

# アフリカツメガエルをモデル系とした体軸形成に重要な遺伝子群の網羅的解析

●花房 洋

名古屋大学大学院理学研究科

## 〈研究の目的と進め方〉

初期胚では、様々な組織の誘導・分化（三胚葉の形成、オーガナイザーの形成、神経誘導及び中枢神経組織の形成、体節の分化など）が起き、秩序だった個体が形成されていく。本研究では、初期体軸形成に焦点を合わせ、これらの過程で機能する新規因子群の同定と、それらが構成するシグナルネットワーク機構を明らかにする事を目指した。アフリカツメガエル初期胚腹側領域にWnt8 mRNAを微量注入すると、頭部を含む完全な二次軸が形成されることが明らかとなっている（図1A）。このように、アフリカツメガエル初期胚は完全な初期体軸形成を異所的に再現させることが可能である。そこで、Wnt8 mRNAを微量注入した胚とコントロール胚とからcDNAプールを製作しサブトラクティブスクリーニングを行う事で、初期体軸形成、特にWntシグナル下流で機能する遺伝子群の同定を試みた（図1B）。

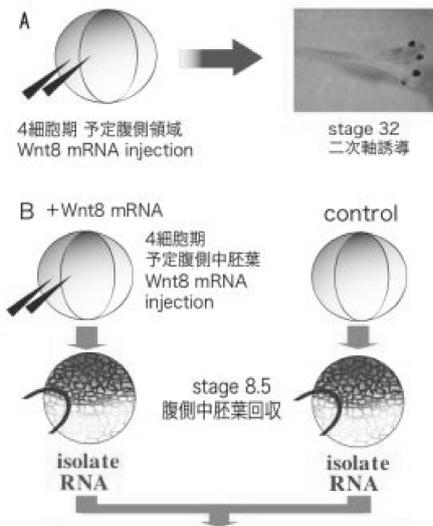


図 1 Wnt シグナル下流で体軸形成に関与する遺伝子群の同定

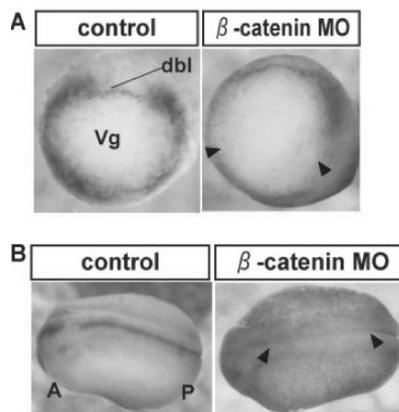
## 〈研究開始時の研究計画〉

スクリーニングで得られた候補遺伝子は、Whole-mount in situ hybridizationやanimal cap assay（RT-PCRを用いた細胞分化能の検討）など二次スクリーニングを行い、解析にまわす候補遺伝子の決定を行う。さらにWntシグナルの下流でどのように体軸形成に関与するのか、他のシグナル（Nodalシグナル、BMPシグナル、FGFシグナルなど）との関係を中心に検討する。体軸は初期の決定因子の局在、三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）の分化、中枢神経の形成など、発生の過程でおこる様々なイベントをとおして形成されていく。我々が単離、同定した遺伝子がこれらのイベントのどこで機能しているのか検討していく予定である。

## 〈研究期間の成果〉

マイクロアレイを行い、14400転写産物についてWntシグナルの下流で発現が誘導される遺伝子の解析を行った結果、Siamois、Chordinなど既知のWntシグナル標的遺伝子のほかに、機能未知の遺伝子が多数同定された。Animal cap assayにより実際にWntシグナルで発現制御をうける機能未知遺伝子を47個単離し、Whole-mount in situ hybridizationを行った。その結果、24個の遺伝子について興味深い発現パターンが得られた。そのうちのひとつXenopus Pinhead (xPinhead) についてさらに詳細な解析を行った。Pinheadは原腸胚期に腹側中胚葉で、神経胚期に神経管で特異的な発現が見られた。また、Pinheadの発現は $\beta$ -cateninをknockdownすることで消失したことから、Wntシグナルに依存していると考えられる（図2）。Pinhead-MOにより内在性Pinheadタンパク質をknockdownすると、頭部が尖った表現型が得られる。また、腹側中胚葉においてPinheadをknockdownすると、一部の腹側中胚葉遺伝子の発現が減少することが明らかとなった。このことから、Pinheadは腹側中胚葉の形成に重要な働きをしていると考えられる。Pinheadの作用機構を明らかにするため、酵母Two-hybridスクリーニング法を用いて相互作用する因子の探索を行った。その結果、BMPシグナルの阻害因子Smad6がPinheadと相互作用することが明らかになった。BMPシグナルは、細胞内伝達因子Smad1やSmad5がレセプターによってリン酸化され、Smad4とヘテロダイマーを形成することで核へ移行しシグナルが伝達される。Smad6はBMPレセプターと結合することでレセプターによるSmad1、5のリン酸化を阻害し、BMPシグナルを抑制することが知られている。事実、PinheadはSmad6と結合する事でSmad6の活性を阻害し、結果としてBMPシグナルを促進していることが確認された。腹側中胚葉の形成には、WntシグナルとともにBMPシグナルが重要である事が知られている。PinheadはWntシグナル依存的に発現が誘導され、Smad6によるBMPシグナル阻害を抑制することでBMPシグナルを促進し、腹側中胚葉形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

スクリーニングで同定された他の遺伝子についても順



次解析を進めていく予定であるが、現在遺伝子の全長クローニングを行っている段階である。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

アフリカツメガエルは初期発生の研究を行う上で非常に優れたモデル系であり、これまで様々な知見が蓄積されてきている。ゲノムプロジェクトの進行や、マイクロアレイに代表される新しい実験手法の確立から、これまで未同定だった新規機能因子の同定が可能となってきた。様々な研究室で我々と同様網羅的な遺伝子の探索と機能解析を行っている。我々のプロジェクトが、これら他の研究室で行われているプロジェクトと相互に補完しあえば、初期発生、特に体軸形成とそれに沿った細胞分化のメカニズムが明らかになると期待される。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

マイクロアレイを用いたスクリーニング自体は非常に効率よく機能している。特にアフリカツメガエルの初期胚はバックグラウンドが低く、非特異的な発現変化でひっかかってきた遺伝子はごく少数であった。さらにanimal cap assay (RT-PCR) による簡便な手法で、候補遺伝子が本当にWntシグナルによって発現誘導されるのか確認することができた。このように一次スクリーニングは何も問題なく進んだが、whole-mount in situ hybridizationの段階で、染色が得られない遺伝子が多数存在した。RT-PCRの結果から、発現自体はおきているにもかかわらず、半分以上の候補遺伝子で顕著な染色が得られなかった。我々はプローブの濃度、胚処理の条件、ハイブリダイゼーションの条件など、様々な条件検討を行い改善を行ってきた。その結果、いくつかの興味深い発現様式を示す遺伝子の同定に成功したが、当初目標としていた網羅的な遺伝子群の同定には遠く及ばない結果となってしまった。さらに候補遺伝子は部分長でしか同定されず、全長をクローニングするのに時間がかかるものもあった。今後はこれらの点をいかに改善し、効率良く大規模な遺伝子群同定がおこなえるのか検討する必要がある。

### 〈今後の課題〉

今後の課題として、同定した遺伝子を如何に解析していくかが問題である。アフリカツメガエル初期胚は、胚操作の簡便性、animal cap assayに代表される優れたアッセイ系が存在すること、モルフォリノアンチセンスオリゴなどを用いた内在性蛋白質のknockdownが可能なことなど、初期発生を研究する上で非常に有用なモデル系である。しかし、遺伝学的手法に欠け、さらに個々の細胞内でどのような分子メカニズムが働き、結果として組織のようなヘテロな細胞集団の分化に至るのか解明するのは非常に困難である。我々は哺乳類培養細胞系を用いた解析（細胞内での挙動、相互作用する因子の同定、シグナル伝達経路の上流下流関係など）を併用することで、アフリカツメガエル単独では得られない知見を得ようと努めてきた。今後はアフリカツメガエル初期胚のメリット（例えばスクリーニングには非常に適した系と思われる。）をいかしつつ、他の系（遺伝学が使えるモデル動物や生化学的手法など）を併用することで、細胞分化におけるシグナル伝達ネットワークのさらなる全容解明を行う必要があると思われる。また網羅的に候補遺伝子を同定する際にも、cDNAマイクロアレイと蛋白質-蛋白質相互作用の両方を併用し、より幅広い情報を得つつスクリーニングができないか検討したく思う。

### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

xPinheadの論文は現在投稿中です。