

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：94404

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370095

研究課題名(和文) 縞パターンの移動と分裂を制御する仕組みの解析

研究課題名(英文) Analyses of mechanisms regulating the traveling and splitting of stripe patterns

研究代表者

小田 広樹(Oda, Hiroki)

株式会社生命誌研究館・その他部局等・研究員

研究者番号：50396222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円、(間接経費) 3,690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、節足動物門・鋏角類オオヒメグモの頭部体節形成において観察されるヘッジホッグ発現波の移動と分裂に着目し、その分子メカニズムの解明を目指した。胚性RNA干渉法による表現型スクリーニングを行い、ヘッジホッグ遺伝子の発現波の振る舞いに異常が表れる遺伝子として、ウイングレスシグナル経路の構成因子のアルマジロとアキシンを同定した。表現型の詳細な解析から、アルマジロの遺伝子活性がないとヘッジホッグ発現波の動的性質が失われること、また同時に、そのヘッジホッグの発現がオルソデンティクル非依存的になることがわかった。本研究で、ストライプ状の遺伝子発現波の移動と分裂を制御する仕組みの一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This work was aimed at elucidating molecular mechanisms underlying the traveling and splitting of a wave of hedgehog expression, which is observed for head segmentation in the embryo of the spider *Parasteatoda tepidariorum*, an emerging model arthropod that belongs to the Chelicerata. We carried out an embryonic RNA interference screen for genes whose knockdowns affected the behavior of the wave of hedgehog expression and identified *armadillo* and *axin*, which are known as regulators of *wingless* signaling. Detailed analyses of the phenotypes showed that the absence of *armadillo* activity prevented the hedgehog wave from behaving dynamically and made the hedgehog expression independent of *orthodenticle*. Our findings revealed a part of the mechanisms of hedgehog wave traveling and splitting.

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：パターン形成 体節形成 細胞間シグナル 反応拡散 節足動物 縞パターン

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の個体発生に見られるパターン形成の多くは、なんらかの拡散因子によって制御されている。複数の拡散因子の相互作用を想定した反応拡散系の数理モデルは、スポット(点)やストライプ(縞)などの空間的周期パターン形成過程を再現するが、このタイプのパターン形成過程では、遺伝子発現が細胞系譜にとらわれることなく ON、OFF の制御を受け、“波”としてダイナミックに振る舞うことが必要である。しかしながら、生体内の具体的なパターン形成過程において、遺伝子発現波を解析できる実験系は乏しく、本研究の開始時点では、遺伝子発現波の解析を可能にするシンプルな実験系の開発が求められていた。

新たなモデル生物として開拓されたオオヒメグモの初期胚では、頭部体節形成に関わる縞状の遺伝子発現が、波として細胞から細胞へ伝搬し、その後、繰り返し2回分裂することが見出された(図1; Kanayama et al., 2011)。この発見により、オオヒメグモの頭部領域が、パターン形成における遺伝子発現波の性質及びメカニズムを解析するために有用な実験系を提供しうると考えた。

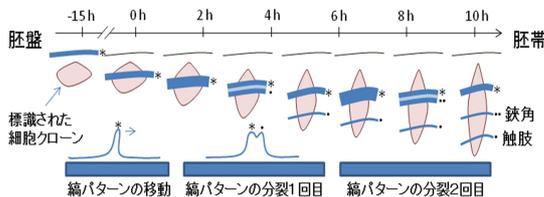


図1. オオヒメグモ胚の予定頭部領域におけるヘッジホッグ発現波の移動と分裂

## 2. 研究の目的

オオヒメグモの初期胚では、ヘッジホッグ(*hh*)の縞状の発現が胚盤の縁に沿って現れるが、その発現は細胞系譜にとらわれることなく、胚盤の中心側(将来の後部側)へ数細胞分移動し、引き続いて前後方向へ分裂を2回繰り返す。この縞パターンの分裂は、パターン形成場となる外胚葉上皮の収斂伸長を伴って起こる。このようなパターン形成現象は実際の生体内ではほとんど記載されていないが、反応拡散系の数理モデルでは成長を伴ったパターン形成と比較的容易に再現される。

そこで本研究は、オオヒメグモ胚の予定頭部領域に現れるヘッジホッグ発現波のダイナミクスに着目し、どのような分子メカニズムでヘッジホッグ発現波の移動と分裂が起こるのかを解明するとともに、このパターン形成が反応拡散系の数理モデルで説明されるのかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) オオヒメグモ胚のトランスクリプトーム解析

次世代シーケンサー・ロッシェ GS FLX+を用いて、オオヒメグモ胚のトランスクリプトーム解析を行った(受託解析、フィルジェン社)。発生ステージの異なる6袋の卵囊の胚から得たRNAを合わせてcDNA合成のテンプレートとし、ランダムプライマーを用いてcDNA合成を行った後、さらに均一化処理を行った。得られた配列はCLC Genomics Workbenchでアセンブル解析し、コンティグ配列を得た。

### (2) 縞パターンの移動と分裂に関わる遺伝子の探索

オオヒメグモの頭部体節形成におけるヘッジホッグの縞パターンの移動と分裂に関わる遺伝子を探索するために、これまでに確立したembryonic RNA interference (eRNAi, 胚性RNA干渉法; Kanayama et al., 2011)を用いて、網羅的に機能スクリーニングを行った。具体的には、利用可能な様々な遺伝子断片から二本鎖RNA(dsRNA)(400bpから1kbp程度)を作製し、オオヒメグモの32-64細胞期胚の割球にそれぞれの二本鎖RNA(dsRNA)(400bpから1kbp程度)を標識デキストランと混ぜて微量注入することにより、標識された細胞クローンで任意の遺伝子の機能が抑制された状態を作った。しかし、注射時に将来の運命を予見できないため、胚盤期において予定頭部領域に標識された細胞クローンをもつ胚(図1)を選別し、それらについてのみ、ヘッジホッグ発現波が分裂を完了するタイミングで胚を固定し、染色することで、ヘッジホッグ発現波の移動/分裂に特異的に影響を及ぼす遺伝子を特定した。本研究開始以前の段階で、*otd*(オルソデンティクル)のeRNAiの細胞クローンではヘッジホッグ発現波が消失すること、*opa*(オッドペアード)のeRNAiの細胞クローンでは縞パターンの分裂が乱されることがわかっていった(Kanayama et al., 2011)。これらと類似の表現型を示す遺伝子だけでなく、新規の表現型を示す遺伝子も同定できるのではないかと期待した。

### (3) 表現型の解析

eRNAiスクリーニングでヘッジホッグ発現波の振る舞いへの影響が確認された遺伝子について、多重色蛍光*in situ*ハイブリダイゼーションによって表現型の詳細な解析を行った。多重色蛍光*in situ*ハイブリダイゼーションはチラミド・シグナル増幅法(TSA)を用いたが、オオヒメグモ胚サンプルへの最適化が必要であった。この染色法の最適化は、本研究期間内に秋山-小田康子との共同で行った。多重色で染色した胚は、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、三次元画像解析ソフトImarisで解析を行った。

#### (4) 遺伝子発現の定量解析

オオヒメグモのひとつの卵嚢由来の胚を少数ずつ、20時間にわたって2時間の間隔で固定して別々にプールし、それらを使って蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションで染色した。染色した胚は共焦点レーザー顕微鏡で観察し、三次元画像データを取得した後、画像解析ソフト Imaris と ImageJ を用いて、胚の表面細胞層内の前後軸に沿ったシグナル強度を取得した。シグナル強度は最小値と最大値の間で正規化し、10 $\mu$ m 幅でスムージングを行った。シグナル強度のピーク位置、ピーク間距離、ピーク形状などの計測を数値解析ソフト Origin で行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) オオヒメグモ胚のトランスクリプトームデータベースの構築と公開

オオヒメグモの6つの異なるステージの胚の転写産物の、次世代シーケンサーによる配列解析により、合計 890,221 リードの配列情報を得た。リードあたりの平均の配列長は 433.49 塩基であった。アセンブル解析で 26,405 のコンティグが得られた。以前に独自にクローニングした低発現量遺伝子の配列を用いて、これらのコンティグ配列に対して BLAST 検索を行ったところ、今回のトランスクリプトーム解析で取得した配列情報が、オオヒメグモ胚の低発現量遺伝子を広く網羅していることが確認された。これらの配列情報は、本研究以前に得たオオヒメグモの配列情報とともに、MySQL を用いてデータベース化し、テキスト検索と BLAST 検索ができる形で Web 上に公開した ([http://www.spider-brh.jp/pt\\_spiderbase/](http://www.spider-brh.jp/pt_spiderbase/))。

##### (2) ヘッジホッグ発現波の制御因子としてウイングレスシグナル関連遺伝子を同定

eRNAi スクリーニングにより、ウイングレスシグナル経路の構成因子であるアルマジ

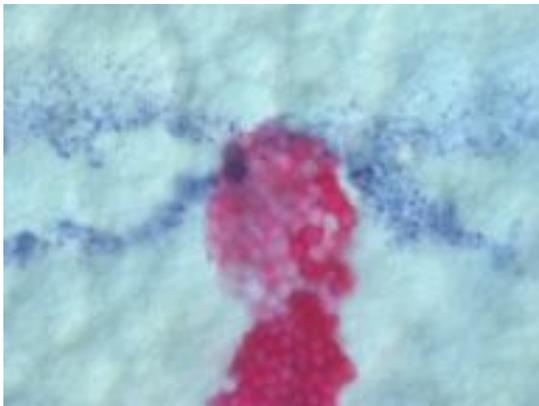


図2 アルマジロ胚性 RNA 干渉によるヘッジホッグ発現波の伝播の異常。赤で染まった領域にアルマジロ二本鎖 RNA が導入されている。ヘッジホッグの発現波（青）の後方へ（下方）の伝播が妨げられているのがわかる。

ロ遺伝子とアキシン遺伝子の機能抑制で、ヘッジホッグ遺伝子の縞パターンに異常が表れることが明らかになった（図2）。両者の eRNAi の表現型は異なっており、アルマジロの eRNAi ではヘッジホッグ発現波の伝播が阻害され、アキシンの eRNAi ではその発現波の伝播が促進されている可能性が明らかになった。

そこで、アルマジロ eRNAi の表現型をさらに詳細に解析したところ、アルマジロの遺伝子活性がないと、ヘッジホッグ発現波の動的性質が完全に失われることが示唆された（図3）。また、ヘッジホッグ発現波の維持にオルソデンティクルの活性が必要であることがわかってきたが、今回の解析から、アルマジロの活性がなければ、オルソデンティクルの活性がなくても、ヘッジホッグの発現が維持されることがわかった（図3）。この発見は、ヘッジホッグ発現波の分裂で生じる2つの発現波のうち、後方側（胸部側）の発現波がなぜ、オルソデンティクル陰性にもかかわらず安定に維持されるのかを説明するかもしれない。

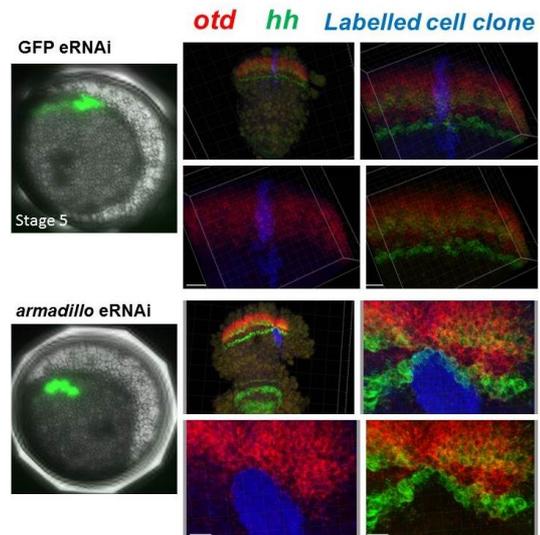


図3 アルマジロ eRNAi 胚におけるオルソデンティクル (otd, 赤) とヘッジホッグ (hh, 緑) の発現。GFP eRNAi 胚はコントロール。ヘッジホッグ発現波はアルマジロ eRNAi 細胞クローンに入ったところで留まっており、分裂パターンにも影響が及んでいることがわかる。

##### (3) 分裂に先立ったヘッジホッグ発現波の非対称化

ヘッジホッグ発現波の形状の時間的変化の定量的解析から、分裂に先立ってヘッジホッグの発現波の形状が非対称になることがわかった（図4）。具体的には、ヘッジホッグの発現波は、前後方向の軸伸長に伴って前後に広がるが、その際、発現波のピーク中心（シグナル最大値位置）のピーク後端からの距離に大きな変化が見られなかった。この観

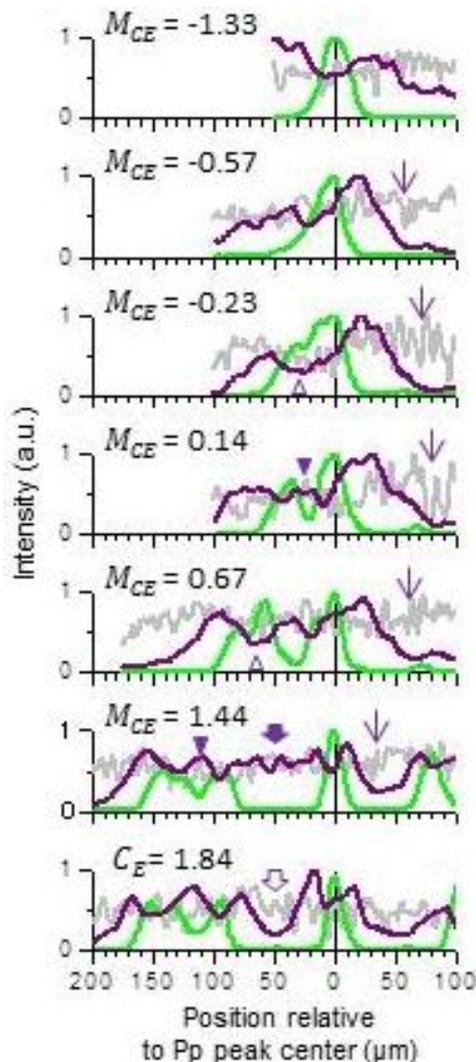


図4. 予定頭部領域におけるヘッジホッグ（緑）とパッチト（紫）のシグナル強度プロファイルの時間的変化。

察は、後方（胸部側）にヘッジホッグ発現波を安定化するシグナルが存在する可能性を示唆した。さらにアルマジロ eRNAi のデータを加えてヘッジホッグ発現波の分裂の仕組みを考えると、胸部側に由来するウイングレスシグナルを抑制するシグナル活性がヘッジホッグ発現波のピーク後方をオルソデンティクル非依存的な状態に転換し、ピーク後方が安定化されることで、前方部のオルソデンティクル依存的なヘッジホッグ発現領域との分離が誘起される可能性が考えられた。この可能性は今後の研究で検証したい。

本研究は、ヘッジホッグ発現波の移動と分裂が反応拡散系のパターン形成システムとして理解できるかを目指したが、確たる証拠を得るところまでは至らなかった。しかし、拡散因子として働くウイングレスシグナル系の関与が強く示唆されたことから、ヘッジホッグシグナル系とウイングレスシグナル

系が反応拡散システムの分子の実体である可能性は今後検証すべき課題として残った。

#### 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 1 件)

1. Kanayama, M., Akiyama-Oda, Y. Osamu Nishimura, O., Tarui, H., Agata, K. and Oda, H. (2011) Travelling and splitting of a wave of *hedgehog* expression involved in spider-head segmentation. *Nature Communications* 2, 500. DOI:10.1038/ncomms1510

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Kanayama, M., Akiyama-Oda, Y. and Oda, H. Different modes of dynamic gene expression involved in animal segmentation: oscillating vs. splitting. 日本発生生物学会 (Asia-Pacific Developmental Biology Network 共催), 2011.5.20, 沖縄

2. 小田広樹, クモ頭部の体節形成に関わるヘッジホッグの縞パターンの移動と分裂. 日本発生生物学会、秋季シンポジウム, 2011.12.20, 岡崎

3. Oda, H. and Akiyama-Oda, Y. Embryonic RNAi screen for genes involved in the mechanisms of stripe-splitting segmentation in the spider. 日本発生生物学会 (第45回) 日本細胞生物学会 (第64回) 合同年会, 2012年05月31日, 神戸

4. 小田広樹, 秋山-小田康子, 縞パターン生み出す遺伝子発現ダイナミクスの多様性: クモ胚をモデルとした研究, 日本進化学会第14回大会, 2012年08月21日~2012年08月23日, 東京

5. Oda, H. and Akiyama-Oda, Y. Three distinct modes of stripe pattern formation for embryonic segmentation in an arthropod. Evo-Devo Satellite Meeting, Asia-Pacific Developmental Biology Conference, 2012年10月05日, Taipei, Taiwan

6. Oda, H. Three distinct modes of segmentation in an arthropod embryo. Swiss-Japan Developmental Biology Meeting, 2012年11月06日, Kyoto

7. 小田広樹, 秋山-小田康子, クモ胚における縞パターン形成の3つの異なる様式, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月14日, 福岡

8. Oda, H. Background of our research on the spider *Parasteatoda tepidariorum*, First International SpiderWeb meeting, 2013年02月23日, Oxford, UK

9. Oda, H. and Akiyama-Oda, Y. *armadillo* and *orthodenticle* regulate the traveling of a

wave of *hedgehog* expression in the early spider embryo. 日本発生生物学会第46回大会, 2013年5月30日, 松江  
10. Hemmi, N., Akiyama-Oda, Y. and Oda, H. Quantitative characterization of three distinct modes of stripe formation in a dynamic epithelium of the spider embryo. 日本発生生物学会第47回大会, 2014年5月28日, 名古屋

〔その他〕

(1) JT 生命誌研究館ホームページ:

<http://www.brh.co.jp>

(2) ハエとクモ、そしてヒトの祖先を知ろう

細胞・発生・進化研究室:

<http://www.brh.co.jp/research/lab04/>

(3) Evolutionary Cell and Developmental Biology:

<http://www.brh.co.jp/en/research/lab04/>

#monograph

(4) Pt\_spiderBASE, オオヒメグモ

(*Parasteatoda tepidariorum*) の遺伝子配列データベース:

[http://www.spider-brh.jp/pt\\_spiderbase/](http://www.spider-brh.jp/pt_spiderbase/)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田広樹 (ODA HIROKI)

株式会社 生命誌研究館・主任研究員

研究者番号: 50396222