

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2006 年～2010 年

課題番号：18GS0320

研究課題名（和文） 脊椎動物頭部進化の比較分子発生学的解析

研究課題名（英文） Ontogeny and phylogeny of head development in vertebrates

研究代表者 相沢 慎一

独立行政法人理化学研究所・ボディプラン研究グループ・グループディレクター

研究者番号：60073011

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：頭部ギャップ遺伝子、エンハンサー、系統発生、胚体外組織、前後軸形成、頭部誘導、脳領域化、皮質形成

1. 研究計画の概要

現在なお、脊椎動物の起源、門レベルの進化を解明する道筋はない。しかし、各脊椎動物での分子発生学的解析の進捗とゲノム情報の進捗によって、綱レベルでの脊椎動物の体造りの変化を解明する時点に達した。脊椎動物の頭部は脳と神経堤細胞のつくる頭蓋によって特徴づけられ、これに比する構造は原索動物には存在しない。脊椎動物にのみ特有な頭部はまた脊椎動物進化の過程で最も劇的に変遷した構造で、生物体最高の所産であるヒト新皮質を生み出した。本研究は頭部形成の各段階で主要な役割を果たす頭部ギャップ遺伝子について、各発現を制御するシスエレメントを中核に、上流因子、協働因子、下流因子を含めた遺伝子カスケードの変化として脊椎動物の頭部進化を明らかにする。

2. 研究の進捗状況

臓側内胚葉での *Otx2* 発現はマウス胚で前後軸の形成と頭部の誘導に必須である。この発現のための VE エンハンサーを転写開始点近傍の 51bp に同定し、上流・下流の遺伝子カスケードを明らかにした。臓側内胚葉は卵黄を捨てて子宮で発生する道を選んだほ乳動物に特有な構造で、これに相同な構造は両生類には存在しない：何故前後軸形成、頭部誘導という発生の基本過程がほ乳動物で新たに獲得された構造によって担われているのか。四足動物、シーラカンス、ポリプテルス、エイ、真骨魚での比較解析から、VE エンハンサーとその遺伝子カスケードは祖先四足動物で成立し、両生類では深部内胚葉細胞で、は虫類ではハイポブラスト、ほ乳動物

では臓側内胚葉で用いられることになったと考えられ、鳥類での特殊化が示唆された。

真骨魚でも胚体外組織 (yolk syncytial layer) が軸形成、胚葉形成に重要な働きをするが、両生類には胚体外組織は無い。ポリプテルス、ナメクジウオでの解析より、祖先硬骨魚、祖先脊椎動物胚は全割をしたが植物局側の割球は胚体外で、内胚葉・中胚葉は赤道軸上の周辺領域より生じたと考えられた。羊膜類ならびに真骨魚で体軸形成に重要な働きをする胚体外内胚葉はこれより生じた相同な構造で、両生類で 2 次的に胚体深部内胚葉に組み込まれ、胚体外組織としては失われたと考えられる。この結果は両生類型が祖先型で胚体外組織は真骨魚と羊膜類でそれぞれ独自に進化したとの従来の考えを覆すものである。

誘導された吻側神経外胚葉 (AN) でも *Otx2* は最初に発現し、AN の後方化を抑制する。AN エンハンサーは 6 体節期までに活性を失い、その後の前脳・中脳 (FM) では、*Otx1* と FM エンハンサーの下 *Otx2* が発現し、FM の後方化を抑制し、*Emx2*, *Pax6* と協働して前脳の領域化に働く。げっ歯類は第 2 の FM を有し、中脳・後脳の境界形成に *Otx* dosage を上げる必要があったと想定された。AN, FM からなる脳での *Otx2* 発現のためのエンハンサー構成は、エイにも存在し祖先有額類で成立したと考えられるが、ポリプテルス、真骨魚の条鰭類では AN エンハンサーは失われ、FM エンハンサーが AN 活性も担い、異なる上流因子により制御されていることが明らかとなった。

Emx2 は 5-6 体節期 *Otx1/Otx2* と協働して尾側前脳域・間脳原基の形成に、E9.5 *Emx1* と協働して終脳の形成に、E11.5 以降 *Emx1* と

働いて皮質層構造の形成に働く。これらの Emx2 発現は全て同一の FB エンハンサーによって担われていること、FB エンハンサーは Otx, Tcf, Smad, および 2 つの未知因子によって制御されていることを明らかにした。このエンハンサーは層構造を形成しないは虫類、両生類でも保存されており、他方、真骨魚での特殊化が想定される。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

Otx2 の下流で、FGF および WNT レセプターの細胞表面への発現を抑制することによって両シグナルの抑制に cell autonomous に働く因子として Shisa を同定し、また、上皮・間充織転換を post-translational に制御する因子として EPB41L5 を同定するなどの成果も得た。EPB41L5 は p120catenin に結合して E-cadherin を不安定化し細胞間接着を弱め、paxillin に結合してインテグリンの細胞表面での発現を亢進し、focal adhesion を活性化、細胞/ECM 相互作用を高める。さらに、層構造形成に関わる因子として microRNA9 を同定した。miR9 は Foxg1 の発現を抑制することによって Cajal-Retzius 細胞の分化を制御し層構造形成に働くが、層構造形成しないニワトリ、カエルでも Foxg1 の発現を制御し、真骨魚では Foxg1 の制御に関わらない。他方、本研究の中心課題の一つである皮質領域の形成に中心的に働く遺伝子に関しては、幾つかの候補遺伝子を得た段階にある。

4. 今後の研究の推進方策

げっ歯類の胚は卵筒状をしているが大半のは哺乳動物胚及びは虫類胚は、鳥類と同じくディスク状である。ディスク状胚としてブタ胚、スンス胚、スッポン胚、ヤモリ胚について前後軸形成の方式を明らかにする。魚類のオーガナイザーでは Otx2, Otx1 の両者が発現するがそのエンハンサーは四足動物と異なる。これらのエンハンサーと遺伝子カスケードを同定し、四足動物と魚類で異なるオーガナイザーでの Otx の働きを明らかにする。EPB41L5 が制御する ETM の分子機構の詳細を明らかにする。FM エンハンサーの上流因子の解析をすすめ条鰭類で AN 活性を担う機構とその意義を明らかにする。ほ乳類皮質での層構造形成のためほ乳類で Emx2 が獲得したターゲットを同定する。また FB エンハンサーの未知上流因子を探索し、真骨魚での特殊化の分子機構と間脳、終脳形成におけるその意義を明らかにする。は虫類、両生類での miR9 による Foxg1 制御の意義を明らかにし、また miR9 欠損マウスから明らかになった他の miR9 target 遺伝子の解析を進める。皮質形成に関わる候補遺伝子の解析を更に進める。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計 28 件)

1. Sugiyama, S., Nardo, AD., Aizawa, S., Matsuo, I., Volovitch, M., Prochiantz, A. and Hensch, TK. (2008). Experience-Dependent Transfer of Otx2 Homeoprotein into the visual Cortex Activates Postnatal Plasticity. *Cell* 134 208-520. (査読有)
2. Hirano, M., Hashimoto, S., Yonemura, S., Sabe, H. and Aizawa, S. (2008). EPB41L5 functions to post-transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Biology* 182 1217-1230. (査読有)
3. Shibata, M., Kurokawa, D., Nakao, H., Ohmura, T. and Aizawa, S. (2008). MicroRNA-9 modulates Cajal-Retzius cell differentiation by suppressing Foxg1 expression in mouse medial pallium. *J Neurosci.* 28, 10415-21. (査読有)
4. K Ito, T Kawasaki, S Takashima, I Matsuda, A Aiba, and T Hirata (2008) Semaphorin 3F confines ventral tangential migration of lateral olfactory tract neurons onto the telencephalon surface. *J. Neurosci.* 28 4414-4422. (査読有)
5. Suda, Y., Kurokawa, D., Takeuchi, M., Kajikawa, E., Kuratani, S., Amemiya, C. and Aizawa, S. (2009). Evolution of Otx paralogue usages in early patterning of the vertebrate head. *Developmental Biology* 325, 282-295. (査読有)
6. Takasaki, N., Kurokawa, D., Nakayama, R., Nakayama, J. and Aizawa, S. (2007). Acetylated YY1 regulates *Otx2* expression in anterior neuroectoderm at two *cis*-sites 90kb apart. *The EMBO Journal* 26, 1649-1659. (査読有)
7. Furushima, K., Yamamoto, A., Nagano, T., Shibata, M., Miyachi, H., Abe, T., Ohshima, N., Kiyonari, H. and Aizawa, S. (2007). Mouse homologues of Shisa antagonistic to Wnt and Fgf signalings. *Developmental Biology* 306, 480-492. (査読有)
8. Kurokawa, D., Sakurai, Y., Inoue, A., Nakayama, R., Takasaki, N., Suda, Y., Miyake, T., Amemiya, C. and Aizawa, S. (2006). Evolutionary constraint on Otx2 neuroectoderm enhancers-deep conservation from skate to mouse and unique divergence in teleost. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 19350-19355. (査読有)