

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770190

研究課題名 (和文) クシクラゲ *Brachyury* から探る後生動物に保存された細胞運動制御機構研究課題名 (英文) Evolutionary conserved mechanisms of cell movements in metazoans: insights from the ctenophore *Brachyury*

研究代表者

山田 温子 (YAMADA ATSUKO)

北海道大学・低温科学研究所・研究員

研究者番号：60333217

研究成果の概要 (和文)：クシクラゲ *Brachyury* (*Bra*) 遺伝子 (*MBra*) の機能抑制型をツメガエル胚に導入する実験から、*MBra* は、ツメガエル *Bra* (*Xbra*) と同様に、ツメガエル胚の原腸陥入を制御できることを示した。この結果は、細胞運動制御に関する *Bra* の役割が種を超えて保存されていることを示唆する。また、ツメガエル胚を用いたマイクロアレイ解析から、*Bra* の下流で Delta-Notch シグナルの構成因子とプリンヌクレオシドホスホリラーゼ遺伝子が働くことを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Injection of RNA encoding a dominant-interfering construct of *MBra*, a *Brachyury* (*Bra*) ortholog of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*, into *Xenopus* embryos revealed that *MBra* could regulate *Xenopus* gastrulation in the same way as the endogenous *Xenopus Bra* (*Xbra*), suggesting that the role of *Bra* in cell movements is conserved over the species. In addition, microarray analyses in *Xenopus* embryos suggested that Delta-Notch signaling components and the *purine-nucleoside phosphorylase* gene may function downstream of *Bra*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：細胞運動、進化、*Brachyury* 遺伝子、クシクラゲ、ツメガエル、Delta-Notch シグナル、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ

1. 研究開始当初の背景

Brachyury (*Bra*) は、後生動物全般に保存されて存在する転写因子である。*Bra* は、初め、マウスの中胚葉形成に関与する因子として同

定されたが、様々な無脊椎動物から単離された *Bra* ホモログの発現解析から、*Bra* の本来の機能は細胞運動の制御にあると考えられるよ

うになってきた。しかし、細胞運動における *Bra* の役割に関する具体的な証拠はまだ乏しく、また、*Bra* の下流にある細胞運動を引き起こすための分子的機序についてもほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、クシクラゲとツメガエルを用いて種を超えた *Bra* の細胞運動における役割について解析を行う。クシクラゲとツメガエルの *Bra* を用いて様々な比較を行い、それぞれの遺伝子における機能の共通点と相違点を明らかにする。その結果から、*Bra* による後生動物に保存された細胞運動制御機構について考察する。

3. 研究の方法

(1) *MBra* の機能を *Xbra* と比較して理解するために、*MBra-EnR* の機能阻害型 (*MBra-EnR*) を注入したツメガエル胚の表現型を、*Xbra* の機能阻害型 (*Xbra-EnR*) を注入した場合と比較する。具体的には、注入胚から作製した外殖体の観察や *Xbra* の下流で働く因子の発現解析を行う。

(2) *Bra* の下流で細胞運動を制御する分子基盤を明らかにするために、*MBra-EnR* あるいは *Xbra-EnR* を注入したツメガエル胚と正常胚とを比較するマイクロアレイ解析を行う。マイクロアレイによって同定された *Bra* の標的遺伝子の候補について機能阻害実験を行い、細胞運動との関連性を調べる。さらに、種を超えて保存された *Bra* の役割を明らかにするために、*Bra* 標的遺伝子のクシクラゲホモログを単離し、クシクラゲ胚を用いた発現パターンの解析を行う。

(3) *Bra* の分子としての進化と機能の進化を解析するために、*Xbra* と *MBra* のキメラ遺伝子を作製し、ツメガエル胚への注入実験を行う。

4. 研究成果

(1) *MBra-EnR* の注入は、*Xbra-EnR* の場合と同様に、①ツメガエル胚の原腸形成過程における細胞運動の1つである Convergent Extension (CE) を阻害すること、② *Xbra* の発現を抑制すること (図 1 A-D 参照)、③ *Xbra* の下流で働く因子として知られる *Xwnt11* の発現を抑制すること (図 1 E-H 参照)、④ 中胚葉に関わる分子 (*pintallavis*, *chordin*) の発現には影響しないこと (図 1 I-P 参照) を明らかにした。これらの結果から、*MBra* はツメガエル胚の中で *Xbra* と共通の分子機構によって CE を調節できることが示唆された。

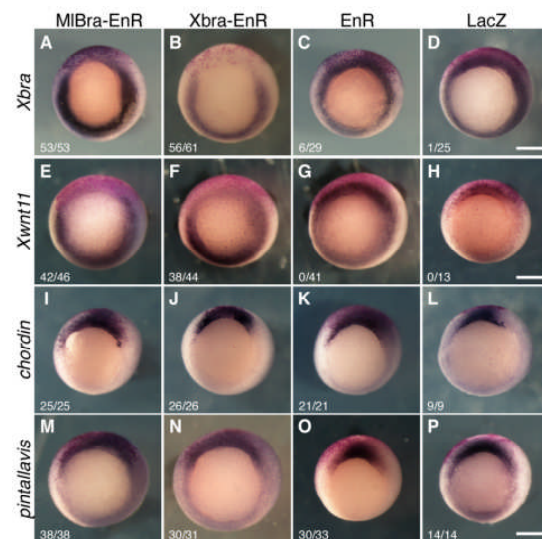


図 1 *MBra-EnR* 及び *Xbra-EnR* を注入されたツメガエル胚 (中期原腸胚) における発現解析. *EnR* 及び *LacZ* 注入胚は対照実験. 紫は遺伝子の発現シグナル, ピンクは注入した RNA を受け継ぐ細胞を示す.

(2) ツメガエル胚を用いたマイクロアレイ解析から、*MBra-EnR* あるいは *Xbra-EnR* の注入によって共に発現が減少する分子を *Bra* の下流に位置する分子の候補 (163 遺伝子) として同定した。さらに、それらの発現パターンの解析やツメガエル胚を用いた外植体アッ

セイから、*Bra* の下流に位置し、*Bra* によって発現を活性化される分子として、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ遺伝子 (*pnp*)、*X-delta-2*、2 種類の *esr-related* 遺伝子を同定した。*X-delta-2* と *esr-related* 遺伝子は Notch シグナルの構成因子であり、特に *X-delta-2* はリガンドとして Notch シグナルの上流で働く可能性が考えられた。そこで、*X-delta-2* の機能阻害実験を行ったところ、ツメガエル胚の原腸形成が阻害されることが分かった (図 2A)。この表現型は *Xbra-EnR* や *MBra-EnR* を注入された胚とよく似ていた (図 2B, C)。

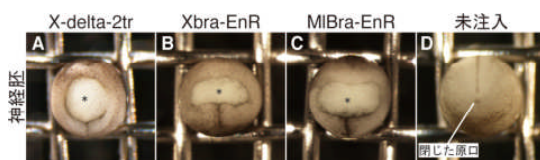


図 2 *X-delta-2* の機能阻害型 (*X-delta-2tr*) 注入による *X-delta-2* の機能阻害実験. 原腸形成が異常になり、原口が閉じなかった (*).

以上の結果から、Delta-Notch シグナルは *Bra* の下流で細胞運動の制御に関与していることが示唆された。Delta-Notch シグナルは、胚発生過程の様々な細胞の運命決定に関与することが知られているが、近年、細胞の移動や腫瘍細胞の転移における役割についても示唆されつつある。*Bra* に関しても、がん細胞の転移過程における役割が報告されており、細胞運動を制御する同一カスケード内に *Bra* と Delta-Notch シグナルを位置づけた本研究は、医療分野にも貢献し得る興味深い知見を与えるものになったと考えられる。

また、アンチセンスモルフオリノオリゴを用いた *pnp* の機能阻害実験から、*pnp* は原腸形成運動の制御に関与していることが分かった。*pnp* と Delta-Notch シグナルとの関係を明らかにすることは今後の課題である。

クシクラゲ胚における *pnp* や Delta-Notch シグナルの役割についての解析は、現在進行

中である。

(3) 野生型の *Xbra* と野生型の *MBra*、機能阻害型の *Xbra-EnR*、機能阻害型の *MBra-EnR*、これら 4 種類の合成 RNA の機能をつメガエル胚の中で比較する実験から、DNA 結合ドメインである T-box ドメイン以外の領域に、ツメガエルとクシクラゲにおける *Bra* の機能の違いがあることを明らかにした。*Xbra* では、T-box ドメインの外側にある N 末領域が Smad1 タンパク質 (腹側化のために必要な BMP シグナルの構成成分) と相互作用することが知られており、この N 末の配列は、軟体動物や環形動物、哺乳動物の *Bra* に保存されて存在するが、クシクラゲや刺胞動物では見られない。つまり、N 末領域は左右相称動物特異的な機能を *Bra* に与えている可能性が考えられる。従って、今後、*MBra* と *Xbra* の N 末領域に結合する因子を比較・解析することにより、進化の過程で多様化した *Bra* の機能について理解できると期待される。

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 1 件)

- ① Yamada, A, Martindale, M. Q., Fukui, A., and Tochinai, S., Highly conserved functions of the *Brachyury* gene on morphogenetic movements: Insight from the early-diverging phylum Ctenophora, *Developmental Biology*, Vol. 339, pp. 212-222, 2010, 査読有り, <http://hdl.handle.net/2115/42805>.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Atsuko Yamada, Kanako O. Koyanagi, and Hidemi Watanabe, *In silico* and *in vivo*

surveys of *Brachyury* target gens in vertebrates, The 3rd International Symposium on Global COE Program of Center for Next-Generation Information Technology Based on Knowledge Discovery and Knowledge Federation, January 19, 2010, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

② 山田温子, 小柳香奈子, 渡邊日出海, *Brachyury* タンパク質の結合サイト配列を用いた *Brachyury* 標的遺伝子の探索, 第2回若手研究者支援のための産学協同GCOE 国内シンポジウム, 2009年10月1日, 札幌, 京王プラザホテル札幌.

③ Atsuko Yamada, Mark Q. Martindale, Akimasa Fukui, Hidemi Watanabe, and Shin Tochinai, Study on ancestral roles of the *Brachyury* gene during metazoan evolution, The 2nd International Symposium on Global COE Program of Center for Next-Generation Information Technology Based on Knowledge Discovery and Knowledge Federation, January 20, 2009, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 温子 (YAMADA ATSUKO)
北海道大学・低温科学研究所・研究員
研究者番号：60333217

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし