の概要（英文）：The primary goal of this research project is to understand how the neurogenic ectoderm of the sea urchin embryo establishes the resistant mechanisms against signals that induce non-neurogenic ectoderms. With microarray experiments using FoxQ2 morphants, *in situ* hybridization, and QPCR analyses, Fez was identified as a downstream factor of FoxQ2 function in the neurogenic ectoderm. When Fez function was blocked, the size of neurogenic ectoderm became smaller than that of normal embryos. However, that size decrease was rescued by simply blocking BMP2/4 function that induces non-neurogenic ectoderm. This indicates that FoxQ2 induces Fez to block the non-neurogenic ectoderm-inducing signal to maintain the size of neurogenic ectoderm of the sea urchin embryos.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：細胞分化、体軸形成

1. 研究開始当初の背景
多細胞生物が三次元の体を構築するためには一つの軸形成が単独で正常に進行するだ

けでなく、各体軸同士が綿密な情報交換を行うことが必要不可欠である。その中で神経外胚葉領域は体軸形成の影響を受けながらも

その領域自体のサイズ決定は胞胚期から原腸胚期にかけて終了し、その後は体軸形成シグナル分子による非神経外胚葉誘導に頑強に抵抗する。非神経外胚葉誘導シグナルは、神経外胚葉内でのパターンニングには利用されるため、シグナル分子自体が神経外胚葉領域に拡散していることは明確であるが、そのシグナルを実際に細胞内で減衰し、非神経外胚葉にならないようにするメカニズムに関しては未だに謎が多い。また、各体軸形成がリンクしている可能性から、それぞれのシグナル分子に対抗するメカニズムを備えるタイミングのコントロール等のメカニズムを明らかにする必要があると残されている。これまで、ウニ胚を用いた研究において、一次軸形成と二次軸形成をリンクさせる分子として転写因子 **FoxQ2** が報告されており、その分子自体が二次軸形成を抑制するメカニズムの頂点に位置している可能性が示されているが、詳細に関しては一切わかっていない。

2. 研究の目的

一次軸形成過程において **Wnt/beta-catenin** 依存的に神経外胚葉領域に局限される **FoxQ2** が、二次軸形成を担う **Nodal** や **BMP2/4** といった **TGF-beta** シグナルを抑制するメカニズムの詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

ゲノム情報が明らかになっている北米ムラサキウニを利用し、**FoxQ2** の機能阻害胚を用いたマイクロアレイを行った。**FoxQ2** の機能が失われたことで発現が抑制された因子を日本のバフンウニから単離した。それら単離された因子と **FoxQ2** との関連を確定するために **FoxQ2** 機能阻害胚と正常胚それぞれにおいて *in situ* hybridization と定量 PCR 法を用いて時空間的発現解析を行った。その後、モルフォリノオリゴの頭微注入による対象因子の翻訳阻害を行い、**FoxQ2** 下流因子の二次軸形成抑制に対する機能を解析した。

4. 研究成果

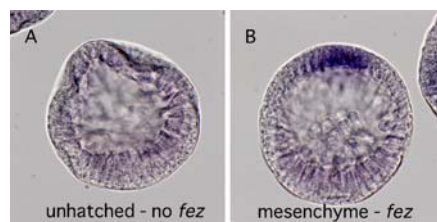
(1) マイクロアレイを用いた **FoxQ2** 下流因子の単離：北米ムラサキウニ *Strongylocentrotus purpuratus* を用いて、**FoxQ2** の機能阻害胚と正常胚の全 mRNA の比較により機能阻害胚において特異的に発現量の低下した遺伝子を 24 個選別した。それら全ての時空間的パターンを日本産バフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus* を用いて **FoxQ2** 機能阻害胚および正常胚それぞれについて *in situ* hybridization と定量 PCR により確認し、**FoxQ2** 依存的に神経外胚葉特異的な発現を示すものを単離した。

(2) そのうちひとつは神経外胚葉の腹側に存在する不動繊毛である頂毛の伸長をコン

トロールする遺伝子であり **AnkAT-1** と名付け報告した。**AnkAT-1** は二次軸形成依存的に発現パターンを変えるが、二次軸形成を制御するものではなかった。

AnkAT-1 は初期胞胚期に **FoxQ2** 非依存的に神経外胚葉に一樣に発現し、その後マイクロアレイを行った間充細胞胚期を含む孵化胞胚期から原腸胚期にかけて **FoxQ2** 依存的に神経外胚葉に発現する。**AnkAT-1** 機能阻害胚では、神経外胚葉に存在する不動繊毛 **Apical Tuft** が顕著に短くなり、通常より半分以下の長さになることが明らかになった。しかし一方で、不動性に関しては通常の **Apical Tuft** と同様でほぼ動かず、**AnkAT-1** の機能としては不動性のコントロールでなく他の繊毛の倍程度ながくなる伸長具合をコントロールしていることが明らかになった。さらに、**Apical Tuft** が最終的に腹側の神経外胚葉のみに限定されるメカニズムを二次軸形成を担う **Nodal** と **BMP2/4** のシグナル分子の機能に注目して解析したところ、**Nodal** が **AnkAT-1** の発現を長期にわたり維持することが明らかになった。このことは軸形成と共に腹側外胚葉誘導と神経外胚葉腹側をパターンニングする **Nodal** の機能と神経外胚葉二発現する因子の関係を明らかにする結果となった。

(3) 次に、間充細胞期に神経外胚葉特異的に発現する **Fez** に着目した (図 A, B)。Fez は孵化前には発現は一切見られなく、胞胚期に神経外胚葉全体に見られた後は、各セロトニン神経へとその発現場所を収束していく。**Fez** は他の動物で神経外胚葉のパターンニングに関与することが報告されている。**Fez** は N 末側に engrailed homology repressor motif 1、C 末側に Zinc finger を持っており、転写抑制因子として働いていることが予想されている。

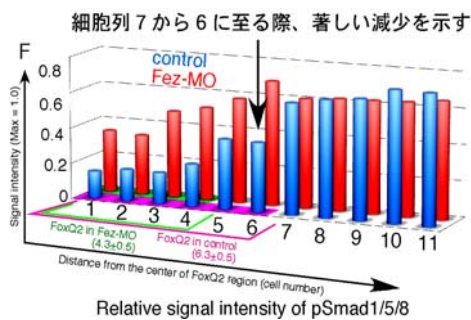


(4) **Fez** の機能阻害により、セロトニン神経の細胞数が減少した。これは **Fez** 機能阻害胚では発生初期に神経外胚葉領域のサイズが縮小することが原因であることを他の神経外胚葉特異的な因子の発現パターンから明らかにした (図 C, D)。実際に神経細胞自体の発現が抑制されている可能性を検討するために、側方抑制を阻害する **gamma-secretase inhibitor (DAPT)** を **Fez** 機能阻害胚に作用させると、**DAPT** なしの機能阻害胚に比べ、神経細胞数の増加が見られたっており、神経細胞の分化自体には関与して

いないことが明らかになった。また、そのステージに非神経外胚葉を誘導し二次軸形成を担う分子である Nodal、Univin、BMP2/4 をそれぞれ機能阻害または過剰発現をし、Fez の発現パターンおよび神経外胚葉マーカーである FoxQ2 の発現パターンを確認した。その結果、Nodal および Univin においては機能を阻害しても増幅しても間充織胞胚期においては FoxQ2 の発現に一切変化は見られなかった。しかし、BMP2/4 を増幅した胚では、FoxQ2 の発現領域が顕著に狭くなり、BMP2/4 に神経外胚葉抑制の機能が存在していることが明らかになった。そこで、Fez と BMP2/4 を同時に機能阻害すると、Fez のみを機能阻害した胚で見られていたような神経外胚葉の縮小が見られなくなった(図 E)。つまり、正常胚では BMP2/4 は神経外胚葉形成を抑制する機能を持っており、Fez はその機能を抑制し、神経外胚葉のサイズを維持していることを示している。



(5) 神経外胚葉領域における BMP2/4 シグナルの強度を Fez 存在下、非存在下で可視化するために細胞内媒介因子である Smad1/5/8 のリン酸化状態の相対値を測定した。正常胚の神経外胚葉領域では Fez の機能により Smad1/5/8 のリン酸化状態は著しく減少しており、Fez の機能阻害胚ではその著しい減少は見られなかった(図 F)。



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)

全て査読有

1. *S. Yaguchi, J. Yaguchi, Z. Wei, K. Shiba, L.M. Angerer, K. Inaba. ankAT-1 is a novel gene mediating the apical tuft formation in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* (2010) 348:67-75. (*corresponding author)

2. S. Yaguchi, J. Yaguchi, R.C. Angerer, L.M. Angerer, R.D. Burke. TGFβ signaling positions the ciliary band and patterns neurons in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* (2010) 347:71-81.
3. H. Katow, T. Suyemitsu, S. Ooka, J. Yaguchi, T. Jin-Nai, I. Kuwahara, T. Katow, S. Yaguchi, H. Abe. Development of a dopaminergic system in sea urchin embryos and larvae. *J. Exp. Biol.* (2010) 213: 2808-2819.
4. Y. Sasakura, J. Yaguchi, S. Yaguchi, M. Yajima. Excision and superposition activity of Tc1/mariner superfamily transposons in sea urchin embryos. *Zoolog Sci* (2010) 27:256-262
5. S. Ooka, T. Katow, S. Yaguchi, J. Yaguchi, H. Katow. Spatiotemporal expression pattern of an encephalopsin orthologue of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* during early development, and its potential role in larval vertical migration. *Develop. Growth Differ* (2010) 52:195-207
6. Z. Wei, J. Yaguchi, S. Yaguchi, R.C. Angerer, L.M. Angerer. The sea urchin animal pole domain is a Six3-dependent neurogenic patterning center. *Development.* (2009) 136:1179-1189

[学会発表] (計 3 件)

1. バンウニ胚神経形成における zinc finger homeobox の機能解析 谷口順子、稲葉一男、谷口俊介 日本動物学会第 81 回大会 2010 年 9 月 23 日 東京大学
2. A zinc finger protein, Fez, downstream of FoxQ2, influences development of serotonergic neurons and the size of the animal plate ectoderm in the sea urchin embryo. S. Yaguchi, J. Yaguchi, Z. Wei, K. Inaba. *Developmental Biology of the Sea Urchin XIX*, 2009 年 10 月 3 日 Woods Hole, MA, U.S.A.
3. ウニ神経外胚葉形成における転写因子 Fez の機能解析 谷口俊介、谷口順子、Wei Zheng, Angerer Robert C.、Angerer Lynne M.、稲葉一男 日本動物学会第 80 回大会 2009 年 9 月 19 日 静岡市グランシップ

[その他]

ホームページ等

<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~yaguchi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 俊介 (YAGUCHI SHUNSUKE)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：00505331