

分子発生学研究

高 田 慎 治

分子発生学研究部門は、統合バイオサイエンスセンター（現、岡崎統合バイオサイエンスセンター）の設立とともに 2001 年に開設された。それから今日に至るまで、脊椎動物の形態形成機構の理解に向けて、マウスとゼブラフィッシュをモデルにして研究を行っている。特に、形態形成過程における領域の形成とその特異化に焦点を当て、体節の分節機構に関わる分子の同定と機能解析、領域形成を制御する分泌性シグナルの機能解析を中心に研究を行ってきた。ここにその概略を紹介させていただく。

1. 脊椎動物の体節形成機構の研究

動物のからだには、さまざまな繰り返し構造が認められる。例えば、脊椎は一つ一つの椎骨が連なりあってできている。このような構造の反復性は、もとをたどれば発生初期に一過的に形成される体節の反復性に由来する。脊椎動物の各体節は、発生の進行に従い頭部側から尾部側に向けて順次作られるが、その際、体節は胚の後端に存在する未分節中胚葉から一定の時間間隔のもと、逐次くびれ切れることにより形成される。すなわち、未分節中胚葉において一定の時間間隔のもと繰り返し起きる変化が、体節という形態の反復性を生み出しているわけである。このような「時間的周期性から形態的反復性への変換」は脊椎動物の体節形成を特徴づける大きなポイントとなっており、その変換を生み出す分子メカニズムは興味を持たれる。

当部門では、この「時間的周期性から形態的反復性への変換」を生み出す分子メカニズムの解明を目指し、ゼブラフィッシュをモデル系にして分子遺伝学的方法により研究を進めている。これまで、

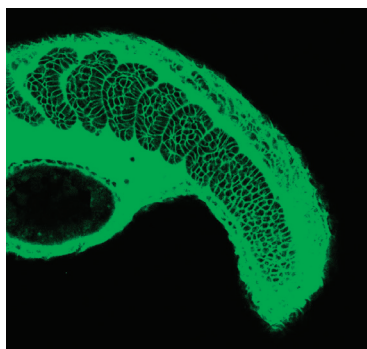


図 1. 体節の発生
未分節中胚葉（右端）が順次くびれきれることにより体節が作られていく。図中、左が頭側、右が尾側。

2つの異なる（そして互いに相補的な）アプローチにより、体節形成に関わる未知の遺伝子を網羅的に同定することを試みてきた。その一つは、ゼブラフィッシュを用いて体節形成に異常を呈する新規突然変異体のスクリーニングを行うことであり、これまでに複数の突然変異体を樹立することに成功している。もう一つのアプローチは、未分節中胚葉に特異的に発現する遺伝子を *in situ* hybridization 法を用いたスクリーニングにより収集し、体節形成に必須な新規遺伝子の同定を行うというものである。

突然変異体に関しては体節境界形成に異常を呈するものにはまず着目して原因遺伝子の同定と表現型の詳細な解析を行い、Integrin $\alpha 5$ と fibronectin が体節境界の維持に必要であり、そこ

では Integrin $\alpha 5$ を足場にして fibronectin タンパク質が体節境界に集積すると結論した。一方、未分節中胚葉で特異的に発現する遺伝子のうち、転写因子 her13.2 と ripply1 に関してその機能解析を行い、her13.2 は未分節中胚葉の後部で FGF シグナルにより発現誘導され、her1 遺伝子の周期的発現変動を制御する key factor であることを、一方 ripply1 は未分節中胚葉の前部で遺伝子の空間的発現パターンが体節の繰り返し構造に変換される際に必要不可欠であり、その際には転写抑制因子 Groucho と相互作用することを示している。さらにマウスを用いて、種間における体節形成に関わる遺伝子の機能の違いについても研究を進めている。これらの成果は、体節形成の分子メカニズムの理解を大きく進めるものであり、今後の研究の展開によって「時間的周期性から形態的反復性への変換」を生み出す分子メカニズムの解明が期待できる。

2. 分泌性シグナルタンパク質 Wnt の分泌、作用機構の解析

動物の発生過程の様々な局面において、Wnt, BMP, FGF といった分泌性のシグナルタンパク質が重要な働きを演じている。これらの分泌タンパク質はその産生細胞自身およびその周囲の細胞に対して働きかけるが、その分泌距離に応じて作用を受ける細胞の数と種類が変わってくることが考えられる。特に、受容する細胞が分泌タンパク質の濃度に応じて作用を異にする場合、すなわち組織の部域化と呼ばれるような現象が引き起こされる場合には、その濃度勾配の傾斜と広がり程度が組織の形態形成や機能分化に大きな意味をもつ。このような点から考えれば、分泌性シグナルタンパク質が細胞外環境へどのように分泌され、その環境下でどのようにその拡散が制御され、さらにその濃度情報を細胞がどのように認識していくのかという問題は、動物の発生メカニズムを理解する上でまさに不可欠なものであるが、その理解はまだほとんど進んでいない。

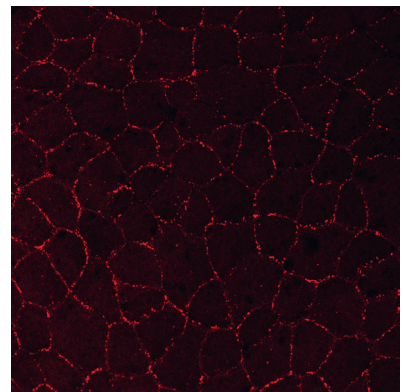


図2. 分泌された Wnt タンパク質
上皮細胞から分泌された Wnt タンパク質（赤）は、細胞間にドット状に局在する。

Wnt タンパク質の分泌には porcupine と呼ばれる小胞体に局在する膜タンパク質が必要であることが、ショウジョウバエ、線虫を用いた遺伝学的解析から示唆されている。最近 porcupine がアシル基転位酵素と構造的に相同であることが示され、その酵素活性による脂質修飾が Wnt タンパク質の分泌に関わることが提唱されてきた。私たちは独自に確立した Wnt3a タンパク質を効率良く細胞外に分泌する培養細胞系を用いて、Wnt-3a タンパク質が不飽和脂肪酸による独特の脂質修飾を受けること、そしてこの修飾には porcupine が必要であることを示すとともに、この修飾は Wnt-3a タンパク質が小胞体から輸送される上で必要であることを明らかにした。この結果は、これまでほとんど研究の進んでいなかった Wnt タンパク質の分泌並びに修飾機構の理解に大きく貢献した。

3. シグナルタンパク質の機能多様性の確立機構

細胞外に分泌されるシグナルタンパク質は動物の形態形成過程において多種多様なはたらきをす

る。私たちは、このようなシグナルの機能の多様性が生じる分子メカニズムを解析することを目的として、シグナルによって発現が調節される遺伝子（以下、標的遺伝子と呼ぶ）に着目し、その探索を行ってきた。マウス胚性幹細胞（ES 細胞）に対して Wnt-3a タンパク質を添加することによって発現が変動する遺伝子として、10 数個の標的遺伝子を同定し、さらに、そのうちのいくつかはマウスの発生過程においても Wnt シグナルによって発現が制御されていることを明らかにするとともに、その変異体個体を作製し、標的遺伝子が担う役割を明らかにした。このような研究をさらに体系的に行うことにより、Wnt シグナルが担う機能の多様性がどのようにして確立されるのかについて明らかにして行きたいと考えている。

参考文献

1. Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., & Takada, S. (2006) Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: Its role in Wnt secretion. *Dev. Cell* 11, 791-801.
2. Yamaguchi, Y., Yonemura, S., & Takada, S. (2006) Grainyhead-related transcription factor is required for duct maturation in the salivary gland and the kidney of the mouse. *Development* 133, 4737-4748.
3. Kawamura A., Koshida S., Hijikata H., Ohbayashi A., Kondoh H., & Takada S. (2005) Groucho-associated transcriptional repressor ripply1 is required for proper transition from the presomitic mesoderm to somites. *Dev. Cell* 9, 735-744.
4. Koshida S., Kishimoto Y., Ustumi H., Shimizu T., Furutani-Seiki M., Kondoh H., & Takada S. (2005) Integrin α 5-dependent Fibronectin accumulation for maintenance of somite boundaries in zebrafish embryos. *Dev. Cell* 8, 587-598.
5. Kawamura, A.*, Koshida, S.*, Hijikata, H., Sakaguchi, T., Kondoh, H., & Takada, S. (*: These two authors contributed equally to this work.) (2005) Zebrafish Hairy/Enhancer of split protein links FGF signaling to cyclic gene expression in the periodic segmentation of somites. *Genes Dev.* 19, 1156-1161
6. Muromiya Y., Fujihara M., Ikeya M., Kondoh H., & Takada S. (2002) Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev* 16, 548-553
7. Ohbayashi, N., Shibayama, M., Kurotaki, Y., Imanishi, M., Fujimori, T., Itoh, N., & Takada, S. (2002) Fgf18 is required for cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev.* 16, 870-879

