

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770241

研究課題名(和文) 体軸間相互作用による神経外胚葉サイズ決定のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of size determination of neurogenic ectoderm

研究代表者

谷口 俊介 (YAGUCHI, Shunsuke)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00505331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は体軸形成過程でその領域サイズが決定されるウニ胚神経外胚葉に着目し、一次軸および二次軸形成に關与するシグナル分子が神経外胚葉のサイズ決定に關わるメカニズムを解析することを目的に行われた。それぞれの軸形成を担う分子の阻害実験により、一次軸形成を担うWnt-JNK経路および二次軸形成を担うNodal経路がウニ胚神経外胚葉サイズ決定に重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to understand the molecular mechanisms that determine the size of neurogenic ectoderm of the sea urchin embryos, especially focusing on the molecular interaction between signaling pathways that specify the cell fate along with the primary and secondary body axes. By loss-of-function experiments for each molecules, I could show that Wnt-JNK and Nodal pathways that are important to form primary and secondary axes, respectively, are essential for sea urchin embryos to maintain the precise size of anterior neurogenic ectoderm.

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：細胞分化 体軸形成

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物が三次元の体を構築するためには、一次軸(e.g.背-腹)、二次軸(e.g.左-右)の各体軸に沿った細胞・組織・器官の正確な分化と配置が必要である。さらにこの三次元構築を実現する為には一つの軸形成が単独で正常に進行するだけでなく、各体軸同士が綿密な情報交換を行なうことが必要不可欠であると予想される。体軸形成に関する重要な知見は我が国からも報告されており、脊椎動物の左右軸に関する Nodal 経路の解明はその最たる例である(Hamada et al., 2002 Nat Rev Genet; Hirokawa et al., 2006 Cell)。一方、実験的に一次軸形成の不全を引き起こすと、多くの場合において二次軸の不全も伴うというように、各軸同士の関わりがこれまでも示唆されてきた(Danos and Yost, 1995 Development)。しかし、ふたつの軸の関連に関する報告はほとんどなく、また、2つの体軸形成情報が神経外胚葉形成過程に反映されるメカニズムやタイミングに関しては未知である。本申請における研究計画はこの点において新規の知見を与えるものである。

### 2. 研究の目的

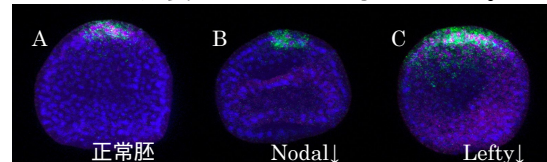
体軸間情報伝達の仕組みを解析することは、各組織・器官を構成する一つひとつの細胞がどのように“三次元の世界”を認識しているのかという発生生物学の根幹にせまるものであり、また、その分子実体の解明は再生学への応用にも期待されるものである。全体の研究プロジェクトとしては、独立した二つの軸の形成過程においてそのインターフェイスで働く転写因子とシグナル伝達分子の機能解析を行ない、一次軸形成因子と二次軸形成因子の相互作用の詳細な解析を目指す。本申請研究の具体的な目的としては体軸形成過程でその領域サイズが決定される神経外胚葉に着目し、一次軸および二次軸形成に関与するシグナル分子が神経外胚葉のサイズ決定に関わるメカニズムを解析する。

### 3. 研究の方法

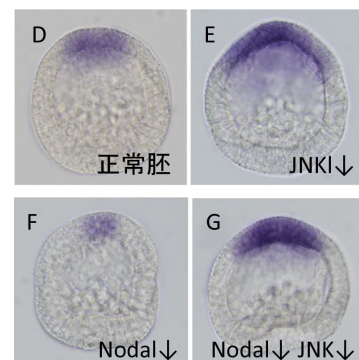
神経外胚葉のサイズ決定における Nodal 経路の役割を明らかにする。まず、Nodal 経路が予定神経外胚葉サイズの縮小過程を阻害するメカニズムを解析する。この際、リガンド・受容体・細胞内シグナル経路のどの段階で阻害機能を担っているのかを明確にする。次に、Nodal 経路に誘導されその下流で二次軸形成に関与する因子と神経外胚葉サイズ決定との関連を明らかにする。また、予定神経外胚葉領域特異的に最も早く発現する Specification gene である FoxQ2 の発現調節メカニズムを cis 解析により明らかにし、体軸形成因子との関連を考察する。さらに、可能であれば Nodal-下流因子経路の機能解析の過程や FoxQ2 の発現調節メカニズムの解析過程で一次軸形成時に予定神経外胚葉を抑制するシグナル X の候補を探索する。

### 4. 研究成果

まず、神経外胚葉の胚前端部への限局が一次軸形成依存性であると思われていたが、その過程に二次軸形成因子の Nodal が関与する事実を示した。モルフォリノオリゴのマイクロインジェクションによる Nodal ノックダウン胚では間充細胞胚期の神経外胚葉サイズが正常胚よりも縮小していた(図 A, B)。一方、Nodal のアンタゴニストである Lefty ノックダウン胚では神経外胚葉サイズが正常胚よりも拡大していた(図 C)。さらにこれらの縮小および拡大がどのタイミングで生じるかを検証したところ、受精後 12、15 時間では Nodal ノックダウン胚では正常胚と差異がなく、18 時間から差が生じることが明らかになった。しかし、Lefty ノックダウン胚では 12 時間では変化がないものの 15 時間で既に神経外胚葉サイズが正常胚のそれよりも拡大していることが明らかになった。これは神経外胚葉の正常なサイズ維持には受精後 12 時間から 15 時間の間に適切な量の Nodal が必要であることを示している。



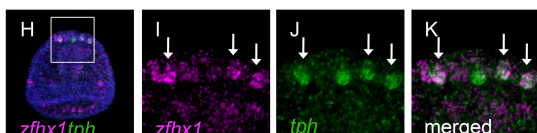
次に、外胚葉サイズ決定を制御している点に関して、Nodalシグナルが実際に相互作用しているシグナル経路の探索を中心に解析を行った。一次軸形成を担うとされている Wntシグナル全てをノックダウンするために Wnt の受容体である LRP5/6 のノックダウンを行い、一次軸形成を阻害した。その条件下では Nodal 自体が発現しないため Nodal と Wnt の関係を探るには不適切であった。そこで Wntシグナルのうち、Wnt-JNK経路のみ阻害したところ Nodal の発現は見られたため、Wnt-JNK阻害胚において Nodal 阻害を行ったところ神経外胚葉サイズが Nodal だけ阻害した胚よりも大きくなったことが確かめられた(図 D-G)。このことから Wnt-JNK経路と Nodalシグナルが相互作用している可能性が示唆された。



さらに、神経外胚葉形成に必要な転写因子 FoxQ2 の発現調節解析を行ううえで必要な情報を得るために、バフウニゲノムを解読した。それにより FoxQ2 がゲノムの中で 2 コピー存在すること、また、その転写調節領域配

列にそれぞれ微妙な違いがあることが明らかになった。現在、それぞれの upstream 8 kb までの配列をゲノムDNAから単離することができたため、今後その配列の中で重要と思われる domain の解析を行う。そのために必要な GFP コンストラクトの作成を終えたところである。

体軸形成解析の際に指標となる神経外胚葉内での神経細胞分化マーカーの単離を同時並行で進行させていたが、本研究期間内に転写因子 zinc-finger homeobox と delta がウニ胚セロトニン神経細胞分化の最も初期に現れることを発見した(図 H-K: Yaguchi et al., 2012)。



## 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 4 件) 全て査読有

1. Krupke O, Yaguchi S, Yaguchi J, Burke RD. Imaging neural development in embryonic and larval urchins. *Methods in Molecular Biology*. (2014) 1128, 147-160.
2. Jin, Y, Yaguchi S, Shiba K, Yamada L, Yaguchi J, Shibata D. Sawada H. Inaba K. Glutathione transferase theta in apical ciliary tuft regulates mechanical reception and swimming behavior of sea urchin embryos. *Cytoskeleton*. (2013) 70, 453-470.
3. Yaguchi J, Angerer LM, Inaba K, \*Yaguchi S. Zinc finger homeobox is required for the differentiation of serotonergic neurons in the sea urchin embryo. *Dev Biol*. (2012) 363, 74-83. (\*corresponding author)
4. \*Yaguchi S, Yaguchi J, Wei Z, Jin Y, Angerer LM, Inaba K. Fez function is required to maintain the size of the animal plate in the sea urchin embryo. *Development*. (2011) 138, 4233-4243. (\*corresponding author)

[学会発表](計 9 件)

1. Yaguchi, J., Takeda, N., Inaba, K., Yaguchi, S. TGF- $\beta$  signals regulate the dorsoventral patterning of neurogenic ectoderm of the sea urchin embryo. 46<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. くにびきメッセ、松江 2013 年 5 月 29 日
2. Yaguchi, S. TGF- $\beta$  signals regulate the dorsoventral patterning of neurogenic ectoderm of the sea

urchin embryo. *Developmental Biology of the Sea Urchin XXI*, Woods Hole, USA 2012 年 10 月 26 日

3. 金銀華、山田力志、澤田均、谷口俊介、稲葉一男 Analysis of the apical tuft specific proteins with LC-MS/MS. 82<sup>nd</sup> annual meeting of the Zoological Society of Japan, 旭川市神楽地区公共施設群、旭川市 2011 年 9 月 21 日
4. 谷口順子、竹田典代、稲葉一男、谷口俊介 Homeobrain is required for the differentiation of serotonergic neurons in animal plate of the sea urchin embryos. 82<sup>nd</sup> annual meeting of the Zoological Society of Japan, 旭川市神楽地区公共施設群、旭川市 2011 年 9 月 21 日
5. 谷口俊介、谷口順子、Wei Zheng、金銀華、Angerer Lynne、稲葉一男 Fez function is required for establishing a border between the neurogenic and non-neurogenic ectoderm. 82<sup>nd</sup> annual meeting of the Zoological Society of Japan, 旭川市神楽地区公共施設群、旭川市 2011 年 9 月 21 日
6. 水野克俊、谷口順子、柴小菊、谷口俊介、稲葉一男 ウニ胚繊毛運動における  $Ca^{2+}$  結合タンパク質カラクシンの機能 82<sup>nd</sup> annual meeting of the Zoological Society of Japan, 旭川市神楽地区公共施設群、旭川市 2011 年 9 月 21 日
7. Yaguchi, S, Yaguchi, J, Wei, Z, Jin, Y, Angerer, LM, Inaba, K. Intracellular FoxQ2-Fez function is required for establishing a border between the neurogenic and non-neurogenic ectoderm. *Developmental Biology of the Sea Urchin XX*, Woods Hole, USA 2011 年 4 月 28 日
8. Yaguchi, J., Takeda, N., Inaba, K., Yaguchi, S. Dynamic changes in the borders of hbn expression in the animal pole domain of the sea urchin embryo are regulated by Wnt and TGF- $\beta$  signals. *Developmental Biology of the Sea Urchin XX*, Woods Hole, USA 2011 年 4 月 28 日
9. Yaguchi, J., Inaba, K., Angerer, RC, Angerer LM, Yaguchi, S. Zinc finger homeobox is required for the differentiation of serotonergic neurons in the sea urchin embryo. *Developmental Biology of the Sea Urchin XX*, Woods Hole, USA 2011 年 4 月 28 日

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~yaguchi/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

谷口 俊介 (YAGUCHI, Shunsuke)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00505331