

1-2 分子発生

高田 慎治（教授）

1) 専門領域：発生生物学

2) 研究課題：

- a) 脊椎動物の体節形成機構に関する研究
- b) 脊椎動物の発生過程における細胞間シグナルの機能に関する研究

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 脊椎動物の体節は頭部側から尾部側にかけて逐次、周期的に形成される。個々の体節ユニットが時間経過とともに順次形成されていく仕組みは、すでにその理解が進んでいる多くの発生現象には認められていない独特なものであり、その解明には興味もたれる。本研究では体節の形成と維持の機構を解明することを目的として、そこに関与する遺伝子の探索と機能解析を2つのアプローチにより行ってきた。

その一つはゼブラフィッシュの体節前駆細胞に特異的に発現する遺伝子の探索とその機能解析である。我々はこれまでに *in situ hybridization* により、ゼブラフィッシュの体節前駆細胞に特異的に発現する遺伝子を数多く同定してきたが、今年度の研究から、その一つである *her13.2* 遺伝子は体節の周期性の確立に重要な働きをすることが示された。体節の周期性の確立には分節時計と呼ばれる Notch シグナル伝達系と転写因子 Hairy (*her*) から形成される負のフィードバックループが中心的な役割を果たしており、その維持は Fgf や Wnt などの分泌性シグナルにより行われている。*her13.2* 遺伝子は体節前駆細胞において FGF シグナルにより発現が誘導され、しかもその機能阻害実験から分節時計の形成に必須であることが明らかになった。さらに、分節時計の心臓部である *Her1* タンパク質と結合し分節時計を協調的に制御することが示された。以上の結果から、FGF シグナルによる分節時計の維持のしくみを理解する上で鍵となる分子の実体とその機能が明らかになった。

一方、このような研究と平行して、我々は体節の形成に異常をきたす突然変異体を複数系統樹立してきた。そこで、各変異体における原因遺伝子の同定とその機能解析を平行して行い、体節形成の様々な局面に関与する遺伝子の機能を多角的に解析することを試みている。我々はそのような突然変異体の中に頭部側数体節の体節境界の維持に異常を呈するものがあることを見出し、その原因遺伝子の同定を行った結果、Integrin と Fibronectin が体節境界の維持に必要であることを明らかにした。さらに、体節境界に面した細胞の上皮化がその維持には深く関わっていた。以上の結果から、体節の周期性が確立された後に、形態的に明瞭な境界が形成されるプロセスが明らかになった。

b) Wnt、FGF、BMP それに Hedgehog といった分泌性シグナルタンパク質は、動物の形態形成過程において繰り返し使われ、しかも細胞の増殖、分化、移動、さらには組織の領域形成など多様な役割を担っている。このようなシグナルの多様性を成立させる分子的基盤がいかなるものであるのか、我々は未だその実体をほとんど理解していない。本研究では、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、Wnt 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）の発現制御機構と機能の解析を行うとともに、標的遺伝子の発現制御に異常を示す突然変異体に着目し、その原因遺伝子の同定を行っている。

Wnt シグナルの標的遺伝子は遺伝子トラップ法とマイクロアレイ法を用いることにより複数の遺伝子を同定しているが、そのうちの一つに腎臓や唾液腺などの外分泌性器官において管構造を形成する上皮細胞で特異的に発現していることが明らかになった GRFTR1 遺伝子がある。今年度はその機能解析を個体レベルで行うことを目的として、この遺伝子の機能が欠質した変異体マウスを作製し、解析を行った。その結果、これら器官の分化に異常が認められ、その生理的な機能が損なわれていた。したがって、Wnt シグナルはこの遺伝子の発現を介して、外分泌性器官の管の分化を制御しているものと考えられた。

一方、マウスの初期発生過程において Wnt シグナルは原口（原始原条）周囲や神経管背側といった複数の領域で発現しており、その機能も多岐にわたる。転写調節因子 T (Brachyury) は Wnt シグナルの標的遺伝子であるが、Wnt シグナルによるこの遺伝子の転写活性化は原口周囲において特異的であり、Wnt シグナルが活性化されているその他の領域では発現が認められない。これに対して、我々は系統的な遺伝学的スクリーニングが可能なゼブラフィッシュを用いて突然変異体のスクリーニングを行い、T (Brachyury) を原口周囲以外にも異所的に発現する変異体を多数獲得することに成功した。今年度はこれら変異体の原因遺伝子を同定を目的として、ポジショナルクローニングを進めた。

4) 学術論文

T. Kamata, K. Katsube, M. Michikawa, M. Yamada, S. Takada and H. Mizusawa,
"R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants." *Biochim Biophys Acta.* **1676**, 51-62 (2004).

Y. Muroyama, H. Kondoh and S. Takada,
"Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture."
Biochem Biophys Res Commun. **313**, 915-921 (2004).

M. Naito, R. Katayama, T. Ishioka, A. Suga, K. Takubo, M. Nanjo, C. Hashimoto, M. Taira, S. Takada, R. Takada, M. Kitagawa, S. Matsuzawa, J. C. Reed and T. Tsuruo,

"Cellular FLIP inhibits β -catenin ubiquitylation and enhances Wnt signaling." *Mol Cell Biol.* **24**, 8418–8427 (2004).

H. Hasegawa, S. Ashigaki, M. Takamatsu, R. Suzuki-Migishima, N. Ohbayashi, N. Itoh, S. Takada and Y. Tanabe,

"Laminar patterning in the developing neocortex by temporally coordinated fibroblast growth factor signaling."

J Neurosci. **24**, 8711–8719 (2004).

H. Usui, M. Shibayama, N. Ohbayashi, M. Konishi, S. Takada and N. Itoh,

"Fgf18 is required for embryonic lung alveolar development."

Biochem Biophys Res Commun. **322**, 887–892 (2004).

Y. Kishimoto, S. Koshida, M. Furutani-Seiki and H. Kondoh,

"Zebrafish maternal-effect mutations causing cytokinesis defect without affecting mitosis or equatorial vasa deposition." *Mech. Develop.* **121**, 79–89 (2004).

K. Satoh, M. Kasai, T. Ishidao, K. Tago, S. Ohwada, Y. Hasegawa, T. Senda, S. Takada, S. Nada, T. Nakamura and T. Akiyama,

"Anteriorization of neural fate by inhibitor of beta-catenin and T cell factor (ICAT), a negative regulator of Wnt signaling." *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **101**, 8017–8021 (2004).

6) 国際会議発表リスト

Akinori Kawamura, Sumito Koshida, Hiroko Hijikata, Hisato Kondoh, and Shinji Takada "Identification of the mediator that transmits FGF signaling to the segmentation clock" in 6th International Conference on Zebrafish Development & Genetics Madison, (USA) July 29–August 2 (2004).

Ritsuko Takada, Hiroko Hijikata, Hisato Kondoh, Shinji Takada "Specificity between Wnt ligands and Frizzled receptors in the canonical Wnt pathway" in Wnt meeting Ann Arbor, (USA) May 20–23 (2004).

Koshida S., Kishimoto Y., Ustumi H., Shimizu T., Furutani-Seiki M., Kondoh H., Takada S. "Isolation and characterization of zebrafish mutants defective in the anterior somite development" : 6th International Conference on Zebrafish Development & Genetics, Madison, (USA) July 29–August 2 (2004).

Yoshifumi Yamaguchi, Shinji Takada "Identification of a transcriptional factor commonly required for proper development and physiological function of the ducts of the kidney and the salivary gland" Mouse molecular genetics meeting, Cold Spring Harbor. (USA), September 1–5 (2004).