

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06258

研究課題名(和文) 原腸形成期の内胚葉は分泌性因子によって内臓中胚葉を誘引する

研究課題名(英文) The gastrulating endoderm attracts the visceral mesoderm through secretory factors

研究代表者

村上 柳太郎 (Murakami, Ryutaro)

山口大学・その他部局等 ・名誉教授

研究者番号：40182109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画は内胚葉と内臓中胚葉が原腸陥入時に合体するメカニズムの解明が主なテーマだったが、陥入時の中腸原基で発現する遺伝子を探索し、その突然変異および強制発現を行う過程で、ParaHOX 遺伝子 *caudal* (*cad*) が中腸の前後性の確立に必須であることが判明したことから、*cad* の機能解析に研究の中心を移した。*cad* は *bicoid* 支配下で後方内胚葉で発現しその分化を誘導する。*cad* の系統進化的意義を検討したところ、*cad* オーソログは前後性を示す管状の消化管を持つ左右相称動物のみに見られた。*cad* は放射相称の消化器官から前後性を示す消化管への進化で決定的な役割を担ったと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ショウジョウバエの後方内胚葉で *caudal* (*cad*) が発現することは以前から知られていたが機能は不明だった。本研究では *cad* が内胚葉後半部を決定することを、多くの内胚葉部域特異的遺伝子の発現を指標として明らかにした。*cad* の後方内胚葉での発現は新口動物でも報告があり、新口・旧口で共通だと予想される。*cad* オーソログの有無をさまざまな動物群で調べると、前後性を示す消化管を持つ左右相称動物に限定されていた。左右相称体制、前後極性を示す内胚葉性の消化管獲得という進化の一大イベントにおいて、後方内胚葉で発現する ParaHOX 遺伝子 *cad* は中心的役割を担ったと考えられる

研究成果の概要(英文)：This research project initially focused mainly on the mechanism by which the endoderm and visceral mesoderm of the fruit fly merge during gastrulation. However, during the process of screening genes expressed in the midgut primordium during invagination, it was found that the ParaHOX gene *caudal* (*cad*) is essential for establishing the anteroposterior polarity in the midgut. Afterward, the primary research focus shifted to functional analysis of *cad*. It was demonstrated that *cad* is expressed in the posterior endoderm under the control of *bicoid* and induces posterior differentiation. Examining the phylogenetic aspect of *cad*, *cad* orthologs were present only in bilaterian animals with tubular digestive tracts. These results indicate that *cad* played a crucial role in the evolution from radially symmetrical digestive organs to digestive tracts with anteroposterior polarity.

研究分野：発生生物学

キーワード：ショウジョウバエ 中腸 内胚葉 ParaHOX *caudal*

1. 研究開始当初の背景

(1) 多細胞動物の消化管は本研究の主な材料であるショウジョウバエにおいても、脊椎動物である哺乳類、鳥類においても内胚葉性の上皮とそれを取り囲む内臓中胚葉が原腸形成時に胞胚のそれぞれ異なる領域から別々に陥入し、合体して管状の構造となり、胚の前後軸に沿った特有の部域分化を示す消化管を形成する。この過程に関わる研究は、1980年代後半から90年代初めに内臓中胚葉で発現するHOX遺伝子が内胚葉への誘導作用に関わることを示唆されたが、その後長年に渡り研究は殆ど行われなかった。我々は内胚葉の発生に関わる遺伝子の作用を調べる過程で、内胚葉の欠損によって内臓中胚葉の移動が正常に進行しないことから、内胚葉で発現する遺伝子が内臓中胚葉の発生に作用すると仮定し、内胚葉で発現する遺伝子のスクリーニングを行っていた。そこで有力候補となったのが分泌性酵素のアングジオテンシン転換酵素 Ance で、研究開始時には Ance の機能解析を中心的に行った。しかし、ショウジョウバエストックセンターで唯一保存されていた Ance 突然変異系統の遺伝的特性を調べる過程で、登録されていた Ance 突然変異系統は実際には内臓中胚葉の異常を引き起こす jeb の突然変異であることが研究計画初年度に判明し、Ance 欠損が内臓中胚葉の発生に関わる証拠が得られなかった。

(2) それまで我々は発生過程の内胚葉および内臓中胚葉で発現する遺伝子を精力的に探索しており、中腸発生に関わる候補遺伝子も複数見つけていた。その遺伝子を用いて内胚葉と内臓中胚葉の相互作用、さらに中腸内胚葉の部域分化メカニズム解明を研究計画の中心に切り替え、その後の研究を進めた。

2. 研究の目的

上記の経緯で原腸形成期の内胚葉および内臓中胚葉で発現する遺伝子を網羅的に探索し、見つかったもっとも重要な候補遺伝子は原腸形成の最初期から発現する ParaHOX 遺伝子のひとつ caudal (cad) である。cad の表現型から、zygotic な cad が内胚葉後半の決定に関わることを示唆されたことから、本研究では cad の解析を中心として以下の2点を明らかにすることに計画を修正した。

(1) 胚軸決定に関わる前方システム、後方システム、末端部システムの遺伝子群、さらに内臓中胚葉で発現するHOX遺伝子とcadとの関係を遺伝学的に解析して中腸前後軸(前後極性)形成の全体像を解明する。

(2) cad は ParaHOX 遺伝子の一員であり、さまざまな動物グループで進化的に保存されており、マウス、ニワトリ胚では cad オーソログ Cdx が、内胚葉の後半部決定に関与することが示唆されている。さまざまな動物群のゲノム情報、遺伝子情報データベースを探索し、cad と内胚葉性消化管の前後軸形成の系統進化的側面を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 胚軸決定に関わる遺伝子群、主なものは前方システムの bcd、後方システムの nos、末端部システムの tll、hkb、そしてHOX遺伝子と、内胚葉で発現する cad の発現制御の関係、そして消化管前後軸形成との関係を、各遺伝子の突然変異胚、遺伝子強制発現胚の中腸の表現型の分析によって明らかにする。HOX 遺伝子との関わりについては内臓中胚葉そのものが欠失する jeb 突然変異胚も用いる。分析には本研究で見出した内胚葉のさまざまな部域特異的マーカー遺伝子の発現を指標として用いる。

(2) cad がショウジョウバエ内胚葉性中腸の後方を誘導することで前後性を示す消化管が成立していることが予想されたことから、cad を含む、ParaHOX 遺伝子である Gsx、Pdx、Cdx (cad) の相同遺伝子がさまざまな動物群のゲノムに含まれるかどうかをNCBIの遺伝情報データベースを用いたホモロジー検索によって詳細に調べた。明確な基準は存在しないが、ホモロジースコア80を判定の目安としてオーソログがどうかの一応の判定を行った。さらにそれら遺伝子の発現パターンと機能、消化器官の形態などについての情報を、文献データ、論文データベースから集めて整理し、内胚葉性の消化器官の前後極性と、ParaHOX 遺伝子の系統進化的関係を検討する。

4. 研究成果

(1) 内臓中胚葉で発現するHOX遺伝子と中腸内胚葉の発生の関わりについては表現型が複雑で体節決定におけるHOX遺伝子の役割とは大きく異なっていた。これまで報告されているのは、中腸第2チェンバーの内臓中胚葉で発現する Ubx に関するもので、Ubx の支配下で発現する分泌性シグナル Dpp が第2チェンバー特異的な内胚葉の分化を誘導する、というものだけである。他のHOX遺伝子も同様に発現領域に対応した内胚葉の分化を誘導するだろうと推定されて来たのだが、他の中腸チェンバーに対応する内胚葉の分化マーカーが無かったことから研究が行われなかった。我々は中腸の4つのチェンバーの内胚葉の部域特異的の分化マーカーを複数同定し、

それを用いて内臓中胚葉で発現する HOX 遺伝子の内胚葉に対する誘導作用を解析した。その結果は当初の予想とは異なり、内胚葉の部域分化を誘導する作用は、Ubx が第 2 チェンバーを誘導する以外は認められなかった。内胚葉に対する誘導作用の有無を明確にする目的で、内臓中胚葉そのものが欠損する *jeb* 突然変異胚の中腸の表現型を調べた。その結果、内臓中胚葉の欠失胚では Ubx の発現領域に対応する中腸第 2 チェンバーと第 3 チェンバー前半の分化が見られないが、他の領域のマーカーの発現は失われなかった。つまり、内臓中胚葉で発現する HOX 遺伝子は Ubx を除けば内胚葉の部域分化に直接関与していないことが初めて明らかとなった。HOX 遺伝子の機能については分化誘導ではなく各チェンバーの大きさ、あるいはチェンバーの境界の決定に関わることが示唆された。

(2) ParaHOX 遺伝子の一員である *caudal* (*cad*, *Cdx*) の *zygotic* は発現が陥入開始直後の後方内胚葉で報告されていたが、形態的異常が見られないことから部域分化の研究は従来行われてこなかった。中腸チェンバー特異的な内胚葉マーカーを用いて *cad* 胚、および *cad* 強制発現胚の表現型を調べたところ、*zygotic* な *cad* 変異胚では後方内胚葉が前方内胚葉に転換し、*cad* 強制発現胚では前方内胚葉が後方内胚葉に転換しており、*cad* が消化管の前後軸あるいは前後極性を決する主要な要因であることが初めて示された。さらにいずれの表現型も前後パターンが鏡像対称となることが顕著な特徴であり、消化器官が放射相称から前後極性を持つ消化管へと進化する系統進化の一側面を示唆していると推定された。

(3) *zygotic* な *cad* の発現が内胚葉前後軸の決定の支配的要因であることが上記の結果から明らかになったことから、*cad* の発現を制御する上方の遺伝子経路の探索を行った。調べた対象は胚の前後軸形成に関わる既知の遺伝子群。前方システムの主要な母性遺伝子 *bicoid* の変異では外部体壁とほぼ同様に前方内胚葉が後方内胚葉に転換し、前後で鏡像対称の極性を示した。後方システムの主要な母性遺伝子 *nanos* 変異では内胚葉の極性に明確な異常は認められなかった。*bicoid* は母性因子として卵全体の前後軸に関わることから、*bicoid* より後期に発現する *zygotic* 遺伝子と *cad* の関係を調べたところ、*zygotic* な遺伝子として最初期に発現して、陥入予定域である胞胚の前端後端の発生に関わるギャップ遺伝子 *tailless* の変異で、後方内胚葉の *cad* が消失するとともに、後方内胚葉が前方内胚葉に転換することが分かった。この結果は、ショウジョウバエ消化管の前後極性が *zygotic* な *tailless* が *cad* を活性化することで成立することを示している。*tailless* の発現は胞胚の最初期には前後対照的に発現するが、前方では母性の *bicoid* の作用で発現が消失し、それが *cad* 発現の前後の違いをもたらし、内胚葉の前後軸、前後極性が成立する、という一連の制御経路の概略が明らかとなった。

(4) 以上の結果より、ショウジョウバエ内胚葉の第 2 チェンバーは内臓中胚葉で発現する HOX 遺伝子 Ubx 支配下の Dpp を介して分化誘導されること、および、後方内胚葉の分化はギャップ遺伝子 *tailless* が誘導する ParaHOX 遺伝子 *caudal* (*cad*, *Cdx*) が決定することが明確となったが、Dpp 作用と *cad* の作用の関係が明確ではなかったことから、Dpp 受容体の *tkv* 胚での *cad* 強制発現、および、活性型 *tkv* と *cad* の同時強制発現胚を作成してその表現型を調べた。その結果、Dpp と *cad* の作用に上下関係はなくパラレルに作用してそれぞれ第 2 と第 3/4 チェンバーを分化誘導していることが分かった。細胞分化を細胞 1 個ごとに調べたデータはないが、*in situ* のシグナルからは同じ細胞が複数の分化マーカーを発現している可能性が高い。Dpp の内胚葉の作用を詳細に解析すると、Dpp は従来考えられてきた第 2 チェンバーだけでなく第 3 チェンバー前半部の分化も必須であることが分かった。作用するのは主として第 2 チェンバー領域だが、そこから拡散した弱い Dpp シグナルが第 3 チェンバー前半の分化誘導に関わるとえられる。

(5) *cad* や *cad* 強制発現の内胚葉における表現型はすべて前後極性が鏡像対称的なパターンを示していた。ショウジョウバエの初期胞胚では胚の前端と後端でギャップ遺伝子 *tailless* と *hkb* が鏡像対称的な発現を示すが、前端部では母性 *bicoid* の作用によって *tailless* が消失し、それが前後の対称性を破り、その後の前後性を成立させることがわかった。しかし、*bicoid* や *tailless* が非対称に発現している状況でも *zygotic* な *cad* 変異、*cad* 強制発現によっても前後が鏡像対称となる表現型が誘導されることから、前後の鏡像対称性がショウジョウバエ胚内胚葉ではプレパターンのような基本的な性質と見なされる可能性が高い。このような性質は内胚葉性中腸の前後に接続している外胚葉性の消化管である前腸と後腸では認められず、*cad* 強制発現でも前腸が後腸に転換することはなかった。前後の鏡像対称的な性質は内胚葉に特有の性質と予想される。これは多細胞動物の内胚葉性消化器官が刺胞動物などの放射相称的形態から左右相称動物の前後軸を持つ消化管へと進化した過程の反映ではないかと考えられる。この問題は実験的な検証は困難だが、*cad* を含む ParaHOX 遺伝子の有無と消化器官の形態の関係をさまざまな動物群のゲノムデータベース、論文データベースの探索によって何らかのヒントが得られると期待し、詳細な調査を行った。その結果、外部に面した平板上の消化器官を持つ平板動物のゲノムでは *Gsx* との相同性を示す ParaHOX 遺伝子が 1 種類のみ認められた。放射相称

的形態の消化器官を持つ刺胞動物では動物種によっては2種類の ParaHOX 相同遺伝子をゲノムに持っているが、明確な相対性を示すものは Gsx であり、データベース上で Cdx と記載されているものでもホモロジースコアが低く Cdx オースログとは認められなかった。ゲノムデータが公表されているイソギンチャク的一种では、内胚葉に Pdx と Cdx 両者との低いホモロジーを示す遺伝子が内胚葉で非放射対称的な発現を示す種もあることから今後の検討が必要である。明確な Cdx オースログをゲノムに持つ動物群は、旧口動物と新口動物の両方、つまり左右相称動物に限定され、いずれも前後軸を示す内胚葉性の消化管を有していた。口と排泄孔が共通な放射相称の内胚葉性消化器官から、前後軸を持つ管状の消化器官が進化する過程では、内胚葉を後方化する機能を獲得した ParaHOX 遺伝子 cad が、消化管の前後性を成立させたと推定できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fei Liu, Ena Yamamoto, Katsunobu Shirahama, Tsubasa Saitoh, Shuhei Aoyama, Yumiko Harada, Ryutaro Murakami, Hiroshi Matsun	4. 巻 vol.19(1)
2. 論文標題 Analysis of Pattern Formation by Colored Petri Nets with Quantitative Regulation of Gene Expression Level	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics 2020	6. 最初と最後の頁 317,327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/tcbb.2020.3005392	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryutaro Murakami, Ryo Hijikata, Saki Kamioka, Keika Fujimoto, Akihiro Kanao, Seiichi Nagai, Lily Shimooka, Masahiko Arishige, Izumi Tanoue, Yumiko Harada
2. 発表標題 Ryutaro Murakami, Ryo Hijikata, Saki Kamioka, Keika Fujimoto, Akihiro Kanao, Seiichi Nagai, Lily Shimooka, Masahiko Arishige, Izumi Tanoue, Yumiko Harada
3. 学会等名 Asia Pacific Drosophila Research Conference 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryutaro Murakami, Saki Kamioka, Ryo Hijikata, Akihiro Kanao, Lily Shimooka, Yumiko Harada
2. 発表標題 Visceral mesoderm-dependent and -independent regional differentiation of the midgut endoderm of Drosophila
3. 学会等名 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Developmental Biology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上柳太郎, 土方亮, 上岡早紀, 金尾昭洋, 原田由美子
2. 発表標題 ショウジョウバエ中腸内胚葉の部域分化を制御する遺伝子経路と系統進化
3. 学会等名 第93回日本動物学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上柳太郎, 土方亮, 上岡早紀, 金尾昭洋, 原田由美子
2. 発表標題 ショウジョウバエ中腸内胚葉の部域分化メカニズムと進化
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土方 亮 リチャード、上岡 早紀、田上 和、原田 由美子、村上 柳太郎
2. 発表標題 ショウジョウバエ中腸の部域分化におけるDppシグナルの作用
3. 学会等名 2021年度 生物系三学会 中国四国地区合同大会 (香川)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土方 亮 リチャード、藤本 啓太、上岡 早紀、有重 昌彦、下岡 リリー、花田 舞、永井 星一、原田 由美子、村上 柳太郎
2. 発表標題 Function of Dpp in the regional differentiation of the Drosophila midgut
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上 柳太郎, 藤本 啓太, 有重 昌彦, 永井 星一, 下岡 リリー, 原田 由美子
2. 発表標題 ショウジョウバエ内臓中胚葉が発現する Dpp と Wg による内胚葉中央部の分化誘導
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土方 亮 リチャード, 上岡 早紀, 田上 和, 原田 由美子, 村上柳太郎
2. 発表標題 ショウジョウバエ中腸上皮の部域分化を決定する遺伝子経路
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上柳太郎、下岡リリー、堀駿、上岡早紀、藤本啓太、有重昌彦、原田由美子
2. 発表標題 内胚葉と内臓中胚葉の相互作用によるショウジョウバエ中腸の部域分化機構
3. 学会等名 中国四国地区生物系三学会合同大会（広島大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryutaro Murakami, Satomi Kawamura, Mai Hanada, Yuichi Yoshimura, Saki Kamioka, Yumiko Harada
2. 発表標題 Cell-non-autonomous interaction between the endoderm and mesoderm is essential for morphogenetic movements of both tissues during gastrulation of the Drosophila embryo
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 柳太郎, 上岡 早紀, 原田 由美子, 藤本 啓太, 下岡 リリー, 有重 昌彦, 吉村 裕一, 田上 和, 堀 駿
2. 発表標題 ショウジョウバエ胚中腸の部域分化を制御する遺伝子経路
3. 学会等名 第90回日本動物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 柳太郎, 上岡 早紀, 原田 由美子, 藤本 啓太, 有重 昌彦, 田上 和, 吉村 裕一, 下岡 リリー, 堀 駿
2. 発表標題 ショウジョウバエ内胚葉の前後軸に沿った分化パターンを確立する遺伝子制御経路
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金尾昭洋, 河村聡美, 村上柳太郎
2. 発表標題 ゲノムデータベースによるショウジョウバエ内臓中胚葉形成に関わる遺伝子制御経路の研究
3. 学会等名 中国四国地区生物系三学会合同大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 末光隆志 編集	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 772
3. 書名 動物の事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関

中国	South China University of Technology			
----	--------------------------------------	--	--	--