

# ホヤ胚における脊索形成の遺伝子カスケード

(12308038)

平成12年度～平成14年度 科学研究費補助金  
基盤研究 (A) (2) 研究成果報告書



平成16年3月

研究代表者 佐藤 矩 行  
(京都大学大学院理学研究科 教授)

## は し が き

本報告書は、平成 12 年度から平成 14 年度の 3 年間にわたって行われた基盤研究 (A) (2) 「ホヤ胚における脊索形成の遺伝子カスケード」の成果をまとめたものである。

まず初めに、本研究は研究代表者・佐藤矩行の単独の研究である。しかし実際には、佐藤ゆたか（京都大・院・理・助手）、今井 薫（現、学振 PD）、高橋弘樹（現、国立岡崎研究機構・基生研・助手）、堀田耕司（現、学振 PD）、平山和子（教務補佐員）、Mike Levine（カリフォルニア大学バークレイ校）を初めとして、当研究室のスタッフおよび大学院生たちの協力がなくてはなしえなかったものであり、ここに深く感謝したい。

脊索動物は、ホヤなどの尾索動物、ナメクジウオの頭索動物、そして我々ヒトを含む脊椎動物からなる。また、脊索動物は、約 5.5 億年以上前に、新口動物（棘皮動物＋半索動物＋脊索動物）の共通祖先から、脊索・背側神経管・鰓裂といった全く新しい形質を組織化しながら進化してきたと考えられている。脊索は、脊索動物という動物群の名前がそこから由来するように、脊索動物を特徴づける最も重要な形質の一つである。個体発生学的観点に立てば脊索は中軸中胚葉と呼ばれる。自身は内胚葉からの誘導によって形成され、その後その背側に中枢神経系を誘導し、さらに側方の中胚葉などに働いて体の中軸となる。脊索はまた、原腸形成または原条形成において著しい集中と伸長（コンバージェント・エクステンション）を行い、脊索動物の形態形成運動に重要な役割を果たす。一方、進化機能形態学的観点に立てば、脊索は著しく空胞化した細胞が互いに密な結合をつくって構成する弾力のある支持器官である。その表面は結合組織性の脊索鞘によって取り囲まれ、この支持器官の存在により幼生の尾の筋肉の屈曲が支えられていると考えられる。

本研究では、ホヤ胚における脊索形成の遺伝子カスケードの全貌を明らかにすることを目標として研究を行った。これまでに、脊索形成が異常となるゼブラフィッシュの突然変異体が幾つか解析され脊索形成が幾つかの素過程から成ることがわかっているが、脊索そのものの形成の分子メカニズムについてはまだ不明な点が多い。1990 年にマウスの突然変異体 *Brachyury*（短尾）の原因遺伝子がクローニングされ、その後、この遺伝子は T-box とよばれる新規の DNA 結合ドメインを含む転写因子をコードすることがわかった。ホヤのオタマジャクシ幼生の発生に伴って尾の中央に正確に 40 個の細胞からなる脊索が形成され、

その細胞系譜は完全に明らかにされている。我々がホヤ *Brachyury* 遺伝子を単離しその発現パターンを調べてみると、この遺伝子は予定脊索細胞でのみ発現し、そのタイミングは脊索細胞の発生運命の限定のタイミングと一致することがわかった。さらにこの遺伝子を異所的に発現させてみると、予定内胚葉細胞などが脊索細胞に変化する。したがって、少なくともホヤ *Brachyury* 遺伝子は脊索形成のマスター遺伝子として働くと考えられる。そこで、後述するように、ホヤ *Brachyury* (*Ci-Bra*) の下流で働く遺伝子の cDNA クローンの単離を試みたところ、*Ci-Bra* によって活性化する約 500 個の遺伝子の cDNA クローンの単離に成功した。そしてこれら全遺伝子の発現パターンを調べた結果、その中の 40 個が脊索に特異的または優先的に発現する遺伝子のものであることをつきとめた。

本研究の目的は、こうした研究のバックグラウンドのもとで、*Brachyury* を中心にしてホヤ脊索形成の全貌を明らかにすることである。そのために、(1) *Ci-Bra* の上流遺伝子カスケード、すなわち受精卵から始まってどのような分子メカニズムによって *Ci-Bra* の活性がもたらされるのかについて、また (2) *Ci-Bra* の下流遺伝子カスケード、すなわち *Ci-Bra* によってどのような遺伝子が活性化されて実際の脊索形成に至るかを中心に研究した。そして、「研究の成果」で示すように、それなりの成果が得られたものと確信している。

現代発生生物学の最も重要な研究課題の一つは、発生遺伝子のネットワークシステムを理解することである。多くの発生遺伝子が発生遺伝学的解析から明らかにされてきたこともあって、マスター遺伝子（たとえばホメオボックス遺伝子）の下流で働き、実際に構造をつくり出すにいたる遺伝子カスケードがブラック・ボックスのままになっている場合が多い。本研究はホヤ *Brachyury* の下流で働く多くの脊索特異的遺伝子を得て「器官形成における遺伝子カスケード」の解明という点でブレークスルーとなりうる研究でもある。また「発生と進化」の分子メカニズムに関する研究が活発化している。本研究の成果は、脊索という新口動物を特徴づける形質がどのように生まれたのかを、それを作り出した遺伝子 *Brachyury* をもとに理解することにつながった。したがって、本研究はこの分野の研究としての独創性の高いものでもある。

そしてこうした研究成果の全体像を、*Nature Reviews, Genetics* 4: 285-295 (2003) で公表できたことは、望外の喜びである。

平成 16 年 3 月

佐 藤 矩 行

## 研究組織

研究代表者： 佐 藤 矩 行 （京都大学大学院理学研究科 教授）

## 交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

|          | 直接経費    | 間接経費   | 合計      |
|----------|---------|--------|---------|
| 平成 12 年度 | 20, 600 | 0      | 20, 600 |
| 平成 13 年度 | 10, 500 | 3, 150 | 13, 650 |
| 平成 14 年度 | 8, 400  | 2, 520 | 10, 920 |
| 総計       | 39, 500 | 5, 670 | 45, 170 |

## 研究発表

### (1) 学会誌等

#### 2001

1. Shimauchi, Y., Murakami, S. D. and Satoh, N. (2001). FGF signals are involved in the differentiation of notochord cells and mesenchyme cells of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development* **128**, 2711-2721.
2. Nishino, A., Satou, Y., Morisawa, M. and Satoh, N. (2001). *Brachyury (T)* gene expression and notochord development in *Oikopleura longicauda* (Appendicularia, Urochordata). *Dev. Genes Evol.* **211**, 219-231.
3. Nishino, A. and Satoh, N. (2001). The simple tail of chordates: Phylogenetic significance of appendicularians. *genesis* **29**, 36-45.
4. Satoh, N. (2001). Ascidian embryos as a model system to analyze expression and function of developmental genes. *Differentiation* **68**, 1-12.

#### 2002

5. Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., ....., Kohara, Y., Levine, M., Satoh, N. and Rokhsar, D. S. (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **298**, 2157-2167.
6. Imai, K. S., Satoh, N. and Satou, Y. (2002). Early embryonic expression of *FGF4/6/9* gene and its role in the induction of mesenchyme and notochord in *Ciona savignyi* embryos. *Development* **129**, 1729-1738.
7. Imai, K. S., Satou, Y. and Satoh, N. (2002). Multiple functions of a Zic-like gene in

the differentiation of notochord, central nervous system and muscle in *Ciona savignyi* embryos. *Development* **129**, 2723-2732.

8. Imai, K. S., Satoh, N. and Satou, Y. (2002). An essential role of a *FoxD* gene in notochord induction in *Ciona* embryos. *Development* **129**, 3441-3453.
9. Takada, N., York, J., Davis, J. M., Schumpert, B., Yasuo, H., Satoh, N. and Swalla, B. J. (2002). *Brachyury* expression in tailless molgulid ascidian embryos. *Evol. Dev.* **4**, 205-211.

## 2003

10. Satoh, N. (2003). The ascidian tadpole larva: Comparative molecular development and genomics. *Nature Rev. Genet.* **4**, 285-295.
11. Satoh, N., Satou, Y., Davidson, B. and Levine, M. (2003). *Ciona intestinalis*: an emerging model for whole-genome analyses. *Trends Genet.* **19**, 376-381.

佐藤矩行 (2000). 進化発生生物学の誕生. 科学 70, 329-334.

佐藤矩行・高橋弘樹・堀田耕司 (2001). ホヤの脊索形成機構. 細胞工学 20, 417-419.

佐藤矩行・佐藤ゆたか・小原雄治 (2003). ホヤ・ゲノムの解読: 動物の進化・比較ゲノム科学の新展開. 細胞工学 22, 776-783.

## (2) 口頭発表

### [外国]

Satoh, N., Ascidian notochord formation: Evolution and development. NASA Evolution and Development Meeting, Woods Hole, USA, July 29-31, 2000.

Satoh, N., *Ciona* cDNA project and genome project. BSDB/Genetics Society Joint Spring Meeting on Evolution of Developmental Mechanisms, York, UK, March 20-23, 2002.

Satoh, N., Imai, K.S., Satou, Y., The making of notochord in ascidian embryos --- Genetics cascade underlying the occurrence of an evolutionarily epoch-making event. Evolution of Developmental Diversity, Cold Spring Harbor Lab. Symp., Cold Spring Harbor, USA, April 17-20, 2002.

Satoh, N., The ascidian tadpole larva and the origin of chordates. Evolution of Developmental Processes, München, Germany, March 30-31, 2003.

Satoh, N., Genes regulating ascidian development. Developmental Biology of Sea Urchins and other Basal Deuterostomes XV, Woods Hole, USA, Sept. 26-29, 2003.

[国内]

今井薫・佐藤矩行・佐藤ゆたか、ユウレイボヤ (*Ciona savignyi*) の中胚葉形成における Cs-ZicL および Cs-FGF4/6/9 の役割、第 35 回日本発生生物学会大会、平成 14 年 5 月 23 日

高橋弘樹・堀田耕司・山田成宏・佐藤矩行・上野直人、カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) 脊索形成の分子機構、第 36 回日本発生生物学会大会、平成 15 年 6 月 11 日

堀田耕司・山田成宏・五條堀孝・佐藤矩行・上野直人・高橋弘樹、ホヤ脊索形成過程における転写抑制因子 Mad ホモログ *Ci-Noto7* の機能解析、第 36 回日本発生生物学会大会、平成 15 年 6 月 11 日

山田成宏・堀田耕司・佐藤矩行・上野直人・高橋弘樹、カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) 脊索特異的遺伝子群の細胞内局在、第 36 回日本発生生物学会大会、平成 15 年 6 月 12 日

(3) 出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

## 研 究 成 果

「はしがき」で述べたように、脊索は脊索動物を特徴づける最も重要な形質である。脊椎動物の発生においては、脊索は内胚葉からの誘導によって形成され、その後その背側に中枢神経系を誘導し、さらに側方の中胚葉などに働いて体の中軸となる。脊索はまた、原腸形成または原条形成において著しい集中と伸長（コンバージェント・エクステンション）を行い、脊索動物の形態形成運動に重要な役割を果たす。

ホヤの発生にともなってオタマジャクシ幼生の尾部に正確に 40 個の細胞からなる脊索が形成され、その系譜は完全に記載されている。前方の 32 個は 8 細胞胚の A4.1 割球対に由来し（A 系統）、後方の 8 個は 8 細胞胚の B4.1 割球対に由来する（B 系統）。本研究では主として A 系統について述べるが、A 系統では 64 細胞期の A7.3 および A7.7 ペアで脊索細胞への発生運命の限定がおこり、後に 4 回の分裂を経て 32 個の脊索細胞ができる。またこれまでのマボヤを使った研究から、32 細胞期におこる内胚葉からの誘導により 64 細胞期に脊索細胞の発生運命の決定がおこると考えられている。

1927 年にマウスの尾が短くなる突然変異体ブラキユリー [*Brachyury (Bra)* または *T*] が報告された。そしてその後 60 年以上を経た 1990 年にその原因遺伝子が単離された。*Bra* はマウス胚の脊索を中心とする内中胚葉で発現し、ホモ変異体は脊索を初めとした内中胚葉形成が不完全で致死になる（ヘテロ変異体では生まれた仔の尾が短くなる；*Brachyury* は短尾を意味する）。その後、この遺伝子が T-ドメインと呼ばれる新規の DNA 結合ドメインをもつ転写因子をコードすること、哺乳類を中心として 20 以上の遺伝子からなる T-ボックス遺伝子ファミリーを形成し、発生のさまざまな過程で働いていることなどがわかってきている。*Bra* は次のような理由からホヤ脊索形成の最重要発生遺伝子と考えられる。(1) ホヤの *Bra* は 64 細胞期から脊索細胞でのみ発現し、その発現のタイミングは予定脊索割球の発生運命の限定のタイミングと一致する。(2) *Bra* の機能を阻害すると脊索細胞の分化がおこらなくなる（予定脊索細胞はその発生運命を内胚葉細胞に変える）。(3) *Bra* を予定内胚葉細胞などで異所的に発現させると予定内胚葉細胞などは脊索細胞に分化する。

したがって、本研究では、カタユレイボヤの *Brachyury (Ci-Bra)* の発現に至る *Ci-Bra* 上流遺伝子カスケードと、*Ci-Bra* の働きによって脊索が形成される *Ci-Bra* 下流遺伝子カスケードを研究した。

### (1) *Ci-Bra* 上流遺伝子カスケードの解析

(a) ホヤ胚の内胚葉分化における  $\beta$ -カテニンの役割： 先行研究によって脊

索の分化には内胚葉からの誘導が必須であり、そのシグナル分子として FGF が示唆されていた。したがって、64 細胞期における *Ci-Bra* 発現に至るまでの遺伝子的カスケードを内胚葉分化との関連において明らかにする必要がある。 $\beta$ -カテニンは Wnt シグナル伝達系で Tcf と協同して標的遺伝子の転写を制御する役割を担い、最近さまざまな動物で、初期胚の軸形成に  $\beta$ -カテニンが重要な役割を担っていることが示されている。Imai *et al.* (Development 127, 3009-3020, 2000) は、ユウレイボヤ (*Ciona savignyi*) およびカタユウレイボヤ (*C. intestinalis*) の  $\beta$ -カテニン遺伝子を単離し、その機能を研究した結果、(1) 母性的に供給された  $\beta$ -カテニンは未受精卵の細胞質に存在するが、受精とともに植物極とくに予定内胚葉細胞の核に移行する；(2)  $\beta$ -カテニンの核移行を阻害すると内胚葉の分化がおこらず、多くの胚細胞はその発生運命を表皮に変える。その結果、脊索細胞の分化はおこらない；(3)  $\beta$ -カテニンを過剰発現させ、核移行を内胚葉細胞以外でもおこさせると、多くの胚細胞はその発生運命を内胚葉に変える。この時、予定脊索細胞もその発生運命を内胚葉に変える。したがって脊索細胞の分化はおこらない、ことを示した。この結果は、ホヤ胚の内胚葉細胞分化は  $\beta$ -カテニンによってもたらされ、この正常な内胚葉細胞分化が脊索の分化に必須であることを示している。

(b)  $\beta$ -カテニン標的遺伝子の解析： 上に述べた  $\beta$ -カテニンの役割から、*Ci-Bra* 上流遺伝子カスケードの研究は、 $\beta$ -カテニンの核移行がどのように *Ci-Bra* の活性化に結びつくかを明らかにすることになる。そこで、Satou *et al.* (Development 128, 3559-3570, 2001) および Imai (Differentiation 71, 346-360, 2003) は、 $\beta$ -カテニン機能阻害胚と過剰発現胚の mRNA をサブトラクションすることによって、 $\beta$ -カテニン標的遺伝子の単離を試みた。その結果、*Lhx3*, *FoxA*, *FoxD*, *ZicL*, *FGF9/16/20* などがその標的遺伝子として得られた。このうち *Lhx3* は 32 細胞期から内胚葉で発現し、その機能を阻害すると内胚葉分化がおこらないことから、内胚葉分化に必須なものと考えられる。

*FGF9/16/20* は 16 および 32 細胞期の内胚葉で発現するが、この遺伝子の機能を阻害すると間充織細胞の分化がおこらないことから、*FGF9/16/20* は間充織の分化誘導に働いていると考えられる。*FGF9/16/20* の脊索分化誘導についてはまだ今後の研究課題である。

(c) *FoxD* 遺伝子および *ZicL* 遺伝子と *Ci-Bra* 活性化： 脊索細胞分化と関連して興味深いのは *FoxD* 遺伝子である。この遺伝子は、16 および 32 細胞胚の内胚葉細胞で一過的に発現する。*FoxD* 遺伝子の 5' 発現調節領域に Tcf 結合配列が存在し、ここに変異を加えると発現が認められなくなることから、*FoxD* は  $\beta$ -カテニンの直接の標的遺伝子と考えられる。おもしろいことに、この遺伝子の機能を阻害しても内胚葉の分化はおこる。しかし脊索細胞の分化がおこ

らなくなる。したがって、*FoxD* は内胚葉細胞の脊索分化誘導にもっぱら働く遺伝子と考えられる。さらに *ZicL* 遺伝子は 32 細胞期の予定脊索細胞／神経索細胞で発現するが、*FoxD* の機能阻害実験などから、直接的標的遺伝子かどうかは不明としても、*FoxD* の下流遺伝子であることは確かであり、また *ZicL* の機能を阻害すると *Ci-Bra* の発現がおこらなくなる。したがって、本研究によって、 $\beta$ -カテニン $\rightarrow$ *FoxD* $\rightarrow$ *ZicL* (および *eFGF*)  $\rightarrow$  *Bra* という主たる転写因子カスケードが明らかになった。

## (2) *Ci-Bra* 下流遺伝子カスケード

(a) *Ci-Bra* 下流標的遺伝子の単離： 先行研究で、我々は、*Ci-Bra* の下流で脊索特異的に働く遺伝子の cDNA クローンの単離を試みた。ホヤの *fork head* 遺伝子は主として内胚葉と脊索で発現する。この遺伝子のプロモーターを利用して *Ci-Bra* を内胚葉で強制的かつ異所的に発現させることができる。エレクトロポレーション法によって得られた大量の *Ci-Bra* 強制発現胚と正常胚 mRNA の cDNA をサブトラクションすることによって、約 900 個の *Ci-Bra* 強制発現胚特異的 cDNA クローンの単離に成功した (Takahashi *et al.*, *Genes & Dev.* 13, 1519-1523, 1999)。EST 解析によって重複を除き、ドットプロット解析によりこれらの遺伝子が本当に *Ci-Bra* によって活性化されるか否かを確かめた結果、約 500 クローンが残った。そしてこれら 500 クローンの発現パターンをホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションによって調べた結果、その中の 40 個が脊索に特異的または優先的に発現する遺伝子のものであることをつきとめた。

(b) *Ci-Bra* 下流遺伝子の同定： これらの *Ci-Bra* 下流遺伝子のうち 20 個の cDNA の全塩基配列を決定した結果、これらの脊索特異的遺伝子がコードするタンパク質の中に、LIM only protein (転写因子のコファクターとして機能する可能性をもつ分子)、collagen  $\alpha 1$  (脊索鞘の形成に関わると思われる分子)、fibroblast-type tropomyosin、LAR-transmembrane tyrosine phosphatase (ショウジョウバエのモーターアクソン・ガイダンスに必須の分子)、cdc45, ezrin/radixin/moesin (ERM) (細胞外シグナルによる細胞の変形に関与する細胞骨格分子ファミリー) など、細胞接着・細胞分裂・細胞の変形などに関与する分子が存在することを明らかにした (Hotta *et al.*, *Develop. Biol.*, 224, 69-80, 2000)。現在、残りのすべての cDNA クローンの全塩基配列の決定を行いつつあり、これら脊索特異的遺伝子のレパートリーを明らかにすることによって、脊索が分子的・構造的・機能的にどのような器官であるのかを明らかにしたいと考えている。

これまでの研究から、Brachyury タンパク質の認識配列として、ACCTAGGT というコア配列を含む TTTACACCTAGGTGTGAAA パリンドロームが明らか

にされている。また最近の研究で、コア配列の半分でも Brachyury タンパク質の認識配列として機能することが報告されている。本研究と平行しつつ、我々は日米の研究グループと共同でカタユレイボヤのゲノムの解読を進め、2002 年末にドラフト・ゲノムの解読に成功した (Science 298, 2157-2167, 2002)。それにより、上記 20 遺伝子の上流配列情報を得ることができた。そこでこれらの配列に留意しつつこれら 20 遺伝子の発現調節領域を調べてみると、ほとんどの遺伝子の発現調節領域に Brachyury タンパク質認識配列を認めることができた。したがって、これらの *Ci-Bra* 下流遺伝子の多くは、直接的標的遺伝子と考えられる。

(c) *Ci-Bra* 下流遺伝子の機能： 上に述べたように、これまでの研究から、*Ci-Bra* 下流遺伝子として、脊索細胞の形の変化に関わる遺伝子 (例えば *Ci-PKI* や *Ci-ERM*)、代謝に関わる遺伝子 (例えば *Ci-PTP* や *Ci-ASAT*)、細胞周期に関わる遺伝子 (*Ci-cdc45*) などが明らかになっている。これらの遺伝子の機能をモルフォリノを使って確かめてみると、多くの遺伝子の機能阻害は脊索細胞の集中・伸長運動の阻害をもたらし、尾部の正常な形成がおこらなくなる。これらの事実は、*Bra* は脊索細胞に形態形成運動能を付加することによって、脊索特異的な器官形態の具現化に関与していると考えられる。

要約すると、ホヤでの脊索という構造は、まず母性の  $\beta$ -カテニンに始まる転写および細胞間シグナルの発生遺伝子カスケードによって脊索形成の鍵となる T-ボックス遺伝子 *Bra* が活性化され、次に *Bra* の働きによって主として形態形成運動に関わる多くの遺伝子が活性化されることによって形成される。本研究は、これらの遺伝子カスケードのほぼ全貌を明らかにしたものといえる。