

胸腺器官発生機構の包括的解析

●岩波 礼将 ◆高浜 洋介

徳島大学ゲノム機能研究センター遺伝子実験施設

<研究の目的と進め方>

ヒトを含めた脊椎動物のTリンパ球は胸腺で分化・成熟する。胸腺は第3咽頭嚢内胚葉から発生し、神経冠細胞やT前駆細胞との相互作用により固有の皮質髄質構造を形成して、Tリンパ球の分化を支持する機能を発揮する。これまでに、胸腺発生異常を原因とする免疫不全症や自己免疫疾患の患者やモデル動物の解析により、DiGeorge症候群での*tbx1*、ヌードマウスでの*foxn1*、自己免疫性多腺性内分泌不全症(APECED)での*AIRE*などが責任遺伝子として同定されている。またノックアウトマウスの解析などから、胸腺発生に関わる遺伝子が明らかになりつつある。とはいえ、胸腺器官発生の分子機構の全体像は未だほとんど不明である。

そこで私たちは胸腺発生を支配する分子経路の包括的な理解のために、メダカを用いた順遺伝学的手法によってゲノム網羅的に作製した胸腺発生異常変異体の表現型解析と責任遺伝子同定を目指した。さらにTILLINGによる逆遺伝学的変異体パネルを用いて、上記の責任遺伝子間及び既知の胸腺発生関連遺伝子との相互作用を明らかにし、胸腺発生を支配する遺伝素因の総体的な理解を目指した。

<2007年度の研究の当初計画>

前年度までに私たちはENUミュータジェネシスにより、胸腺発生に異常を示すメダカ変異体の収集を行い、メダカゲノムの約60%を網羅すると考えられる538F2ファミリーのスクリーニングの結果、胸腺内での未熟リンパ球特異的*rag1*遺伝子の発現に異常を示す劣性変異体を22系統樹立した(Mech Dev 121; 779-89(2004))。中でも咽頭弓の形成に異常が少なく胸腺特異性が高いと考えられる11変異体に注目し、メダカ胸腺発生異常変異体のポジショナルクローニングにより、9変異体において変異を染色体にマップし、そのうち4変異体において責任遺伝子を同定しつつあった。

そこで2007年度はレスキュー実験やmorpholinoアンチセンスオリゴ投与による表現型の再現実験により、機能的な確認を得ることが最優先課題であった。その上で、それらの遺伝子の正常胚や各々の変異体胚における発現パターンを調べ、どのように相互作用しながら胸腺発生に関与しているのかを解析した。またTILLINGにより既知の胸腺発生関連遺伝子のノックアウトメダカを作製し、同様にして変異体責任遺伝子との相互関係を明らかにすることを計画した。

一方、透明度の高いメダカ胚の利点を生かした未熟リンパ球の胸腺内でのリアルタイム観察を目指して、私たちは前年度までに未熟リンパ球特異的にEGFPを発現するトランスジェニックメダカを作製し動態解析を進めてきたが、2007年度は特にT前駆細胞の胸腺への移入経路とその分子機構に焦点を当てて解析を進めることを計画した。

<2007年度の成果>

胸腺発生異常メダカ変異体の1つの責任遺伝子として同定し、これまでに機能が知られていないWDR55に関して機能解析を行った。前年度にWDR55が核小体に局在することを明らかにしていたが、変異体胚では5.8S-28S相当のrRNAプロセッシングの中間体の蓄積が認められた。このことからWDR55が核小体で5.8S-28S相当のrRNAのプロセッシングに関与していると考えられた。しかし、これまでにrRNAプロセッシングの同じ段階に関与し、タンパク複合体を形成することが知られているPes1、Bop1、WDR12のいずれとも会合しないことが免疫沈降で明らかになった。また培養細胞でsiRNAによるWDR55のノックダウンを行ったところ、*p21(WAF1/CIP1)*の発現上昇とG1期での細胞周期の阻止が見られた。つまり、WDR55はp53経路を介して細胞周期を制御していると考えられた。またレトロウイルス挿入によってWDR55に変異を持つゼブラフィッシュ(PNAS 101; 12792-7(2004))を入手して解析したところ、ゼブラフィッシュにおいてもメダカと同様に胸腺発生異常をもたらすことが明らかになった。一方、WDR55ノックアウトマウス(Nature 435; 360-4(2005))の生存期間を調べたところE3.5で既に-/-胚が消失していることが分かり、マウスにおいてはWDR55が受精前後の早期に必要であると考えられた。このようにメダカ順遺伝学を通じて、新規遺伝子WDR55が核小体でのrRNA合成や細胞周期の制御に関与し、魚類における胸腺発生に関わっていることを明らかにした(論文投稿中)。

またその他の3変異体においても、既にマップされたゲノム領域内の候補遺伝子に点変異を見つけていたが、他の候補遺伝子には全く変異が導入されていないことを確認し、さらに野生型胚への責任遺伝子候補のmorpholinoアンチセンスオリゴ投与による表現型の再現を確認し、責任遺伝子である機能的証拠を得た。3遺伝子ともメダカ胚において全身性に発現されることや、少なくともうち2遺伝子についてはWDR55と同様にノックアウトマウスが初期胚期で致死であることが知られていることから、マウスの解析では見落としがちな器官形成関連遺伝子が魚類を用いた変異体解析によって見つけられる可能性が示唆された(論文投稿準備中)。

また、胸腺発生異常メダカ変異体を逆遺伝学的に作製する試みのひとつとして、まずTILLINGにより未熟リンパ球特異的に発現する*rag1*遺伝子に点変異をもつ変異体を樹立し、表現型解析を開始した。

それらと並行して、我々が既に作製していた未熟リンパ球特異的にEGFPを発現するトランスジェニックメダカを用い、初めて胸腺内Tリンパ球の動態の生理的リアルタイム観察を行った。その結果、胸腺周囲の血管形成前にはT前駆細胞がおそらくケモカインによる誘導で前方(頭側)から胸腺へ移入する経路がある

のに対し、血管形成後はおそらく血管を通過して多方向から移入することが明らかになった。また胚期の胸腺細胞が静的であるのに対し、抗原受容体や補受容体を発現する時期になると胸腺内でランダムな方向性の活発な動きが観察された (J Immunol 170; 1605-15(2007))。

<国内外での成果の位置づけ>

胸腺発生機構の順遺伝学的解析は、ゼブラフィッシュを用いて国外の複数のグループで行われている (J Immunol 177; 2463-76 (2006), PNAS 104;6608-13(2007))。しかし新規遺伝子の同定はこれまでに1例しか報告されていない。私たちが今回同定したメダカ胸腺発生異常変異体の4つの責任遺伝子は、生物種の違うスクリーニングによってゼブラフィッシュから得られる情報を十分に補うものと考えられる。特に、これまでに全く機能の分かっていたWDR55の*in vitro*、*in vivo*両面からの機能解析は器官発生と核小体の機能をつなぐ重要な成果であると考えられる。

未熟リンパ球特異的にEGFPを発現するトランスジェニックメダカを用いた胸腺内未熟Tリンパ球の動態観察は、これまでマウスを用いて試みられてきたものの常に外科的ストレスや麻酔などのTリンパ球に影響を与えることが懸念される条件下でしか行われてこなかったリアルタイム観察を、メダカ胚の透明性を生かして生理的条件下で初めて実現したことに価値が見いだされる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

責任遺伝子を300kb以下のゲノム領域にマップした胸腺発生異常メダカ変異体の中には、その領域内の候補遺伝子のいずれにおいても発現レベルの低下が見られず、かつcDNAに変異が特定されていないものもあり、責任遺伝子同定が難航しているものがある。これらのゲノム解析を進めていくためには、今後、遺伝子構造予測の見直しやnon-coding RNAの検索などが必要と考えられる。また、遺伝子コード領域外の変異が表現型の原因である可能性も考えられるので、変異体由来のゲノムライブラリーを作製し、マップされた領域のゲノム配列を野生型と比較する必要性も考えられる。

<今後の課題>

胸腺発生異常変異体の表現型解析と責任遺伝子の同定、その機能解析をさらに進めることにより、胸腺形成をもたらす分子経路ネットワークを明らかにしていくことができると考えられる。これまでに責任遺伝子が同定できた4変異体においても、胸腺原基形成の段階、胸腺原基へのT前駆細胞の移入の段階、T前駆細胞の胸腺内での増殖の段階と、それぞれ少なくとも3つの別個の段階に異常を示すことが今回明らかになった。他の変異体からの情報の蓄積が期待される。

また、メダカにおけるマイクロレイ解析が充実すれば、変異体責任遺伝子の下流の遺伝子群についてより広範な理解が得られ、TILLINGでの逆遺伝学とのコンビネーションで胸腺発生を支配する遺伝子ネットワークの全体像の理解につながることを期待される。

<成果公表リスト>

1) 論文

0708021708

Li, J., Iwanami, N., Hoa, V.Q., Furutani-Seiki, M., and

Takahama, Y.:Noninvasive intravital imaging of thymocyte dynamics in medaka. J. Immunol. 179, 1605-1615 (2007).

2) データベース/ソフトウェア

なし