

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

◆ 記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		NISHIDA HIROKI					
①研究代表者氏名		西田 宏記			②所属研究機関・部局・職		大阪大学・大学院理学研究科・教授
③研究課題名	和文	局在 mRNA と誘導的細胞間相互作用によるホヤ胚発生の制御					
	英文	Control of embryogenesis of ascidians by localized mRNAs and embryonic induction					
④研究経費		平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	平成20年度	総合計
18年度以降は内約額 金額単位：千円		26,000	13,600	13,600	13,600	13,700	80,500
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
西田 宏記	大阪大学・大学院理学研究科・教授	発生生物学	研究計画の総括と、ホヤ胚発生における母性局在 mRNA の役割				
熊野 岳	大阪大学・大学院理学研究科・助手	発生生物学	ホヤ胚発生における誘導的細胞間相互作用の解析				
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>ホヤは近年、発生過程の詳細な記述、初期発生のしくみの理解度の高さ、ゲノムプロジェクトの完了などにより、発生生物学における新たなモデル動物として注目を集めている。本申請ではマボヤの初期発生を司るしくみの理解をさらに押し進めるため、母性の局在因子、特に卵内で局在している mRNA について詳細かつ網羅的な解析を行う、また、受精後 32 細胞期あたりからスタートする誘導的細胞間相互作用について、シグナルに対する応答能を制御する因子、そして誘導によって引き起こされる非対称細胞分裂の制御メカニズムを解析することを目的とする。研究計画調書には、以下のように4つのテーマを掲げていた。</p>							
<p>1. 卵内で局在している因子の解析</p> <p>受精卵後極に局在する母性 mRNA の機能解析</p> <p>内胚葉決定因子に関する解析</p>							
<p>2. 誘導的細胞間相互作用の制御</p> <p>誘導における応答能の制御</p> <p>誘導によっておこる非対称分裂の解析</p>							

⑦これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

1. 卵内で局在している因子の解析

受精卵後極に局在する母性 mRNA の機能解析

Type I postplasmic mRNA の 1 つである *Hr-POPK-1* の機能を解析した。*Hr-POPK-1* は kinase をコードしている。特異的な翻訳阻害剤であるモルフォリノアンチセンスオリゴ(MO)の注入によって *POPK-1* の機能を阻害した胚は、*macho-1* 機能阻害胚と似たような表現型を示し、筋肉と間充織がほとんどの胚で形成されなかった。エピスタシス解析の結果 *Hr-POPK-1* は *macho-1* の上流で働くことがわかった。結局、*Hr-POPK-1* 機能阻害胚では、*macho-1* を含めすべての *Type I postplasmic* mRNAs の局在が異常になっていた。卵割期初期では局在が正常よりやや広がり、その後正常よりもかなり小さい領域に局在した。*Type I* mRNA は、卵表層を裏打ちしている小胞体（表層 ER）にアンカーされ、卵割期には表層 ER とともに胚後極に移動して、最終的には胚後極の小さな構造である Centrosome-Attracting Body (CAB) に濃縮されることがわかっている。*Hr-POPK-1* 機能阻害胚では、胚後極に濃縮された表層 ER 領域が小さくなっており、それに一致して *Type I* mRNA の局在領域も小さくなっていった。さらに、CAB の形成も異常になることがわかった。よって、*Hr-POPK-1* が表層 ER を胚後極に濃縮することによって、*Type I* mRNAs の局在に関与するのと同時に、生殖顆粒を含む CAB の形成にも関与することが示唆された。

内胚葉決定因子に関する解析

マボヤの β -catenin の抗体の作成に成功したので、初期発生過程における β -catenin の局在を観察した。その結果、植物極の内胚葉系列割球での核局在を検出した。また、wnt/ β -catenin 経路に関与すると考えられる因子の MO を受精卵に注入し、 β -catenin の核局在の変化と β -catenin の標的遺伝子と考えられる *lim*, *FGF*, *FoxA*, *FoxD*, *ZicN* の発現パターンの変化を観察した。その結果、*Wnt5a* のノックダウン胚において β -catenin の核局在に変化が見られ、*lim* の前方での発現が消失し、*ZicN* の発現が低下した。また、*Dsh* のノックダウン胚においては *lim* の後方での発現が消失した。特に *lim* については *Wnt5a* のノックダウン胚では前方の発現、*Dsh* のノックダウン胚では後方の発現のみが影響を受けたことから、 β -catenin による標的遺伝子の転写制御は画一的でなく少なくとも植物半球の前方と後方において異なった機構が存在する可能性が示唆された。

2. 誘導的細胞間相互作用の制御

誘導における応答能の制御

マボヤ脊索誘導において外来性の FGF シグナルに対する応答能を制御している内在性の因子を同定する手始めとして、*FoxD* と FGF のマボヤオーソログ(*Hr-FoxDa* と *Hr-FGF9/16/20*)を単離した。そして、これら遺伝子の脊索誘導における機能を解析するとともに、既に報告されていた *ZicN* と *FoxA* との関係性を調べた。その結果、(1) FGF は脊索誘導に必須なこと、(2) *FoxD* は *ZicN* の上流で働き、その働きは誘導される側の細胞に必要なこと、(3) *FoxA* もまた脊索形成に必要で、さらに *ZicN* の発現に必要であり、誘導される側の細胞において必要とされることが示された。

次に、これら誘導される側の細胞で発現する遺伝子が、FGF と協調して異所的に脊索を作り出せるかどうかを調べたところ、*FoxD* と *ZicN* に関しては FGF シグナル存在下でも、脊索特異的遺伝子である *brachyury* の異所的な発現を導くことはできなかった。それに比して、*FoxA* 注入胚では異所的な *brachyury* 遺伝子の発現を生じ、この発現が FGF シグナル依存的であることがわかった。さらに、この *FoxA* による *brachyury* の異所的な発現には、*FoxA* と同時にその下流の *ZicN* も必要であることがわかった。したがって、マボヤ脊索誘導においては、*FoxA* と *ZicN* の両者が応答能を制御する内在性因子として働き、細胞外からの FGF シグナルと協調して脊索を形成していくことが示唆された。

FGF シグナルや細胞内因子がどのように統合されて脊索運命の限定に働いているのかを知るためには、脊索特異的遺伝子 *Brachyury* の初期発現がどのように制御されているのかを調べる必要があった。我々は *Brachyury* プロモーターのレポーター解析を初期胚(110細胞期)で行ない2つのエンハンサー領域

(-598bp/-499bp 領域と -398bp/-300bp 領域)を同定した。-598bp/-499bp 領域は3つの Ets 結合配列を含み FGF-responsive element であることが確定した。-398bp/-300bp 領域上には上記の研究で同定された細胞内因子である *Zic* と *Fox* の予想結合配列が存在した。ゲルシフトアッセイにより確認したところ、*ZicN* は強く結合し、*FoxA* はかすかなシフトバンドが検出された。それぞれの予想結合配列に変異を入れるとエンハンサー活性が弱まることから、これらの配列が内在性応答因子-responsive element であると考えられた。したがって、内在性の *FoxA*, *ZicN* と、細胞外からの情報である FGF シグナルが合一し統合される場としては、*brachyury* 遺伝子の転写調節領域上であることがわかった。

誘導によっておこる非対称分裂の解析

次のページの特記事項を参照してください。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

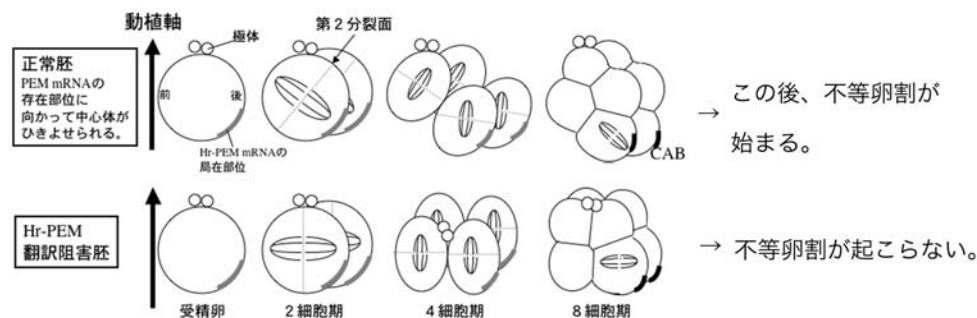
これまでの研究により当初の目的を遂行してきたが、その結果として予想外のおもしろい結果が二つ得られている。これらに関しては、その意味するところがおもしろくかつ重要なので、現在論文を作成中であるがインパクトのある科学雑誌に投稿が可能であると思っている。

PEMによる不等分裂の制御とホヤにおける正しい動物-植物軸の提案

卵割面の定位は重要な発生のメカニズムの一つである。マボヤにおいても8細胞期(第4卵割)以降に最後の割球においてのみ CAB(Centrosome-Attracting Body)と呼ばれる構造が微小管束を介して中心体を引き寄せることで卵割面をコントロールして、大小の大きさの異なる割球を産み出す不等卵割が3回続けておこる。CABに母性 mRNA が局在していくことが分かっている postplasmic RNA の一つである PEM (posterior end mark) の機能を解析した。PEM の翻訳をアンチセンスオリゴにより阻害すると不等卵割が等卵割になった。PEM 翻訳阻害胚では、形態的な CAB に変化はなかったが、それにつながる微小管束の形成は見られなかった。すなわち、PEM は不等卵割に必要な微小管束の形成に働くと考えられる。

さらに、PEM 翻訳阻害胚の8細胞期の形態から、不等卵割が起こる以前にも、すなわち第3卵割においても、卵割面の決定に PEM が関わっていることが明らかになった。PEM を翻訳阻害した4細胞期胚において分裂装置を観察したところ、コントロール胚に比べて分裂装置が正常のように傾かず直立に近い向きで形成されることがわかった。

さらに、いくつかの証拠から第2卵割も、PEM によりコントロールされており、第2卵割面は以前考えられていたのとは異なり、動植物軸に対して傾いている可能性が考えられた。そこで、生体において動物極の指標である極体と同時に卵割面の形成や分裂装置を観察することで、動植物軸に対して第2卵割面が傾いていることを示した。すなわち、これまで考えられていたホヤ胚の動植物軸は間違っており、ホヤにおける正しい動植物軸を提案した(下図)。



脊索誘導における前方外胚葉からの新規シグナルの関与

脊索誘導においては、誘導が起こる時点ではいまだ応答細胞の発生運命が一つに限定されていないが、内胚葉からの FGF の作用により、脊索/神経索細胞の発生運命を持つ親細胞は非対称分裂を行い、内胚葉と接する側に位置する娘細胞が脊索細胞に、それとは反対側の前方外胚葉と接する娘細胞は神経索細胞に非対称分裂を行う。この過程で FGF が作用する方向が脊索/神経索細胞の非対称分裂の方向性を決定するのに重要であるか否かを調べる実験を行った。意外なことに、単に前方外胚葉細胞を除去するだけで、神経索細胞の代わりに脊索細胞が形成されることがわかり、さらに、前方外胚葉が接する側からいくら FGF を作用させても、前方外胚葉が存在する限り、神経索系列に異所的に脊索を作ることは難しいことがわかった。さらに詳しい実験を行った結果、脊索誘導において脊索細胞の位置が決定される際に、FGF が作用する方向に加えて、前方外胚葉からの抑制シグナルが、前方の娘細胞が脊索にならないように保証していることが判明した。この前方外胚葉からの抑制シグナルは、FoxA の発現を神経索系列で抑制している。前ページで明らかにした事実より、脊索の形成には内在性応答能因子である FoxA/ZicN と誘導シグナルである FGF が必須であることがわかっているが、前方外胚葉からのシグナルは内在性応答能因子のひとつである FoxA の発現を抑制することで脊索誘導を抑制していることが解った。

このことは、予定脊索/神経索細胞が非対称分裂を行う前に前後の両側から分裂面と直行するようにふたつの相反する作用を持つシグナルを受け取ることで極性化されることを示している。この前方外胚葉からの抑制シグナルの発見により、これまでうまく説明することができなかった、脊索誘導に関するいくつかの実験結果を明瞭に説明できることがわかった。

最終的に、脊索形成において FoxD/FoxA/ZicN を含めた転写因子ネットワークと、FGF や前方外胚葉からの細胞外誘導シグナルとが巧みに絡み合うことにより、脊索前駆細胞での内在性応答能因子 FoxA/ZicN の発現を保証し、これら応答能因子と FGF シグナリングとの相互作用により、胚の正しい位置に脊索を作り出していることが明らかになった。間充織・脳という FGF によって誘導される他の組織における内在性応答能因子はそれぞれすでに Macho-1 と GATA であることがわかっており、ホヤ胚における初期誘導の全体像をかなり理解することが可能となったことは、特筆に値する。

- ⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

「原著論文」

1. Akanuma, T., and Nishida, H. Ets-mediated brain induction in embryos of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev. Genes Evol.* (2004) 214, 1-9.
2. Taniguchi, K., and Nishida, H. Tracing cell fate in brain formation during embryogenesis of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Dev. Growth Differ.* (2004) 46, 163-180.
3. Kawai, N., Takahashi, H., Nishida, H., and Yokosawa, H. Regulation of NF- κ B/Rel by I κ B is essential for ascidian notochord formation. *Dev. Biol.* (2005) 277, 80-91.
4. Sawada, K., Fukushima, Y., and Nishida, H. Macho-1 functions as transcriptional activator for muscle formation in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Gene Express. Patt.* (2005) 5, 429-437.
- 5. Nakamura, Y., Makabe, K. W., and Nishida, H. POPK-1/Sad-1 kinase is required for the proper translocation of maternal mRNAs and putative germ plasm at the posterior pole of the ascidian embryo. *Development* (2005) 132, 4731-4742.
- 6. Nakamura, Y., Makabe, K. W., and Nishida, H. The functional analysis of *Type I postplasmic/PEM* mRNAs in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Dev. Genes Evol.* (2006) 216, 69-80.
- 7. Kumano, G., Yamaguchi, S., and Nishida, H. Overlapping expression of FoxA and Zic confers responsiveness to FGF signaling to specify notochord in ascidian embryos. *Revision in Dev. Biol.*
8. Matsumoto, J., Kumano, G., and Nishida, H. Promoter analysis for initiation of notochord-specific expression of *brachyury* gene of the ascidian *Halocynthia roretzi*. In preparation.
9. Kim, G. J., Kumano, G., and Nishida, H. Extracellular signal from opposite sides polarize and promote asymmetric division of notochord/nerve cord precursor cells in ascidians. In preparation.

「欧文総説」

1. Nishida, H. Specification of embryonic axis and mosaic development in ascidians. *Dev. Dynam.* (2005) 233, 1177-1193.

「国際会議招待講演」

1. Nishida, H., Nakamura, Y. Role of localized maternal mRNAs in eggs of a basal chordate, the ascidian *Halocynthia roretzi*. International Congress of Experimental Biology. April 2-6, 2005, San Diego, USA.
2. Nishida, H., Nishio, T., and Fijii, S. Culture, cleavage pattern, and gastrulation of *Oikopleura dioica*. 3rd International Tunicate Meeting. July 9-13, 2005. Santa Barbara, USA.
3. Kumano, G., Matsumoto, J., Yamaguchi, S., Kim, G. J., and Nishida, H. Zic and FoxA cooperate with FGF signaling to specify notochord cells in ascidian embryos. 3rd International Tunicate Meeting. July 9-13, 2005. Santa Barbara, USA.
4. Nishida, H., Nakamura, Y., and Negishi, T. Role of localized maternal mRNAs in eggs of a basal chordate, the ascidian *Halocynthia roretzi*. 15th International Congress of Developmental Biology. Sept. 3-7, 2005. Sydney, Australia.
5. Nishida, H. Notochord formation in ascidian embryos. 1st Meeting Italy-Japan on "VERTEBRATE ORGANOGENESIS" April. 24-26, 2006, Ischia, Italy

- ⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

「学会」

1. 中村依子、真壁和裕、西田宏記 Kinase POPK-1はホヤ胚後極でのmRNA局在化に関与する。日本発生生物学会、2004年6月、名古屋
2. 西尾孝也、西田宏記 オタマボヤの飼育法、発生、原腸陥入について。日本発生生物学会、2004年6月、名古屋
3. 庭野智子、西田宏記 マボヤのWnt-5は脊索の収斂伸張に細胞自律的に関わっている。日本動物学会、2004年9月、神戸
4. Nishida, H. Role of localized maternal mRNAs in eggs of a basal chordate, the ascidian. The CDB Symposium 2005 "Origin and Development of the Vertebrate Traits" 2005年4月、神戸
5. 熊野岳, 山口聡史, 金吉中, 西田宏記 マボヤ胚脊索誘導における応答能制御因子の解析。日本発生生物学会、2005年6月、仙台
6. 松本潤, 熊野岳, 西田宏記 FGFシグナルとZic転写因子によるマボヤ脊索特異的遺伝子の発現制御機構。日本発生生物学会、2005年6月、仙台
7. Francois Prodon, Christian Sardet, Hiroki Nishida. The animal - vegetal (A - V) polarity of ascidian eggs is established during oocyte maturation. 日本発生生物学会、2005年6月、仙台
8. Kim, G. J., Kumano, G., and Nishida, H. Direction of an FGF signal from endoderm and a signal from anterior epidermis pattern the vegetal hemisphere in ascidian embryos. The 60th Annual Meeting of the Korean Association of Biological Sciences. 2005年、8月、Daejeon, Kore
9. Matsumoto, J., Kumano, G., Nishida, H. Initial expression of notochord specific Brachyury gene requires Ets, Zic and FoxA binding sites in ascidian embryos. 15th International Congress of Developmental Biology. Sept. 3-7, 2005. Sydney, Australia.
10. Kumano, G, Yamaguchi, S, Kim, GJ, Nishida, H. Zic and FoxA cooperate with FGF signaling to specify notochord cells in ascidian embryos. 15th International Congress of Developmental Biology. Sept. 3-7, 2005. Sydney, Australia.
11. 藤井勢津子、西田宏記 ワカレオタマボヤ*Oikopleura dioica*の初期卵割過程の記載。日本動物学会、2005年10月、つくば
12. 河合成道、西田宏記 マボヤ初期発生過程における β -cateninたんぱく質の局在解析。日本動物学会、2005年10月、つくば
13. 真壁和裕、田端義敏、西田宏記、荒木良子、安倍真澄 マボヤ初期胚の表皮・神経分化運命分岐における高感度トランスクリプトーム解析。日本動物学会、2005年10月、つくば
14. 榎本敬、熊野岳、西田宏記 マボヤの脊索誘導における応答能喪失のメカニズム。日本動物学会、2005年10月、つくば
15. Kumano, G., Matsumoto, J., Yamaguchi, S., Kim, G. J. and Nishida, H. Zic and FoxA cooperate with FGF signaling to specify notochord cells in ascidian embryos. The CDB Symposium 2006 "Logic of Development" 2006年4月、神戸