

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：22770230

研究課題名（和文） 初期胚の背腹軸決定における形成体発生場の自発的な単一収束機序の解析

研究課題名（英文） Spontaneous single dorsal-ventral axis formation in the early *Xenopus* embryo

研究代表者

猪股 秀彦 (INOMATA HIDEHIKO)

独立行政法人理化学研究所・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（和文）：本研究では自発的な単一背腹軸が形成される過程を、分泌蛋白質に注目して解析を行った。背腹軸形成においては Chordin が形成する濃度勾配が重要であり、勾配の形状は主に蛋白質の産生・拡散・分解により制御されている。本研究では、Chordin の濃度勾配が分解に強く依存し、ポジティブフィードバックを形成している事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：During early *Xenopus* development, the dorsal-ventral axis is formed according to Chordin protein gradient secreted from the organizer. We tried to quantify production rate, diffusion coefficient and degradation rate of Chordin protein in vivo, which regulate the shape of protein gradient. In the present study, we found that the Chordin protein was rapidly degraded in the extracellular space and it formed a positive-feedback loop.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：アフリカツメガエル・背腹軸・モルフォゲン勾配・Chordin・Szl・定量

1. 研究開始当初の背景

アフリカツメガエルの初期胚においては、形

成体が司令塔として働き、背側中軸を誘導する事が知られている。また、人工的に形成体

を二つ作成すると、各々から独立した背側中軸が発生する。つまり、初期発生場は少なくとも二つ以上の背側領域を誘導可能な場であると考えられる。しかし、正常胚では複数の背側中軸が形成される事なく、背側中軸の発生が一本に収束されるが、その分子機序はほとんど知られていない。

2. 研究の目的

申請者はアンチセンス MO を用いて β Catenin シグナルを阻害した胚（腹側だけの胚；BMP 活性が高い状態）に、均質に中程度の Chordin 蛋白質（BMP 阻害因子）を胞胚期の胞胚腔にインジェクションした。その結果、BMP シグナルの“内的なゆらぎ”をもとに胚は単一の背腹軸を自発的に形成することを見いだした。このことから、胚発生場は本来「背」と「腹」に自発的に二極化する性質を内在的に持っている可能性が考えられる。本研究は自発的に単一の背腹軸が形成される過程を、（1）形成体の発生起点が自己形成的に構築される際のシグナル制御の解析、（2）胚の背腹軸が一本の軸だけに収束する分子機序の二点に注目して研究を行う。

3. 研究の方法

アフリカツメガエルの背腹軸形成は、Chordin 蛋白質が形成する濃度勾配が重要な役割を果たしている。従って、単一の背側中軸誘導の分子機序を明らかにするためには、Chordin 濃度勾配の形成過程を明らかにする必要がある。濃度勾配は主に産生・拡散・分解の三つのパラメータに依存して、その形状を変化させる事が知られている（図 1）。本研究では、in vivo における Chordin 蛋白質の各々のパラメータの定量を試み、これらの定

量データをもとに背側中軸の単一収束の分子機序の解明を試みた。

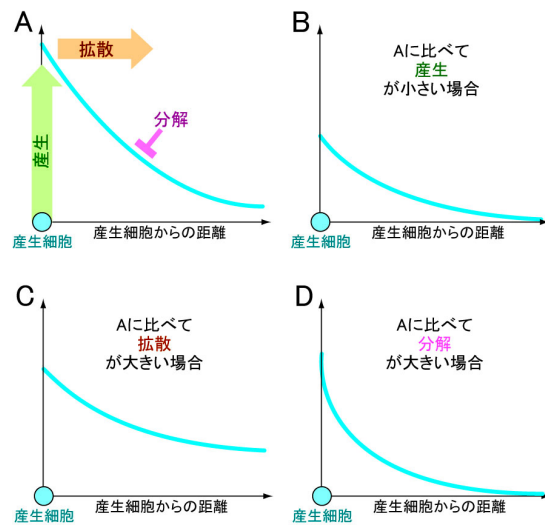


図 1. 産生・拡散・分解の条件で変化する濃度勾配

具体的な定量方法として、

① 産生

背腹軸形成は、主に BMP シグナルの活性勾配依存的に蛋白質の産生が制御されている事が知られている。本研究では、BMP 活性依存的に誘導される遺伝子の発現を Q-PCR 法を用いて定量を行った。

② 拡散

拡散係数を定量するために、蛍光相関分光法（Fluorescence correlation spectroscopy : FCS 法）を用いて計測を行った。シグナルペプチドの後ろに Venus 蛋白質を付加し、直接拡散した蛋白質の可視化を試みた。

③ 分解

精製した Chordin 蛋白質を胞胚期の胞胚腔にインジェクションし、インキュベーションした後、精製蛋白質を免疫沈降しウェスタンブロットティング法により蛋白質量を定量した。

4. 研究成果

① 初期胚の背腹軸は大きく3つの領域（背側・側方・腹側）に分割する事が出来る。 β Catenin を用いて完全腹側化（高 BMP 活性状態）すると、腹側マーカーである Sz1 の発現は認められたが、側方・背側のマーカーの発現は認められなかった。この胚を用いて、異なる濃度の Chordin 蛋白質（BMP 阻害因子）を胞胚期の胞胚腔にインジェクションしたところ、中程度の Chordin では側方・背側マーカーの発現が認められ、一方腹側マーカーの発現が消失した。さらに、高濃度の Chordin 蛋白質をインジェクションすると、側方マーカーの発現も抑制され、背側マーカーのみが発現した。このことから、初期胚の背腹軸形成期は BMP 活性の勾配依存的に、背側・側方・腹側の遺伝子発現が誘導される事が明らかとなった。

② FCS 法を用いて、背腹軸形成に関わるいろいろな分泌タンパク質の拡散係数の定量を試みた。その結果、異なる蛋白質間において拡散係数の顕著な違いは認められなかった。また、免疫染色法を用いて Chordin 蛋白質を直接検出したところ、胚全体に拡散していることが認められた。このことから、Chordin 蛋白質の濃度勾配を拡散係数依存的に制御する事は困難であると考えられる。

③ Chordin 蛋白質の安定性を検討するために、Chordin の C 末端に V5-6xHis タグを付加したコンストラクトを HEK293 細胞にトランスフェクションし、その後培養上清に分泌した Chordin 蛋白質を His タグを用いて精製した。また、Chordin と同様に BMP 阻害活性を有する Noggin-V5-6xHis も精製した。各々、等量の蛋白質を胞胚期の胞胚腔にインジェクションし、インキュベーションした後、V5 抗体を用いて免疫沈降し蛋白量をウェスタ

ンブロット法により検出した。その結果、Noggin に比べ Chordin は速やかに分解されることを見いだした。

④ 産生・拡散・分解の定量結果より、自発的な単一背側中軸への収束には、Chordin 蛋白質の産生と分解が重要な因子であると考えられる。産生に関しては、BMP 活性依存的にシグモイド様のグラフを描き、BMP 活性の抑制が Chordin の発現を誘導する。従って、BMP 阻害因子 Chordin の発現は BMP 活性を抑制し、さらに自身の発現を促すポジティブフィードバックを形成していると考えられる。一方、分解の定量から、細胞外に分泌された Chordin 蛋白質は速やかに分解される事を見いだした。Chordin と同様に BMP 阻害活性を有する分泌蛋白質 Noggin は、Chordin に比べ分解速度が遅く非常に安定である。従って、Chordin の濃度勾配は分解依存的に制御されている可能性が高いと考えられる。

⑤ 本研究の結果を踏まえて、Chordin 蛋白質の分解と、Chordin が形成するポジティブフィードバックを組み込んだ数理モデルを構築する事により、自発的な単一背側中軸への収束現象を明らかにしたいと考えている。

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 Kamiya D, Banno S, Sasai N, Ohgushi M, Inomata H, Watanabe K, Kawada M, Yakura R, Kiyonari H, Nakao K, Jakt LM, Nishikawa S, Sasai Y. Intrinsic transition of embryonic stem-cell differentiation into neural progenitors. **Nature**. (2011) 470,

503-509. 査読有

- ② Takai A, Inomata H^{**}, Arakawa A,
Matsuo-Takasaki M, Sasai Y.
(*Co-corresponding-author)
Development. (2010) 137, 3293-3302. 査
読有

[学会発表] (計1件)

- ① Inomata H. Dynamic BMP signaling
control in robust dorsal-ventral
patterning. **2011 FASEB Summer Research
Conferences** (The TGF- β Superfamily:
Signaling in Development and Disease)
August 24, 2011 Il Ciocco, Lucca, Italy

[その他]

ホームページ等

<http://www.cdb.riken.jp/sasai/>

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・器官発生研究グ
ループ・研究員

研究者番号：60372166