

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770252

研究課題名（和文） ホヤ幼生末梢神経の誘導メカニズム

研究課題名（英文） Induction mechanism of peripheral nervous system in ascidian

研究代表者

大塚 幸雄（OHTSUKA YUKIO）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：90344192

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ホヤ幼生の末梢神経誘導における Nodal シグナルの役割について解析した。その結果、Nodal は神経板境界での Chordin、BMP 遺伝子の発現を調節することでホヤ幼生末梢神経を誘導することを明らかにした。また、Nodal 標的遺伝子である *ci-chordin*、*ci-Pax3/7* が神経板境界に発現するのに必要な転写調節領域を単離し、nodal シグナル応答領域を同定した。

研究成果の概要（英文）：

In order to understand the induction of ascidian peripheral nervous system, I investigated the role of nodal signaling pathway in neural plate border induction. My results show that nodal regulates the specification of ascidian peripheral neurons via induction of chordin and BMPs in neural plate border. In addition, I isolate the cis-regulatory elements of nodal target genes, *ci-chordin* and *ci-Pax3/7*, and identify their nodal response elements.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：進化発生

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の末梢神経はそのほとんどが神経堤に由来する。神経堤の細胞は末梢神経のほかに内分泌細胞、色素細胞など様々な細胞種へと分化する多能性細胞であること、また成人からでも採取可能であることから、再生医学の分野で注目されている。神経堤は脊椎動物への進化の過程で獲得した形質であるが、類似した細胞群は無脊椎動物にも存在することが報告されている。脊椎動物に近縁な原索動物ホヤでは、幼生期の末梢神経系の前駆細胞は移動能持たないという違いはあるが、神経板境界に局在することや、神経堤誘導因子 Snail、Pax3/7 を発現しているなど神経堤細胞によく似た性質をもつ。したがって、ホヤ幼生の末梢神経がどのように誘導されるかを明らかにし、神経堤形成に関する知見と比較することは神経堤の発生・進化を理解する上で極めて重要と考えられる。

## 2. 研究の目的

ホヤ幼生の末梢神経細胞は神経板境界に由来し、その神経板境界の誘導には Nodal シグナルが関与していることが報告されている。しかしこれまでの研究で、脊椎動物の Nodal シグナルが内中胚葉誘導や左右非対称性の形成に重要であることは報告されているが、神経堤の誘導に関与することは報告されていなかった。そこで、本研究では、ホヤ初期発生における Nodal シグナル伝達経路を解析することにより、ホヤ幼生末梢神経の誘導メカニズムについての理解を押し進める。また、得られた知見をもとに脊椎動物の神経堤・感覚器プラコードの発生・進化を考察する。具体的な課題としては、

(1) Nodal シグナルはホヤ幼生の末梢神経誘導で最も初期のシグナルの一つと考えられるため、Nodal シグナルの下流で働く転写因子・シグナル因子を同定し、その役割を

明らかにする。

(2) ホヤ初期胚の神経板境界誘導及び幼生末梢神経誘導に關与する Nodal シグナル伝達因子はこれまで報告されている因子と異なる可能性があることから、Nodal 標的遺伝子の発現制御領域をホヤゲノムから単離し、Nodal シグナル応答領域を同定する。また、上記の結果を踏まえ、ホヤ幼生末梢神経の前駆細胞に外来遺伝子を導入するためのツール開発を行う。

## 3. 研究の方法

(1) ホヤ幼生の末梢神経誘導における Nodal シグナルの下流解析：

ホヤ幼生の末梢神経誘導には Nodal シグナル以外に BMP シグナルが関与することが報告されている。BMP シグナルは Nodal シグナルの下流に位置すると考えられるが、BMP シグナル分子の発現制御メカニズムの詳細については不明である。そこで、マボヤ胚神経板での BMP シグナル分子 (*HrChordin*, *HrBMPa*, *HrBMPb*) の発現が Nodal シグナルによりどのように制御されているかを明らかにするために、Nodal シグナル阻害剤で処理した胚と *HrNodal* RNA を顕微注入した胚の神経板における *HrChordin*, *HrBMPa*, *HrBMPb* のそれぞれの遺伝子発現をホールマウント in situ ハイブリダイゼーション法により解析する。

(2) Nodal 標的遺伝子の発現制御領域の単離・解析：

カタユウレイボヤ胚では、*ci-chordin*, *ci-snail*, *ci-Pax3/7* 遺伝子の神経板境界における発現が Nodal シグナルにより制御されていることが明らかにされている。それら Nodal 標的遺伝子の発現制御領域を同定するために、それぞれの遺伝子の非翻訳領域内に存在する保存領域を組み込んだレポーターコンストラクトをエレクトロポレーショ

ン法によりカタユウレイボヤ卵に導入し、末梢神経前駆細胞における転写活性を調べる。

また、Nodal シグナル応答領域を同定するために、単離した発現制御領域の転写活性がNodal シグナル阻害剤により阻害されるかを調べる。

#### 4. 研究成果

(1) マボヤ幼生の頭部感覚神経誘導におけるNodal シグナルとBMP シグナルの役割を説明：

マボヤ幼生頭部感覚神経の前駆細胞におけるBMP シグナル分子の遺伝子発現がNodal シグナルにより制御されていることを明らかにした。具体的には、

①Nodal シグナルは*HrChordin*及び*HrBMPa*の感覚神経前駆細胞での発現、*HrBMPb*の誘導細胞での発現を制御する。

②*HrBMPa* および *HrBMPb* の遺伝子発現はnodal 濃度依存的に異なる制御を受けている。

③Nodal シグナルによるBMP シグナル分子の遺伝子発現の制御は神経板の前方と後方で異なる。

これまでの研究で末梢神経の誘導には適量のBMP シグナルが必要であることが知られていることから、Nodal シグナルはホヤ末梢神経の誘導に必要なBMP シグナルの量を調節していることが示唆された。

以上の成果は、日本動物学会第81回大会、The 5th International Tunicate meetingにおいて発表し、現在論文の投稿を準備している。

(2) Nodal シグナル応答領域を単離・同定：

Nodal 標的遺伝子である *ci-chordin*, *ci-snail*, *ci-Pax3/7* がカタユウレイボヤ初期胚の幼生末梢神経前駆細胞に発現するの

に必要な転写調節領域が5'上流域に存在すること、*ci-Pax3/7*についてはさらに1stイントロンにも転写調節領域があることを明らかにした。

また、それら単離した転写調節領域のうち、*ci-chordin* の119bp、*ci-Pax3/7* の134bpをnodal シグナル応答領域として同定した。

これまでの研究で、Nodal シグナル応答領域にはSmad/FoxH1 およびSmad/Mixer 複合体が結合することが報告されている。本研究で同定したカタユウレイボヤの *ci-chordin* 及び *ci-Pax3/7* のNodal シグナル応答領域の配列には、Smad の結合配列は存在するが、FoxH1 の結合配列は存在しなかった。また、Mixer 遺伝子はホヤのゲノム上に存在しないことから、これまで知られていない新たなNodal シグナル応答因子の存在が示唆された。

#### 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)

[学会発表] (計2件)

- ① 大塚幸雄、マボヤ神経板におけるBMPシグナル分子の発現、日本動物学会第81回大会、2010年9月23日、東京大学(東京)
- ② Yukio Ohtsuka、The specification of trunk epidermal sensory neuron in *Halocynthia* embryos、The 5th International Tunicate meeting、2009年6月22日、沖縄産業支援センター(沖縄)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 幸雄 (OHTSUKA YUKIO)

独立行政法人産業技術総合研究所・

バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：90344192