

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06699

研究課題名(和文) 肢芽内の未知のレチノイン酸分布の可視化による探索

研究課題名(英文) Visualization of retinoic acid gradients underlying the mouse limb formation

研究代表者

下 蘭 哲 (SHIMOZONO, Satoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：40391982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は遺伝子にコードされたレチノイン酸プローブ、mGEPRAを発現するトランスジェニックマウスを作成し、胎仔期における四肢の発生におけるレチノイン酸の役割を解明することを試みた。当初、前後軸に沿ったレチノイン酸分布があるとの想定のもと、マクロズーム顕微鏡や共焦点顕微鏡を用いて解析を行ったが、特徴的な分布は観察されなかった。しかしながら、トランスジェニックマウス胎仔(胎生9日、10日)の前肢を含む急性スライスを作成し、レチノイン酸分布を解析したところ、これまでのsource-sinkモデルでは説明のつかない分布を示すことを発見した。更にこの分布のメカニズムを探るべく組織学的解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レチノイン酸はビタミンAを摂取した後に体内において代謝されて生成される生理活性物質である。レチノイン酸は生体内において様々な機能を果たすが、そのうちの 하나가脊椎動物の発生時における形態形成における役割である。その活性のために妊娠中にレチノイン酸を大量に摂取すると奇形をもつ赤ちゃんが産まれることがある。このように重要な生理活性物質でありながら、体内分布の定量的な理解は遅れていた。申請者は、レチノイン酸を、生きたマウス胎仔において観察できる技術を開発し、レチノイン酸の効果が顕著にあらわれる四肢の解析を行った。その結果、未知のレチノイン酸濃度勾配を発見した。

研究成果の概要(英文)：I have developed gene-encoded probes for retinoic acid (GEPRA). Using mouse lines expressing mGEPRA (improved version of GEPRA), I aimed to find novel retinoic acid distributions in the developing limb.

First, I hypothesized retinoic acid concentration gradients along the antero-posterior axis of the limb. While I analyzed the RA distributions by using a macro-zoom microscope and a confocal microscope, I did not find the concentration gradients. When I analyzed the RA distribution using acute slices across the forelimb, however, I found RA concentration gradients along the proximo-distal axis, which cannot be explained by the source-sink model. I further conducted histological analysis of the limb to reveal the mechanisms generating the gradient.

研究分野：発生生物学

キーワード：FRET レチノイン酸 肢芽

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レチノイン酸は脊椎動物の多くの器官形成を制御する強力な生理活性物質である。四肢においても形態形成を制御する中心的なシグナリング分子として、1980年代から活発に研究されてきた。これまでの研究の結果、前後軸に関しては、レチノイン酸が、肢芽内に ZPA (zone of polarizing activity) と呼ばれる小領域を誘導し、誘導された ZPA から分泌される Shh (sonic hedgehog) が濃度勾配を形成することにより前後軸に沿った形態形成を引き起こす、というモデルが認められつつある。しかし現在までこのモデルを支持する、ZPA 特異的なレチノイン酸分布は観察されていない。この原因を私はレチノイン酸分布の検出手段の低感度等にあると考えた。私は定量的レチノイン酸プローブ、GEPR4 (*Nature* 496, 363–366 (2013)) を開発しており、ゼブラフィッシュの後脳形態形成において、レチノイン酸の直線的濃度勾配が形成されること及びその濃度勾配と後脳の形態の間に相関があることを見出している。この濃度勾配は、ゼブラフィッシュのコミュニティーにおいてレチノイン酸分布可視化のスタンダードとして用いられていた EYFP をレポーターとしたレポーター遺伝子アッセイ (転写因子であるレチノイン酸受容体の結合配列の下流に EYFP を配置したもの) では検出できなかったものである。

2. 研究の目的

四肢の形態形成は発生生物学の主要な研究領域の一つである。レチノイン酸は脊椎動物の多くの器官形成において中心的な生理活性物質の一つであり、四肢についても形態形成を制御する主要なシグナリング分子として、1980年代から活発に研究されてきた (*Nature* 296, 564–566 (1982))。このようにレチノイン酸は四肢形態形成に重要でありながら、その分布については、レチノイン酸の合成酵素・分解酵素の発現パターンに基づくものやレポーター遺伝子アッセイによるものであり、定量的とは言い難い。本研究において、四肢形態形成におけるレチノイン酸が果たす役割を可視化により定量的に理解することを目指す。

3. 研究の方法

改良型 GEPR4 (mGEPR4) 発現トランスジェニックマウスは既に樹立している。このマウスを用いて胎生 10 日を中心に、肢芽内レチノイン酸分布を可視化する。

まず胎生 9 日及び 10 日胚の広域的レチノイン酸分布を検討する。マクロズーム顕微鏡 (最大 5.5 cm 四方の領域を観察可能。MVX-10, Olympus) を用いて、胎生 9, 10 日における広域的なレチノイン酸分布を可視化し、胚芽形成部位周辺 (体幹) におけるレチノイン酸分布を検討する。マクロズーム顕微鏡にて濃度勾配を観察した後、2 光子顕微鏡を用いた詳細な観察を行う。

4. 研究成果

(1) 肢芽の前後軸に沿ったレチノイン酸濃度勾配の探索

研究の背景に記述した通り、前後軸に関しては、レチノイン酸が、肢芽内に ZPA (zone of polarizing activity) と呼ばれる小領域を誘導し、その誘導された ZPA から分泌される Shh (sonic hedgehog) が濃度勾配を形成することにより前後軸に沿った形態形成を引き起こす、というモデルが認められつつある。これまで LacZ をレポーターとして用いたレポーター遺伝子アッセイによっては前後軸に沿ったレチノイン酸濃度勾配は発見されていない。

胎生 9, 10 日目の mGEPR4 トランスジェニックマウスの肢芽のレチノイン酸をマクロズーム顕微鏡にて検討した。全身および摘出した肢芽を用いて観察を行ったところ、前後軸に沿った (ZPA と対応するような) レチノイン酸分布は観察されなかった。マクロズーム顕微鏡は深さ方向の分解能が非常に低い。深さ方向の極局所にレチノイン酸濃度勾配がある可能性を検討するために、2 光子顕微鏡を用い

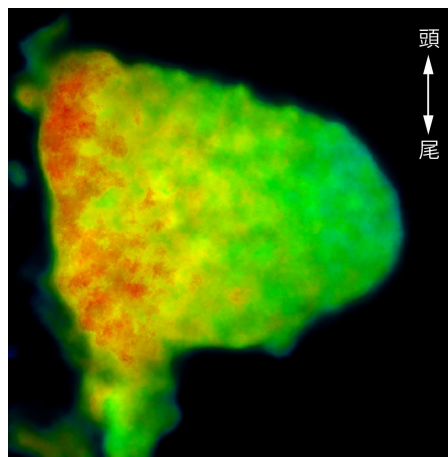


図 1、胎生 10 日の mGEPR4 トランスジェニックマウスから肢芽を単離し 2 光子顕微鏡により観察。赤：高レチノイン酸、緑：低レチノイン酸。

て摘出した枝芽の観察を行った（図 1）。しかし前後軸に沿ったレチノイン酸濃度勾配の存在は確認できなかった。mGEPRA マウスにおいては様々な器官の既知のレチノイン酸濃度勾配の検出に成功し、また、未知のレチノイン酸分布も発見していることから、枝芽においては前後軸に沿ったレチノイン酸濃度勾配は存在しない可能性が高いと考えている。

(2) 遠近軸、背腹軸に沿ったレチノイン酸濃度勾配の探索

次に枝芽の遠近軸（体幹から枝芽先端）および背腹軸にかけてのレチノイン酸濃度勾配を検討した。遠近軸については、体幹部にレチノイン酸合成酵素発現領域があり、枝芽先端部にレチノイン酸分解酵素発現領域があるため、体幹から枝芽先端にかけての濃度勾配が一般に想定されている（Source-Sink モデル）。確かに我々もゼブラフィッシュの後脳において、レチノイン酸の合成部位から分解部位にかけての直線上の濃度勾配を観察している。

枝芽を含む急性スライスを作製し、マクロズーム顕微鏡を用いて、遠近軸、背腹軸に沿ったレチノイン酸濃度勾配を検討したところ、上記 Source-Sink モデルでは説明のできない濃度勾配が存在することを発見した。現在、そのメカニズムについて組織学的検討を進めている。

(3) 超低親和性の GEPRA プロープの開発

ゼブラフィッシュ発生時のレチノイン酸分布観察において、レチノイン酸に反応しない GEPRA 変異体として GEPRA-AA プロープ（2 アミノ酸の変異を持つ）を用いた。このプロープは、見かけの解離定数が 50 nM を持ち、ゼブラフィッシュに GEPRA-AA を発現させたところ、レチノイン酸シグナルは観察されなかった。

しかし、mGEPRA-AA 発現マウスの胎仔から様々な器官を摘出し、観察したところ、レチノイン酸シグナルが観察された。生化学的解析からマウス胎仔の全身の平均のレチノイン酸濃度は、~20 nM 程度という報告がある。局所的には非常に高濃度のレチノイン酸が存在することを示している。従って、mGEPRA-AA よりも親和性の低いプロープを作製することにした。mGEPRA-AA は先述の通り mGEPRA と比較して 2 アミノ酸の変異を持つが、レチノイン酸に対する親和性を低下させることが示されている変異をもう 1 箇所導入し、mGEPRA-AAA を開発した。mGEPRA-AAA をマウスイメージングのネガティブコントロールとすべく mGEPRA-AAA をトランスポゾンによりマウスゲノムに組み込んだ。その結果、mGEPRA-AAA マウスを樹立することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirano Masahiko, Ando Ryoko, Shimozono Satoshi, Sugiyama Mayu, Takeda Noriyo, Kurokawa Hiroshi, Deguchi Ryusaku, Endo Kazuki, Haga Kei, Takai-Todaka Reiko, Inaura Shunsuke, Matsumura Yuta, Hama Hiroshi, Okada Yasushi, Fujiwara Takahiro, Morimoto Takuya, Katayama Kazuhiko, Miyawaki Atsushi	4. 巻 -
2. 論文標題 A highly photostable and bright green fluorescent protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41587-022-01278-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下園 哲
2. 発表標題 生体内レチノイン酸分布の可視化
3. 学会等名 第126回日本解剖学会、第98回日本生理学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Shimozono
2. 発表標題 Visualization of retinoic acid gradients
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------