

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570192
 研究課題名 (和文) 細胞外マトリックスタンパク質Del1による初期胚パターン形成の制御機構
 研究課題名 (英文) Anterior neural development requires the matrix protein Del1, which attenuates intracellular Wnt signaling
 研究代表者
 猪股 秀彦 (INOMATA HIDEHIKO)
 独立行政法人理化学研究所・細胞分化・器官発生研究グループ・研究員
 研究者番号：60372166

研究成果の概要：代表研究者らはアフリカツメガエルを用いて、分泌蛋白質 Del1 が初期胚の神経発生における前後軸の制御に必須の因子であることを見いだした。Del1 の機能阻害では、神経の頭側の発生が抑制され、後方化した胚が発生する。一方、機能亢進実験により頭部形成が促進された。Del1 がこれらの表現系を示す分子メカニズムを明らかにするために下流のシグナル解析を行ったところ、Del1 は Wnt シグナルを抑制していることが判明した。レポーターアッセイを用いて Del1 の Wnt シグナルに対する作用点を解析したところ、転写因子である Tcf も Del1 の過剰発現により抑制された。また、タンパクレベルでの解析から、Del1 は細胞外に分泌されたのち、細胞周辺に蓄積する細胞外マトリックスとして機能していることが示された。Del1 は頭側に細胞外マトリックスを形成することにより、頭部抑制因子 Wnt シグナルから頭部を隔離し、神経発生における前後軸のパターン形成に関与している可能性が高い。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,500,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞内・細胞間情報伝達

キーワード：アフリカツメガエル・初期胚・パターン形成・BMP・細胞外マトリックス・Wnt

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物胚の体軸決定は初期発生において重要な役割を果たす。申請者らは初期発生の体

軸形成の分子生物学的研究が最も進んでいるアフリカツメガエル胚を用いて、体軸形成を制御する必須因子として分泌タンパク質Del1

(Developmentally endothelial locus1) を同定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、**Del1** の初期発生における機能と作用機序を明らかにすることである。特に、神経発生の前後軸パターン形成における **Del1** の役割をアフリカツメガエル胚により解析する。また、**Del1** が **Wnt** シグナル経路に作用する機序を明らかにする。それらを通して、初期発生における前後軸のパターン形成制御の分子メカニズムを、細胞外の分泌タンパク質の観点から解析する。

3. 研究の方法

以前、代表研究者らは **Del1** が **BMP** シグナルを細胞内で抑制し、背腹軸形成において必須の因子であることを報告した。しかし、**BMP** シグナルの抑制因子である **Chordin** によって誘導される二次軸は頭部の構造を伴わないが、**Del1** を同時に過剰発現させることにより頭部形成が誘導された。このことは、**Del1** が **BMP** シグナル以外のシグナルにも関与している可能性を示している。

そこで、**Del1** の前後軸への影響を解析するために、RNA 微量注入による機能亢進実験と、モルフォリノアンチセンス (**MO**) を用いた機能阻害実験を行った。さらに、アフリカツメガエルにおいて前後軸に関与することが既に知られている、**Wnt**、**Fgf**、**Nodal** シグナルと **Del1** の関係をレポーターアッセイ並びに生化学的手法を用いて解析した。

また、タンパクレベルでの機能を解析するために免疫染色を行い、**Del1** の細胞外における局在を解析した。

4. 研究成果

前後軸のパターン形成における **Del1** の機能

を明らかにするために、アフリカツメガエルを用いて解析を行った。腹側に **Chordin** のみを発現させると、頭部のない二次軸が誘導されるが、**Del1** を同時に過剰発現させると頭部形成がみられた。さらに、**Del1** の RNA を動物極側に注入し、外胚葉に **Del1** を過剰発現させたところ頭部領域の拡大が見られた。逆に、**Del1-MO** により機能阻害実験を行ったところ頭部形成が阻害された。これらの結果から、**Del1** が初期発生において前後軸に必須の因子であることが示された。

Del1 による神経の前後軸の制御が、直接外胚葉を制御しているのか、または中胚葉等を介して間接的に制御しているのかを明らかにするために、アニマルキャップ (**AC**) を用いてさらに解析を行った。**Chordin** および **Wnt1** により後方神経化した **AC** に **Del1** を過剰発現させたところ、**AC** は前方化した。つまり、**Del1** は中胚葉等を介さずに直接神経の前後軸を制御出来ることを示している。

Del1 による頭部形成の促進が、どのようなシグナルを介して制御されているかを明らかにするために、前後軸の形成に重要である事が既に知られている **Wnt**、**Fgf**、**Nodal** シグナルに注目した。**Wnt** シグナル特異的なレポーターアッセイである **TOP-Flash** を用いて解析したところ、**Del1** の過剰発現により **Wnt** シグナルが強く抑制された。また、**Fgf** および **Nodal** シグナルは **Del1** により影響を受けなかった。さらに、**Del1** の **Wnt** シグナルへの作用点を明らかにするために、**Wnt** シグナルの下流因子である **Dsh**、**dnGSK3 β** (**Gsk3 β** の優性阻害型)、 **β Catenin** および転写因子 **Tcf3-VP16** (**Tcf3** の恒常活性型) の過剰発現により **Wnt** シグナルを活性化させた。各々の条件で **Del1** を共発現させたところ、興味深いことに **Del1** はいずれの場合においても **Wnt** シグナルを抑制した。このとき、 **β Catenin** の

核移行は阻害されていないことも確認した。

De11 は細胞外に分泌されるタンパク質であり、直接細胞内の Wnt 下流因子を制御するとは考えにくい。De11 は未知のシグナル経路を介して間接的に Wnt シグナルの最下流である転写因子 Tcf3 を制御している可能性が考えられる。

次に、タンパクレベルでの De11 の機能を解析するために、V5-tag を融合させた De11 を AC に過剰発現させ、分泌された De11 の局在を調べた。De11 は分泌後、主に細部周辺部に蓄積し細胞外マトリックスを形成していることが観察された。

これらの結果より、De11 は主に頭部領域に発現し、頭部領域を BMP と Wnt シグナルから隔離する細胞外マトリックスを形成することにより、頭部のパターン形成を制御していることを証明した。

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 4 件)

- ① Arakawa, A., Matsuo-Takasaki, M., Takai, A., Inomata, H., Matsumura, M., Ikeya, M., Takahashi, K., Miyachi, Y., Sasai, N. and Sasai, Y.、The secreted EGF-Discoidin factor xDe11 is essential for dorsal development of the *Xenopus* embryo.、*Developmental Biology*、306、160-169、(2007)、査読有
- ② Onai, T., Matsuo-Takasaki, M., Inomata, H., Aramaki, T., Matsumura, M., Yakura, R., Sasai, N., and Sasai, Y.、XTsh3 is an essential enhancing factor of canonical Wnt signaling in *Xenopus* axial determination.、

EMBO J、26、2350-2360、(2007)、査読有

- ③ Sasai, N., Yakura, R., Kamiya, D., Nakazawa, Y. and Sasai, Y.、Ectodermal Factor Restricts Mesoderm Differentiation by Inhibiting p53.、*Cell* 133、878-890、(2008)、査読有
- ④ Inomata, H., Haraguchi, T. and Sasai, Y.、Robust Stability of the Embryonic Dorsal Axial Pattern Requires ONT1, a Secreted Scaffold for Chordin Degradation.、*Cell*、134、854-865、(2008)、査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 猪股 秀彦、*Xenopus* ONT1 is novel secreted pro-BMP factor that restricts Chordin in axial development.、41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biology、2008 年 5 月 28 日、徳島県郷土文化会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪股 秀彦 (INOMATA HIDEHIKO)

独立行政法人理化学研究所・細胞分化・器官発生研究グループ・研究員

研究者番号：60372166

(2008 年 8 月 15 日付学振助一第 180 号承認にて、研究代表者交替)

笹井 紀明 (SASAI NORIAKI)

独立行政法人理化学研究所・細胞分化・器官発生研究グループ・研究員

研究者番号：80391960

(2008 年 8 月 12 日付けにて退職)

現在、National Institute for Medical Research に在籍)

(2) 研究分担者

猪股 秀彦 (INOMATA HIDEHIKO)

独立行政法人理化学研究所・細胞分化・器
官発生研究グループ・研究員

研究者番号：60372166

(2008年8月15日付け承認にて研究代表
者へ交替)