

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24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770229

研究課題名（和文）脊椎動物における初期発生システム多様性の進化発生学的研究

研究課題名（英文）An Evo-Devo study for mechanisms of early embryogenesis in vertebrates

研究代表者

竹内 雅貴 (TAKEUCHI MASAKI)

独立行政法人理化学研究所・ボディプラン研究グループ・専門職研究員

研究者番号：00392019

研究成果の概要（和文）：*Xenopus* の頭部形成において、*siamois* ホメオボックス転写因子は母性 *Wnt* シグナルの標的として必要とされる。しかしながら、他の分類群においてこの相同遺伝子は見つかっていなかった。本研究では、原始的条鰭類ポリプテルスの *siamois* 相同遺伝子 *dioskouroi* を発見し、機能解析を行った。結果として、*dioskouroi* はポリプテルスの頭部形成のみならず、体軸形成と内胚葉分化に必要とされる事が明らかとなった。これは、硬骨動物の共通祖先における初期発生システムの類推と、*siamois* 相同遺伝子を失った後の初期発生システム多様化の理解へつながる知見である。

研究成果の概要（英文）：*Xenopus siamois* is a homeobox gene coding for a transcriptional mediator of the dorsal *Wnt* signaling pathway and is necessary for the head formation. Despite its importance in *Xenopus* development, no *siamois*-related genes have been found in other taxa. In this study, I found a novel *siamois*-related gene, *dioskouroi*, in bichir. The bichir gene, which is different from *siamois*, plays roles in not only organizer formation but also endoderm differentiation endogenously. These results lead to a hypothesis that the *siamois*-related protogene in a common ancestor of bony fishes played central role in early embryogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：進化発生生物学

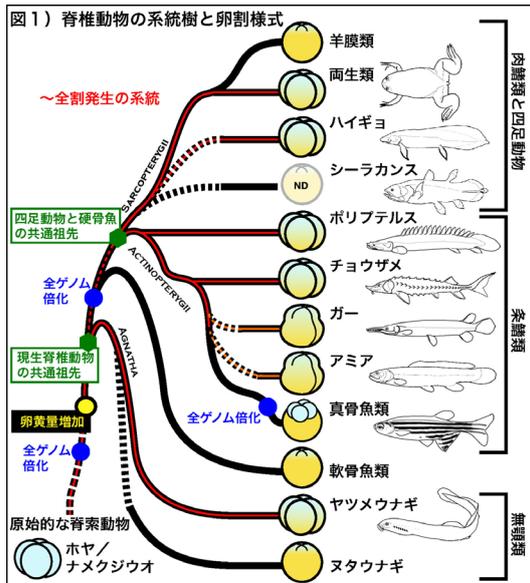
科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：体軸，オーガナイザー，三胚葉，条鰭類，両生類，*siamois*，*Wnt* シグナル，*nodal*

1. 研究開始当初の背景

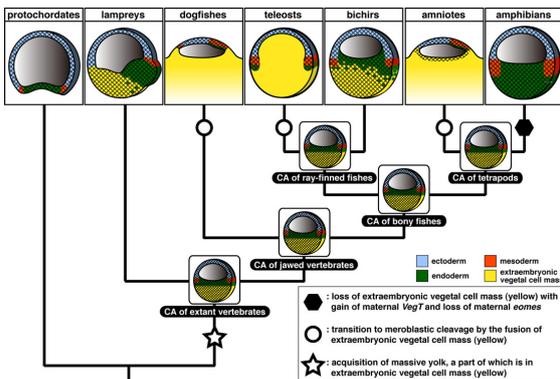
脊椎動物の初期発生過程は、ボディプランを確立する重要な発生段階であるにも拘らず、全割／盤割の卵割様式や胚体外組織の有無、原腸形成時の組織配置など、形態的に多様である。より祖先的な後口動物と比較し、

脊椎動物は進化的に卵黄を多量に獲得したため、その保持様式を変化させる事によって多様化したと考えられる。この多様性は初期発生過程が卵黄量の増減によりフレキシブルに変化するために生じたと思われがちであるが、動物綱レベルではよく保存されてお



り、脊椎動物全体という比較的マクロな視点で系統的に解釈する事が可能であると考えている(上図)。

一般的に、脊椎動物系統の根幹を成す初期発生様式は両生類様であると広く考えられてきた。なぜなら、両生類においては原索動物と共通で、全割により生じたすべての細胞が初期三胚葉の一部へ分化し、胚体外組織を形成しないためである。しかしながら、“全割発生する両生類以外の脊椎動物”についての分子発生的知見はほとんどなかった。これまでに、研究代表者は全割発生するポリプテルスやヤツメウナギの初期発生を解析してきた。特にポリプテルスの実験動物化については、飼育から実験技術の開発まで世界に先駆けて行ってきた。



また初期三胚葉マーカー遺伝子の発現解析から、両生類とは異なり、ポリプテルスの内胚葉が帯域でのみ分化する事を示した。植物極側細胞集団 (vegetal cell mass, VCM; 両生類では内胚葉領域) は、胚葉へ分化せず、栄養細胞集団として後の発生で吸収される。この胚体外細胞集団は、顎口類すべての外胚葉に位置し、現生脊椎動物で最も初期に分岐した無顎類の生物であるヤツメウナギの胚においても共通して存在する。従って、両生類のみが例外的であり、他の脊椎動物は共通

に卵黄細胞もしくは胚体外領域を持つ事が示唆される(上図☆)。両生類の胚葉形成は、植物極側で母性に発現する T-box 転写因子 *VegT* に制御される点で特徴的である。ポリプテルスの *VegT* ortholog はニトリヤゼブラフィッシュと同様に母性発現しない事から、母性 *VegT* の獲得により、両生類は二次的に VCM を内胚葉へ変化させたと考えられる(上図●)。

2. 研究の目的

脊椎動物における初期発生機構の多様性を系統的に理解するため、脊椎動物系統での根幹的な胚発生パターンをもつポリプテルスの初期発生を解析する。

Xenopus 胚発生において、母性 *VegT* は母性 *Wnt* シグナルと協調的に働く事によって、背側オーガナイザー形成のための *nodal* 関連因子の発現に寄与する事が知られている。すなわち、母性 *VegT* は中内胚葉の分化だけでなく、体軸形成においても重要な役割を果たす。前述のように、*VegT* の母性発現は両生類系統のみでみられるため、母性 *Wnt* シグナルの機能と体軸形成機構の関係性が進化の過程でどのように変遷してきたのか、現生脊椎動物における多様性から検証する事が重要である。その観点から、homeobox 遺伝子の *siamois* に注目する。*Xenopus* 胚発生において、*siamois* とそのパラログ *twin* は、母性 *Wnt* シグナルのターゲットであり、その機能を仲介する役割を果たす。しかしながら、ゲノム解読の進む種も含めた両生類以外の分類群においては、その相同遺伝子は見つかっていなかった。

本研究ではポリプテルスにおける *siamois* 関連因子を同定した事から、その機能解析を行った。この結果から体軸形成機構の多様化過程を推測し、脊椎動物原腸形成の統合的・俯瞰的理解を導き出す事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ポリプテルスの飼育と胚採集、胚操作技術の開発:

ポリプテルス種は *Polypterus senegalus*, *P. endlicheri* の二種を使用した。胚操作については、卵膜処理、顕微注入、胚の解剖、などを開発した。

(2) ポリプテルスの遺伝子単離:

遺伝子断片の単離は、主に縮重プライマーを用いた RT-PCR 法 (Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction) で行った。また、受精卵から初期神経胚までの cDNA ライブラリーを作成し、その EST (Expression Sequence Tag) 解析からの情報を利用した。全長 cDNA の単離は、3' -もしくは 5' -RACE 法 (Rapid

Amplification of cDNA Ends)で行った。

- (3) ポリプテルス胚での遺伝子発現解析：
 発生段階に従った遺伝子発現の量的変化は、各遺伝子の特異的プライマーを用いた RT-PCR によって解析した。発現の領域的パターンとの同定には *in situ* hybridization 法と、切り分けられた組織片から RT-PCR する事で行った。

- (4) *Xenopus* 胚、ポリプテルス胚への顕微注入と animal cap assay：

各種 mRNA, Morpholino oligo、等は 2-4 細胞期に指定の領域へ顕微注入された。Animal cap assay においては、4 細胞期の動物極側へ顕微注入した。その後、初期胚期に動物極側組織片を切り出して後期原腸胚期まで培養。培養した組織片を回収し、RT-PCR で遺伝子発現の変化を調べた。

4. 研究成果

- (1) ポリプテルスの cDNA library 作成と EST 解析：

ポリプテルス (*P. senegalus*) の初期胚 (受精卵から初期神経胚期) から cDNA ライブラリーを構築し、約 20,000 クローンについて両端の配列決定を行った (EST 解析)。その情報からデータベースを作成し、トラザメ・ヌタウナギと共に Vertebrate Time Capsule として発表した (下図、雑誌論文②)。

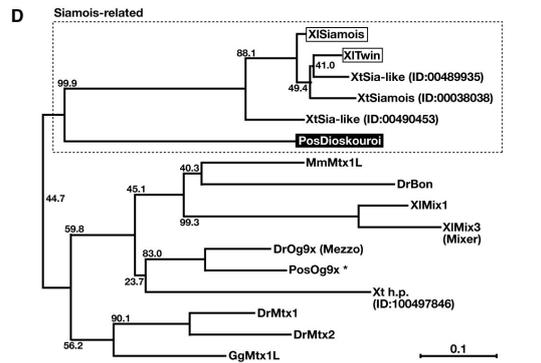
- (2) ポリプテルスにおける *siamois* 関連遺伝子 *dioskouroi* の単離：

ポリプテルスの EST データベースに見つかったいくつかの homeobox 転写因子

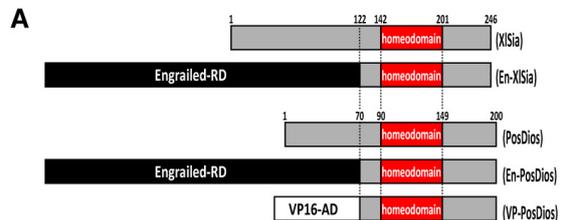
について、全長 cDNA を単離した。それらを *Xenopus* 胚の腹側へ過剰発現したところ、非常に強い二次軸誘導活性を持つ因子を発見し、*dioskouroi* (以下、*dios*) と名付けた (下図 A-C)。



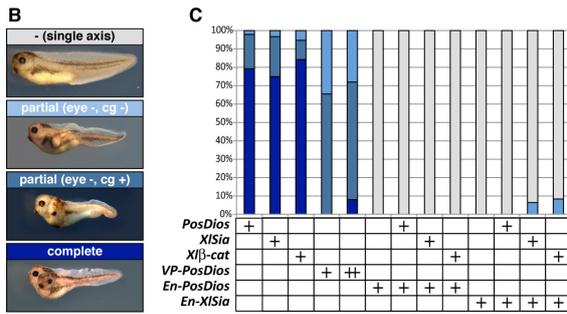
Dios は homeobox ドメインのアミノ酸配列から、新規の mix-type homeobox 因子である。また、*Xenopus siamois* と類似性が高く、*Xenopus* 以外で初めて見つかった *siamois* 関連遺伝子である (下図 D, E)。



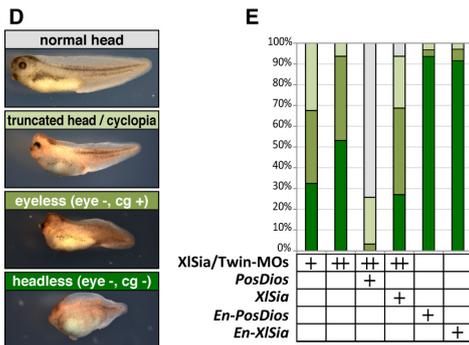
- (3) *Xenopus* 胚での頭部形成/二次軸形成における *dios* と *siamois* の活性比較：



Siamois は転写活性化因子である事が知られており、転写抑制型 *siamois* (上図 A, En-XISia) は負の優性変異体として働く。*Dios* と *Siamois* の *Xenopus* 胚における二次軸誘導活性を比較するため、転写抑制型 *dios* (En-PosDios) と、転写活性化型 *dios* (VP-PosDios) を構築し実験に用いた (上図 A)。



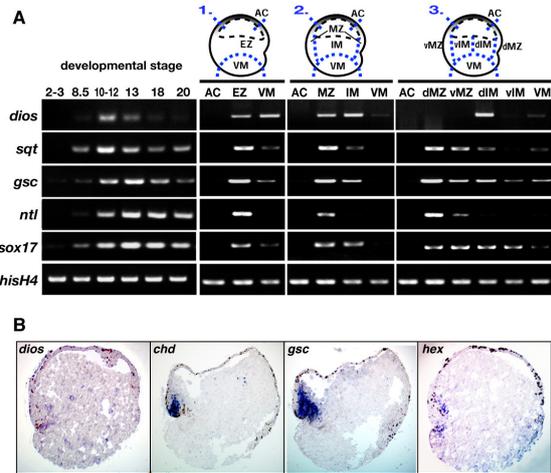
二次軸形成のインデックスを上図 B とし、*Xenopus* 胚腹側へ顕微注入した結果が同 C である。転写活性化型 *dios* は野生型 (レーン 1) 同様に二次軸誘導し (レーン 4, 5)、転写抑制型 *dios* はしない (レーン 6)。また、転写抑制型 *dios* は野生型 *dios* の二次軸誘導を阻害する (レーン 7)。従って、*Dios* は *Siamois* 同様に、転写活性化因子として二次軸を誘導すると考えられる。さらに、転写抑制型 *dios* は野生型 *siamois* の活性を、転写抑制型 *siamois* は野生型 *dios* の活性を互いに抑制する (レーン 8, 11) ため、両者の転写機能は同一であると考えられる。



次に、*Xenopus* 胚の背側への顕微注入で、内在の *siamois* 活性との関係性を検討した。上図 D は頭部欠損のインデックスである。上図 E で示すように、転写抑制型 *dios* は転写抑制型 *siamois* と同様に、同部形成を阻害する (レーン 5, 6)。これは内在 *siamois* の活性を阻害した結果と考えられる。そして重要な事に、*siamois/twin* 配列特異的な Morpholino oligo. (以下 MO) を用いた二重 knockdown による頭部欠損表現型 (レーン 1, 2) は、野生型 *dios* によって救済される (レーン 3)。これらの結果は、*Xenopus* 胚において、*dios* は *siamois* と同一の活性を持つ事を示す。

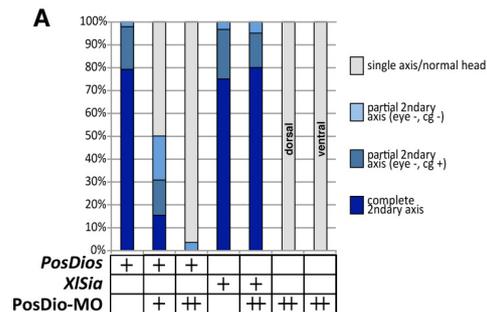
- (4) ポリプテルス胚における *dios* の発現：
dios は原腸胚期 (stage10-12, 下図 A, 左パネル) に一過的に発現する。発現領域は、原口周辺域を中心に、深部に比較

的強く発現する事がわかった (下図 A；胚を切り分けて RT-PCR, B; 初期原腸胚切片を用いた *in situ* hybridization、背側/原口は左側)。この領域は頭部オーガナイザーで発現するとされる *hex* や、prechordal 領域のマーカである *gsc* の発現領域と一部オーバーラップする (下図 B)。従って、*dios* がポリプテルスの頭部形成に直接的に関与する事を示唆する。



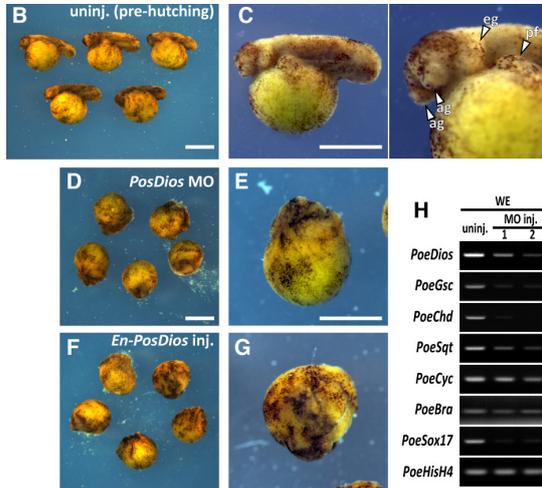
- (5) ポリプテルス胚発生における *dios* の役割：

dios の MO (PosDios-MO) を合成し、機能阻害実験を行った。*Xenopus* 胚において、PosDios-MO は *dios* 過剰発現による二次軸誘導を阻害する (下図 A, レーン 1-3) が、*siamois* の二次軸誘導や胚の頭部形成を阻害しない (下図 A, レーン 4-7)。従って、*dios* の配列に特異的な効果を持つと言える。

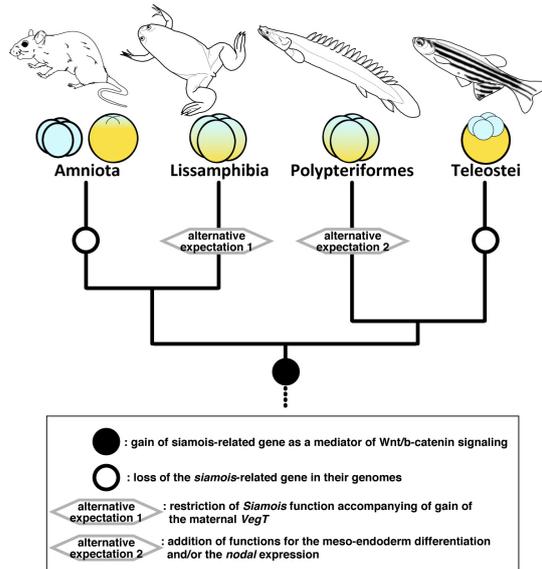


PosDios-MO をポリプテルス胚へ顕微注入した胚は、コントロール胚のような胚構造の形成 (下図 B, C, ag; attachment gland, eg; external gill bud, pf; pectoral fin bud) が見られないだけでなく、体軸が形成されない (下図 D, E)。また、転写抑制型 *dios* の顕微注入においても同様の表現型が観察される (下図 F, G)。さらに、MO 胚の RT-PCR によるマーカ解析では、背側オーガナイザーマーカである *gsc*, *chd* だけでなく、

nodal リガンドの一つ *sqt* や内胚葉マーカー *sox17* の発現減少が明らかとなった (下図 H)。これらの結果は、ポリプテルス胚において、*dios* が背側オーガナイザーの形成だけでなく内胚葉の分化においても転写活性化因子として重要な役割を果たす事を示唆する。



(6) 脊椎動物の初期発生における *siamois* 関連遺伝子の機能的変遷についての考察:



両生類とポリプテルスの系統的位置から、少なくとも bony fishes (すべての四肢動物と硬骨魚) の共通祖先におけるゲノムには *siamois* 関連因子がコードされていたと考えられる (上図●)。しかしながら、ヒト、マウス、ニワトリなどの羊膜類、メダカ、ゼブラフィッシュ、フグなどの真骨魚類のゲノムに *siamois* 関連因子は存在しないため、両系統で平行して失われたと考えられる (上図○)。これまでの結果が示すように、現存する *siamois* 関連因子 (両生類の *siamois*, *twin*、ポリプテルスの *dios*) の転写活性

化因子としての機能は非常に類似しており、区別できない。その一方で、両動物種における *siamois* 関連遺伝子の knockdown 表現型は明らかに異なっている。これは、ポリプテルス胚発生における *dios* の役割は、*Xenopus* 胚発生における *siamois/twin* の役割と異なる; 具体的には、*Xenopus siamois/twin* が体軸の決定に限定的な役割を持つのに対し、*dios* は体軸決定に加え、内胚葉の形成においても役割を果たす事が示唆される。*Xenopus* における母性 *VegT* 機能阻害胚では、*dios* 機能阻害胚と同様に、*nodal* の発現と内胚葉の形成、体軸の形成に異常が見られる事が知られている。従って、現生両生類系統での母性 *VegT* 獲得が *siamois* 関連因子の役割に変化をもたらした可能性 (上図, alternative expectation 1) があると考えている。

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 Kurokawa D., Ohmura T., Ogino H., Takeuchi M., Inoue A., Inoue F., Suda Y., Aizawa S. 「Evolutionary origin of the *Otx2* enhancer for its expression in visceral endoderm」 *Developmental Biology*, 査読有, 342, 110-120, (2010).
- ② Takeuchi M., Takeuchi M., Ota K. G., Nishimura O., Mochii M., Itomi K., Adachi N., Takahashi M., Fujimoto S., Tarui H., Okabe M., Aizawa S., Kuratani S. 「Overview of the transcriptome profiles identified in hagfish, shark, and bichir: current issues arising from some nonmodel vertebrate taxa」 *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 査読有, 316B, 526-546, (2011).

[学会発表] (計 9 件)

- ① 竹内 雅貴, 「脊椎動物における初期発生システムの多様性 -原始的条鰭類ポリプテルスの知見から考察する-」 日本発生生物学会 秋季シンポジウム 2011, 2011 年 12 月 19 日, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎市
- ② 竹内 雅貴, 高橋 麻衣子, 相沢 慎一, 「The early embryogenesis of *Polypterus* (bichirs): insights into the origin and evolution of developmental mechanisms

in vertebrates」第 33 回日本分子生物学会, 2011 年 12 月 8 日, パシフィコ横浜, 横浜市

- ③ 竹内 雅貴, 相沢 慎一, 「脊椎動物における初期発生システムの進化 -原始的条鰭類ポリプテルスの胚発生から考察する-」第 5 回 日本ツメガエル研究会, 2011 年 10 月 6 日, かんぼの宿本館, 熱海市
- ④ 竹内 雅貴, 「脊椎動物における初期発生システムの多様性 -原始的条鰭類ポリプテルスの知見から考察する-」日本動物学会 第 82 回 旭川大会 2011 (招待講演), 2011 年 9 月 21 日, 大雪クリスタルホール, 旭川市
- ⑤ 竹内 雅貴, 相沢 慎一, 「脊椎動物における初期発生システムの進化 -原始的条鰭類ポリプテルスの知見から考察する-」日本進化学会 2011 京都, 2011 年 7 月 30 日, 京都大学, 京都市
- ⑥ Takeuchi M., Takahashi M., Aizawa S. 「The early embryogenesis of *Polypterus* (bichirs): insights into the origin and evolution of developmental mechanisms in vertebrates」44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (招待講演), 2011 年 5 月 21 日, 沖縄コンベンションセンター, 宜野湾市
- ⑦ 竹内 雅貴, 高橋麻衣子, 相沢慎一, 「脊椎動物における初期発生の多様性 -原始的条鰭類ポリプテルスの知見から-」第 16 回 小型魚類研究会, 2010 年 9 月 18 日, プラザイースト, さいたま市
- ⑧ Masaki Takeuchi, 「The early embryogenesis of *Polypterus* (bichirs): Insights into the origin and evolution of vertebrate body plans」日本進化学会 第 12 回東京大会 (招待講演), 2010 年 8 月 4 日, 東京工業大学 大岡山キャンパス
- ⑨ Takeuchi M., Takahashi M., Aizawa S. 「The early embryogenesis of *Polypterus* (bichirs): Insights into the origin and evolution of vertebrate body plans」2nd Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology, 2010 年 5 月 27 日, Institute Pasteur, Paris, France

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
Vertebrate Time Capsule
(<http://transcriptome.cdb.riken.go.jp/vtcap/>)
The Rising Generation of Evo-Devo Biologist
(<http://www.evo-devo.net/posters.html>)

6. 研究組織
(1) 研究代表者
竹内 雅貴 (TAKEUCHI MASAKI)
独立行政法人理化学研究所・ボディプラン研究グループ・専門職研究員
研究者番号: 00392019