

論文の内容の要旨

論文題目

プラコード形成に関わる新規遺伝子の同定および機能解析

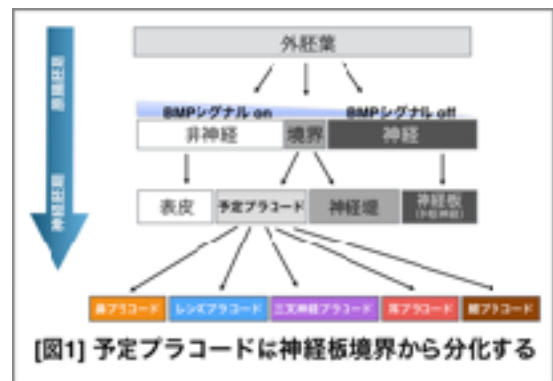
(Identification and characterization of the new novel gene involved in development of the placode)

氏名

渡邊 朋子

研究背景・目的

プラコードは脊椎動物の発生において、様々な頭部の感覚神経関連器官の原基として作られる、外胚葉由来の肥厚した組織である。プラコードは表皮が作られる領域と脳を含む中枢神経（神経板）が作られる領域の境界に形成され、その後増殖して遊走性を獲得し、脳下垂体前葉、嗅上皮、水晶体、三叉神経、側線そして耳胞等の器官に終分化する。プラコードの形成の分子機序は概ね以下の通りである（図1）。まず原腸胚期において、外胚葉は中内胚葉組織に裏打ちされ、BMP 阻害因子が拡散することにより BMP の濃度勾配が生じる。そして BMP シグナルを阻害されなかった領域は表皮へ、阻害された領域は神経板へと分化する。両者が接するところでは神経板境界が生じ、その非神経側からは予定プラコードが、神経側からは神経堤が形成される。予定プラコードはその後 Wnt シグナル等の調節を受け、鼻・レンズ・三叉神経・耳・鰓の各プラコードへ分化する。本研究ではこれまでに十分解明されてこなかった予定プラコードの形成機構に着目し、形成に必須とされる新規遺伝子の同定を目指した。



結果・考察

1、プラコード形成に関わる新規遺伝子の同定

BMPシグナル制御による予定プラコード様細胞の誘導

予定プラコードは一過的に形成される組織であり、外見から識別し単離することが困難であった。そこでツメガエル外胚葉片を用い、生体における発生過程を擬似的に再現することで予定プラコード細胞だけを特異的に誘導することを試みた。ツメガエル外胚葉細胞は BMP2/4/7 を多量に発現し、切り出して培養すると表皮へと分化する。一方で、BMP 阻害因子を作用させると神経へと分化する。そこで、BMP に直接結合してシグナル阻害をする Chordin (Chd) に着目し、その注入量を検討することで BMP シグナルの強度を調節し、予定プラコードマーカー遺伝子の発現量が変化するかどうか調べた。遺伝子の発現量を RT-qPCR 法で評価した結果、BMP シグナルの軽度阻害 (20 pg の Chd mRNA 注入) の条件で、予定プラコードマーカー遺伝子の発現量が上昇していることが分かった。他の外胚葉のマーカー遺伝子 (神経板、表皮、神経堤) の発現量についても同様の解析を行なった結果、同条件においては神経板、表皮、神経堤マーカー遺伝子の顕著な発現量上昇は見られなかった。

新規予定プラコード関連遺伝子の同定

次に誘導した予定プラコード様細胞に加え、表皮、神経堤、神経板の3種類の外胚葉の細胞についても誘導条件の検討を行い、DNAマイクロアレイによる比較解析を行い、予定プラコードに特異的に発現する新規遺伝子の同定を目指した。まず4つのサンプルのうち、予定プラコード様細胞において最も発現量が多かった128 遺伝子を候補遺伝子として選出した。予定プラコード様細胞と神経堤様細胞のどちらにおいても高発現する遺伝子が数多く見られたため、次に Cluster 3.0 を用いてクラスタリング解析を行い、既知の予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1* と発現の挙動の近いものを候補遺伝子の中から選択した。その結果、47 遺伝子が選出された。さらに、whole-mount *in situ* hybridization スクリーニングを行い、尾芽胚期における各プラコード、および初期神経胚期における予定プラコードで mRNA の発現が確認出来た遺伝子を選び、新規予定プラコード関連因子として *Fam46a* 遺伝子を同定した。

本研究では複雑なプラコード形成機構の解明の一端として BMP シグナルのみの強度を調節することにより、特異的に予定プラコード様細胞が誘導出来ることを解明した。今後は実際の発生過程において BMP シグナルに加えて働いていると考えられる、FGF シグナルや Shh シグナル等の他のシグナル経路についても合わせて条件検討することで、より精度の高い PPE 細胞誘導系を確立することが必要とされる。また、予定プラコードに発現する新規遺伝子を同定することに成功した。この成果は発生学のみならず、再生医療分野でも応用されることが期待される。

2、新規予定プラコード遺伝子 *Fam46a* の機能解析

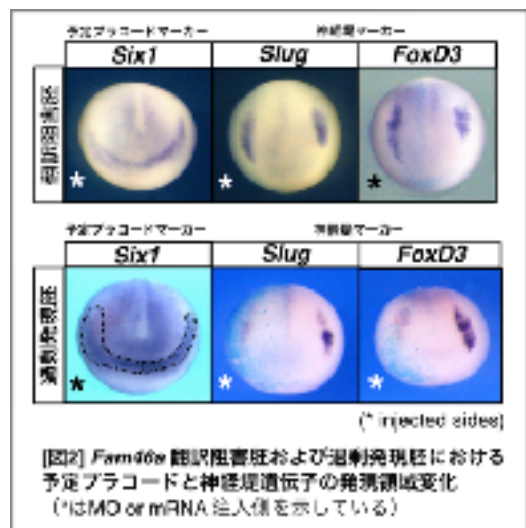
Fam46a の発現パターンの解析

新たに同定した *Fam46a* 遺伝子の詳細な空間的発現を解析するために、*in situ* hybridization により発現パターンの解析を行なった。解析の結果、*Fam46a* は胞胚期に動物極側で強く発現し、*maternal* にも発現があることが分かった。初期の神経胚期においては、予定プラコードに発現が見られ、尾芽胚期においては鼻、鰓、そして耳の各プラコードにおいて発現が見られた。さらに発生の進んだ初期幼生においては、上鰓骨側線、嗅上皮、そして耳胞において発現が見られた。これらの発現パターンは既知の予定プラコードマーカー遺伝子である *Six1*, *Eya1* と類似していた。次に *Fam46a* の時間的発現を解析するために、各発生ステージにおける胚からRNAを抽出し、cDNAを合成してStage PCRを行なった。Stage PCRの結果は、*Fam46a* が原腸胚期から初期幼生期まで発現していることを示した。したがって、*Fam46a* は予定プラコードおよび後期の鼻、鰓、耳のプラコードに発現する有用なマーカー遺伝子であることが示された。

Fam46a 発現による外胚葉パターンニングへの影響の検証

次に *Fam46a* の機能を探索するために、*Fam46a* の翻訳阻害胚および過剰発現胚を作成し、表現型観察を行った。3日目胚において表現型観察を行ったところ、翻訳阻害胚においては、眼の欠損および体色が暗くなる色素沈着異常が見られた。一方で過剰発現胚においては、眼を含む頭部欠損と体軸の縮小および体色異常の表現型が見られた。体色に関わる色素細胞は、神経堤由来の細胞から分化することが知られている。したがってこの結果は、*Fam46a* が神経堤に対しても作用を持っていることを示唆した。そこで次に、*Fam46a* 翻訳阻害胚および過剰発現胚の神経胚期におけるパターンニング変化を *in situ*

hybridization 法により解析した。その結果、*Fam46a* の翻訳阻害により、予定プラコードマーカー遺伝子の発現領域が縮小し、逆に隣接する神経堤マーカー遺伝子の発現領域が拡大していることが分かった (図2)。また反対に *Fam46a* を過剰発現させた際には予定プラコードマーカー遺伝子の発現領域が拡大し、神経堤マーカー遺伝子の発現領域は縮小していた。この結果は、*Fam46a* の発現が予定プラコード形成に必須であり、その一方で隣接する神経堤の分化に対しては阻害的に作用していることを示した。



Fam46a と BMP シグナルの関連性の検証

次に予定プラコード形成における *Fam46a* の作用機序の探索を行った。外胚葉のパターンニングの過程においては BMP シグナルが重要な役割を担っており（図 1）、*Fam46a* も先行研究においてシグナル構成因子 *Smad1* と相互作用があることが報告されていた（Colland et al., 2015）。そこで次に *Fam46a* と BMP シグナルの関連性について検証実験を行なった。ツメガエル外胚葉片において、*Fam46a* mRNA を注入し過剰発現させたところ、BMP シグナルターゲット遺伝子である *Vent1*, *Vent2* の発現量の顕著な上昇が見られた。この結果は *Fam46a* が BMP シグナルターゲット遺伝子の発現を促進させていることを示した。

BMP シグナルは BMP 2/4/7 などを用いたリガンドとし、*Smad 1/5/8* が受容体に直接リン酸化され、*Smad4* と複合体を形成した後に核移行し、ターゲット遺伝子のプロモーター配列に結合することで転写を促進する。そこで次に、BMP シグナル構成因子である *Smad1*, *Smad4* と *Fam46a* との間で結合が見られるかどうかを、共免疫沈降法により検証した。その結果、*Fam46a* と *Smad1* 間、*Fam46a* と *Smad4* 間のいずれにおいても結合があることが確認された。さらに、BMP シグナルターゲット遺伝子である *Id3* のプロモーター配列を用いたルシフェラーゼアッセイを行なった結果、*Fam46a* 発現により、*Smad1* 発現時と同様に *Id3* の転写の活性化が起こることが示された。以上の結果から、*Fam46a* は BMP シグナル構成因子と結合し、さらに自身も核移行することでターゲット遺伝子の転写を活性化していることが示された。

本研究で新たに同定された予定プラコードマーカー遺伝子 *Fam46a* の発現は、予定プラコード形成に必要とされ、一方で神経堤分化に対しては阻害的に作用していた。このことは予定プラコードに発現する遺伝子が隣接する神経堤に対しては阻害的な作用を持っており、それにより境界規定が強化されていること示唆した。また、その作用機序としては BMP シグナルの活性化があることが分かった。*Fam46a* は BMP シグナル構成因子である *Smad1*, *Smad4* と結合し、ターゲット遺伝子の発現を促進していた。実際の発生過程においては同時期に他の転写因子が働いていることが報告されているため、今後はそれらの因子との関連性を検証することで、より詳細な予定プラコード形成機構が解明されることが期待される。総じて、本研究の成果は予定プラコード形成機構の一端を解明することになったと考える。