

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2006～2010

課題番号：18107006

研究課題名(和文) 組織構造の反復性を生み出す分子ネットワーク

研究課題名(英文) Molecular mechanism underlying metameric morphogenesis

研究代表者

高田 慎治 (TAKADA SHINJI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60206753

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の反復構造が形成される仕組みを理解するため、順・逆両方の遺伝学的方法により体節の分節化に必須な遺伝子を多数同定した。その一つである Ripply1 は T-box 型転写因子の機能を複数のメカニズムを介して抑制し、分節位置を規定する鍵因子として働くことが明らかになった。さらに Ripply と T-box 転写因子の相互作用は咽頭弓の分節化にも関与しており、分節化機構には組織を超えた共通性があることが示された。

研究成果の概要(英文)： To understand the molecular mechanism underlying the development of metameric structures, we identified several genes required for somite segmentation. One of these genes, Ripply1, represses the function of T-box transcription factors through several ways, resulting in proper positioning of the segmentation boundary. Furthermore, the interaction between Ripply and T-box factors also appears to be required for the segmentation of another metameric structure, the pharyngeal arch, suggesting that a common machinery is involved in segmentation of different tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	18,800,000	5,640,000	24,440,000
2007年度	16,700,000	5,010,000	21,710,000
2008年度	16,400,000	4,920,000	21,320,000
2009年度	16,800,000	5,040,000	21,840,000
2010年度	16,700,000	5,010,000	21,710,000
総計	85,400,000	25,620,000	111,020,000

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：発生・分化、細胞・組織、遺伝子、発現制御

1. 研究開始当初の背景

動物のからだには、さまざまな繰り返し構造が認められる。そのような繰り返し構造の多くは元をたどれば発生初期に一過的に形成される体節の反復性に由来する。脊椎動物の各体節は、発生の進行に従い頭部側から尾部側に向けて順次作られていくが、このような時間経過に沿った漸進的な領域の区

画化は、脊椎動物の体節形成に特徴的な現象であり、その分子機構の解明は発生生物学の大きな課題の一つである。さらに、その分子機構が持つ特性が他の発生現象にも使われているのか、もし使われているとするならそこにはどのような共通の意味があるのか、といった問題には、脊椎動物の発生機構を包括的に理解する上からも興味が

持たれるところであった。

2. 研究の目的

本研究では、体節の分節化過程において「時間経過に沿った漸進的な領域の区画化」を生み出す分子メカニズムの解明を目指し、(1) 体節形成に必須な役割をはたす未知の遺伝子の同定と、これら遺伝子を含めた体節形成に関わるさまざまな遺伝子間の相互作用の解明を行う。それと同時に、(2) 体節の分節化に関わる遺伝子間作用が体節形成以外の発生過程において担う役割を明らかにし、体節の分節化メカニズムを多角的に理解する。

3. 研究の方法

(1) 体節の分節化に関わる遺伝子を2通りの方法により同定した。第1は、突然変異体の原因遺伝子を同定する方法である。研究代表者の研究グループは独自に突然変異体のスクリーニングを実施し、すでに体節の分節性に異常を呈するゼブラフィッシュ突然変異体を複数単離している。本研究ではこれらの突然変異体に着目し、ポジショナルクローニングによりその原因遺伝子を同定した。第2は遺伝子の発現パターンから体節の分節化に関わる遺伝子を探索する方法である。ゼブラフィッシュ胚の体節前駆細胞(未分節中胚葉)より作製したcDNAライブラリーを用いて *in situ hybridization* により体節前駆細胞に特異的に発現する遺伝子を選択し、遺伝子機能阻害実験により体節の発生に関与するものを同定した。

(2) これら原因遺伝子ならびに別法により同定した体節の分節化に関わる遺伝子のうち特に注目すべきものに関して、体節の分節化に関わる因子間との相互作用を中心にその作用機作を解析した。さらに、胴部と尾部の体節形成機構の違いに着目し、そのような違いを生み出すことに関わる遺伝子を同定するとともに、その機能解析を行った。

(3) また、動物種間における体節の分節機構を比較するために、ゼブラフィッシュとマウス間で、体節の分節化に関わる遺伝子のオルソログの機能を比較した。

(4) それとともに、体節の分節化に関わる分子機構の一般性を検討した。具体的には、体節と同じく分節構造を持つ咽頭弓に着目し、体節と咽頭弓の分節機構の共通性を検討した。

(5) さらに、ゼブラフィッシュを用いて、咽頭弓の分節化に関わる遺伝子の探索と機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 体節形成の各素過程に関わる分子の同定と分子間相互作用の解明

① 体節分節化異常突然変異体の原因遺伝子の同定と機能解析

研究の方法において述べたように、体節の分節化に異常を呈するゼブラフィッシュ突然変異体のうち、原因遺伝子が未同定だった4系統について、当初の計画通りその原因遺伝子を同定した。そのうちの1系統では、*Rtf1* が原因遺伝子であることが判明した。*Rtf1* は転写伸長やクロマチン修飾に関わる *Paf1* 複合体の構成因子であり、*Rtf1* 変異体では体節の分節化に大きな役割を果たす *Notch* 情報伝達による標的遺伝子の転写活性化が選択的に減少していた(図1)。また、他の *Paf1* 複合体構成因子や転写伸長因子である *Spt5* や *Spt6* も *Rtf1* と協調して体節分節の形成を制御していることを見だし、体節の分節化過程における *Notch* シグナル伝達系が機能する上での分子基盤の一端を明らかにした(Akanuma et al. 2007)。

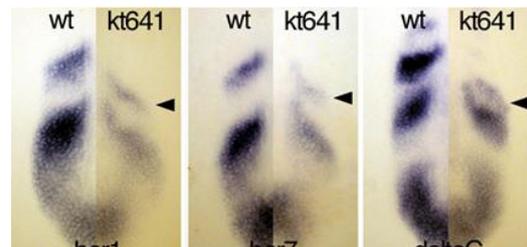


図1 *Rtf1* 変異体における *Notch* 情報伝達の低下
体節の分節化過程において、*Rtf1* 変異体(kt641)では *her1*, *her7*, *deltaC* などの *Notch* シグナルの標的遺伝子の転写が選択的に低下する。各々、野生型胚を左側に *Rtf1* 変異体(kt641)を右側に配置する。

もう1つの突然変異体の原因遺伝子は、RNA核外輸送因子 *NXF1* をコードすることが判明した。この変異体では体節位置形成に深く関わる *FGF* シグナル伝達が大きく減弱しており、*FGF* シグナル伝達系の因子のRNA核外輸送が選択的に影響を受けているものと考えられる。RNAの選択的な核外輸送という問題は本課題の枠を超えて興味深い問題であり、その発展が別途期待される。他の2系統の突然変異体は、体節分節の形態的反復性の確立過程に異常を呈すると考えられたが、各々 *Na-K ATPase* と *P450* の一つである *Cyp46A1* が原因遺伝子であることが判明し、原因遺伝子の同定はすべて計画通り完了した。これら遺伝子の機能阻害がいかんして分節化異常に結びつくかということは興味深い問題である。しかしながら、これらの原因遺伝子がコードするタンパク質が分節化メカニズムの根幹に位置する分子ではないことが示唆されたこと、別途我々の手により同定した

Ripply が体節の空間パターン形成の鍵を握る分子であることが本研究の進行とともに次第に明らかになって来たことから、上記変異体において同定した遺伝子の解析は中断し、下記に述べる他の研究に重点を移行した。

② 体節分節の空間パターン形成の鍵をにぎる Ripply の機能解析

突然変異体の原因遺伝子の同定と平行して、未分節中胚葉で強く発現し、分節化に関わる遺伝子の機能解析も進めた。未分節中胚葉とは分節前の体節前駆組織であり、その前端が一定の時間周期のもとに順次くびれ切れることにより体節が形作られる。研究代表者らは未分節中胚葉で発現し体節の分節化に関わる遺伝子として Ripply1 を本研究開始時に発見していた。Ripply は転写調節因子としての性質を持ち、ゼブラフィッシュ、マウス、ヒトなどの脊椎動物には3つの相同遺伝子が存在する。このうち、Ripply1 と Ripply2 は未分節中胚葉で発現し、転写共抑制因子 Groucho と相互作用することから、体節の分節形成に関わる遺伝子の転写抑制に働くものと考えられてきた。

そこで、Ripply1 のターゲットになる遺伝子を探索した結果、空間的な分節パターン形成の主役である Mesp-b 遺伝子の発現が Ripply1 により直接抑制されることを突き止めた。さらに、その抑制には空間的な分節パターン形成に関わるもう一つの転写制御因子 Tbx24 が必要であり、種々の解析の結果、Ripply1 は Groucho/HDAC 転写共抑制因子複合体と Tbx24 を結合させるメディエーターとして機能し、Tbx24 の転写活性因子から抑制因子へと転換させているという結論を得ることができた (図2; Kawamura et al. 2008)。すなわち、Tbx24 は Ripply1 の発現に応じてその転写調節因子としての性質を変えて Mesp 遺伝子の発現を巧妙に制御しており、その結果として規則正しい分節構造が形作られるものと考えられた。

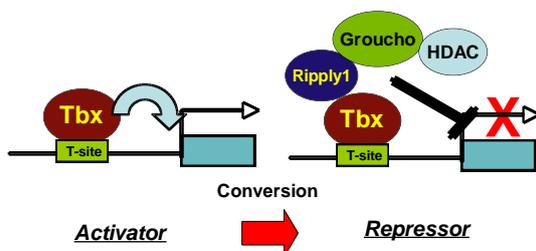


図2 Ripply による Tbx の機能制御機構

体節の分節化における Tbx と Mesp の機能はマウス胚で精力的に研究されてきた。未分節中胚葉においては、Mesp2 の発現が Tbx24 のオルソログである Tbx6 と Notch シグナルによって誘導される。その一方で、Mesp 2 は Tbx6 タンパク質の分解に関わることによって Tbx6 タンパク質発現領域の前方位置を規定し、その位置が体節境界になることが明らかにされている。すなわち、Mesp と Tbx の間での双方向の相互作用が、体節の分節位置の決定に大きな役割をはたす。このような分節位置の決定機構に Ripply がどのように関わるのかを検討するため、Ripply1 と Ripply2 の両遺伝子をノックアウトした2重変異体マウスを作成するなどして、体節の分節化に関わる因子との関係を解析した。

Ripply1/2 二重変異体における Mesp 遺伝子の発現と Notch シグナルの活性化状態を詳細に調べた結果、Ripply による Mesp 遺伝子の発現の量とタイミングの制御によって分節位置や体節内の前後極性が正しく確立されるものと考えられた。一方、Ripply1 と Ripply2 両遺伝子の発現は Mesp2 に依存して引き起こされ、さらに Ripply1/2 二重変異体では Mesp2 変異体と同様に Tbx6 タンパク質発現領域が前方に拡大していた (図3)。このことは、Tbx6 の分解とその結果としての分節位置の決定には、実は Mesp2 よりも Ripply がより直接的に働いていることを示している。これらの結果から、Ripply1 と Ripply2 は、Mesp2, Tbx6, それに Notch シグナルらとの相互作用により、体節の空間的分節パターン、中でも分節位置の規定、の鍵因子と働くものと考えられた (Takahashi et al. 2010)。今後の課題の一つとして、Ripply による Tbx6 の分解機構の解明があげられるが、それが Ripply の機能として考えられている転写抑制を介するものか、それともそれとは別個の分子機能によるのかという点には興味を持たれる。

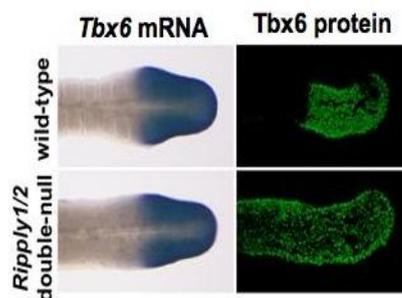


図3 Ripply による Tbx タンパク質の発現境界の規定
Ripply1/2 二重変異体では、Tbx6 タンパク質の発現領域が胚の前方に向けて拡大していた。すなわち、Ripply1/2 は Tbx6 の発現境界を規定しており、この境界が体節の分節位置となるものと考えられる。

③ 前後軸に沿った体節形成機構の違い

上述したように、脊椎動物の体節は前方から後方にかけて一定の時間間隔のもと順次形成されて行く。体節は体の前方か後方に関わりなく一定の機構で形作られるように思われるが、ゼブラフィッシュなどを用いた遺伝学的解析から、胴部と尾部の体節形成に必要な遺伝子の少なくとも一部は異なることが示唆されていた。

一方、我々は *in situ hybridization* による発現スクリーニングにより、bHLH 型の転写因子である *mesogenin 1 (msgn1)* が未分節中胚葉で発現することを見いだしていたが、その機能を抑制したところ、*msgn1* 単独の機能阻害では尾部の体節形成に軽微な異常が現れるのに対し、*msgn1* とともに T box 型の転写因子である *spadetail (spt)* の機能を同時に抑制した場合には、胴部と尾部の体節が完全に欠失することを見いだした (図 4)。このような胴部と尾部における体節形成の違いは、*msgn1* と *spt* を取り巻く遺伝子制御ネットワークの差によるものと考えられた。そこで、体節形成における *msgn1* の作用機構を詳細に解析したところ、体節中胚葉の幹細胞と考えられる中胚葉前駆細胞 (*mesodermal progenitor cell*) が未分節中胚葉へと分化する過程で *msgn1* が発現し、体節への分化を誘導するものと結論された。これらの結果から、体の前後における体節形成の違いを生み出す仕組みについての理解が深まると同時に、幹細胞から体節中胚葉への分化の初発段階を担う因子が同定でき、体節の分節化を支える分子基盤の一端を明らかにすることができた (論文投稿中)。

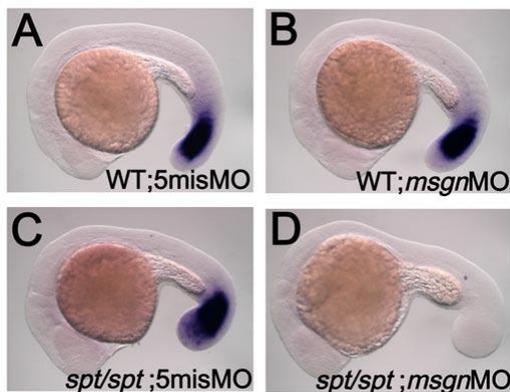


図 4 尾部体節形成における Mesogenin の役割

msgn1 と *spt* の二重機能欠損胚 (D) では、胴部と尾部において体節中胚葉分化のマーカー (Tbx24) の発現がなくなり体節が欠失する。

(2) 体節において同定された分節メカニズムの一般性についての検討

① 咽頭弓の分節化における Ripply 3 の役割

体節と同様に頭部から尾部にかけて逐次

分節が形成される組織として、咽頭弓が知られる。我々は Ripply ファミリー遺伝子の第 3 のメンバーである Ripply3 が、咽頭弓で発現することを見いだした。Ripply3 の発現は咽頭弓の分節過程においてダイナミックに変動するが、特に新たな咽頭弓分節が作られる途上の咽頭弓領域の最後端で強く発現する。興味深いことに、この領域では T box 型転写制御因子の一つ Tbx1 が発現していることから、咽頭の分節形成過程において体節と同様に Tbx-Ripply の相互作用が重要な働きをしているのではないかと考え、Ripply3 ノックアウトマウスを作成し解析した。Ripply3 ノックアウト胚では、第 3 体節より後方の分節性が完全に消失し (図 5)、この領域から発生する胸腺、副甲状腺、心臓流出路、動脈弓などに異常が認められた。これは、体節以外の分節形成の場に体節の場合と同様の分子機構が関与することを示唆した初めての例であり、咽頭弓と体節という脊椎動物に共通する代表的な分節組織が形成される過程で、分子機構の上でも共通性があるというこれまでにない考え方を提示している。

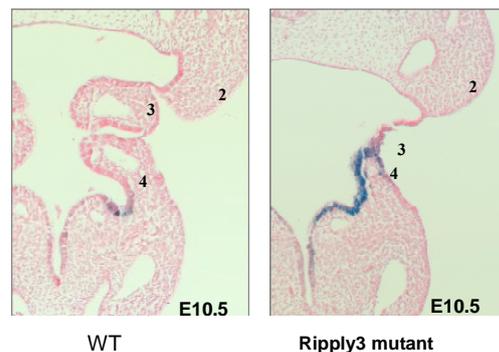


図 5 Ripply 3 変異体における咽頭弓の分節異常本来は第 4 咽頭嚢で発現するマーカーの発現広がり分節性を呈していない。

② 咽頭弓と体節の境界形成に共通に認められる Jagged/Notch シグナルによる Fibronectin の集積を介した上皮構造の制御

咽頭弓の分節機構をより広範に解析するために、既存のゼブラフィッシュ突然変異体の中から咽頭弓の分節性に異常を示すものを探索した。その結果、Notch シグナル伝達系の構成因子の一つである *mind bomb* 変異体において、咽頭弓の上皮構造に異常があることを見いだした。ここでの Notch シグナル伝達系の役割は、体節分節の形成過程ですでに明らかになっているものとは異なり、時間的周期性の確立ではなく、むしろその後起こる反復的な構造形態が実際に作られる過程の制御であった。すなわち、我々は咽頭弓の上皮細胞は前腸の上皮細胞が一端形態を崩して重層化した後に単層の咽頭上皮細胞

に再編成されることを見いだしたが、Notch シグナルはこの再編成に必要なことが明らかとなった。そしてその過程には Integrin $\alpha 5$ や Fibronectin が関わることも突き止めた。さらに、この咽頭領域で見いだされた分節構造の形成には Notch のリガンドの一つ Jagged2 が必須であることも明らかにした。一方、この結果に先立ち、Integrin $\alpha 5$ を介した Fibronectin の集積が体節境界で起きることを我々はゼブラフィッシュ変異体を用いてすでに明らかにしているが、まったく予期しなかったことに Jagged2/Notch シグナルが体節境界における Fibronectin の集積とその結果である境界の維持にも寄与することがわかった (図 6)。したがって、体節と咽頭弓に見られる分節性を持った上皮構造の形成には、Integrin $\alpha 5$ を介した Fibronectin の集積が共通に必要なこと、そしてその集積は Jagged2/Notch シグナルによって共通に誘導されるものと考えられる (論文投稿中)。

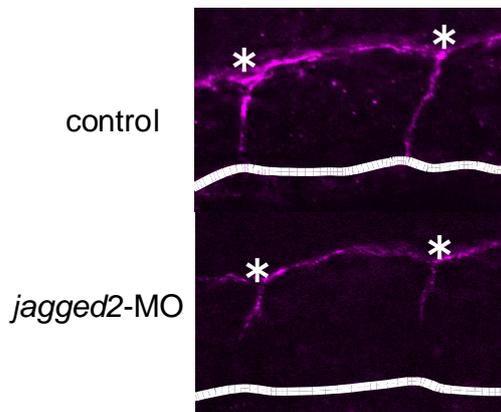


図6 Jagged2 機能阻害胚における体節境界(*)での Fibronectin の集積の低下 Jagged2 機能阻害胚ならびに変異体胚においては、咽頭上皮の再組織化とともに体節境界の形成異常が観察された。どちらの場合も、Fibronectin の集積を介して Jagged2 シグナルは上皮細胞の組織化を制御するものと考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 9 件、すべて査読有り)

- ① Okubo, T., Kawamura, A., Takahashi, J., Yagi, H., Morishima, M., Matsuoka, R., & Takada, S. Ripply3, a Tbx1 repressor, is required for development of the pharyngeal apparatus and its derivatives in mice *Development* **138**, 339-348 (2011)
- ② Takahashi J., Ohbayashi A., Oginuma M., Saito D., Mochizuki A., Saga Y., & Takada S. Analysis of Ripply1/2-deficient mouse embryos reveals a mechanism underlying the rostro-caudal patterning within a somite. *Dev.*

Biol. **342**,134-145 (2010)

- ③ Hashimoto, H., Shinohara, K., Wang, J., Ikeuchi, S., Yoshiba, S., Meno, C., Nonaka, S., Takada, S., Hatta, K., Wynshaw-boris, A., & Hamada, H. Planar polarization of node cells determines the rotational axis of node cilia. *Nat Cell Biol.* **12**, 170-176 (2010)
- ④ Miyaoka, Y., Tanaka, M., Imamura, T., Takada, S., & Miyajima, A. A novel regulatory mechanism for Fgf18 signaling involving cysteine-rich FGF receptor (Cfr) and delta-like protein (Dlk) *Development* **137**, 159-167 (2010)
- ⑤ Kawamura, A., Koshida, S., & Takada, S. “Activator-to-repressor conversion of T-box transcription factors by the Ripply family of Groucho/TLE-associated mediators.” *Mol. Cell Biol.* **28**, 3236-3244. (2008)
- ⑥ Alvarez-Medina, R., Cayuso, J., Okubo, T., Takada, S., & Marti, E. “Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression” *Development* **135**, 237-247 (2008)
- ⑦ Akanuma, T., Koshida, S., Kawamura, A., Kishimoto, Y., & Takada, S. “Paf1 complex homologues are required for Notch-regulated transcription during somite segmentation.” *EMBO Rep*, **8**, 858-863 (2007)
- ⑧ Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., & Takada, S. “Monounsaturated fatty acid modification of Wnt proteins: Its role in Wnt secretion.” *Dev. Cell* **11**, 791-801 (2006)
- ⑨ Yamaguchi, Y., Yonemura, S., & Takada, S. “Grainyhead-related transcription factor is required for duct maturation in the salivary gland and the kidney of the mouse.” *Development* **133** 4737-4748 (2006)

[学会発表] (計 33 件)

主要な口頭発表のみ記載

- ① Takada S. “Jagged/Notch is required for epithelial organization and maintenance of assembled fibronectin during pharyngeal morphogenesis” in Exiting Biologies: Biology at the interface, RIKEN CDB, Kobe, September 29, (2011)
- ② 高田慎治 “ゼブラフィッシュの咽頭嚢形成における上皮組織の再組織化” 第 8 4 回日本生化学会 (シンポジウム)、京都国際会館 (京都府) 9 月 22 日 (2011)
- ③ Takada S. “Jagged/Notch regulates epithelial morphogenesis during the development of

pharyngeal pouch” in the 5th Asia –Oceania Zebrafish Meeting, Beijing, August 27, (2011)

- ④ 高田慎治 “咽頭弓と体節の発生における Jagged シグナルとフィブロネクチンの相互作用” 第62回日本細胞生物学会(シンポジウム)、大阪国際会議場(大阪府) 5月19日(2010)
- ⑤ Okubo, T. Kawamura, A., Takahashi, J., Ohbayashi, A., & Takada, S. “Tbx-associated transcriptional corepressor Ripply3 is essential for pharyngeal arch development” 第31回日本分子生物学会大会 BMB2008 神戸国際会議場(兵庫県) 2008年12月9日
- ⑥ Takada S. “Ripply3, a negative regulator of Tbx1, is required for development of caudal pharyngeal arches and their derivatives” in Cold Spring Harbor Meeting on Mouse Molecular Genetics, Cold Spring Harbor (USA), October 31 (2008)
- ⑦ Takada S. “Transcriptional repression of mesp gene via Groucho/TLE-associated mediator Ripply.” in Satellite meeting to the 66th Annual Meeting of the Society for Developmental Biology and the First Pan-American Congress in Developmental Biology: Somitogenesis: from models to Therapeutics, Cancun (Mexico), June 16 (2007)

[図書、総説] (計2件)

- ① 大久保直、高田慎治 “咽頭弓からの胸腺形成と先天性異常の発症機構” **生化学** **84**, 168-176 (2012)
- ② 川村哲規、越田澄人、高田慎治 “Groucho 結合因子 Ripply1 による分節プログラムの制御” **細胞工学** **25**, 272-273 (2006)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/cib2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 慎治 (TAKADA SHINJI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60206853

(2) 研究分担者

越田 澄人 (KOSHIDA SUMITO)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号：40342638

大久保 直 (OHKUBO TADASHI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号：10450719

(3) 連携研究者

矢部 泰二郎 (YABE TAIJIRO)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号：30470074

赤沼 啓志 (AKANUMA TAKASHI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・研究員

研究者番号：50450721

川村 哲規 (KAWAMURA AKINORI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・学振特別研究員

研究者番号：10466691

高田 律子 (TAKADA RITSUKO)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・研究員

研究者番号：40450720

(4) 研究協力者

内海 秀子 (UTSUMI HIDEKO)

基礎生物学研究所、分子発生学研究部門、
技術職員

陳 秋紅 (CHEN QUIHONG)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・研究員

高橋 潤 (TAKAHASHI, JUN)

総合研究大学院大学・大学院生

津国 浩之 (TSUNOKUNI HIROYUKI)

総合研究大学院大学・大学院生

WANGLAR CHIMWAR

総合研究大学院大学・大学院生