

平成23年 5月 25日現在

機関番号： 82401

研究種目： 学術創成研究費

研究期間： 2006～2010

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（AIZAWA SHINICHI）

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

研究成果の概要（和文）：

哺乳類（マウス、ウサギ、ブタ、スンクス）、爬虫類（ゲッコウ、スッポン）、鳥類（ニワトリ）、両棲類（カエル）、総鰭類（シーラカンス）、腕鰭類（ポリプテルス）、真骨魚類（ゼブラフィッシュ、メダカ、フグ）、軟骨魚類（エイ）、無顎類（ヤツメウナギ）を比較発生及び比較ゲノム解析することによって、胚体外ヘッドオーガナイザー組織の相同的起源、ヘッドオーガナイザー *Otx2* 遺伝子カスケードの肉鰭類での成立、条鰭類と肉鰭類で異なる神経外胚葉形成機構、皮質層構造形成の起源などを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Comparative analyses of mammalian (mouse, rabbit, pig, suncus), reptile (gekko, turtle), avian (chick), amphibian (*Xenopus*), actinist (coelacanth), cladist (bichir), teleost (zebrafish, medaka, fugu), cartilaginous fish (skate) and agnatha (lamprey) embryos, developmentally and/or genomically, demonstrated that 1) extraembryonic head organizer tissues in vertebrates are homologous to deep endoderm cells in *Xenopus*, 2) *Otx2* gene cascade was established in ancestral sarcopterigian to suppress poeriorizing signals, 3) anterior neuroectoderm develops differently between sarcopterigian and actinopterigian, 4) potency to form layer structures in cortical progenitor cells would have been established in reptile stage, not in mammal, and others.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	74,400,000	22,320,000	96,720,000
2007年度	57,200,000	17,160,000	74,360,000
2008年度	57,200,000	17,160,000	74,360,000
2009年度	57,200,000	17,160,000	74,360,000
2010年度	57,200,000	17,160,000	74,360,000
総計	303,200,000	90,960,000	394,160,000

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：脊椎動物系統発生、前後軸形成、オーガナイザー、頭部誘導、脳形成、皮質形成、比較発生学、比較ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

生物学はなお、脊椎動物と原索（頭索・尾索）

動物の共通先祖がどのような体造りをする動物で、この共通祖先からどのように脊椎動物が生まれたか、脊椎動物頭部の起源、門レベルの進化を解明する道筋をもたない。しかし、各綱脊椎動物での分子発生的解析の進捗と各綱脊椎動物でのゲノム解析の進捗によって、顎を持たない魚として生まれた脊椎動物が、一方で現存する軟骨魚、真骨魚へ、他方で総鱗類から両棲類、そして爬虫類・鳥類、ほ乳類へと至った、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ていた。

2. 研究の目的

脳と神経堤細胞のつくる頭蓋によって特徴づけられる脊椎動物の頭部に比する構造は原索（頭索・尾索）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。ほ乳動物の皮質は6層構造を形成し、各領域にわかれて機能を果たす。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の成立・欠失を中核に、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しようとするものである。

3. 研究の方法

哺乳類マウス、鳥類ニワトリ、両棲類カエル、真骨魚類ゼブラフィッシュ、メダカで確立されている実験系により、遺伝子の発現、機能解析を行った。加えて、脊椎動物の系統発生上及び実験上鍵となるほ乳動物ウサギ、ブタ、スナグ、爬虫類ゲッコウ、スッポン、腕鰭類ポリプテルス、真骨魚類フグについて、初期発生での遺伝子発現の解析、遺伝子機能の解析を可能とするよう動物飼育、胚採取、分子生物学的解析ツール、プロトコルを整備した。無顎類ヤツメウナギ胚については、理研神戸 CDB 倉谷繁 GD に、軟骨魚エイ胚については Benaroyal Research Institute Chris Amemiya 教授の助力を得た。また、シーラカンス、ポリプテルス、ヤツメウナギのゲノム解析は Chrysi Amemiya 教授の助力を得た。

4. 研究成果

1) ヘッドオーガナイザーの起源

マウスとゼブラフィッシュでは胚体外組織である anterior visceral endoderm (AVE) 及び yolk syncytial layer (YSL) がヘッドオーガナイザー機能を持ち、カエルでは胚性深部内胚葉がこの機能を持ち、これらの構造は相同ではなく、ヘッドオーガナイザーの起源が謎であった。

全卵割により発生する両棲類胚では全ての割球は3胚葉の何れかに寄与し、その植物局

側の割球は内胚葉となる。この形式での発生が脊椎動物の発生の祖先系型であると考えられ、盤割は軟骨魚類、条鰭類と爬虫類でそれぞれ独立に獲得されたと考えられてきた。これは原始的な硬骨魚及び無顎類胚の発生が、カエルとよく似た全卵割であることにより、これらの胚の植物局の割球は、カエル胚同様内胚葉になると考えられてきた。しかしこのことは確認されてこなかった。本研究ではポリプテルス及びヤツメウナギ胚での解析により、これらの胚でその内胚葉、中胚葉は赤道帯域に生じ、その植物極の細胞は non-cell autonomous な中・内胚葉誘導活性を持つ、胚体外の卵黄性割球であることを明らかにした。また母性 VegT を内胚葉形成に用いるのはカエル胚に特有で、他の脊椎動物は eomesodermin を内胚葉形成に母性に発現する。これらの結果は、ポリプテルス、ヤツメウナギ型の植物極割球を卵黄性割球とする全卵割が、脊椎動物の祖先型で各系列の幹動物で保存されたことを示す。胚体外の卵黄性割球は、それぞれの系譜で融合し軟骨魚、真骨魚、爬虫類、鳥類にみる卵黄割球を生んだが、他方両棲類胚では2次的に内胚葉に組み込まれたと考えられる。すなわち、マウスの AVE、カエルの深部内胚葉、ゼブラフィッシュの YSL は相同な構造である。

2) ヘッドオーガナイザーにおける Otx2 機能の起源

AVE および anterior mesendoderm (AME) では一連の anti-Fgf, anti-Wnt, anti-nodal 因子とその発現を制御する転写因子が発現する。Otx2 はこのような転写因子のひとつである。Otx2 の発現は最初 BMP シグナルにより抑制されているが、エピプラスとの成長とともにその閾値が下がることによって起こる。Otx2 は Lim1, Foxa2 の発現を活性化、Lim1 と Foxa2 は互いに発現を活性化、Foxa2 は Otx2 の発現を活性化することにより、これら3転写因子の発現は亢進する。Otx2 は Foxa2, Lim1 と協働して dkk1, shisa などの anti-Wnt, anti-Fgf の発現を制御することによって、AVE(前後軸)を形成し、隣接するエピプラストを吻側神経外胚葉に誘導する。この Otx2 の AVE, AME での発現は、転写開始点近傍にある VE および CM と命名した2つのエンハンサーにより制御され、これらを欠損すると AVE での Otx2 発現が失われ頭部が形成されない。この2つのエンハンサーを各種脊椎動物で解析することにより、VE, CM エンハンサーの獲得により Otx2 を後方化抑制にヘッドオーガナイザーで用いる機構は条鰭類との分岐後、祖先肉鰭類で成立し、両生類深部内胚葉、ほ乳類ハイポプラスト、ほ乳類臓側内胚葉で用いられるに至ったことが明らかとなった。これに対し条鰭類は別のオーガナイザー形成、頭部誘導機構を獲得した。

3) 羊膜類における前後軸形成機構の変遷

Otx2 カスケードをヘッドオーガナイザーに用いることは共通としつつ、しかし、羊膜類でニワト

リの前後軸形成機構はマウスのそれと異なる。ウサギ、ブタ、スナグ、スッポン、ゲッコウ胚での比較解析をすすめており、羊膜類での基本機構と各動物でのデフォルメの機構が明らかになりつつある。

4) 条鰭類と肉鰭類における吻側神経外胚葉形成機構

Otx2 は AVE, AME で誘導された吻側神経外胚葉 (ANE) とその初期領域化 (終脳、間脳、中脳、後脳) の際吻側脳で発現する。前者の発現は AN, AN2、後者の発現は FM1, FM2 というそれぞれ 2 つの別のエンハンサーにより制御されており、AN, AN2 を欠失させると誘導された ANE は維持されず、全体が後方化し、FM1, FM2 エンハンサーを欠失させると間脳、中脳が後脳化する。AN, AN2 エンハンサーは肉鰭類の各動物のみならず軟骨魚のサメでも保存されているが、ポリプテルスでもゼブラフィッシュ、メダカ、フグでも、すなわち条鰭類ではともに失われていた。これに対し、FM1, FM2 エンハンサーはすべての脊椎動物に存在し、条鰭類では AN, AN2 エンハンサー活性も担っていた。条鰭類は他の脊椎動物と異なる神経管形成の様式をもつ。

5) 前脳形成機構

Gbx2 によって形成される峽域神経外胚葉 (将来の後脳) に対し、Otx により確保された吻側神経外胚葉では Six3, Emx2, Pax6, Irx3, Pax2, En1 等の転写因子が発現し、脳の初期領域が似関わっていると考えられる: Emx2/Pax6 2 重変異体では間脳が中脳化する。脳の初期領域化の時期のこれら転写因子の発現比較を、エンハンサーを含め、哺乳類、鳥類、爬虫類、両棲類ですすめ、肉鰭類で脳領域化の分子機構は保存されていることが示唆された。

6) 終脳形成の分子機構

終脳は皮質と皮質下部よりなる。ほ乳動物の皮質は六層構造を形成し、各領域からなり、皮質下部には各神経核が形成される。先に、Emx2 と Emx1 が皮質層構造の形成に働くカハールレチウス細胞の形成を制御し、その欠損マウスでは層構造が形成されず、皮質下部で形成されるインターニューロンの皮質への移動が起らず、皮質から視床への投射回路、視床から皮質への投射回路が正常に形成されないことなどを明らかにした。複雑な皮質と皮質下部の形成には様々な遺伝子が関与し、かつこれらの遺伝子間の相互作用は微細に調整されていると考えられる。遺伝子発現を微細に調節する因子として microRNA9 を、Emx1, Emx2 下流因子の探索で同定した。皮質で初期の神経幹細胞の増殖と分化、カハールレチウス細胞の形成は Foxg1 によって制御されているが、microRNA9 は Foxg1 の発現を

制御する。この制御は E16.5 以降発現の亢進する RNA 結合蛋白 Elavl2 により解除される。後期の皮質での神経幹細胞の増殖と分化にか Nr2e1 と Pax6 が関与し、Pax6 発現は Meis2 によって抑制されることが知られている。microRNA9 は Elavl1 とともに Nr2e1 発現を活性化し、また、Meis2 発現を抑制することで Pax6 発現を上げ、幹細胞の増殖をプラスに微調節する。また皮質下部の神経幹細胞の増殖と分化に、microRNA9 は Foxg1, Meis2, Gsh2, Islet1 の発現を制御する。これらにより、microRNA は皮質と皮質下部の境界決定、コリドールの形成と皮質-視床投射、インターニューロンの皮質への移動を制御する。このような終脳形成における microRNA-9 の働きの比較解析を、ニワトリ、カエル、ゼブラフィッシュで進めた。

7) 皮質層構造の起源

ほ乳類の層特異的神経マーカー遺伝子の発現解析から、終脳に層構造をもたないニワトリにおいても、ほ乳類新皮質の上層や下層に相同な神経細胞が存在することが明らかになった。これらの神経細胞は、軸索投射の様式からも、ほ乳類の上層ならび下層の神経細胞と相同であると考えられた。これらの細胞は、ニワトリ脳では、層状ではなく塊状に分布した。その理由は、ニワトリの神経幹細胞の能力が、ほ乳類よりも制限されており、偏った種類の神経細胞を生み出すためであり、ほ乳類型と非哺乳類型終脳との決定的な違いは、神経幹細胞の能力の差であると考えられた。しかし培養系での解析から、能力の制限されたニワトリの神経幹細胞であってもクローン培養下に置かれると、ほ乳類に類似の発生プログラムを発揮して、まず下層タイプの神経細胞を生み、次に上層タイプの神経細胞を生みだすことが明らかとなった。すなわち、幹細胞の能力を制限しているのは、ニワトリ終脳の環境であって、幹細胞自身の性質ではない。幹細胞のデフォルトとしての性質は、ほ乳類であろうとニワトリであろうと、順繰りに多様な神経細胞を生み出す多能性を備えているのである。

この結果は、終脳神経細胞の層特異的個性や、これを生み出す発生プログラムが、ほ乳類固有に進化してきた訳ではなく、大脳皮質層構造が進化する前から既に存在していた事を意味する。これは、これまで信じられてきた大脳新皮質進化の定説をくつがえし、新たな新皮質進化モデルを提唱するものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 53 件)

- (1) Satoh, W., Gotoh, T., Tsunematsu, Y., Aizawa, S. and Shimono, A. (2006) Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development* 133, 989-999. (査読有)
- (2) Hirano, M., Kiyonari, H., Inoue, A., Furushima, K., Murata, T., Suda, Y. and Aizawa, S. (2006) A new serine/threonine protein kinase, *Ompk1*, essential to

- ventral body wall formation. *Developmental Dynamics* 235, 2229-2237. (査読有)
- (3)Nagano, T., Takehara, S., Takahashi, M., Aizawa, S. and Yamamoto, A. (2006). Shisa2 promotes the maturation of somatic precursors and transition to the segmental fate in *Xenopus* embryos. *Development* 133, 4643-4654. (査読有)
- (4)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)
- (5)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)
- (6)Kimura-Yoshida, C., Tian, E., Nakano, H., Amazaki, S., Shimokawa, K., Rossant, J., Aizawa, S. and Matsuo, I. (2007). Crucial roles of *Foxa2* in mouse anterior-posterior axis polarization via regulation of anterior visceral endoderm-specific genes. *PNAS* 104, 5919-5924. (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)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)
- (9)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)
- (10)Aizawa, S. (2008). Retrospective on reverse genetics in mice around the world and in Japan. *Develop. Growth Differ.* 50, S29-S34. (査読有)
- (11)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)
- (12)Ito, K., Kawasaki, T., Takashima, S., Matsuda, I., Aiba, A. and Hirata, T. (2008). Semaphorin 3F confines ventral tangential migration of lateral olfactory tract neurons onto the telencephalon surface. *J. Neurosci.*, 28, 4414-4422. (査読有)
- (13)Hatakeyama, J., Shimamura, K. Method for electroporation for the early chick embryo. *Develop. Growth Differ.* 50, 449-452, 2008. (査読有)
- (14)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)
- (15)Matsuyama, M., Aizawa, S. and Shimono, A. (2009). *Sfrp* controls apicobasal polarity and oriented cell division in developing gut epithelium. *PLoS Genet.* 5, e1000427. (査読有)
- (16)Takeuchi, M., Takahashi, M., Okabe, M. and Aizawa, S. (2009). Germ layer patterning in bichir and lamprey; an insight into its evolution in vertebrates. *Developmental Biology*, 332 90-102. (査読有)
- (17)Kurokawa, D., Ohmura, T., Ogino, H., Takeuchi, M., Inoue, A., Inoue, F., Suda, Y. and Aizawa, S. (2010). Evolutionary origin of the *Otx2* enhancer for its expression in visceral endoderm. *Dev. Biol.* 342, 110-120. (査読有)
- (18)Kiyonari, H., Kaneko, M., Abe, S. and Aizawa, S. (2010). Three inhibitors of FGF receptor, ERK, and GSK3 establishes germline-competent embryonic stem cells of C57BL/6N mouse strain with high efficiency and stability. *Genesis* 48, 317-327. (査読有)
- (19)Suda, Y., Kokura, K., Kimura, J., Kajikawa, E., Inoue, F. and Aizawa, S. (2010). The same enhancer regulates the earliest *Emx2* expression in caudal forebrain primordium, subsequent expression in dorsal telencephalon and later expression in the cortical ventricular zone. *Development* 137, 2939-2949. (査読有)
- (20)Sakurai, Y., Kurokawa, D., Kiyonari, H., Kajikawa, E., Suda, Y. and Aizawa, S. (2010). *Otx2* and *Otx1* protect diencephalon and mesencephalon from caudalization into metencephalon during early brain regionalization. *Dev. Biol.* 347, 392-403. (査読有)
- (21)Yamatani, H., Kawasaki, T., Mita, S., Inagaki, N. and Hirata, T. Proteomics Analysis of the Temporal Changes in Axonal Proteins during Maturation. *Dev. Neurobiol.* 70, 523-537 (2010) (査読有)
- (22)Shibata, M., Nakao, H., Kiyonari H., Abe T. and Aizawa, S. (2011). MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors. *J Neurosci.* 31, 3407-3422. (査読有)
- (23)Abe T, Kiyonari H, Shioi G, Inoue KI, Nakao K, Aizawa, S. Fujimori T. (2011). Establishment of conditional reporter mouse lines at ROSA26 locus for live cell imaging. *Genesis*. In print. (査読有)
- (24)Shioi G, Kiyonari H, Abe T, Nakao K, Fujimori T, Jang CW, Huang CC, Akiyama H, Behringer RR, Aizawa, S. (2011). A mouse reporter line to

conditionally mark nuclei and cell membranes for in vivo live-imaging. *Genesis*. In print. (査読有)

[学会発表] (計 123 件)

1. Shinichi Aizawa
Otx2 gene cascade in A-P axis formation
Monterotondo Mouse Biology Meeting
April 19-20, 2006, Monterotondo, Italy
2. Shinichi Aizawa
Evolutionary constraint on
Otx2-neuroectoderm enhancers; deep
conservation from skate to mouse and unique
divergence in teleost.
FIRST PAN AMERICAN CONGRESS IN
DEVELOPMENTAL BIOLOGY
June 16-20, 2007, Cancun, Mexico
3. Shinichi Aizawa
Otx2 and A-P axis formation in vertebrates
Japan/USA Joint Meeting on Vertebrate
Organogenesis
November 20-21, 2008, Houston, USA
4. Tatsumi Hirata
Axon outgrowth inhibition mediated by
four-transmembrane protein M6a.
Japan/USA Joint Meeting on Vertebrate
Organogenesis
November 23-24, 2008, San Francisco, USA
5. Kenji Shimamura
The adherens junction is required for the
regulation of neural differentiation
Frontiers in Developmental Biology
September 13-17, 2008, Giens Peninsula,
France.
6. Shinichi Aizawa
The same enhancer regulates the earliest Emx2
expression in caudal forebrain primordium,
subsequent expression in dorsal telencephalon
and later expression in cortical ventricular zone.
16th International Society of Developmental
Biologists Congress.
September 6-10, 2009, Edinburgh, United
Kingdom
7. Tatsumi Hirata
Emergence of the layer structure in the
mammalian neocortex associated with a change in
the stem cells dynamics
Cold Spring Harbor Laboratory SYMPOSIUM
LXXIV, Symposium on Evolution
May 27, 2009, Cold Spring Harbor, NY
8. Kenji Shimamura
Role of the adherens junction in neurogenesis
16th international Society of Developmental
Biologists Congress 2009
September 6-10, 2009, Edinburgh, UK.
9. Shinichi Aizawa
Otx1 and Otx2 functions in forebrain and
midbrain development.
Society for Developmental Biology 69th annual
meeting
August 5-9, 2010, New Mexico, USA

10. Tatsumi Hirata
Conservation of developmental mechanisms in
evolutionarily divergent brain structures.
SYMPOSIA PARIS meeting 2010, Euro Evo Devo
July 6-9, 2010, Paris, France
11. Kenji Shimamura
The adherens junction serves as a switch for neurogenesis
via Notch signaling
Notch and Stem Cells
October 3-6, 2010, Athens, Greece.
12. Shinichi Aizawa
MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse
telencephalon by targeting multiple transcription
factors
2011 Meeting of German Society of Developmental
Biologists
March 23-26, 2011, Dresden, Germany

[図書]

1. Takeuchi, M., Okabe, M. and Aizawa, S. (2009). The
Genus *Polypterus* (Bichirs); A fish group diverged at
the stem of Ray-finned fishes (Actinopterygii). *In*
Emerging Model Organisms (Cold Spring Harbor
Laboratory Press) volume 1, 447-468.
2. Hatakeyama, J. and Shimamura, K. Method of
Electroporation for the Early Chick Embryo. (2009).
*Electroporation and Sonoporation in Developmental
Biology*. Springer, 43-54.

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ : <http://www.cdb.riken.go.jp/vbp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相沢 慎一 (AIZAWA SHINICHI)
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
60073011

(2) 研究分担者

嶋村 健児 (SHIMAMURA KENJI)
熊本大学・発生医学研究所・教授
70301140

平田 たつみ (HIRATA TATSUMI)
国立遺伝学研究所総合遺伝研究系・准教授
80260587