

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月1日現在

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22570205
 研究課題名（和文） 内臓中胚葉で発現するHOX遺伝子群は内胚葉の部域分化を支配するか？
 研究課題名（英文） Do HOX genes in the visceral mesoderm control regional differentiation of the endoderm?
 研究代表者
 村上 柳太郎 (MURAKAMI RYUTARO)
 山口大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：40182109

研究成果の概要（和文）：本研究計画の目的は、ショウジョウバエ胚の中腸内臓筋で発現するHOX 遺伝子群の機能の解明である。本研究によって、①胚中腸の4つのチェンバーで部域特異的な発現を示す分化マーカー遺伝子を多数同定した。②これらの遺伝子の発現を指標として、HOX 遺伝子である Antp, Ubx, abd-A それぞれの突然変異胚と強制発現胚における各チェンバーの分化に及ぼす影響を明らかにした。③HOX 遺伝子の機能は上皮の細胞分化誘導、および、パターン制御である。ことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：This research project was undertaken in order to elucidate roles of HOX genes in the visceral mesoderm of *Drosophila* midgut. During the research period, epithelial genes suitable as specific markers for regional differentiation of the midgut were identified, and phenotypes of the mutants and misexpression of HOX genes were analyzed. It was demonstrated that roles of HOX genes in the visceral mesoderm are induction and regulation of regional differentiation of the underlying endoderm.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、発生生物学

キーワード：器官形成

1. 研究開始当初の背景

(1) ショウジョウバエの中腸は消化・吸収を担う主要な器官で、内胚葉性の上皮と内臓中胚葉由来の内臓筋から構成されており、上皮は腸管の前後に沿って明確な部域分化を示す。中腸の発生を司る遺伝子機構として、

胚発生初期になされる内胚葉の決定は、GATA 因子遺伝子である *srp* と、その標的遺伝子で、同じく GATA 因子をコードする *GATAe* によってなされることを研究代表者らが示してきたが、その後の発生過程でなされる部域分化についての知見は少ない。

(2) HOX 遺伝子群は、胚の前後軸に沿って non-overlapping なパターンで発現しており、前後軸に沿って配置される体節や神経管などの部域特異的なアイデンティティを支配することが、新口・旧口動物を通じて確立している。しかし、ショウジョウバエでもマウスなどの哺乳類でも、体節を構成する細胞の種類が多様であると同時に、どの部域においても共通の細胞型が存在しており、HOX 遺伝子の標的遺伝子や、部域特異的な細胞分化を引き起こす細胞レベル、遺伝子レベルのメカニズムについては、断片的な知見にとどまっている。HOX 遺伝子の働きの解析には、組織構築の単純な実験系が必要である。本研究計画で研究材料とする消化管の組織構成は、内胚葉性の上皮と、それを取り巻く内臓中胚葉という単純なもので、内臓中胚葉では、体節などと類似した前後軸に沿ったパターンで、HOX 遺伝子の発現が見られることが知られている。

(3) ショウジョウバエ中腸の内臓中胚葉で発現する HOX 遺伝子群は、中腸上皮の部域分化を制御しているとする仮説が提唱されてきたが、上皮の部域特異的な分化マーカー遺伝子の知見が乏しかったため、1990 年代半ばから研究が進んでいない。HOX 遺伝子の標的遺伝子や、発生における分子・細胞レベルでの機能や役割などの知見が乏しいまま、他の実験系での研究も非常に少なくなっているが、HOX 遺伝子群は多細胞動物で進化的に広く保存されており、その作用機構の解明は多細胞動物の形作りの仕組みを知る上で、極めて重要な課題であると考えられる。

(4) ショウジョウバエでは、EST プロジェクトの進展によって、cDNA の胚発生過程での発現パターンの情報もデータベースとして利用可能になり、特定の胚組織の分化マーカーとして利用できる遺伝子の同定が飛躍的に容易になり、胚中腸の部域特異的な遺伝子を見つけて中腸発生における HOX 遺伝子の機能解明の研究に利用できると期待される。

2. 研究の目的

(1) ショウジョウバエ胚の中腸内臓中胚葉で発現する HOX 遺伝子群が、消化・吸収機能を担う内胚葉由来の中腸上皮の部域分化において、どのような役割を担っているか解明することが、最終的な目的である。

(2) 中腸 HOX 遺伝子の機能を調べる上で必要な、上皮の部域特異的な分化マーカー遺伝子を EST クローンの中からスクリーニングして同定する。

(3) このマーカー遺伝子発現を指標として、中腸発生における HOX 遺伝子の役割を解明する。

(4) 中腸内臓中胚葉で発現している HOX 遺伝子が、内胚葉性の中腸上皮の発生・分化に

作用するには、分泌性シグナル因子を介することが必要である。各 HOX 遺伝子の作用を媒介するシグナル因子の同定を行う。

(5) 内臓中胚葉の HOX 遺伝子によって転写活性化されるシグナル因子が、内胚葉の発生に及ぼす作用について解析する。

(6) ショウジョウバエ以外の動物でも内臓中胚葉での HOX 遺伝子発現が報告されており、消化管発生における役割が多細胞動物で広く共通している可能性があり、これを遺伝学的研究が可能な脊椎動物でも調べる。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエの遺伝情報データベースには、胚で発現する mRNA から作製した EST クローンのライブラリーと、それぞれのクローンの胚での大まかな発現パターンをまとめたデータベースが含まれており、このデータベースの画像より、胚中腸で発現している cDNA クローンを入手し、それらから RNA プロブを合成して、全胚 in situ ハイブリダイゼーションを行い、中腸上皮の部域分化マーカー遺伝子として好適なものを網羅的に同定する。同定された遺伝子を、中腸（上皮）の部域分化マーカーとして使用する。

(2) ショウジョウバエ胚中腸の内臓中胚葉（内臓筋）では、HOX 遺伝子 *Scr*、*Antp*、*Ubx*、*abd-A* が、腸管の前方から順番に発現している。それぞれの遺伝子について、突然変異胚、多重変異胚、および、強制発現胚の中腸における表現型を、上皮の部域特異的なマーカー遺伝子発現を指標として in situ ハイブリダイゼーションによって調べる。

(3) 内臓中胚葉の HOX 遺伝子が、隣接する内胚葉に作用を及ぼすためには、何らかの分泌性シグナル因子を介していると予想される。それぞれの HOX 遺伝子の標的遺伝子として活性化される分泌性シグナル因子の同定を、既知遺伝子を対象に、網羅的に行う。

(4) 内臓中胚葉 HOX 遺伝子の標的遺伝子として同定された分泌性シグナル因子の、内胚葉の発生に対する作用を、突然変異胚・強制発現胚の表現型によって明らかにする。

(5) 内臓中胚葉の HOX 遺伝子間には“後方優位性”など、遺伝子間の相互作用があり、表現型の解釈が困難になることが多い。これを避けるために、内臓中胚葉を欠く胚を、アポトーシス誘導などによって作製し、中腸上皮の各チェンバー特異的な分化マーカー遺伝子の発現を調べる。

4. 研究成果

(1) 胚中腸は 4 つのチェンバーに区別される。各チェンバーの内胚葉性上皮の特異的な分化マーカー遺伝子を、それぞれのチェンバーごとに複数同定することができた。同定された遺伝子には、消化に関わる可能性のある遺

伝子（トリプシンなど）、機能の不明な遺伝子が含まれている。

(2) 後方中腸（第3・第4チェンバー）で発現しているHOX遺伝子 *abd-A* の突然変異胚では、第3・第4チェンバー上皮の分化マーカー遺伝子が、いずれも消失しており、分化形質発現には *abd-A* が必要であることを初めて示した。

(3) *abd-A* 突然変異胚の後方中腸では、第2チェンバー特異的な分化マーカー遺伝子が発現しており、体節と同様な“後方優位性”が、内臓中胚葉のHOX遺伝子間でも見られることがわかった。

(4) ところが、*abd-A Ubx* 二重変異胚では、後部中腸の分化マーカー遺伝子発現が復活することがわかり、*abd-A* が後部中腸の分化形質を誘導しているのではない、ことが明らかとなった。

(5) *Ubx* によって転写活性化される分泌性シグナル因子 Dpp は、中腸中央部（第2チェンバー）以外の上皮の部域分化を阻害することが初めて明らかとなった。*abd-A* 突然変異胚で、後方中腸のマーカー遺伝子発現が消失したのは、*Ubx* 発現が“後方優位性”によって後方に拡大し、*Ubx* の標的遺伝子である *dpp* が、後方中腸上皮に作用したため、と考えられる。

(6) 中腸の内臓中胚葉にアポトーシスを誘導することで、内臓中胚葉の形成を阻害した胚を作製し、中腸の発生、特に、4つのチェンバー特異的な上皮の分化マーカー遺伝子発現に着目して検討した。内臓中胚葉を欠く胚では、胞胚の前後両末端部に由来する内胚葉の陥入はなされるものの、その後の卵黄両側面に沿った移動が阻害され、卵黄の包み込みも不完全とのままだった。しかし、内胚葉から形成される中腸上皮に特異的な分化マーカー遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで見たところ、第1、第3、第4チェンバーの上皮に特異的な分化マーカー遺伝子は、すべて発現しており、これらのチェンバーの上皮の細胞分化は内臓中胚葉のHOX遺伝子に依存していない、という意外な事実が初めて明らかとなった。一方、第2チェンバーについては、調べた2つの特異的な分化マーカー遺伝子はいずれも消失することがわかった。これらの結果から、中腸内臓中胚葉のHOX遺伝子の機能は、遺伝子によって多様であることが予想され、今後の研究を進める上で極めて貴重な発見となった。第2チェンバー上皮の部域分化が、HOX遺伝子 *Ubx* に依存している理由は、*Ubx* の標的遺伝子である分泌性シグナル因子 Dpp が、第2チェンバー上皮の分化形質発現を誘導しているため、と考えられる。

abd-A、*Ubx* の作用の解析、および、内臓中胚葉を欠失した胚の中腸上皮の発生につい

ての結果は、国際学会を含む複数の学会で発表しており、現在、論文投稿の準備をしている段階である。

(7) 最も前方の内臓中胚葉で発現しているHOX遺伝子 *Scr* の突然変異胚および強制発現胚では、前胃の後方に生じる4本の盲嚢の形成に異常が生じていたが、上皮の部域分化マーカー遺伝子発現に対する影響は明白ではなく、盲嚢の形成に関わる可能性が高いと考えられる。

(8) 第1チェンバーと第2チェンバーの境界部の内臓中胚葉で発現する *Antp* の表現型について従来報告はなかったが、本研究計画で同定された第1、第2チェンバー特異的な分化マーカー遺伝子発現に対する影響を調べた結果、*Antp* 突然変異では第1チェンバーが後方に拡大するとともに、第2チェンバーが相補的に縮小することが初めて明らかとなった。この表現型は、マーカー遺伝子発現で見ると、*Antp* の後方で発現する *Ubx* 遺伝子の表現型に類似している。*Antp* 突然変異胚では、第2チェンバーの縮小に対応するように Dpp 発現領域も縮小しており、*Antp* が何らかの標的遺伝子を介して、隣接する *dpp* 発現領域に影響を与えている、と考えられる。一方、*Antp* の強制発現胚では、突然変異の表現型とは逆に、第1チェンバーの縮小と、第2チェンバーの拡大が見られた。これらの結果から、*Antp* は、中腸発生において、各チェンバーの部域分化というよりも、部域ごとの大きさの制御に関わっている可能性があると考えられる。これは、HOX遺伝子の普遍的な機能を考える上で、大きな示唆に富む発見であり、ショウジョウバエ中腸のみならず、脊椎動物の消化管など、HOX遺伝子が発現している他動物でも、同様の働きがあるかどうか、検討する必要がある。本研究計画に関しては、現在、*Antp* がどのような分泌性シグナル因子を介して隣接領域の *dpp* 発現に影響しているか、同定を進めると同時に、どのような作用機構で各チェンバーの大きさが制御されているか解析を進めている。*Antp* に関する研究成果は、学会等において発表しており、現在、論文を執筆中である。

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2件)

① Takashi Hamaguchi, Shigeo Takashima, Aiko Okamoto, Misa Imaoka, Takashi Okumura, Ryutaro Murakami, Dorsoventral patterning of the *Drosophila* hindgut is determined by interaction of genes

under the control of two independent gene regulatory systems, the dorsal and terminal systems., Mechanisms of Development, vol. 129, 2012, 査読有, pp. 236-243,

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2012.07.006>

②Sarder N. Uddin, Masahiro Yano, Ryutaro Murakami, The *drumstick* gene acts cell-non-autonomously and triggers specification of the small intestine in the *Drosophila* hindgut., International Journal of Developmental Biology, 査読有, vol. 55, 2011, pp. 945-952, DOI: 10.1387/ijdb.113343su

[学会発表] (計 16 件)

①Masahiko Arishige 他 (Ryutaro Murakami), Ubx in the visceral mesoderm of *Drosophila* midgut specifies developmental fate of the underneath endoderm by suppressing the fate of adjacent midgut regions through the action of Dpp, Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, May 28-31, 2012, Kobe International Conference Center, Kobe.

②Keita Fujimoto 他 (Ryutaro Murakami), HOX genes in the visceral mesoderm of *Drosophila* midgut regulate regionalizaion through the action od Dpp., 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13-16 日、横浜ポートアイランド、神戸

③Yumiko Harada 他 (Ryutaro Murakami), Ubx and *abd-A* in the Visceral Mesoderm of the

Midgut of *Drosophila* Regulate Regional Differentiation of the Adjacent Endoderm through the Action of Dpp., 1st Asia-Pacific Drosophila Research Conference, May 22-25, 2011, Taipei, Taiwan

④Keita Fujimoto 他 (Ryutaro Murakami), HOX genes in the visceral mesoderm of *Drosophila* midgut regulate regionalizaion through the action od Dpp. 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7 日-10 日、神戸ポートアイランド、神戸

⑤原田由美子 他 (村上柳太郎)、ショウジョウバエ中腸内臓筋で発現する HOX 遺伝子による内胚葉部域分化の制御、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7 日-10 日、神戸ポートアイランド、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 柳太郎 (MURAKAMI RYUTARO)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40182109

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

原田 由美子 (HARADA YUMIKO)
山口大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：70284239