

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460245

研究課題名(和文) 神経誘導の保証機構に働く遺伝子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of developmental canalization for the neural induction

研究代表者

竹林 公子(鈴木) (Takebayashi-Suzuki, Kimiko)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00397910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：初期胚の背腹・前後軸をそれぞれ制御するBMPとWntシグナル伝達経路の統合に働くFoxB1転写因子と同様に、2つの体軸形成に關与する新規因子として、Biz転写因子を単離し機能解析をおこなった。FoxB1とBiz転写因子の機能阻害実験を行った結果、それぞれのMOをインジェクションした場合に比べ両者を組み合わせると種々の神経マーカーの発現が著しく低下し、FoxB1とBiz転写因子が神経誘導の保証機構に重要な遺伝子ネットワークを形成することが強く示唆された。また、Oct-25転写因子の新規下流因子として単離したJunB転写因子が、後方組織である尾の形成に深く關与することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The formation of the dorsoventral (DV) and anteroposterior (AP) axes, fundamental to the body plan, is regulated by TGF- β , FGF, and Wnt signals. In order to ensure the establishment of the body plan, the processes of DV and AP axis formation must be linked and coordinately regulated. However, the mechanisms responsible for these interactions remain unclear. We studied the molecular mechanisms of neural induction and patterning regulated by Biz (BMP inhibitory zinc finger), a novel candidate involved in the coordinative regulation of the DV and AP body axes. Overexpression of Biz resulted in inhibition of BMP and activation of Wnt signaling, thereby promoted posterior neural development. Knockdown of Biz resulted in repression of neural gene expression. We found that Biz functionally interacted with FoxB1, another important factor in the coordinative regulation of DV and AP patterning. Our results suggest that Biz plays essential roles in the establishment of the body plan.

研究分野：発生生物

キーワード：発生・分化 神経誘導 転写因子 保証機構 BMP Wnt

1. 研究開始当初の背景

生物は遺伝的・環境的要因の変化に、うまく適応して生息圏を拡大している。例えば、両生類の胚は羊膜や卵殻を持たず様々な影響を受けやすいにも関わらず正常に発生することができる。これは生物が遺伝的・環境的变化に適応する仕組みを発達させてきたことを示唆し、わずかな遺伝的・環境的变化が生じても個体自身は大きく影響を受けない保証機構が存在すると考えられる。

さらにヒト胎児の先天異常に着目すると、その発症原因には大きく分けて環境要因と遺伝的要因があり、同じ環境要因にさらされても、重症化する場合と、逆に全く症状が出ない場合がある。これは個々の遺伝的要因(保証機構の破綻)が先天異常の発症につながることを示唆する。中でも、ヒトの運動・知能・感覚など生命維持すべてにつながる中枢神経系が、環境要因・遺伝的要因の変化に関わらず発生過程で確実に形成されるためには神経形成の保証機構が必要だと考えられた。

研究代表者は神経外胚葉に発現する FoxB1 転写因子が、BMP と Wnt シグナル伝達経路の統合的制御にはたらき、カエル初期胚の背腹・前後軸を制御すること、また、上流で働く Oct-25 転写因子と feed-forward ネットワークを形成し神経誘導を保証していることを明らかにした(Takebayashi-Suzuki et al. *Developmental Biology*, 2011)。feed-forward 遺伝子ネットワークの存在によって FoxB1 単独の機能阻害は神経誘導にほとんど影響しない。その理由として 外胚葉内の他の神経誘導因子と協調し神経誘導を保証している、外胚葉を裏打ちする中胚葉との間の協調的な神経誘導保証作用が存在する、という2つの可能性が考えられた。FoxB1 機能欠損マウス胚でも初期の神経誘導は正常で後期の神経形成に異常が認められることから(Labosky et al., *Development*, 1997, 他数編)、カエル以外の動物種にも保存された保証機構が存在する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、FoxB1 転写因子が関与する神経誘導の保証機構に着目し、FoxB1 と他の制御因子の協調作用を解析することで、保証機構に重要な遺伝子ネットワークを明らかにする。そして、保証機構の障害により発生異常が生じるメカニズムを体系的に理解して、先天異常の発症機構の解明につなげることを目的とした。

研究代表者は FoxB1 転写因子と同様に背腹軸と前後軸の両方の形成に関与する Biz 転写因子の単離に成功しており、外胚葉内で FoxB1 と Biz 転写因子が協調して神経誘導の保証機構にはたらく可能性が考えられた。これらの協調作用を解析することによって、外胚葉内の神経誘導保証機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

さらに Oct-25 の下流因子として FoxB1 以外にも複数の因子(新規 Oct-25 下流因子)を単離しており、これらは、Oct-25/FoxB1 と共に神経誘導の保証機構として働いている可能性が考えられた。そこで新規 Oct-25 下流因子の1つである JunB 転写因子の初期胚におけるはたらきを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) FoxB1 転写因子と同様に背腹軸と前後軸の両方に関与する新規因子である Biz 転写因子の発生段階における発現時期と領域を同定した。Biz 転写因子の過剰発現、あるいは機能阻害をおこない、カエル胚での表現型解析(形態、分化マーカーの発現)や外胚葉細胞における分化マーカーの発現を RT-PCR 法および WISH 法で解析をおこなった。

(2) 新規 Oct-25 下流因子の1つとして単離した JunB 転写因子の発生段階における発現時期と領域を同定した。JunB 転写因子を過剰発現してカエル胚での表現型解析(形態、分化マーカーの発現)や外胚葉細胞における分化マーカーの発現を RT-PCR 法で定量をおこなった。

4. 研究成果

(1) FoxB1 転写因子と同様に背腹軸と前後軸の両方に関与する Biz 転写因子は受精卵の時期から発現しており神経誘導期にも予定神経領域に発現していることを確認した。さらに Biz 転写因子の過剰発現実験により、神経マーカーの発現を誘導し表皮マーカーの発現を抑制すること(背腹軸の制御)、および後方神経マーカーの発現を誘導し前方神経マーカーの発現を抑制すること(前後軸の制御)を明らかにした。FoxB1 と Biz 転写因子の各々を阻害するモルフォリノオリゴで機能阻害を行った結果、それぞれの MO をインジェクションした場合に比べ両者を組み合わせると神経マーカー NCAM、N-tubulin、および後方神経マーカー HoxB9 の発現が著しく低下し、FoxB1 と Biz 転写因子が神経誘導の保証機構に重要な遺伝子ネットワークを形成していることが強く示唆された。さらに、BMP と Wnt シグナル伝達経路に対する Biz 転写因子の作用機序についても明らかになりつつある。

(2) JunB 転写因子は受精卵期から発現し初期神経胚期に神経板の後方領域で発現が上昇することがわかった。さらに後期になると胚後方の尾部に発現がみられたため、JunB 転写因子の過剰発現を行なった結果、尾芽様の突起物を異所的に誘導することがわかった。JunB 転写因子は後方組織である尾の形成に深く関与することを明らかにし、学術論文として報告した。

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2件)

1. Hitoshi Yoshida, Maya Okada, Kimiko Takebayashi-Suzuki, Naoto Ueno, and Atsushi Suzuki* "Involvement of JunB proto-oncogene in tail formation during early *Xenopus* embryogenesis", *Zoological Science*, 査読有, Vol. 33 No. 3, in press, 2016 (*Corresponding author)

2. * Atsushi Suzuki, Uno, Y., Takahashi, S., Grimwood, J., Schmutz, J., Mawaribuchi, S., Yoshida, H., Kimiko Takebayashi-Suzuki, Ito, M., Matsuda, Y., Rokhsar, D., and Taira, M. "Genome organization of the *vg1* and *noda13* gene clusters in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*" *Developmental Biology*, 査読有, in press (Apr. 2016), DOI:10.1016/j.ydbio.2016.04.014 (*Corresponding author)

〔学会発表〕(計16件)

1. Hitoshi Yoshida, Maya Okada, Kimiko Takebayashi-Suzuki, Naoto Ueno and Atsushi Suzuki "A role of JunB proto-oncogene in tail formation and morphogen signal integration during early *Xenopus* embryogenesis", International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research, 2016年03月18日、「岡崎カンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)」

2. Atsushi Suzuki 他16名, "National BioResource Project (NBRP) for *Xenopus*: recent developments at the Asian hub for the international *Xenopus* research community", *Xenopus* PI meeting 2015, 2015年09月29日、「Woods Hole (USA)」

3. 吉田和史、岡田麻耶、竹林公子、上野直人、鈴木 厚、「複数のモルフォゲンシグナルを統合する新奇尾部誘導因子の解析」、第9回日本ツメガエル研究集会、2015年09月15日、「秋田温泉さとみ(秋田県・秋田市)」

4. 鈴木 厚、「ナショナルバイオリソースプロジェクト・ネットイツメガエル」、第9回日本ツメガエル研究集会、2015年09月14日「秋田温泉さとみ(秋田県・秋田市)」

5. 鈴木 厚、他34名、「アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)のゲノム解析と異質倍数体におけるゲノム進化」、新学術ゲノム支援「2015年度拡大班会議」、2015年08月27日、「国立京都国際会館・アネックスホール(京都市・京都市)」

6. 鈴木 厚「ゲノム・遺伝子から見た発生の仕組みとナショナルバイオリソースプロジェクト・ネットイツメガエル」、理科おもしろ実験教室、2015年08月10日、「赤穂市立有年中学校(兵庫県・赤穂市)」

7. 鈴木 厚「ナショナルバイオリソースプロジェクト・ネットイツメガエル」、第48回日本発生生物学会・日本ツメガエル研究会総会、2015年06月05日、「つくば国際会議場(茨城県・つくば市)」

8. Hitoshi Yoshida, Maya Okada, Kimiko Takebayashi-Suzuki, Naoto Ueno and Atsushi Suzuki "Identification of a novel tail organizing factor that integrates morphogen signaling pathways in *Xenopus*" 「モルフォゲンシグナルの統合に働く新しい尾部オーガナイザー因子の同定と解析」、第48回日本発生生物学会、2015年06月4日、「つくば国際会議場(茨城県・つくば市)」

9. 鈴木 厚、「学振・ポスドク申請書を書く前にやっておくべきこと、およびナショナルバイオリソースプロジェクト・ネットイツメガエル技術講習会」、生化学若い研究者の会中四国支部 生命科学 春セミナー、2015年05月09日、「広島大学医学部(広島県・広島市)」

10. 吉田和史、岡田麻耶、竹林公子、上野直人、鈴木 厚「モルフォゲンシグナルの統合に働く新しい尾部オーガナイザー因子の同定と解析」日本動物学会中国四国支部・県例会、2015年3月3日、「広島大学(広島県・東広島市)」

11. 竹林公子、小西秀典、吉田和史、岡田麻耶、鈴木 厚「胚発生初期に背腹と頭尾のパターン形成が調和するしくみ」日本動物学会中国四国支部・県例会、2015年3月3日、「広島大学(広島県・東広島市)」

12. Kimiko Takebayashi-Suzuki, Hidenori Konishi, Hitoshi Yoshida, Maya Okada, Atsushi Suzuki "Establishment of vertebrate body plan via coordinated regulation of dorsal-ventral and anterior-posterior patterning during early *Xenopus* embryogenesis" 2014年8月24日-28日、15th International *Xenopus* Conference, 「California (USA)」

13. Atsushi Suzuki and Kimiko Takebayashi-Suzuki "Establishment of vertebrate body plan via coordinated regulation of dorsal-ventral and anterior-posterior patterning during early *Xenopus* embryogenesis" 第47回日本発生生物学会、2014年5月27日-30日、「ウ

インクあいち (愛知県・名古屋市)」

14. Kimiko Takebayashi-Suzuki, Hidenori Konishi and Atsushi Suzuki
“ Establishment of vertebrate body plan via coordinated regulation of dorsal-ventral and anterior-posterior patterning during early *Xenopus* embryogenesis ” International symposium “ Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing ”、2014年3月28日-29日、
「 広島大学 (広島県・東広島市) 」

15. 鈴木 厚、竹林公子 「背腹軸と頭尾軸の統合的制御によるボディプラン形成と形態多様化のメカニズム」第7回日本ツメガエル研究集会、2013年9月24日、「秋吉台国際芸術村(山口県・秋吉台)」

16. Suzuki, A. and Takebayashi-Suzuki, K.
“ Establishment of vertebrate body plan via coordinated regulation of dorsal-ventral and anterior-posterior patterning and developmental canalization ” 第46回日本発生生物学会、2013年5月30日、「くにびきメッセ(島根県・松江市))

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/amphibia/Suzuki/suzukitop.html>

<http://seeds.office.hiroshima-u.ac.jp/profile/ja.95dd2808fd1fa7ba520e17560c007669.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹林 公子 (鈴木) (TAKEBAYASHI Kimiko (SUZUKI))

広島大学・大学院理学研究科・研究員

研究者番号：00397910

(2) 研究分担者

鈴木 厚 (SUZUKI Atsushi)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：20314726