

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440192

研究課題名(和文) 脊索動物の器官形成におけるレチノイン酸の役割とその進化過程の解明

研究課題名(英文) Elucidation of retinoid acid-dependent mechanism of organogenesis and its evolution in chordates

研究代表者

藤原 滋樹 (Fujiwara, Shigeki)

高知大学・教育研究部自然科学系理学部門・教授

研究者番号：40229068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：レチノイン酸は脊索動物の体づくりに重要なシグナル分子である。本研究ではホヤを用いてレチノイン酸合成酵素(Raldh2)と分解酵素(Cyp26)のレポーター解析を行い、エンハンサーを特定した。転写因子MespがRaldh2のエンハンサーを活性化することが示唆された。

オタマボヤの体の形はホヤと似ているが、レチノイン酸合成経路を欠く。レチノイン酸はホヤHox1遺伝子の転写に必要ながオタマボヤHox1には必要ない。本研究では、オタマボヤHox1のエンハンサーがホヤ胚において活性化することを発見した。レチノイン酸非依存的にHox1を活性化する仕組みが両種の共通祖先に備わっていたことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Retinoic acid is a signaling molecule important for the chordate development. This study identified region-specific enhancer elements of the genes encoding retinoic acid-synthesizing and degrading enzymes (Raldh2 and Cyp26 respectively) in ascidians. Dominant negative experiments suggested that the transcription factor Mesp activates the Raldh2 enhancer.

Although the body plan of larvaceans is similar to that of ascidians, they completely lack biological pathways to synthesize retinoic acid. Retinoic acid is required for transactivation of Hox1 gene in ascidians but not in larvaceans. The present study revealed that an enhancer of larvacean Hox1 can be activated in ascidian embryos. The results suggest that a retinoic acid-independent mechanism of transactivation of Hox1 has been equipped in the common ancestor of ascidians and larvaceans. This mechanism may have enabled the larvaceans to survive the loss of retinoic acid-synthesizing pathways during their evolution.

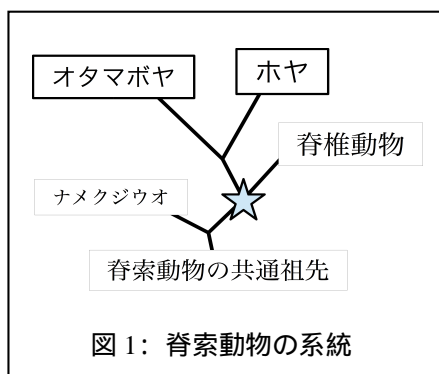
研究分野：進化発生学

キーワード：レチノイン酸 ホヤ 脊索動物 進化 Hox1 レチノイン酸合成酵素Raldh2 レチノイン酸分解酵素Cyp26 転写調節

1. 研究開始当初の背景

(1) レチノイン酸は、脊椎動物を特徴づける体の構造(背側神経管、鰓弓、神経堤細胞など)を正しく作るために必要である。脊椎動物の胚では、レチノイン酸は *Hox1* 遺伝子などの転写を調節して器官形成を制御する。ホヤの尾芽胚の体は、脊椎動物とよく似た構造をしている。しかし、ホヤのレチノイン酸受容体(RAR)や *Hox1* の機能を阻害した過去の研究ではほとんど異常が見出されなかった(Imai et al. 2006 *Science* 312, 1183-1187; Ikuta & Saiga 2010 *Development* 137, 1505-1513)。また、ホヤに近縁なオタマボヤは、そのゲノム中に RAR やレチノイン酸合成酵素(*Raldh2*)の遺伝子を持たない(Cañestro et al. 2006 *Evol Dev* 8, 394-406)。そのため、多くの人々が「ホヤの発生に(また脊索動物に特徴的な体を作るために)レチノイン酸や *Hox* は必要ない」と考えるようになった。

(2) 私たちは、ホヤの *Raldh2* と RAR を同定した(Nagatomo & Fujiwara 2003 *Gene Exp Patt* 3, 273-277; Nagatomo et al. 2003 *Mech Dev* 120, 363-372)。マイクロアレイ解析を行い *Hox1* など多数の標的遺伝子を同定した(Ishibashi et al. 2003 *Dev Growth Differ* 45, 249-259)。また、アンチセンスモルフォリノオリゴ(MO)による *Raldh2*, RAR, *Hox1* の機能阻害や、*Hox1* の突然変異体を用いた研究によって、出水孔原基(脊椎動物の内耳原基に相同)や体壁筋、咽頭鰓裂の形成にレチノイン酸と *Hox1* が必要であることを証明した(Sasakura et al. 2012 *Development* 139, 2156-2160)。レチノイン酸や *Hox1* の機能阻害の影響を、他の組織や器官でも観察・解析すれば、ホヤ胚におけるレチノイン酸の重要性を示す証拠が他にも数多く見つかるに違いない。



(3) 私たちはまた、オタマボヤ *Hox1* (*Od-Hox1*) の上流調節領域が、ホヤ胚の神経管でホヤ *Hox1* (*Ci-Hox1*) と同様に活性化することを発見した(未発表)。このことは、レチノイン酸に依存せずに *Hox1* の発現を活性化する仕組みが共通祖先(図1の)にあり、それがホヤにも残っていることを示唆する。その仕組みを調べれば、共通祖先が

レチノイン酸依存的な発生制御の仕組みをどのような過程を経て獲得し、オタマボヤが *Raldh2* や RAR を失ってなぜ絶滅しなかったのかもわかると考えられる。

2. 研究の目的

(1) *Raldh2* は、脊椎動物でもホヤでも体幹部の中胚葉で発現する。この特異的発現の仕組みは脊椎動物においても未解明である。本研究では、研究協力者の Brad Davidson 博士(Swarthmore 大学)から譲り受けた *Raldh2* 上流配列のエンハンサー活性を調べ、特異的発現の仕組みを調べる。ホヤ胚の *Raldh2* 陽性細胞は、卵割期に BMP や FGF, Wnt の影響を受ける。これらに対する応答エレメントを同定し必要性を調べる。イントロンのエンハンサー活性や、転写後調節の可能性も調べる。

(2) *Cyp26* は脳などで発現し、レチノイン酸を分解することにより、レチノイン酸の働く領域を限定している。*Cyp26* の領域特異的発現パターンはホヤと脊椎動物とでよく似ているが、その転写調節の仕組みはあまりわかっていない。本研究では、*Cyp26* の上流配列を単離してレポーター解析を行い、特異的発現の仕組みを調べる。*Cyp26* の転写レチノイン酸に応答して活性化するので、応答エレメントも同定する。

(3) *Od-Hox1* の調節領域を *lacZ* 翻訳領域に連結してホヤ胚に導入し、中枢神経系における活性化に関するエンハンサーおよび転写因子を同定する。その転写因子が *Ci-Hox1* の転写も活性化するか調べる。さらに、ホヤ *Hox1* の調節領域(Kanda et al. 2009 *Dev Biol* 335, 454-463; Kanda et al. 2013 *Dev Growth Differ* 55, 260-269)を連結したレポーター遺伝子をオタマボヤ胚に導入して、オタマボヤで機能するかどうか調べる。これらの実験は、オタマボヤを専門とする連携研究者の西野敦雄博士(弘前大学)および研究協力者の Cristian Cañestro 博士(Barcelona 大学)と共同で行う。ホヤとオタマボヤの共通祖先がどのような仕組みで *Hox1* の発現を制御していたか解明する。

(4) ホヤ胚の組織分化や形態形成にレチノイン酸がどのように関与するかを調べることは、本研究の開始当初の一つの目標であった。これについては、レチノイン酸に特に強く応答する標的遺伝子で、機能が未解明のリングフィンガータンパク質をコードする *Ci-ZF538* 遺伝子に注目して機能解析を行った。この遺伝子を対象として、ホヤでは使われたことのない vivo-モルフォリノや、CRISPR/Cas9 系を利用した機能阻害を試みた。しかし、これまでのところ、それらの方法が有効に機能しているという結果を得ることはできておらず、手法の確立が今後の課題として残されている。

3. 研究の方法

(1) レチノイン酸合成酵素 *Raldh2* とレチノイン酸分解酵素 *Cyp26* のレポーター解析

Raldh2 の上流配列は Davidson 博士から譲り受けた。この上流配列は *FoxA* 遺伝子のコアプロモーターに連結してあったので、*Raldh2* 本来のコアプロモーターに交換して *lacZ* レポーター遺伝子の 5' 上流に連結した。作製した遺伝子はエレクトロポレーションによって受精卵に導入し、*lacZ* mRNA を *in situ* ハイブリダイゼーションで検出した。上流側から、あるいは内部でさまざまな長さの欠失を作り、転写活性化に必要な塩基配列を絞り込んだ。

Cyp26 の上流配列(コアプロモーターと 5' 非翻訳領域、翻訳領域の N 末端部分を含む)は本研究のためにカタコウレイボヤゲノム DNA を鋳型として特異的 PCR で増幅し、*lacZ* 翻訳領域の上流に連結した。

ドミナントネガティブ *Mesp* も Davidson 博士から譲り受けたものを使用した。*Mesp* の翻訳領域の C 末端部分に WRPW ペプチド(転写抑制因子の共役因子 Groucho の結合配列)を付加したものである。

(2) *Od-Hox1* のレポーター解析

Cañestro 博士より譲り受けたオタマボヤゲノム DNA から、*Od-Hox1* の上流配列を単離し、*lacZ* 翻訳領域に連結した。ホヤ胚へは、エレクトロポレーションによりレポーター遺伝子を導入した。オタマボヤについては、多核の卵母細胞が詰まった卵巣に対してレポーター遺伝子を顕微注入した。後者の実験は西野博士の協力を得て弘前大学にて行った。

4. 研究成果

(1) レチノイン酸合成酵素 *Raldh2* の領域特異的発現の仕組み

Raldh2 は尾の付け根(最前列)の 3 個の筋肉細胞で発現する(図 2A)。それらのうち腹側の 2 個は 64 細胞胚の B7.5 割球に、背側の 1 個は B7.8 割球に由来する(図 2B)。前から 2 列目の 3 個の筋肉細胞でも *Raldh2* は弱く発現する(図 2)。2 列目の 3 個の細胞はすべて B7.8 系統である(図 2B)。

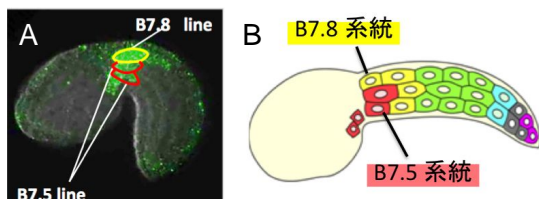


図 2: ホヤ胚における *Raldh2* の発現。**A.** *Raldh2* mRNA の発現(緑の蛍光)。**B.** 胚の模式図。B7.5 系統の細胞を赤、B7.8 系統の細胞を黄色で示した。

本研究では *Raldh2* 遺伝子上流配列を Davidson 博士から譲り受けてレポーター遺

伝子を作製した。1442 bp の上流配列は内在性の *Raldh2* と同様に筋肉細胞で発現した(図 3A)。一方、1052 bp の上流配列は B7.8 系統では活性化したが B7.5 系統では活性化しなかった(図 3B)。この結果は、転写開始点上流 -1442~-1053 の領域が B7.5 系統における転写活性化に必須であることを示唆する。

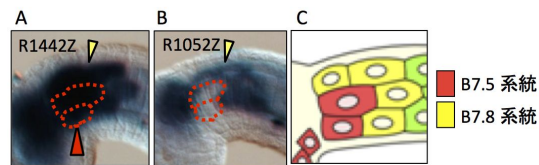


図 3: *Raldh2* のレポーター解析(1)。**A.** 上流 1442 bp を連結した *lacZ* レポーター遺伝子(R1442Z)の発現。**B.** 上流 1052 bp を連結したレポーター遺伝子(R1052Z)の発現。赤い点線は B7.5 系統の細胞。**C.** ホヤの尾部筋肉の模式図。

596 bp の上流配列は B7.8 系統の 4 個の細胞で活性化した(図 4A)。しかし、538 bp の上流配列はまったく活性化しなかった(図 4B)。この結果は、転写開始点上流 -596~-539 の領域が B7.8 系統における転写活性化に必須であることを示唆する。

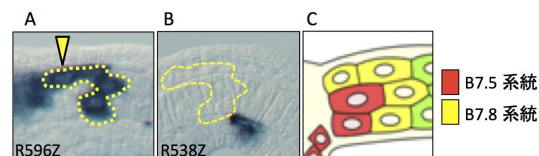


図 4: *Raldh2* のレポーター解析(2)。**A.** 上流 596 bp を連結したレポーター遺伝子(R596Z)の発現。**B.** 上流 538 bp を連結したレポーター遺伝子(R538Z)の発現。黄色の点線は B7.8 系統の細胞。**C.** ホヤの尾部筋肉の模式図。

B7.5 割球は、尾芽胚までに 2 回分裂して 4 個の細胞になり、そのうち 2 個が尾部筋肉となる。残りの 2 個は体幹部に配置し、予定心臓細胞となる(図 2B の体幹部の赤い細胞)。B7.5 系統の細胞では転写因子 *Mesp* が発現する(Satou et al. 2004 *Development* 131, 2533-2541)。本研究では、*Mesp* が *Raldh2* の転写を活性化する可能性を調べるため、Davidson 博士から譲り受けたドミナントネガティブ型 *Mesp* を、レポーター遺伝子と同時に胚に導入した。その結果、ドミナントネガティブ型 *Mesp* は、*Raldh2* レポーター遺伝子の発現を B7.5 系統の細胞で抑制したが、B7.8 系統の細胞では抑制しなかった(図 5)。

以上の結果は、B7.5 系統と B7.8 系統の筋肉細胞における *Raldh2* の発現が異なる転写調節機構によって活性化していること、B7.5 系統では *Mesp* 転写因子が *Raldh2* の転写活性化を担うことを示唆する(図 6, 論文投稿準備中)。

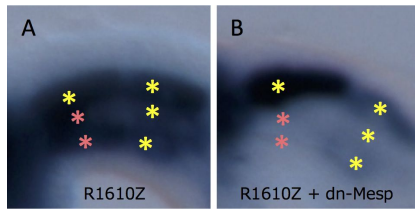


図 5: Mesp の機能阻害が *Raldh2* レポーター遺伝子の発現に及ぼす影響。A. 1610 bp の上流配列をもつレポーター遺伝子 (R1610Z) の発現。B. R1610Z をドミナントネガティブ型 Mesp (dn-Mesp) と一緒に受精卵に導入した結果。赤と黄色のアスタリスクは、それぞれ B7.5 系統と B7.8 系統の筋肉細胞。B の胚では B7.5 系統の細胞においてレポーター遺伝子が発現していない。

図 6



(2) レチノイン酸分解酵素 *Cyp26* の領域特異的発現の仕組み

Cyp26 は脳と頭部内胚葉の一部、尾の付け根の表皮と神経索で発現する (図 7A)。胚をレチノイン酸で処理すると表皮全体で発現が活性化される (図 7B)。 *Cyp26* の上流 4748 bp を連結したレポーター遺伝子 (C4748Z) を胚に導入したところ、内在性の *Cyp26* の発現をほぼ再現した (図 7C)。この胚をレチノイン酸処理すると胚全体で C4748Z が発現した (図 7D)。このことから、上流 4748 bp の領域には *Cyp26* の正常な発現を制御できるエンハンサーと、レチノイン酸応答エレメントがあることがわかった。

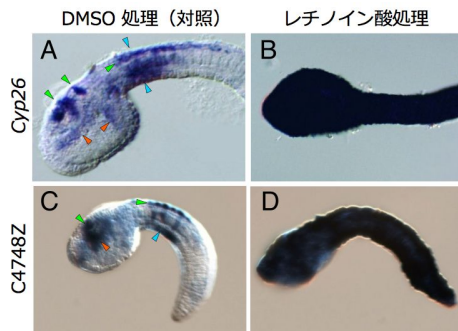


図 7: *Cyp26* の発現。A-B. *Cyp26* mRNA の発現。C-D. 4748 bp の *Cyp26* 上流配列のレポーター解析。A, C. DMSO 処理胚 (対照実験) における発現。B, D. レチノイン酸処理胚における発現。矢尻は中枢神経系 (緑), 内胚葉 (赤), 表皮 (青)。

上流配列を段階的に欠失させたところ、973 bp の上流配列は正常な領域特異的パターンを維持して転写を活性化した (図 8C)。

また、レチノイン酸処理にตอบสนองして表皮全体で発現した (図 8A)。一方、451 bp の上流配列は正常胚で転写を活性化しなかった (図 8D)。遺伝子導入胚をレチノイン酸で処理すると神経索でのみ強い応答が見られたが、表皮における応答はなかった (図 8B)。これらの結果は、正常胚における転写制御に必要な配列と、表皮で機能するレチノイン酸応答エレメントが上流 -973~-452 の間にあること、それとは別に神経索において機能するレチノイン酸応答エレメントが上流 451 bp の領域内にあることを示唆する。

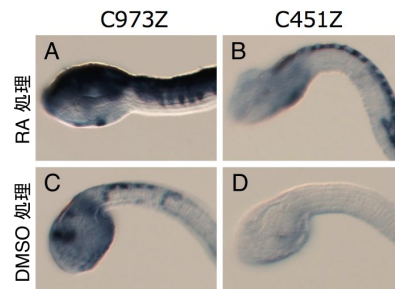


図 8: *Cyp26* のレポーター解析。A, C. 973 bp の上流配列を含むレポーター遺伝子 (C973Z) の発現。B, D. 451 bp の上流配列を含むレポーター遺伝子 (C451Z) の発現。A-B. レチノイン酸処理胚における発現。C-D. DMSO 処理胚 (対照実験) における発現。

翻訳阻害剤ピューロマイシンの存在下でも C973Z はレチノイン酸にตอบสนองしたので、この上流配列中には RAR が直接結合する配列があることが示唆された。また、*Raldh* 阻害剤のシトラールで胚を処理したとき、尾部の表皮や神経索における発現は抑制されたが、脳における発現は影響を受けなかった。このことは、脳における発現がレチノイン酸に依存していないことを示唆する。

(3) オタマボヤとホヤにおける *Hox1* 遺伝子の転写調節の比較

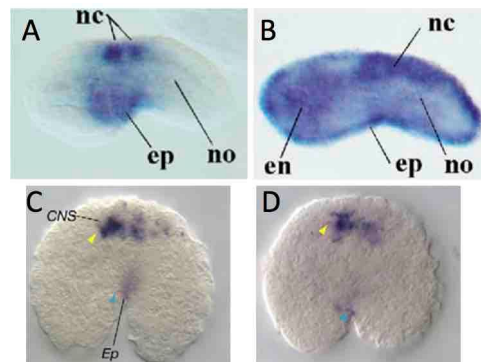


図 9: *Hox1* mRNA の発現。A-B. カタウレイボヤにおける *Ci-Hox1* の発現。C-D. ワカレオタマボヤにおける *Od-Hox1* の発現。A, C. DMSO 処理胚 (対照実験) における発現。B, D. レチノイン酸処理胚における発現。

ホヤにおいては *Ci-Hox1* 遺伝子が出水孔原基や体壁筋などの分化に必須であり、*Ci-Hox1* の発現をレチノイン酸が活性化している。一方、オタマボヤの *Od-Hox1* はホヤとよく似たパターンで発現するが、オタマボヤには *Raldh2* や *Cyp26*, *RAR* などの遺伝子が存在せず、レチノイン酸を合成する代替経路も存在しない (Cañestro & Postlethwait 2007 *Dev Biol* 305, 522-538) (図 9)。*Od-Hox1* はレチノイン酸に応答しない (図 9C, D)。

Od-Hox1 の上流配列を *lacZ* 翻訳領域に連結してホヤ胚に導入すると、神経索で発現する (図 10)。上流配列が 1017 bp より長い場合には *lacZ* が神経索で発現したが、上流配列が 968 bp になると神経索で *lacZ* が発現しなくなった (図 10D, E)。これらの結果から、*Od-Hox1* の上流 -1017~-969 の領域に、ホヤの神経索で転写を活性化できるエンハンサーが存在することがわかった。

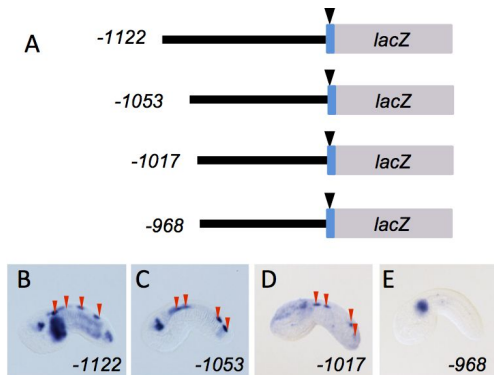


図 10: *Od-Hox1* のレポーター解析。A. さまざまな長さの上流配列を含むレポーター遺伝子の模式図。B~E. ホヤ胚における各レポーター遺伝子の発現。赤い矢尻が神経索における発現を示す。

オタマボヤ胚を用いたレポーター解析については手法が確立していないため、ホヤ胚の神経管で転写を活性化した上流配列が、本来のオタマボヤ胚の神経管で転写を活性化する活性を持つかどうかは確かめられていない。本研究では、連携研究者の西野敦雄博士の協力を得て、オタマボヤ胚への顕微注入を試みた。現在、レポーター遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで検出する実験を行っているところである。

Od-Hox1 がオタマボヤの神経索で転写されるためにレチノイン酸は必要ない。つまり RAR ではない転写因子が *Od-Hox1* の転写を活性化している。一方、ホヤ胚の神経索細胞に存在する転写因子は *Od-Hox1* の転写を活性化できた。*Od-Hox1* レポーター遺伝子を導入したホヤ胚をレチノイン酸で処理しても、レポーター遺伝子の発現は強くならなかった。この結果は、ホヤ胚の神経索において *Od-Hox1* エンハンサーを活性化した転写因子も RAR ではないということを意味する。面白いことに、*Ci-Hox1* の神経索エンハンサー中にはレチノイン酸応答エレメント (RAR

の結合する配列)があるが、その配列を変異させてもレポーター遺伝子は(弱くではあるが)神経索で発現した。つまり、*Ci-Hox1* の調節領域は RAR によっても、レチノイン酸に依存しない転写因子によっても活性化できるのである。*Ci-Hox1* エンハンサーを活性化する RAR でない転写因子と、*Od-Hox1* エンハンサーを活性化する転写因子が同じものであるならば、それらが共通祖先に存在したことが強く示唆される。共通祖先がレチノイン酸に依存するエンハンサーと依存しないエンハンサーを持ち、それらのうち片方があれば神経索における発現を活性化できた(二つのエンハンサーが redundant に機能していた)としたら、そのことが「オタマボヤがレチノイン酸を失っても *Hox1* の発現パターンを維持できた」理由を説明できるに違いない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Brozovic, M., Martin, C., Dantec, C., Duga, D., Mendez, M., Simion, P., Percher, M., Laporte, B., Scornavacca, C., Di Gregorio, A., **Fujiwara, S.**, Gineste, M., Lowe, E. K., Piette, J., Racioppi, C., Ristatore, F., **Sasakura, Y.**, Takatori, N., Brown, T. C., Delsuc, F., Douzery, E., Gissi, C., McDougall, A., Nishida, H., Sawada, H., Swalla, B. J., Yasuo, H. and Lemaire, P. ANISEED 2015: a digital framework for the comparative developmental biology of ascidians. *Nucleic Acids Research* (査読あり) Vol. 44 (2015) pp. D808-818. (doi: 10.1093/nar/gkv966)

Nakamura, J., Tetsukawa, A. & **Fujiwara, S.** Chondroitin 4-O-sulfotransferases are required for cell adhesion and morphogenesis in the *Ciona intestinalis* embryo. *Development, Growth & Differentiation* (査読あり) Vol. 57 (2015) pp. 58-67.

Nakamura, J., Yoshida, K., **Sasakura, Y.** and **Fujiwara, S.** Chondroitin 6-O-sulfotransferases are required for morphogenesis of the notochord in the ascidian embryo. *Developmental Dynamics* (査読あり) Vol. 243 (2014) pp. 1637-1645.

Michibata, J., Okazaki, N., Motomura, S., Uda, K., **Fujiwara, S.** and Suzuki, T. Two arginine kinases of *Tetrahymena pyriformis*: characterization and localization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* (査読あり) Vol.

171 (2014) pp. 34-41.

Horikawa, Y., Matsumoto, H., Yamaguchi, F., Ishida, S. and **Fujiwara, S.** Transcriptional regulation in the early ectodermal lineage of ascidian embryos. *Development, Growth & Differentiation* (査読あり) Vol. 55(2013)pp. 776-785. (2013)

Kawamura, K., Shiohara, M., Kanda, M. and **Fujiwara, S.** Retinoid X receptor-mediated transdifferentiation cascade in budding tunicates. *Developmental Biology* (査読あり) Vol. 384(2013)pp. 343-355.

[学会発表](計 8 件)

Hatakeyama, Y., Tagashira, A., Moriyama, Y., Nabeshima, M. and **Fujiwara, S.** Transcriptional regulation of the retinoic acid-synthesizing and degrading enzymes in the *Ciona intestinalis* embryo. The 8th International Tunicate Meeting (2015年7月16日), リンクステーションホール青森(青森県青森市)

田川泉実, 神田美幸, Adriana Rodríguez-Mari, Cristian Cañestro, **藤原滋樹**「ホヤとオタマボヤにおける *Hox1* 転写調節機構の比較解析」ホヤ研究集会 2014 (2014年10月13日), 筑波大学東京キャンパス(東京都文京区)

ライ=チンシー, 三田薫, **藤原滋樹**「カタユレイボヤにおける神経管形成の仕組みの解析」土佐生物学会(日本動物学会高知県支部会)(2013年12月7日), 高知大学朝倉キャンパス(高知県高知市)

笹倉靖徳, 小椋陽介, 横森類, 朴聖俊, 中井謙太, **藤原滋樹**, 吉田慶太「尾索動物のセルロース合成酵素の示す組織特異的発現の仕組み」日本動物学会第84回大会(2013年9月26日)岡山大学津島キャンパス,(岡山県岡山市)

松崎信生, 西岡雅都, **藤原滋樹**「カタユレイボヤにおける miR-124 の発現機構」日本動物学会第84回大会(2013年9月26日), 岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

Martí-Solans, J., Beliaeva, O., Kanda, M., Badia-Ramentol, J., Godoy-Marin, H., Postlethwait, J. H., **Fujiwara, S.**, Chourrout, D., Albalat, R. and Cañestro, C. Gene loss impact on EvoDevo:

dismantling the retinoic acid genetic machinery in *Oikopleura dioica*. The 7th Tunicate Meeting(2013年7月23日), ナポリ(イタリア)

Matsumoto, H., Yamaguchi, F., Horikawa, Y., Ishida, S. and **Fujiwara, S.** Transcriptional regulation in the early ectodermal lineage of ascidian embryo. The 7th Tunicate Meeting (2013年7月22日), ナポリ(イタリア)

Nakamura, J. and **Fujiwara, S.** Role of glycosaminoglycan sulfotransferases in the ascidian embryogenesis. The 7th Tunicate Meeting (2013年7月22日), ナポリ(イタリア)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 滋樹 (FUJIWARA, Shigeki)
高知大学・教育研究部自然科学系理学部
門・教授
研究者番号: 40229068

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

笹倉 靖徳 (SASAKURA, Yasunori)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号: 10400649

西野 敦雄 (NISHINO, Atsuo)
弘前大学・農学生命科学部・准教授
研究者番号: 50343116