

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440101

研究課題名(和文)三次元の体を構築するための体軸間相互作用の分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular interaction between two axes specification to built 3D body

## 研究代表者

谷口 俊介 (YAGUCHI, Shunsuke)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00505331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では二次軸形成因子NodalがfoxQ2抑制性一次軸形成シグナルを抑制する詳細な分子メカニズムを明らかにすることを最終的な目的とした。金属イオン処理により、一次軸形成過程の一端を担うと思われる遺伝子候補が発見され、現在その機能解析を詳細に行っているところである。また、過去の研究データに基づいた遺伝子探索と機能解析により、Wnt7が一次軸形成時のfoxQ2抑制の最後のパートを担っている可能性を示唆した。さらに、二次軸形成シグナルのNodalがWnt7の機能を抑制しており、適切なサイズのfoxQ2発現領域(後の神経外胚葉)形成を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The research goal is to understand the molecular mechanisms of the linkage that connects the embryonic axis specification and formation in the sea urchin. My previous work showed that the secondary axis specifier Nodal suppressed the primary axis formation. To investigate the detailed molecular mechanisms of this linkage, we blocked the function of Wnt7, as a ligand candidate for the canonical Wnt pathway. In Nodal morphants, the anterior neuroectoderm (animal plate: AP) is more restricted than that in normal embryos. However, when Wnt7 function is blocked simultaneously, the excess restriction is never happened. This result indicates that double suppression mechanism regulates the precise size control of AP region: canonical Wnt suppresses neuroectoderm and Nodal suppresses the canonical Wnt. This leads us to understand how the cell-fate is specified along with the orthogonal body axes during the early embryogenesis.

研究分野：生物学

キーワード：細胞分化 体軸形成

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物が三次元の体を構築するためには、一次軸(e.g.背-腹)、二次軸(e.g.左右)の各体軸に沿った細胞・組織・器官の正確な分化と配置が必要である。さらにこの三次元構築を実現する為には一つの軸形成が単独で正常に進行するだけでなく、各体軸同士が綿密な情報交換を行なうことが必要不可欠である。この情報交換のステップにはいくつかのシグナル伝達経路の関与が示唆されており、そのシグナル伝達を正常にかつ頑強に進行させるためのメカニズムが生物の体には備わっている。

動物の発生過程においては、母性因子の偏りや精子侵入点の位置等により決定された極性に沿って一次軸、二次軸が形成される(Hörstadius, 1973 Oxford University Press)。それぞれの体軸形成に関する重要な知見は我が国からも報告されており、脊椎動物の左右軸に関する Nodal 経路の解明はその最たる例である(Hamada et al., 2002 Nat Rev Genet; Hirokawa et al., 2006 Cell)。一方、実験的に一次軸形成の不全を引き起こすと、多くの場合において二次軸の不全も伴うというように、各軸同士のリンクがこれまでも示唆されてきた(Danos and Yost, 1995 Development)。しかし、ふたつの軸形成のリンクに関する報告はほとんどなく、本申請における研究計画はこの点において新規の知見を与えうるものである。

### 2. 研究の目的

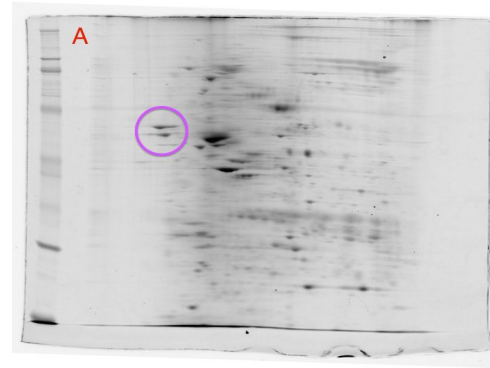
本申請研究では二次軸形成因子 Nodal が *foxQ2* 抑制性一次軸形成シグナルを抑制する詳細な分子メカニズムを明らかにすることを最終的な目的として、「一次軸形成シグナルの解明およびそのシグナルと Nodal シグナルとのリンクの実体解明」をテーマとした。1、2年目は植物半球で起こる  $\beta$ -catenin の核移行の下流ではたらき、かつ動物半球において *foxQ2* の発現領域を縮小させるシグナル X の分子実体を明らかにする点にチャレンジした。また、3年目は Nodal シグナルとシグナル X が細胞内外のいずれの段階でどのようなメカニズムでリンクしているのかを明らかにした。

### 3. 研究の方法

ウニ胚の一次軸(前後軸)形成を担うシグナル X を明らかにするため、まず、Li/Zn 処理によりシグナル X をそれぞれ増幅、減衰させて全タンパク質を二次元電気泳動および質量分析器を用いて解析した。量や状態に差の出たタンパク質全ての発現解析および機能解析を行った。また、シグナル X の影響下にある *foxQ2* の転写調節解析を行い、*foxQ2* の転写を直接誘導・抑制するシグナル経路を明らかにすることを試みた。次に二次軸形成因子 Nodal シグナルとシグナル X の相互作用を明らかにした。

### 4. 研究成果

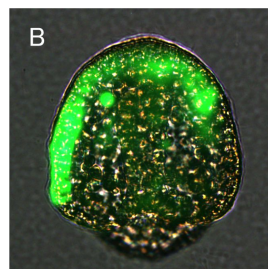
(1) まず、Li/Zn 処理によりそれぞれ後方化した胚と前方化した胚を用意し、すべてのタンパク質を二次元電気泳動で展開後、差のあったタンパク質を質量分析器により同定した。この際に必要となるバフンウニの全遺伝子情報は独自に取得した(投稿準備中)。Zn 処理胚において正常胚とは異なる等電点に位置するタンパク質として、翻訳産物のフォールディング経路に関わるものが同定さ



れた(図A、円)。

このタンパク質は母性的に全ての細胞に存在しているため、細胞種特異的に発現様態が変化している訳ではないと思われる。現在、このタンパク質の機能を明らかにするための解析を行っている。

(2) 次に、*FoxQ2* の転写調節解析から転写因子 *Meis* が *FoxQ2* の転写維持に関与していることを明らかにした。バフンウニゲノム中にある2つの *FoxQ2* の上流 5,000bp にあたる断片それぞれを取得後(*FoxQ2a-cis*、*FoxQ2b-cis*)、green fluorescent protein (GFP) をコードする DNA と結合させ、ウニ卵にその DNA 断片を顕微注入した。GFP の発現位置をもとに、胚発生期に *FoxQ2* が発現した場所を追跡することが可能になった。*FoxQ2a-cis*、*FoxQ2b-cis* 共に *foxQ2* の mRNA



の発現位置と一致したパターンを示した(図B、*FoxQ2a-cis* のパターン)。

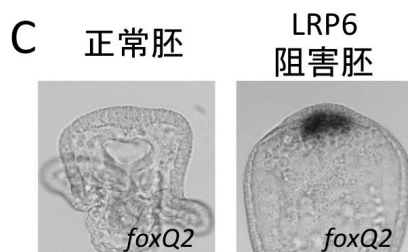
*cis* 領域をアメリカムラサキウニのゲノム情報と比較して保存されているドメインを同定した。その内部領域の *foxQ2* 発現調節能をさらに細かく解析することで、*foxQ2* の発現に必要ないくつかのドメインを明らかにした(投稿準備中)。転写因子結合予測ソフトを用いて明らかになった、それらの領域に結合すると予測される転写因子のうち、今回は *Meis* に着目した。*Meis* はアメリカムラサ

キウニのゲノムプロジェクトの際、発現領域および機能未知の母性因子であることが報告されている (Sodergren et al., 2006 Science)。また、他の動物の脳で発現していると報告されていることから、ウニの神経外胚葉形成に必須な FoxQ2 の発現制御を担っている可能性を追求した。

日本産バフンウニにおける Meis の発現パターンを明らかにするため、定量 PCR と in situ hybridization を行った。それらの結果、母性的に mRNA は一様に発現しており、受精後 14 時間には一度発現がなくなることが明らかになった。さらに、Meis 特異的の抗体を作成し発現パターンを観察したところ、初期胞胚期までは全ての細胞核に Meis タンパク質が存在していることが明らかになった。次に機能を調べるため、Meis-mRNA の翻訳を阻害した。その結果、神経外胚葉形成に必須な FoxQ2 の発現が有意に減少した。また、その過程で、体の前方領域を構成する細胞の運命が後方化することも明らかになった。これらの結果は、Meis がウニ胚の発生過程において前方領域の形成を誘導、維持することを示唆する結果となった (投稿準備中)。

(3) 古典的 Wnt シグナルを発生のごく初期から阻害すると、胚全体が神経外胚葉になってしまうという研究代表者の過去の論文 (Yaguchi et al., 2006 Development) と、他の研究室から発表された最近の論文の結果 (Range et al., 2013 PLoS Biol) から、シグナル X は連続した複数の Wnt シグナルであることが示唆された。そこで、実際にシグナル X の一員となりうる Wnt のリガンドを探るため、初期胞胚期以降に発現する Wnt を検出した。その結果 Wnt3、Wnt6、Wnt7 の3つの Wnt が候補として同定された。それらの発現パターンの解析から、3つの Wnt のうち、Wnt6 と Wnt7 が強い候補として示唆され、その後の機能解析の対象とした。Wnt6 と Wnt7 をそれぞれ翻訳阻害した条件下で、神経外胚葉の Specification に必須である foxQ2 の発現パターンを調べた。その結果、Wnt6 阻害胚では、foxQ2 の発現場所やタイミングに変化がなかったが、Wnt7 阻害胚では foxQ2 が神経外胚葉の Specification 後、徐々に消失していくタイミングにおいても強い発現レベルで維持されていることが明らかになった。さらに、foxQ2 の発現領域も正常胚のそれと比較して有意に広いことから、Wnt7 はシグナル X の一端を担うリガンドであることが示唆された。次に古典的 Wnt シグナルの co-receptor の low density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) の機能を調べた。LRP6 は母性的にタンパク質と mRNA をもっているため、ウニ胚を用いた研究では母性的なタンパク質の機能を抑制できないが、mRNA の翻訳阻害によって発生途中からの古典的 Wnt シグナルを阻害できる。LRP6 の機能阻害の結果、Wnt7 の機能阻害と同様に、失われるべきタイミン

グにおいて foxQ2 の遺伝子発現が維持された (図 C)。



これらの結果から、Wnt7 をリガンドとする古典的 Wnt 経路がシグナル X の一部であり、さらに、胚の前端部において、神経外胚葉 Specification 後の foxQ2 消失を担うシステムとしても古典的 Wnt 経路が関与していることが強く示唆された。さらに、これまで二次軸形成因子である Nodal を抑制すると、神経外胚葉領域が過剰に狭くなることが観察されていたが、Wnt7 を同時に抑制しておくこと、この過剰な抑制が起きないことが明らかになった。これは、一次軸形成因子の Wnt を二次軸形成因子の Nodal が抑制していることを強く示唆する結果になった (Yaguchi et al., PLoS Genet)。

#### 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 3件) 全て査読有

Yaguchi J, Takeda N, Inaba K, Yaguchi S. Cooperative Wnt-Nodal signals regulate the patterning of anterior neuroectoderm. PLoS Genet. (2016) *in press*. (\*corresponding author)

Yaguchi S, Yamazaki A, Wada W, Tsuchiya Y, Sato T, Shinagawa H, Yamada Y, Yaguchi J. Early development and neurogenesis of *Temunopleurus reevesii*. Dev Growth Differ. (2015) 57, 242-250. (\*corresponding author)

Yaguchi S, Yaguchi J, Inaba K. bicaudal-C is required for the formation of anterior neurogenic ectoderm in the sea urchin embryo. Sci Rep. (2014) 4:6852. (\*corresponding author)

[学会発表](計 5件)

Yaguchi J, Takeda N, Inaba K, Yaguchi S. Cooperative Wnt-Nodal signals regulate the patterning of anterior neuroectoderm. Developmental Biology of the Sea Urchin XXIII, Woods Hole, USA 2015年10月8日

谷口順子、谷口俊介 Wnt シグナルによるウニ胚神経外胚葉のパターニング 86<sup>th</sup> annual meeting of the Zoological Society of Japan, 朱鷺メッセ、新潟県

新潟市 2015年9月19日  
谷口順子、谷口俊介 バフンウニ前端部神  
経外胚葉に発現する遺伝子群のパターニ  
ング解析 86<sup>th</sup> annual meeting of the  
Zoological Society of Japan, 朱鷺メッ  
セ、新潟県新潟市 2015年9月19日  
廣瀬慎美子、清本正人、吉田有喜子、成  
瀬貢、大森紹仁、谷口俊介、中野裕昭 日  
本産ウニ類の DNA バーコードと分類学検  
討 86<sup>th</sup> annual meeting of the  
Zoological Society of Japan, 朱鷺メッ  
セ、新潟県新潟市 2015年9月17日  
金城その子、谷口俊介、山本卓、清本正  
人、池尾一穂 バフンウニゲノムおよび  
トランスクリプトームの解読と情報基盤  
整備 86<sup>th</sup> annual meeting of the  
Zoological Society of Japan, 朱鷺メッ  
セ、新潟県新潟市 2015年9月17日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~yaguchi/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷口 俊介 (YAGUCHI, Shunsuke)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00505331