

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、多分化能を持つ胚性幹細胞は、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。この様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。以上のような考えを基に、外胚葉・中胚葉の形成機構及び外胚葉性器官（表皮・神経系など）・中胚葉性器官（筋肉・心臓・腎臓・骨など）の形成機構は、非常に数多くの研究が為されてきた。しかし内胚葉及び内胚葉性器官（肺・胃・小腸・大腸・肝臓・膵臓など）は生存・生命維持に必要不可欠な器官であるにも関わらず、現在まで解析が非常に遅れていた。その理由としては、体の内部の器官であることから、マーカーとなる遺伝子や突然変異体を用いた解析が進まず、分子生物学的知見が大きく欠如していたことが原因と考えられる。

私は、8年前より脊椎動物の初期発生・器官形成機構の遺伝学的・分子生物学的解析に適したモデル実験動物であるゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いて、内胚葉形成機構の解析を行ってきた。私の研究グループは、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。更に私の研究室では、内胚葉性器官（肝臓・膵臓）形成が異常になる変異体のスクリーニングを行い、3種変異体の原因遺伝子の解析を行っている。しかし、内胚葉誘導後に起こる背側正中への移動や消化管形成の分子機構に関してはほとんど明らかにされていない。そこで本公募研究課題では、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遺伝子を、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。

<研究開始時の研究計画>

<2008年度>

(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期前期の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。多数のゼブラフィッシュ胚を集めることは容易であり、セルソーターにより GFP 蛍光を指標にして細胞を集める技術も確立しているため、技術的困難は予想されない。

(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。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。2008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。ゼブラフィッシュ変異体のスクリーニング法は確立されており、私の研究室でも既に1度行っているため、技術的困難は予想されない。

(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の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。2008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。現在の予備的な実験では、*Sdf1/Cxcr4* シグナルを阻害することにより、丸い形態の内胚葉細胞が増加し、仮足を出す回数が減少する結果が得られている。更に細胞レベルでの詳細な観察を行い、*Sdf1/Cxcr4* シグナルと細胞の形態変化を明らかにする。

<2009年度>

(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

マイクロアレイ解析により得られた内胚葉細胞特異的（或いは内胚葉細胞で強く発現する）遺伝子の機能を明らかにするため、mRNA 注入による過剰発現実験やモルフォリノアンチセンスオリゴ (モルフォリノ) を用いた翻訳阻害実験を行う。また、現在までに機能が明らかになっている内胚葉誘導に関与する遺伝子産物や内胚葉性器官（肝臓・膵臓）形成に関与する遺伝子産物との関連・相互作用に関して、変異体・モルフォリノ翻訳阻害胚を用いた解析や mRNA 過剰発現実験により明らかにする。mRNA 過剰発現やモルフォリノ翻訳阻害実験は既に確立された研究手法であり、技術的困難は予想されない。

(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

単離されたゼブラフィッシュ変異体は、詳細な表現型の解析を行い、原因遺伝子のクローニングを行う。更に、クローニングに成功した原因遺伝子に関しては、発現解析・異所的発現や遺伝子産物の生化学的解析を行う。原因遺伝子のクローニング及びその機能解析は既に確立されており、技術的困難は予想されない。

(3) 内胚葉細胞特異的に発現する *cxcr4a* 遺伝子の機能解析

原腸陥入期における内胚葉細胞の運動及び細胞形態に対する Sdf1/Cxcr4 シグナル経路と関係を明確にするため、内胚葉細胞内における filamentous-actin, Phosphoinositide 3,4,5-triphosphate の局在や Ras の活性化部位を調べる。*cxcr4a* 遺伝子の機能解析実験は、研究期間内に学術雑誌での論文発表を目指す。

<研究期間の成果>

(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 の蛍光を指標として内胚葉細胞のみをセルソーターで集めるための条件設定を行っている。

(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をスクリーニングし、候補変異体に関して表現型の詳細な観察を行っている。特に消化管形成が異常になる変異体に関して、表現型の詳細な解析を行っている。

(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。モルフォリノ (MO) 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 (図 1)。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 (図 1)。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わることが示された。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-

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)。

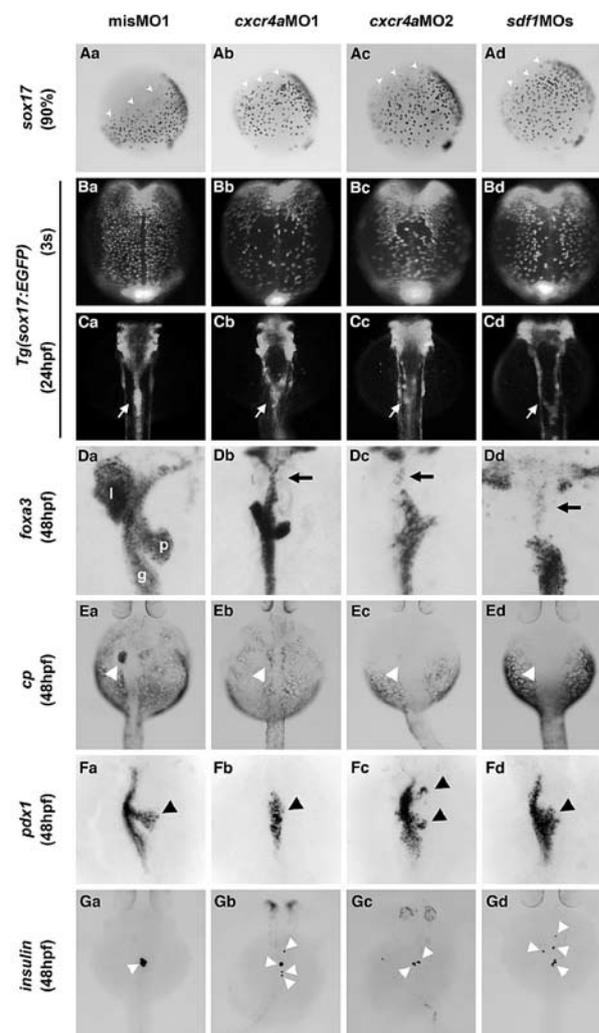


図 1. Sdf1/Cxcr4a シグナルは原腸陥入期における内胚葉細胞の移動を制御する

sdf1 或いは *cxcr4a* ノックダウン胚における内胚葉細胞の移動への影響を調べるため、内胚葉細胞特異的或いは内胚葉性器官特異的な遺伝子の発現を調べた。

内胚葉細胞 (*sox17*)、腸管・内胚葉性器官 (*foxa3*)、内胚葉性器官 (肝臓; *cp*、脾臓; *pdx1*、細胞; *insulin*) 特異的マーカー遺伝子の発現を調べた結果、Sdf1/Cxcr4a シグナルが阻害されることにより、内胚葉細胞の移動が遅くなり、内胚葉性器官が正常に形成されないことが明らかになった。

<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。私達の論文が発表されてから、ほぼ同じ内容の論文が Science に発表

された (Nair et al., Science, 322; 89, 2008) ことは、私達の論文の重要性を示していると考えられる。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>

最初に計画した3つの課題の中で、「内胚葉細胞で発現する *cxcr4a* 遺伝子の機能解析」は、当初の目標を十分達成出来たと考えている。また、「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」は、候補となる変異体を得ることに成功したため、ほぼ目標を達成出来たといえる。一方「マイクロアレイ解析による内胚葉細胞の移動・消化管形成に関する遺伝子の単離」に関しては、時間的な問題により目標を十分に達成させることが出来なかった。特にセルソーターによる内胚葉細胞の分離に関しては、条件設定に予想外の時間が掛かってしまった。

<今後の課題、展望>

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

セルソーターによる内胚葉細胞の分離条件を更に検討し、内胚葉細胞で特異的に発現する遺伝子の単離を行う。

(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

消化管形成が異常になる変異体に関して、表現型の詳細な解析と原因遺伝子のクローニングを行う。

(3)内胚葉細胞で発現する *cxcr4a* 遺伝子の機能解析

Sdf1/Cxcr4 シグナルと協調的に機能する因子のノックダウン実験を行った結果、内胚葉細胞の移動が遅れることが明らかになった。今後は、内胚葉細胞移動における速度や糸状仮足形成の変化に関して共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に観察を行う予定である。また、Cxcr4a レセプターとこの因子との生化学的相互作用に関して調べる。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 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).

2. 0905200936

Kinkel, M.D., Sefton, E.M., Kikuchi, Y., Mizoguchi, T., Ward, A.B. and Prince, V.E.: Cyp26 enzymes function in endoderm to regulate pancreatic field size. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 7864-7869 (2009).

2) 学会発表

1. Shunya Hozumi, Mitsuko Ogata, Akio Yoshizawa, Tohru Ishitani, Makiko Tsutsumi, Atsushi Kuroiwa, Motoyuki Itoh, Yutaka Kikuchi

Analysis of zebrafish mutant *morendo* showing defects of the digestive organ formation.

Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 29, 2008, Tokushima

2. Rie Asada, Mitsuko Ogata, Shunya Hozumi, Akio Yoshizawa, Tohru Ishitani, Makiko Tsutsumi, Atsushi Kuroiwa, Motoyuki

Itoh, Yutaka Kikuchi

Phenotypic analysis of zebrafish mutant *legato* that shows defects of the digestive organ formation.

Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 29, 2008, Tokushima

3. 穂積俊矢、尾形光津子、吉澤明生、石谷太、堤真紀子、黒岩厚、伊藤素行、菊池裕

ゼブラフィッシュの内胚葉性器官に異常を示す *morendo* 変異体の解析

日本分子生物学会、2008年12月10日、神戸

4. 溝口貴正、中村慎吾、熊田ひかり、吉澤明生、石谷太、堤真紀子、黒岩厚、伊藤素行、菊池裕

消化器官の形態形成に異常を示すゼブラフィッシュ変異体 *decrecendo* (*dec*) の解析

日本分子生物学会、2008年12月10日、神戸

5. 吉澤明生、石谷太、堤真紀子、黒岩厚、伊藤素行、菊池裕
ゼブラフィッシュ突然変異体 *kuririn* は終脳におけるニューロンの運命決定に異常を示す

日本分子生物学会、2008年12月10日、神戸

6. Shunya Hozumi, Mitsuko Ogata, Akio Yoshizawa, Tohru Ishitani, Makiko Tsutsumi, Atsushi Kuroiwa, Motoyuki Itoh, Yutaka Kikuchi

Analysis of zebrafish mutant *morendo* showing defects of the digestive organ formation.

Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 29, 2009, Niigata

7. Nobuyoshi Shimoda, Toshiaki Izawa, Yutaka Kikuchi, Naohiro Hashimoto

Zebrafish age with localized hypomethylation and extensive fragmentation of the genome.

Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Dec. 9, 2009, Yokohama

8. Takamasa Mizoguchi, Reiya Kanetou, Mega Landsverk, Mark C. Hannibal, David Kimelman, Yutaka Kikuchi

Mechanistic analyses of endodermal cell migration during gastrulation in zebrafish embryo.

Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Dec. 10, 2009, Yokohama

9. Shunya Hozumi, Ryo Hirabayashi, Akio Yoshizawa, Tohru Ishitani, Makiko Tsutsumi, Atsushi Kuroiwa, Motoyuki Itoh, Yutaka Kikuchi

Analysis of zebrafish mutant *morendo* showing defects of the digestive organ formation.

Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Dec. 11, 2009, Yokohama

10. Akio Yoshizawa, Shingo Nakamura, Yoshinari Nakahara, Toshiaki Izawa, Tohru Ishitani, Makiko Tsutsumi, Atsushi Kuroiwa, Motoyuki Itoh, Yutaka Kikuchi

Ha2 regulates the expression of *neurogenin1* mediated by repressing *her6/hes1* expression in zebrafish telencephalon.

Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Dec. 11, 2009, Yokohama

3) 図書

1. 溝口貴正, 菊池 裕

「内胚葉分化にかかわるシグナル、転写因子群の機能」
内分泌・糖尿病科 (2008) 26: 106-114.

2. 溝口貴正, 菊池 裕

「Sdf1/Cxcr4シグナルはゼブラフィッシュの原腸陥入期において内胚葉細胞の背側への移動を制御する」

細胞工学 (2008) 27: 1160-1161.