

内胚葉細胞の移動・消化管形成を制御する遺伝子の解析

●菊池 裕

広島大学大学院理学研究科

<研究の目的と進め方>

脊椎動物の初期発生過程において、多分化能を有する胚性幹細胞は、原腸陥入の開始に伴い三つの胚葉（内胚葉・中胚葉・外胚葉）に分化することが知られている。このような胚性幹細胞から三胚葉への分化及びその後起こる器官形成過程は、発生現象の解明を目的とした基礎研究のみならず、再生医療を目指した応用研究にも極めて重要である。

私は、現在までに受けた研究費により、内胚葉形成に異常を示す4種突然変異体を解析した結果、内胚葉形成に至る遺伝子制御カスケードを明らかにすることに成功した。しかし、内胚葉細胞誘導後に起こる移動・消化管形成機構に関しては、解析が非常に遅れている。そこで本研究課題では、内胚葉細胞特異的に蛍光を発するトランスジェニックフィッシュ (*sox17-gfp*) を用いて、発生初期における内胚葉細胞の移動や消化管形成に関与するゲノム機能を、分子生物学的・遺伝学的手法により網羅的かつ体系的に明らかにすることを研究目的としている。

<2008年度の研究の当初計画>

(1) マイクロアレイ解析による内胚葉細胞の移動・消化管形成に関与する遺伝子の単離

私は *sox17* プロモーターを用いて内胚葉細胞特異的に GFP 蛍光を発するトランスジェニックフィッシュ (*sox17-gfp*) を既に作製している。このトランスジェニックフィッシュから GFP の蛍光を指標にして内胚葉細胞のみをセルソーターにより集め、マイクロアレイ (Affymetrix 社) 解析により内胚葉細胞特異的に発現する遺伝子をスクリーニングする。マイクロアレイ解析は、内胚葉細胞が正中へ移動している原腸陥入後期、消化管を形成する体節形成前期の2点の発生段階で行う。内胚葉細胞と外胚葉・中胚葉細胞の遺伝子を比較することにより、内胚葉細胞特異的な遺伝子或いは内胚葉細胞で非常に強く発現する遺伝子を探索する。Affymetrix 社のマイクロアレイにより 14,900 以上の転写産物の発現解析を行うことが可能である。得られた遺伝子は、whole-mount in situ hybridization により内胚葉細胞での発現を確認する。

(2) 遺伝学的スクリーニングによる内胚葉細胞の移動・消化管形成に異常を示す突然変異体の単離

内胚葉細胞が特異的に GFP 蛍光を発するトランスジェニックフィッシュ (*sox17-gfp*) に突然変異を導入し、新規変異体のスクリーニングを計画している。新規変異体の解析により、内胚葉細胞の移動・消化器官の形成機構の解明を目標としている。現在私の研究室では、既に化学変異原 ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) による *sox17-gfp* フィッシュの処理を行い、突然変異誘発は終了している。平成 20 年度では、内胚葉細胞の移動・消化管形成が異常になる突然変異体を、蛍光実体顕微鏡の観察により単離する予定で

ある。

(3) 内胚葉細胞で発現する *cxcr4a* 遺伝子の機能解析

私の研究室では内胚葉細胞が完全に欠失している *casanova* ノックダウン胚と野生胚との間でマイクロアレイ解析を行い、原腸陥入期における内胚葉細胞特異的な遺伝子の単離を試みた。その結果、ケモカインレセプターである *cxcr4a* 遺伝子が内胚葉細胞で発現していることを見いだした。*cxcr4a* 遺伝子のモルフォリノによるノックダウン実験を行った結果、原腸陥入期における内胚葉細胞移動の阻害が観察された。更に *Cxcr4a* のリガンドである *Sdf1* は内胚葉細胞層を覆っている中胚葉細胞で発現しており、*sdf1* 遺伝子のノックダウン実験でも同様の阻害効果が観察されたことから、中胚葉細胞が内胚葉細胞の運動を制御していることが示唆された。平成 20 年度では、*Sdf1/Cxcr4* シグナルがどのように内胚葉細胞の運動を制御しているかに関して、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞レベルでの詳細な観察を行うと共に、運動の制御機構に関しても調べる予定である。

<2008年度の成果>

(1) マイクロアレイ解析による内胚葉細胞の移動・消化管形成に関与する遺伝子の単離

sox17-gfp トランスジェニックフィッシュから GFP の蛍光を指標にして内胚葉細胞のみをセルソーターで集めるための準備を行っている。

(2) 遺伝学的スクリーニングによる内胚葉細胞の移動・消化管形成に異常を示す突然変異体の単離

内胚葉細胞の移動・消化管形成が異常になる変異体のスクリーニングを行っている。候補となる変異体のライン化を行い、表現型の詳細な観察を試みている。

(3) 内胚葉細胞で発現する *cxcr4a* 遺伝子の機能解析

sox17-gfp トランスジェニックフィッシュを用いて、*Sdf1/Cxcr4* シグナルによる原腸陥入期の内胚葉細胞運動の制御機構に関して解析を行った。

最初に私達は、*cxcr4a* は内胚葉細胞特異的に発現しているが、リガンドである *sdf1a*, *sdf1b* は中胚葉細胞に発現していることを示した。*Sdf1/Cxcr4* シグナルは細胞の移動を制御していることが知られているため、*Sdf1/Cxcr4* シグナルが内胚葉細胞の移動に関与する可能性に関して解析を行った。アンチセンスモルフォリノオリゴを用いて *Sdf1/Cxcr4* シグナルの阻害実験を行った結果、*Sdf1/Cxcr4* シグナル阻害胚では3体節期において著しい内胚葉細胞の移動の阻害が観察された。また受精後 24 時間のコントロール胚では一本の消化管を形成するが、*Sdf1/Cxcr4* シグナル阻害胚では二股に分かれた消化管が観察された。以上のことから *Sdf1/Cxcr4* シグナルが内胚葉細胞の移動制御に関与することが示された。*Sdf1* は遊走惹起物質 (ケモアトラクタント) として機

能し、*cxcr4* を発現する細胞を誘引することが知られている。そこでゼブラフィッシュの内胚葉細胞の移動にも *Sdf1a*, *Sdf1b* がケモアトラクタントとして機能しているかに関して解析を行った。*Sdf1a* と *Sdf1b* の両方の機能を阻害した *Tg(sox17:EGFP)* 胚に、*sdf1a* もしくは *sdf1b* の過剰発現細胞を移植することにより、内胚葉細胞は移植細胞に誘引されることを示した。この結果よりゼブラフィッシュの内胚葉細胞の移動においても *Sdf1a*, *Sdf1b* がケモアトラクタントとして機能していることが明らかにされた。さらに *Tg(sox17:EGFP)* 胚を用いて 1 細胞レベルで観察を行うと、*Sdf1/Cxcr4* シグナル阻害胚では内胚葉細胞における糸状仮足形成の低下が観察された。

以上の結果から私達はゼブラフィッシュの内胚葉細胞の移動において次のようなモデルを考えている。中胚葉細胞ではリガンドである *sdf1a*, *sdf1b* が発現している。内胚葉細胞ではレセプターである *cxcr4a* が発現している。収斂伸長運動によりリガンドソースである中胚葉細胞は背側へ移動する。*Sdf1a*, *Sdf1b* がケモアトラクタントとして作用し、内胚葉細胞は移動する中胚葉細胞に引きつけられるように移動する。結果として内胚葉細胞は背側へ移動する。

本研究成果により、現在まで不明であった内胚葉細胞の移動を制御する分子メカニズムの一端を明らかにすることに成功した。以上の研究成果を *Development* に発表した(成果公表リストを参照)。

<国内外での成果の位置づけ>

発生過程における内胚葉細胞の運動に関して、ライブイメージングに成功したのは、私達の論文が国内外で初めてである。更に内胚葉細胞の運動における *Sdf1/Cxcr4* シグナルの役割を明らかにすることが出来たことは、重要な成果であると考えている。細胞移動機構の解析に初期胚を用いることは非常に有効であり、今後ゼブラフィッシュ胚などを用いた解析報告が増えることが予想される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

(1) マイクロアレイ解析による内胚葉細胞の移動・消化管形成に関与する遺伝子の単離

sox17-gfp トランスジェニックフィッシュから GFP の蛍光を指標にして内胚葉細胞のみをセルソーターで集めるための準備を行っている。しかし、実験に不慣れであるため条件設定に多くの時間が掛かっている。

<今後の課題>

(1) マイクロアレイ解析による内胚葉細胞の移動・消化管形成に関与する遺伝子の単離

セルソーターの条件検討を行い、マイクロアレイ解析・単離された遺伝子の解析を速やかに行う。

(2) 遺伝学的スクリーニングによる内胚葉細胞の移動・消化管形成に異常を示す突然変異体の単離

ENU により *sox17-gfp* フィッシュを処理し、三世代スクリーニング法により内胚葉細胞の移動・消化管形成が異常になる変異体の探索を行っている。スクリーニング数が少ないため変異体の候補は未だに得られていない。来年度はスクリーニング数を増やし、新規変異体の単離を目指す予定である。

(3) 内胚葉細胞で発現する *cxcr4a* 遺伝子の機能解析

本年度の研究成果により、内胚葉細胞運動における *Sdf1/Cxcr4* シグナルの機能に関して明らかにすることが出来た。今後は *Sdf1/Cxcr4* シグナルの下流で機能する分子制御機構を、1 細胞レベルで解析を行いたいと考えている。更に、原腸陥入期の胚を用いて、*Sdf1/Cxcr4* シグナル以外の細胞運動の制御機構に関して解析を進めたいと考えている。

<成果公表リスト>

論文

1.0901121021

Mizoguchi, T., Verkade, H., Heath, J.K., Kuroiwa, A. and Kikuchi, Y.: *Sdf1/Cxcr4* signaling controls the dorsal migration of endodermal cells during zebrafish gastrulation. *Development*, 135, 2521-2529 (2008).