

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07070

研究課題名(和文) 有袋類胚における頭部神経堤細胞のヘテロクロニ-的発生の制御機構の解明

研究課題名(英文) Heterochronic regulatory mechanisms of cranial neural crest development in marsupials

研究代表者

若松 義雄 (WAKAMATSU, YOSHIO)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60311560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：有袋類は有胎盤類に比べて未熟な状態で生まれるが、母乳を飲むために顎が早く発生する。本研究の研究代表者は、顎原基形成に関わるSox9遺伝子が神経堤において早期に発現を始めることや、Sox9の神経堤エンハンサーに有袋類特異的な変異があることを示している。このエンハンサーの活性制御についてウズラ胚を用いて解析した結果、神経堤発生に重要なWntシグナルはエンハンサー活性に影響を及ぼさず、神経境界形成に働くMyb遺伝子が重要であることがわかった。一方、同様の解析をオポッサム胚/由来細胞でおこなうことを計画したが、全胚培養法の開発、iPS細胞や神経堤細胞を誘導する実験が不調に終わり、課題として残った。

研究成果の概要(英文)：Marsupial neonates are immature at birth, compared to placentals. Since they must suckle on mother's milk, their jaws develop early. Yet, underlying mechanisms regulating this temporal shift of developmental program is unknown. We have previously found that Sox9 expression is turned on early in the cranial neural crest of opossum embryos, compared to mouse ones, and that marsupial-specific sequence alteration in the neural crest enhancer of Sox9 is responsible, at least in part, for this temporal shift. In this study using quail embryos, we have found that Myb transcription factor, a neural-border specifier, activates the enhancer, while Wnt signaling, a neural crest inducer, does not. Aiming to perform similar experiments in opossum embryos/cells, our attempts of culturing opossum embryos, making iPS cells, or direct-reprogramming of fibroblasts into neural crest cells all failed. Thus, technical improvements of these methods seem to be essential for future studies.

研究分野：発生生物学・進化生物学

キーワード：哺乳類 進化 ヘテロクロニ- 有袋類 神経堤 顎 エンハンサー

1. 研究開始当初の背景

(1) マウスなどのモデル実験動物を用いた研究によって、胚発生の制御機構のうち様々な動物種間で共通する部分についての理解が飛躍的に進んだ。一方で、種間の多様性がどのようなゲノムの変化によって実現されるのかは、ほとんどわかっていない。近年、様々な生物のゲノム配列が決定されるようになり、種の多様性に遺伝子レベルでアプローチできる状況になりつつある。

発生プログラムの時間的な変更が形態の変化につながるとする“異時性=ヘテロクロニー”という概念が知られている。例えば、カンガルー等の有袋類では、侵襲性の胎盤を持たないために胎児期に母体からの栄養供給が比較的短期間に限定されるため、ヒトやマウスなどの有胎盤類と比べて相対的に未熟な状態で生まれる。しかし、母親の育児嚢まで這って移動し、母乳を飲んで個体発生を進める必要がある。そのために、有袋類の新生仔では後肢が未発達である一方前肢には筋肉や骨格、爪が発達するという発生段階の差異が生じ、また顎が発達して乳首をくわえることができる。このように、有袋類では一部の組織、器官が前倒して発生するが、顎については、顎原基の元となる頭部神経堤細胞が非常に早く形成されることが知られていた。しかし、この頭部神経堤細胞が“早く”形成されることの背景にある遺伝的制御機構については、全くわかっていなかった。

本研究計画の研究代表者の若松と分担研究者の鈴木のチームはこれまでに、有袋類の一種であるオポッサムについて解析をおこない、頭部神経堤の形成に重要な Sox9 遺伝子が将来頭部神経堤を作る神経境界領域に早期に発現すること、Sox9 遺伝子の神経堤特異的発現をになうエンハンサーに有袋類のみ保存された配列が存在していること、有袋類型に改変したエンハンサーを GFP 遺伝子と連結したレポーター遺伝子を鳥類胚に導入すると、内在性の Sox9 よりも早いタイミングで神経境界に発現を開始することを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究を進展させ、有袋類の頭部神経堤細胞のヘテロクロニ的発生機構の基盤となると考えられる Sox9 遺伝子の早期発現を可能にしている分子メカニズムについて理解を深めるために、以下のような実験計画を立てた。

3. 研究の方法

(1) 有袋類型 Sox9 エンハンサーの発現制御機構の解析

これまでの実験から、有袋類型の Sox9 神経堤エンハンサーを持つ GFP レポーター遺伝子を鳥類胚に導入すると、内在性の Sox9 よりもずっと早いタイミングで予定神経堤領域にレポーター遺伝子の活性化がみられることがわかっている。この“早いタイミング”とは、Sox9 を含む神経堤特異的遺伝子が発現する予定神経堤領域を規定する Pax7 等の“神経境界領域”遺伝子群の発現タイミングと一致している。神経境界の形成には Wnt シグナルなどの複数のシグナル伝達系が関わっていることが知られている他、神経境界形成に関わる転写因子である Pax7 遺伝子の活性化には c-Myb 遺伝子が重要であることが知られている。さらに、有袋類型の Sox9 神経堤エンハンサーには c-Myb の結合配列が含まれている。これらのことから、オポッサムの Sox9 遺伝子の発現は、本来神経境界領域遺伝子を活性化する仕組みを利用して、早く発現するように制御されていると予測された。そこで、鳥類胚を用いてオポッサム型 Sox9 エンハンサー配列に対する c-Myb やその他の神経境界領域形成に関わる制御メカニズムの影響を調べる。

(2) 有袋類胚の全胚培養と遺伝子導入実験系の確立

オポッサム胚で遺伝子機能を解析する技術は全く無い。そこで、取り出した胚を培養し、そこに電気穿孔法によって遺伝子導入する実験系の確立を目指す。

(3) 有袋類由来の iPS 細胞や神経堤細胞の誘導

オポッサム胚の全胚培養系の確立にいたらない可能性も十分ありえるため、オポッサムから繊維芽細胞を取り出して培養し、iPS 細胞にリプログラミングする、iPS 細胞ができた場合、それをさらに神経堤細胞に文化誘導する。また、最近になってマウスやヒト由来の線維芽細胞に Sox10 遺伝子を強制発現させることで神経堤細胞にリプログラミングすることができるようになってきているので、オポッサム由来の線維芽細胞を用いて同様の実験をおこなう。

(4) 有袋類胚/細胞を用いた有袋類型 Sox9 エンハンサーの発現制御機構の解析

上記実験計画(1)~(3)がうまくいった場合、有袋類胚/細胞を用いてエンハンサーの活性制御機構について、解析をすすめる。

(5) 新たなエンハンサーの探索

これまで解析してきた有袋類型神経堤エンハンサーが唯一のエンハンサーであるかどうかは不明である。そこで、オポッサム Sox9 遺伝子周囲 1.5Mbp の配列断片を GFP レ

ポーターに組み込み、ウズラ胚に導入して、頭部神経堤で活性化される新たなエンハンサーを探索する。

4. 研究成果

(1) 有袋類型 Sox9 エンハンサーの発現制御機構の解析

有袋類型 Sox9 神経堤エンハンサーを含む GFP レポーター遺伝子をウズラ胚に導入する際に、他の遺伝子を共導入して、レポーターの活性の変化を調べる実験をおこなった。Wnt シグナルを強制的に活性化するために、恒常活性化型の LEF1 遺伝子や安定型 カテニン遺伝子を共導入したが、GFP の発現に変化はなかった。一方、c-Myb 遺伝子を共導入した場合には異所性の GFP レポーターの発現が検出されたことから、c-Myb が有袋類型のエンハンサーに結合して活性化した可能性が考えられた(図1)。そこで、有袋類型 Sox9 神経堤エンハンサーを含むルシフェラーゼレポーター遺伝子を作成し、c-Myb とともに 3T3 や MDCK 等の複数の培養細胞株に導入して、レポーターの活性に対する影響を調べたが、顕著な変化は認められなかった。そこで、同様の遺伝子セットをウズラ胚に導入してルシフェラーゼレポーターの活性化を調べたところ、やはり活性化が認められたことから、胚組織に発現する c-Myb 以外の遺伝子が協調して働くことが重要であると推測された。

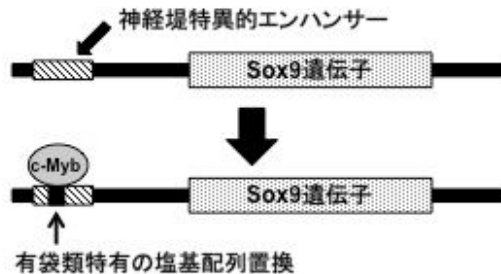


図1: 羊膜類の共通祖先の Sox9 遺伝子(上)に存在した神経堤特異的エンハンサーに、有袋類の進化過程で塩基置換がおきてそこに c-Myb が結合することで Sox9 の発現時期が早まったと考えられる。

(2) 有袋類胚の全胚培養と遺伝子導入実験系の確立

これまでの実験から、高酸素分圧(90% O₂)と低温度(35℃)で培養オポッサム胚の状態をある程度改善できていた。そこで、これまでのラット血清や牛胎児血清から、新たに調製したオポッサム血清に変更して培養を試みたが、特段の変化はみられなかった。また、高酸素により生じるフリーラジカルの悪影響が考えられたため、抗酸化剤の投与も試したが、やはり顕著な効果は得られず、最終的に遺伝子発現制御解析に用いることのできる全胚培養系は確立できなかった。

(3) 有袋類由来 iPS 細胞や神経堤細胞の誘導
オポッサム新生仔より線維芽細胞の初代培養をおこなった。そこに山中4因子の発現ベクターを導入し、マウス iPS 細胞培養条件下で培養をおこなったものの、iPS 細胞らしい形態の細胞塊はえられなかった。そこで、Sox10 の神経堤エンハンサーに GFP をつなげたレポーターを入手し、Sox10 発現ベクターとともに線維芽細胞に導入、神経堤誘導条件下で培養した。ときおり GFP 陽性細胞は出現するも、レポーターの発現の特異性が低いことや、Sox10 の発現誘導が十分でないという問題があり、オポッサム線維芽細胞をリプログラミングして神経堤細胞に分化誘導するという試みは成功しなかった。

(4) 有袋類胚/細胞を用いた有袋類型 Sox9 エンハンサーの発現制御機構の解析

計画の(2)(3)で十分な成果が得られなかったため、オポッサム胚やオポッサム由来細胞を用いた解析をおこなうことはできなかった。

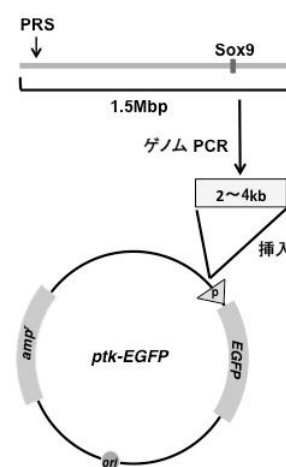


図2: オポッサム Sox9 遺伝子の近傍 1.5Mbp の領域から一箇所につきおよそ 2~4kb のゲノム配列の断片を増幅し、GFP レポーターの ptk-EGFP に挿入した。ヒトやマウスでは PRS に変異が入ると顎の形態異常がおきる。

(5) 新たなエンハンサーの探索

オポッサム Sox9 遺伝子の上流 350kb について、タスマニアデビルと高い相同性を示す配列を PCR により増幅し、GFP レポーター遺伝子に連結したものを作成して、ウズラ胚に導入後に GFP の活性を調べた(図2)。またヒトやマウスの Sox9 遺伝子上流に、変異が入ると顎の形態に異常が生じる配列が知られている (PRS: 図2参照)。オポッサムゲノムの対応する領域とその近傍についても同様に解析したが、いずれの場合も顕著なエンハンサー活性は認められなかった。また、Sox9 のイントロンについて調べたところ、神経板に弱いエンハンサー活性が認められたが、予定神経堤領域特異的なものはなかった。

これらの研究成果により、有袋類の頭部神経堤と顎原基のヘテロクロニック的発生について、分子的、遺伝的メカニズムの一端が明らかになった。一方、オポッサム胚・細胞を用いた解析は実験系の開発が道半ばであり、有袋類の発生研究のためには今後の実験系

の開発を進めなければならない。また、新たなエンハンサーの探索には研究の継続が必要である。

<引用文献>

Wakamatsu Y, Nomura T, Osumi N, Suzuki K. Comparative gene expression analyses reveal heterochrony for Sox9 expression in the cranial neural crest during marsupial development. *Evo. Dev.* 16, 197-206, 2014.

Bagheri-Fam S, Barrionuevo F, Dohrmann U, Gunther T, Schule R, Kemler R, Mallo M, Kanzler B, Scherer G. Long-range upstream and downstream enhancers control distinct subsets of the complex spatiotemporal Sox9 expression pattern. *Dev. Biol.* 291, 382-397, 2006.

5. 主な発表論文等

(研究代表者及び研究分担者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

- (1) Nomura T, Ohtaka-Maruyama C, Yamashita W, Wakamatsu Y, Murakami Y, Calegari F, Suzuki K, Gotoh H, Ono K. The evolution of basal progenitors in the developing non-mammalian brain. *Development* 143, 66-74 (2016) DOI: 10.1242/dev.127100. (査読有)
- (2) Kuwada-Kusunose T, Suzuki K, Fuse M, Matsumoto T, Kusunose A, Niimi T, Tamamura R, Okada H, Sakae T. Observation of carious lesions on undecalcified tooth sections with silver staining method for protein gel electrophoresis. *J. Hard Tissue Biol.* 25, 15-20 (2016). (査読有)
- (3) Suzuki T, Osumi N, Wakamatsu Y. Identification of the neural crest-specific enhancer of *Seraf* gene in avian peripheral nervous system development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467, 1103-1109 (2015) DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.074. (査読有)
- (4) Shida H, Mende M, Takano-Yamamoto T, Osumi N, Streit A, Wakamatsu Y. Otic placode cell specification and proliferation are regulated by Notch signaling in avian development. *Dev. Dyn.* 244, 839-851 (2015) DOI: 10.1002/dvdy.24291. (査読有)

[学会発表](計 3 件)

- (1) Wakamatsu Y, Egawa S, Terashita Y, Osumi N, Kawasaki H, Tamura K, Suzuki K. Homeobox code in the jaw primordia

of marsupial opossum (*Monodelphis domestica*) may represent the prototypical state for heterodont dentition of mammals. 日本発生生物学会年会第 50 回大会、2017

- (2) 若松義雄. 「有袋類における頭部神経堤のヘテロクロニー的発生メカニズム」第 27 回日本色素細胞学会シンポジウム「神経堤細胞研究の新展開」、2016
- (3) Wakamatsu Y, Osumi N, Suzuki K. Recruitment of Sox9 to the neural border specification program in marsupial cranial neural crest development. 日本発生生物学会年会第 48 回大会、2015

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若松 義雄 (WAKAMATSU YOSHIO)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 60311560

(2) 研究分担者

鈴木 久仁博 (SUZUKI KUNIHIRO)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号: 30256903

(3) 連携研究者

なし