

# 形態形成を制御するシグナル分子ネットワークの解明

## Elucidation of the Network of Signaling Molecules in Morphogenesis

(研究プロジェクト番号 : JSPS-RFTF 96L00406)

## プロジェクトリーダー

上野 直人 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所・教授

## コアメンバー

高橋 淑子 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科・助教授



## 1. 研究目的

細胞増殖因子の細胞内シグナル伝達や細胞外における分泌から受容体への結合までの制御機構を明らかにすることによって形態形成を制御するシグナルシステムのネットワークを明らかにするとともに動物進化の過程でのシグナル分子ネットワークの保存性、多様化について解明することを目的とする。

## 2. 研究成果概要

細胞増殖因子は合成された後どのように活性化し、どのような調節を受けているのか。また、近傍の標的細胞への作用、すなわち遺伝子の活性化や不活性化はどのように調節されているのかについて探り、形態形成を司る形原（モーフォゲン）の実体やその勾配の存在の有無についても検討した。また、線虫およびショウジョウバエを用いてシグナル分子ネットワークの保存性、多様性についても研究し数々の興味深い成果を得た。

## 2.1 動物の背腹、頭尾はどのように決まるのか

ほとんどの動物は頭尾、背腹、左右の3つの体軸をもつ。アフリカツメガエルの胚発生における体軸形成は、オーガナイザーと呼ばれる領域に依存している。オーガナイザーは背側中胚葉や神経形成に必須の領域であり、我々はすでに胚の腹側では細胞増殖因子 BMP の働きによってその形成や作用が抑制されていることを明らかにしてきた。BMP による腹側化のシグナル伝達機構を明らかにするために、我々は BMP の標的遺伝子であるホメオボックスタンパク質 Xmsx-1 に着目し、胚に内在する Xmsx-1 活性の必要性について解析を行った。転写活性化因子 VP16 タンパク質の転写活性化領域と N 末端側を一部欠いた Xmsx-1 を融合した変異 Xmsx-1 mRNA のよる過剰発現は Xmsx-1 の腹側化活性を阻害し背側化した。したがって、本来 Xmsx-1 は BMP による腹側化に必要な転写抑制因子であると結論付けた。同変異 Xmsx-1 mRNA を胚の腹側へ過剰発現するよって主に頭部を欠いた二次軸を形成することを見いだした。これは内在の Xmsx-1 の機能を阻害したことによるものと考えられる。さらに、より強い Xmsx-1 阻害活性を示す N 末端領域を含む完全長 Xmsx-1 と VP16 との融合変異体は、単独で初期胚腹側に過剰発現すると、発現量に依存して高い頻度で眼やセメント腺を含む頭部を誘導した。これらのことから、Xmsx-1 は頭部形成に関わることが予想された。最近の研究からオーガナイザーは機能的に頭部オーガナイザーと胴部オーガナイザーの二つに分けられ、胴部オーガナイザーは chordin, noggin, follistatin 等によって BMP 活性のみを抑制する一方、頭部オーガナイザーは Wnt アンタゴニストである Cerberus, Dkk, Frzb 等を分泌し、両オーガナイザーの作用によって BMP と Wnt, nodal シグナルが同時に阻害されることで頭部領域が誘導されると考えられている。我々はこれらのオーガナイザー活性

と BMP 活性との拮抗メカニズムを詳細に解析し、その結果、Xmsx-1 は TGF- $\beta$  family のひとつ Xnr-1 の細胞内シグナルに必須の転写活性化複合体から FAST「因子を排除することによって、Xnr-1 シグナルに拮抗することを明らかにした。また、我々は BMP 標的遺伝子 Xmsx-1 機能阻害により異所的にほぼ完全な頭部が形成されたことから、BMP シグナルの遮断は頭部形成に必要十分であると考え、さまざまな BMP アンタゴニストによるより完全な BMP 活性の阻害を試み、組み合わせによって頭部が効率よく誘導されることを明らかにした。これは BMP シグナルの遮断は頭部形成に必要十分であるとする我々の仮説が正しいことを示している。

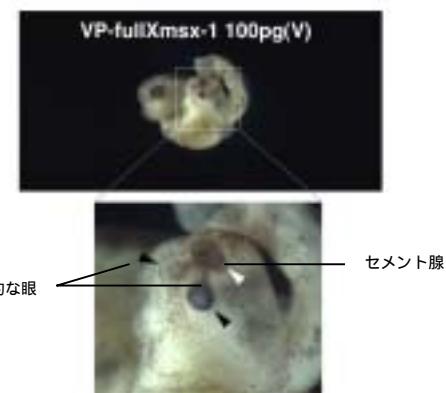


図 1. Xmsx-1 活性の阻害による異所的頭部形成  
内在 Xmsx-1 活性を胚の腹側で阻害することにより腹側に眼や頭部先端に見られる器官、セメント腺などを伴う異所的頭部が形成された。

## 2.2 増殖因子の作用範囲はどのように決まるのか

個体発生の過程では均一な細胞集団が細胞分化によって徐々に異なる性質をもった細胞集団に区画化されていく。この「パターン形成」には細胞間相互作用が必須であり、細胞増殖因子が中心的な役割を担っていることが明らかにされてきた。とくに BMP、アクチビン、ノーダルに代表される TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する細胞増殖因子は初期発生における体軸形成といった基本的なボディープランの確立から器官形成までパターン形成に必須の役割を担っていることが知られている。しかしながら、細胞増殖因子がその産生細胞から分泌された後どのように標的細胞に作用を及ぼし、パターンを形成するのかについては不明な点が多い。我々は、BMP の発現パターンを *in situ* hybridization で観察すると BMP 発現領域は予定神経領域と相補的であり、BMP が長距離にまで拡散して神経分化を抑制する long range signal というより、むしろ近距離でのみ作用する short range シグナルとして作用し、産生細胞の近傍にのみ作用するという知見に基づき、BMP とは対照的に様々な実験系において拡散性が

高いことが認められているアクチビンとの作用範囲の差異について解析した。我々は long range signal であることがよく知られているアクチビンと BMP の拡散効率の差は BMP のアミノ末端側に存在する塩基性アミノ酸によるものであると予想し、この領域を欠損、あるいはアラニンに置換した変体を用いて構造と作用範囲について解析を行った。その結果、変異 BMP は生物活性や受容体への親和性は変わらないものの、拡散性が著しく高くなっていることを明らかにした<sup>7)</sup>。

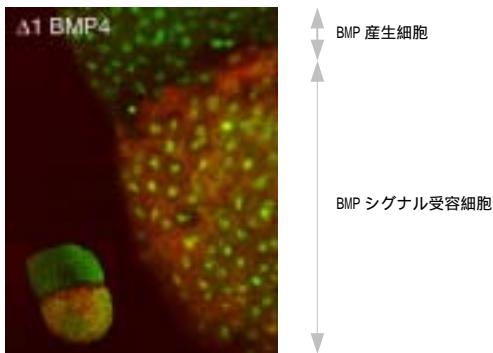


図 2. BMP-4 の N 末端領域の欠損による拡散性の獲得  
N 末端領域の塩基性アミノ酸を欠いた BMP-4 ( $\Delta 1\text{BMP-4}$ ) は長距離の拡散性を獲得し赤く染色された BMP シグナルの受け手となる細胞群全体にわたって Smad1 の核移行を促している（核が緑色で染色されている）。

また、この変異体が欠失した塩基性アミノ酸は本来ヘパリンとの相互作用に関わっているという結果を得ており、BMP の拡散がヘパリン硫酸プロテオグリカンとの相互作用によって制御されていることを示した。

### 2.3 動物の大きさはどのように決まるのか

我々はすでに *C. elegans* から同定した新規 TGF- $\beta$  様リガンド *dbl-1* の機能欠損突然変異株は、その体長が野生型 (1.2mm) に比して短い (0.8mm) ことを見いだし、*DBL-1* が体長調節を制御するリガンドであることを明らかにした<sup>3)</sup>。我々は *C. elegans* における体長調節のメカニズムを探るために、*DBL-1* シグナルの標的細胞で、*DBL-1* のシグナル伝達を介在する受容体 *SMA-6* に着目した。同受容体はその機能欠損変異によって *DBL-1* 変異と同様に体長が短くなることから、*DBL-1* シグナルによる体長調節に必要な受容体であることがわかっている。我々はレポーター遺伝子を用いて、*sma-6* 遺伝子は咽頭筋、腸、下皮細胞 (hypodermis) に発現することを見いだした。次にこれらのいずれの組織で *DBL-1* シグナルが体長調節に必須であるのかを探るため、体長が短い表現型を示す *sma-6* 突然変異体に対して *SMA-6* をさまざまな組織特異的プロモーターで発現する遺伝子導入個体を作出し救助効果を行った結果、下皮細胞で発現させた時の野生型に近い体長まで回復することを明らかにした。したがって *DBL-1* の標的細胞は *SMA-6* の発現細胞のうち下皮細胞であると結論付けた。次に我々は *DBL-1* による体長調節の分子メカニズムを探るため、マクロアレイによって *DBL-1* によって発現制御を受ける標的遺伝子を探索した。体長が短い表現型を示す *dbl-1* 欠失変異体と *DBL-1* 過剰発現によって体長が長い *DBL-1* 遺伝子導入株から調製した mRNA を用いてハイブリダイゼーションし、シグナル強度に差のある遺伝子をスクリーニングし、それらに対して dsRNAi を行って機能阻害を試みた。その結果、*DBL-1* により負の発現調節を受け、また dsRNAi

によって体長が長い表現型を示した遺伝子 *yk298h6* を同定した<sup>8)</sup>。同遺伝子は *lon-1* 近傍にマップされ、*lon-1* 救助実験から LON-1 そのものをコードしていることが明らかになった。*lon-1* は 312 アミノ酸からなる新規膜タンパク質をコードしており、下皮細胞の倍数性を調節していることが判明した。LON-1 を筋肉や腸に発現させても Lon 表現型は野生型に回復しないが、下皮細胞に発現させると効率よく野生型と同様の体長に救助される。したがって、SMA-6 同様、下皮細胞における LON-1 機能が体長の負の調節に重要であると考えられる。

### 2.4 脊椎動物における分節化のしくみ (高橋淑子)

すべての脊椎動物の体には、脊椎骨や肋骨などに代表されるように、からだの前後軸に沿って分節と呼ばれる組織の規則正しい繰り返し構造が認められる。初期個体発生過程において、分節化はまず体節中胚葉内で認められ、後に体節分節が中枢神経系の分節をも支配する。従って分節現象の本質を解明するには、体節分節のしくみを理解する必要がある。我々は、分節現象を総合的に理解することを目的に、分節化の各段階を司る分子メカニズムを解析した。これまでに、形態的境界の形成には、隣接する細胞同士の相互作用が重要であることなどを見いだし、この境界形成の誘導シグナルを“セグメンター”と名付けた。また、セグメンターが Notch シグナルを介してその活性を発揮していることを見いだした。その際、Notch 活性のオン/オフ境界が形態的分節に必須であることがわかった。次に、セグメンターによる境界形成誘導を受けた細胞の上皮化には低分子量 G タンパクである Rho ファミリーの Rac1 が体節分節における細胞の上皮化に深く関わっている知見を得ている。さらに、シグナルシークエンストラップ法を用いて分節現象に関わるシグナル分子の同定を進めており、現在までに体節特異的発現をみせる分泌タンパク質遺伝子を 15 種類同定した。

### 主な発表論文

- Iemura, S., Yamamoto, T. S., Takagi, C., Uchiyama, H., Natsume, T., Shimasaki, S., Sugino, H. and Ueno, N. Direct binding of follistatin to a complex of bone morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early Xenopus embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9337-9342, 1998.
- Nikaido, M., Tada, M., Takeda, H., Kuroiwa, A. and Ueno, N. In vivo analysis using variants of zebrafish BMPR-IA: range of action and involvement of BMP in ectoderm patterning *Development* 126, 181-190, 1999
- Morita, K., Chow, K. and Ueno, N. Body length and male tail ray pattern formation of *Caenorhabditis elegans* are regulated by a member of TGF- $\beta$  family. *Development* 126, 1337-1347, 1999
- Mochii, M., Yoshida, S., Morita, K., Kohara, Y. and Ueno, N. Identification of transforming growth factor- $\beta$ -regulated genes in *Caenorhabditis elegans* by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 15020-15025, 1999
- Nishita, M., Hashimoto, M. K., Ogata, S., Laurent, M. N., Ueno, N., Shibuya, H. and Cho, K.W. Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 403, 781-785, 2000
- Yamamoto, T. S., Takagi, C., Hyodo, A. C. and Ueno, N. Suppression of head formation by Xmsx-1 through the inhibition of intracellular nodal signaling. *Development* 128, 2769-2779, 2001
- Ohkawara, B., Iemura, S.-I., ten Dijke, P. and Ueno, N. Action range of BMP is defined by its N-terminal basic amino acid core. *Curr. Biol.* 12, 205-209, 2002
- Morita, K., Flemming, A., Sugihara, Y., Mochii, M., Suzuki, Y., Yoshida, S., Wood, B., Kohara, Y., Leroi, A. M. and Ueno N. A *C. elegans* TGF- $\beta$ , *DBL-1*, controls the expression of LON-1 that regulates polyploidization and body length. *EMBO J.* 21, 1063-1073, 2002
- Tonegawa, A., Takahashi, Y. Somitogenesis controlled by Noggin. *Dev. Biol.* 202, 172-182, 1998
- Funayama, N., Sato, Y., Matsumoto K., Ogura T., Takahashi Y. Coelom formation: binary decision of the lateral plate mesoderm is controlled by the ectoderm. *Development* 126, 4129-4138, 1999