

研究課題別評価

1. 研究課題名 頭部の形成に関わる分子機構

2. 研究者氏名 橋本主税

3. 研究の狙い：

本研究のねらいは、脊椎動物において「頭部構造」が成立する機構を個体発生学および系統発生学的に解析することにある。脊椎動物の頭部構造は、頭部神経系に見られる特異的な分節構造やその形成過程など、基本的には見た目にも種を越えてよく保存されていることが分かる。さらに、頭部形成を支配する遺伝子も相同の遺伝子が使われており、魚類からヒトに至るまで進化的に共通の機構によって頭部の形成はなされていると考えられている。しかし、基本構造は保存されているものの、例えば魚類とヒトの脳を比較すると実際の大きさや、形、あるいは各部の大きさの比率など明らかに異なっていることも事実である。これら、頭部構造の形成を制御する機構のうち、どのような共通性によって脊椎動物間での類似性が保たれ、またどのような相違点によって種間における差異が生じるのかについて明確な足掛かりを得ることが本研究のねらいでもある。この目的を達成するために両生類であるアフリカツメガエル(以下ツメガエル)の頭部形成機構を形態学と分子生物学の両面から詳細に解析した。両生類も含めて脊椎動物における頭部形成制御の分子機構は基本的に共通であると信じられているが、現在までに知られている両生類の頭部形成過程は形態学的に見て他の脊椎動物種と比べてその発生様式が大きく異なっているために、「相同の分子が相異なる発生様式の中でどのように働き相同の構造を規定するのか?」という疑問が生じる。この疑問の解答を明確にすることで脊椎動物種間での分子機構と発生機構との関係を解析するのに良い材料と考えられる。さらに両生類は、頭部形成過程の研究の歴史的な蓄積がある上に、他の種と比べ発生研究の材料としての数々の利点があるために、他種の頭部形成制御機構との相似性・相違性を明確にすることによって、種間における共通点と相違点を組織レベルと分子レベルにおいて明らかにできることが期待される。

4. 研究結果：

1) 頭部領域の決定。

脊椎動物の頭部領域は原腸形成期に決定される。原腸形成過程における頭部領域の特異化には、内胚葉組織である頭部オーガナイザーと予定頭部神経外胚葉組織の物理的相互作用が重要な役割を担っている。両生類以外の脊椎動物種においては、頭部オーガナイザー組織は初期原腸胚で予定頭部神経外胚葉領域と物理的に接して存在することが知られているが、両生類では頭部オーガナイザー組織と予定頭部神経外胚葉が物理的に接触するのは原腸形成の中期から後期にかけてであると言われている。しかし、その正確な時期は全く解明されておらず、このような発生様式の違いを起こさせる機構を明らかにすることによって脊椎動物の頭部形成を制御する普遍的な機構を求めることが重要である。

そこでまず、ツメガエル胚において頭部神経と頭部オーガナイザーの物理的な相互作用が起こる正確な時期を明らかにした。未分化外胚葉組織と頭部オーガナイザー組織が接する領域を生体染色することにより詳細に解析したところ、他の脊椎動物と同様に物理的相互作用は原腸形成期の非常に初期(ステージ10.25)にはすでに確立していることが示された。この結果はケラーサンドイッチと呼ばれる外植体を用いた詳細な解析からも支持され、これまで予定神経外胚葉組織であると信じられてきた組織は将来の表皮であるということが明確に示された。これらの結果から、

オーガナイザー組織はこれまで言われているように尾部から頭部へと胚内部を遡りながら体軸を形作るのではなく、まず頭部が決まった後に尾部方向へと体軸を形成させるモデルが示された。この視点に立つと、脊椎動物間での頭部体軸形成過程に組織運動のレベルで大きな共通点が見いだされる。見かけ上全く異なる運動様式によって頭部が決まるとされていた両生類が他の脊椎動物種と共通の機構によって頭部形成がなされることが明らかとなったことは、初期発生学の実験材料として最も使いやすいツメガエルの知見を基に脊椎動物一般に適応可能な統一機構の研究が進むことを意味する。

2 頭部オーガナイザーと体幹部オーガナイザーの形成と維持の機構

ツメガエルにおいて、頭部形成に重要な働きをする「頭部オーガナイザー」と、体軸形成に重要である「体幹部オーガナイザー」は、初期原腸胚において非常に近い領域に形成された後、それぞれ将来の頭部と体幹部の領域へと移動することが知られている。また、それぞれの領域を誘導する機構はかなり解析が進んでいるが、隣り合う細胞が頭部オーガナイザーとなり体幹部オーガナイザーとなる差別化の機構や、いったん誘導されたそれぞれの組織が他方の組織を誘導するシグナルによって分化転換を起こさない「維持」の機構については全く解析が進んでいない。

今回、体幹部オーガナイザー特異的に発現する bHLH 型の転写因子 Xhairy2b を新規に単離した。この遺伝子産物はショウジョウバエの hairy やマウスの HES の相同遺伝子であり、カルボキシル末端に特徴的な 4 アミノ酸モチーフ (WRPW) を有する。この遺伝子は体幹部オーガナイザーを誘導するシグナルによって発現が誘導され、またこの遺伝子の強制発現によって体幹部オーガナイザー遺伝子である chordin・follistatin の発現が誘導されることから、実際の発生過程でも Xhairy2b は体幹部オーガナイザー因子として機能することが示唆された。Xhairy2b をツメガエル腹側領域で強制的に発現させたところ、体幹部オーガナイザー因子として期待されるように頭部を有さない二次体軸の形成を誘導した。驚いた事に、予定頭部オーガナイザー領域に Xhairy2b を強制発現させることによって頭部オーガナイザーの形成を阻害し頭部形成を抑制した。ここで非常に興味深いことは、二次体軸の形成にはカルボキシル末端にある WRPW モチーフのみで十分であり、頭部形成の抑制には転写因子としての Xhairy2b が必須であったことである。これらの結果から、Xhairy2b は体幹部オーガナイザーに発現して体幹部オーガナイザーの機能の維持と共に、頭部オーガナイザーへの分化転換の抑制に関与することが示された。

3 頭部神経系のパターン形成機構

脳の領域化に関わる転写因子群の多くが転写補助因子 Groucho と相互作用する事実に着目して解析を進めた。まず、Groucho の機能を生体内で特異的に阻害するペプチド配列の同定を試みたところ、hairy 関連遺伝子産物のカルボキシル末端に存在する WRPW モチーフが生体内の Groucho の機能を特異的に阻害することを突き止めた。このペプチドを用いた Groucho の機能阻害が脳の領域化に、前脳・中脳の領域化の変化、神経堤細胞の分化パターンの異常や三叉神経節形成異常など多岐にわたる莫大な影響を及ぼす事を見いだした。

このような総合的な異常を一分子の機能阻害が引き起こす例は国内外を問わず他に報告がなく、現在もこの研究をさらに継続している。事実として、現在までに単離・解析がなされている脳形成に関与する転写因子において、そのほとんどに Groucho 結合モチーフが存在し、Groucho によるグローバルな調節が行なわれていることは強く示唆されるにも関わらず、転写因子は全て単独の分子機構としてのみ解析が進んでいるために、同時期に同領域で起こる転写制御機構の全体像の解明には至っていない。今回見いだされた Groucho の機能阻害による総合的な異常は、グローバルな調節を全体的に阻害したことを示している。したがってこの現象に関わる分子機構をそれ

それ素過程として抽出し解析した後、再度統合することで脳が形作られる過程に働く転写制御機構の全体像が見えてくると期待できる。

4) 神経外胚葉組織によるオーガナイザーのパターン形成

頭部から尾部へと至る体軸の形成とその部域化にはオーガナイザー組織が一義的に制御していることが現在までに知られている。「魔法の領域」であるオーガナイザー組織が予定神経外胚葉を神経へと誘導し、また接しているオーガナイザーの領域に応じたパターン形成を受けるわけである。しかし今回、予定頭部神経外胚葉のパターンを人為的に乱すことにより、オーガナイザー自身のパターンに変異を与えることが分かった。この発見は、オーガナイザーによりパターン化された予定神経外胚葉組織が、自己のパターンをフィードバック的にオーガナイザー組織へと伝達し、その情報を元にオーガナイザー組織が再パターン化されるという新しいモデルを与える。

5. 自己評価：

研究室の教授の逝去に伴い、学生の移動の面倒を見たり、研究室の後かたづけをしたりと、物理的には研究自体に取り組む余裕がなく、得られた成果自体には全く満足できていない。特に、研究の進展に伴って見えてきた新しい研究領域への萌芽を全く花開かせることができなかったことは残念の極みである。

唯一納得できる成果としてあげられるのは、研究終了直前にようやく受理された論文に関することであろう。この趣旨は、これまで80年間信じられてきた両生類における頭部形成機構の根幹に疑問を投げかけるもので、私の主張を研究の成果とともに世に問うことができたのは良かったと考える。

研究内容に関して言えば、転写補助因子に着目することで頭部神経形成の根本のしくみに迫る可能性を見いだせたことは今後につながる成果であろうと考える。また、現在までの発生学においては、組織の誘導・分化にばかり研究の中心があり、分化誘導を受けた組織や細胞がその性質を維持するしくみに関して分子レベルで解析された例はほとんどないが、本研究において「頭部」と「体幹部」の性質を維持する分子機構について明確に示すことができたと考えている。この段階までは納得できる成果である。

6. 研究総括の見解：

これまで定説としてツメガエル胚で尾部から頭部へと中胚葉が移動しながら体軸が決まるといわれていたのに対して、まず頭部が決まったあとに尾部へ体軸が決定されることを実証した。ついで、体幹部オーガナイザーの新しい遺伝子(転写因子) X hairy2 b の作用を発見、さらに頭部脳の分化に関与する転写補助因子の Groucho の作用を明らかにした。これらの新しい知見はこれまでの定説に見直しを迫り、発生分化の新たな発展に大いに貢献するものと期待される。

7. 主な論文等：

(1) 論文

Tetsuya Koide, Kazuhiko Umesono and Chikara Hashimoto, "When does the anterior endomesoderm meet the anterior-most neuroectoderm during *Xenopus* gastrulation?" Int J Dev Biol, In Press

(2) 総解説

なし

(3)口頭発表

国際会議

Chikara Hashimoto, "The establishment of a head field in the early *Xenopus* gastrula." 3rd Aso Meeting on Vertebrate Body Plan, Kumamoto, November 3-4, 1999.

国内学会

辻咲織 橋本主税、'特異的アミノ酸モチーフがどのように脳の領域化を制御するのか'第35回日本発生生物学会大会、パシフィコ横浜、2002年5月