

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570220

研究課題名（和文） 両生類胚の腹部血島の分化にかかわる新たな因子の同定と解析

研究課題名（英文） Isolation and analyses of novel regulatory factors in differentiation of blood islands of frog embryo

研究代表者

前野 貢 (MITSUGU MAENO)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：10190315

研究成果の概要（和文）：本研究では、アフリカツメガエル胚で発見された新規制御因子 Val および Rdd の生理学的・生化学的な解析をおこなった。核局在因子である Val については、様々な欠損変異体を作製し、それぞれの生理活性と核局在性を調べた。また分泌因子 Rdd の胚体内での局在性を調べ、この因子が血管内皮細胞の分化と密接なかかわりを持っていることを示した。さらに、骨髓球の 2 つの胚体内起源とそれらの分化制御のしくみを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The physiological and biochemical properties of Val and Rdd proteins found in the *Xenopus* embryo have been investigated. We examined the biological activity and biochemical property of the various deletion mutants of Val. We also examined the association of Rdd proteins in the vascular system in the developing embryo. Furthermore, two distinct origins and differential regulations of primitive myeloid cells appeared in the tailbud embryo have been analyzed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：器官形成

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物両生類初期胚における組織の分化において、BMP（骨形成蛋白質）シグナルは極めて重要な働きをしていることがわかっている。中胚葉系列では、中軸、沿軸、中間、側板および腹部中胚葉など異なる中胚葉コンパートメントが形成されていくときに BMP シグナルは位置情報を与える主要な因子である。中間中胚葉からは腎臓、生殖巣、血管、

血球などが、側板中胚葉からは腸間膜や間充織が、腹部中胚葉からは血球が分化してくる。さらに腹部中胚葉のうち前方領域からは心臓や胚性白血球が、後方領域からは主に胚赤血球が分化してくる。これらの前後軸に沿った腹部組織分化パターンにはオーガナイザーに由来する wnt 阻害因子が重要な働きをしていることがわかっているが、個々の器官、組織

が分化するための分子制御機構の詳細は明らかにされていない。

研究代表者らは、アフリカツメガエル胚を用いサブトラクションハイブリダイゼーションを行うことによりBMP-4の下流で発現してくる遺伝子を濃縮したライブラリーを作製し、このライブラリーから興味深い発現パターンを示すcDNAクローン*val* (*ventrally associated leucine-zipper*)および*rdd* (*repeated D domain-like*) を分離した。*val* のmRNA は神経胚期から尾芽胚期にかけて予定血島領域を含む腹側組織に局在して発現していた。*val* がコードするタンパク質はロイシンジッパーモチーフ、プロリンに富む反復配列などを含むことから、このタンパク質は胚腹部組織の分化に何らかの調節的な役割を担っていることが予測される。一方*rdd* は神経胚期に腹部、側部後方の広い領域に発現し、血管の形態形成に関わっていることがわかってきた。アフリカツメガエル胚の腹部血島（後方組織）には主に赤血球が分化してくるが、やや遅れて分化してくるリンパ球などの白血球の前駆細胞も存在していることがわかっている。ところが最近になって、この集団とは別に、胚の前方の心臓の近傍から早期に分化してくる白血球集団が存在していることが明らかにされた。従って、最初に胚に分化してくる白血球は少なくとも2つの独立した領域に起源があると仮定される。申請者らによる最近の実験により、前方の血球前駆細胞は初期胚における一時的な白血球のみを供給していること、それらの細胞が*wnt*シグナルの阻害因子のひとつである*dkk1* によって分化誘導されることなどが示された。しかしながら、この2つの細胞集団はそれぞれどのような分化制御を受けて分化してくるのかは明らかにされていない。またこれら2つの集団が胚に独立して存在する生物学的な意義は何なのかも明らかではない。

2. 研究の目的

(1) 新規核局在因子 *val* の腹部組織分化における生理的機能の解析を行う。(2) 新規分泌因子 *rdd* の生化学的解析を進め、細胞外での生理学的な役割を明らかにする。(3) 腹部血島に見いだされた2つの独立した白血球集団の分化における *wnt* シグナルの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Val* の欠損変異体は、アミノ酸配列から想定される機能領域（ロイシンジッパー、プロリンリッチ、グルタミン酸リッチ）をN末

端、C末端から削除した部分に相当するDNAをPCR法により増幅することによって作製した。活性や生化学的な性質を検証するために、*in vitro* で合成された欠損変異体mRNAを胚細胞に注入した。タンパク質の検出はN末端にmycタグを付加することにより抗myc抗体を用いて行った。

(2) 内在性の*Rdd* タンパク質を検出する目的で、18アミノ酸からなる*rdd* ペプチドを合成し、それに対するウサギ抗血清を作製した。また、新たにHisタグをC末端に付加したりコンビナント*Rdd* を大腸菌から精製し、これに対するラット抗血清を作製した。

(3) 2つの異なる白血球集団の分化制御を比較するために、初期神経胚期の腹部血島組織を切り出して培養した。それらの細胞分化に対する、VEGF、Wnt、FGFシグナルの役割を調べるために、初期胚の割球にあらかじめモルフォリノや阻害コンストラクトなどを注入し、それらの骨髄球分化への影響を調査した。

4. 研究成果

(1) 新規核局在因子 *val* の腹部組織分化における機能の解析をおこなった。*val* 遺伝子の様々な領域を除く欠損変異体を作成し、その核内局在性、胚に注入したときの効果を調べた。その結果、全長455アミノ酸のうち、アミノ末端165アミノ酸を欠損した変異体が、胚の発生に障害を与える効果を持つことがわかってきた。発生の異常は、特に体節形成や血管形成にみられ、*val* が体節中胚葉や側板中胚葉の分化にかかわる因子である可能性がクローズアップされた。さらに、この変異体は核への局在性を失い、細胞質に存在していることも明らかとなった。

(2) カエル胚において新たに発見された分泌因子 *Rdd* の発現解析を行なった。このタンパク質のアミノ酸配列をもとに合成したペプチドを免疫し、ウサギ抗血清を得た。この抗体は、*Rdd3* および *Rdd4* を検出したのに対し、*Rdd2* を検出しなかった。ウエスタンブロットによると、約28kDの内在性のタンパク質がこの抗体により検出された。このタンパク質は、mRNAの発現の上昇に合致して、胚に一過性に発現していた。また、タグ標識したリコンビナント*Rdd* タンパク質を胚細胞に発現する実験から、*Rdd* にはN-グリカン型糖鎖が結合していること、非還元下では高分子にシフトすること、分泌されたタンパク質は細胞間隙に局在して存在することなどが明らかにされた。これら*Rdd* の生化学的性質は、どのようにして*Rdd* が生体内で働くのかを知る

基礎データとして重要である。

(3) 胚の前方および後方領域から分化してくる2つの骨髄球の分化に血管内皮細胞増殖因子 VEGF が関与しているかどうかを検討した。内在性の VEGF の発現を阻害した実験から、後方の骨髄球の分化のみが VEGF 要求性であることがわかった。同じことが、内皮細胞の分化因子である L-KLF (KLF-2) のノックダウン胚でも見られたことから、内皮細胞の分化と骨髄球分化には密接な関連性があることがわかってきた。さらに、アフリカツメガエル胚の前方から分化してくる骨髄球の分化制御のしくみを解析した。モルフォリンによる内在性 NKx2.5 および GATA4 の発現阻害実験から、骨髄球の分化には、心臓原基の形成に重要であることが知られているこれらの転写因子が必要であることが示された。骨髄球の分化に決定的な役割を担っていることがわかっている CEBP α および Nkx2.5、GATA4 はいずれもカノニカル Wnt の阻害因子である dkk1 により誘導されることから、これら複数の転写因子の協調的な働きにより中胚葉の未分化細胞から骨髄球への分化が運命づけられると結論された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Maeno, M., Komiyama, K., Matsuzaki, Y., Hosoya, J., Kurihara, S., Sakata, H., Izutsu, Y.: Distinct mechanisms control the timing of differentiation of two myeloid populations in *Xenopus* ventral blood islands. *Dev. Growth Differ.* 54: 187-201, 2012. 査読あり

② Hosoya, J., Tamura, K., Muraki, N., Okumura, H., Ito, T., Maeno, M.: A novel approach for a toxicity prediction model of environmental pollutants by using a quantitative structure-activity relationship method based on toxicogenomics. *ISRN Toxicology Article ID 515724*, 9 pages, 2011. 査読あり

③ Nogawa-Kosaka, N., Sugai, T., Nagasawa, K., Tanizaki, Y., Meguro, M., Aizawa, Y., Maekawa, S., Adachi, M., Kuroki, R. and Kato, T. Identification of erythroid progenitors induced by erythropoietic activity in *Xenopus laevis*. *J Exp Biol.* 214: 921-927, 2011. 査読あり

④ Kurauchi, T., Izutsu, Y. and Maeno, M.: Involvement of Neptune in induction of the hatching gland and neural crest in the *Xenopus* embryo. *Differentiation*, 4/5: 251-259, 2010. 査読あり

⑤ Saito, Y., Takahashi, Y., Izutsu, Y. and Maeno, M.: Identification and expression of Ventrally associated leucine-zipper (VAL) in *Xenopus* embryo. *Int. J. Dev. Biol.*, 54: 203-208, 2010. 査読あり

⑥ Nogawa-Kosaka, N., Hirose, T., Kosaka, N., Aizawa, Y., Nagasawa, K., Uehara, N., Miyazaki, H., Komatsu, N. and Kato, T.: Structural and biological properties of erythropoietin in *Xenopus laevis*. *Exp. Hematol.* 38: 363-372, 2010. 査読あり

⑦ Mukaigasa, K., Hanasaki, A., Maeno, M., Fujii, H., Hayashida, S., Itoh, M., Kobayashi, M., Tochinai, S., Hatta, M., Iwabuchi, K., Taira, M., Onoé, K. and Izutsu, Y.: The keratin-related Ouroboros proteins function as immune antigens mediating tail regression in *Xenopus* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 18309-18314, 2009. 査読あり

⑧ Saito, Y., Gotoh, M., Ujiiie, Y., Izutsu, Y. and Maeno, M.: Involvement of AP-2rep in morphogenesis of the axial mesoderm in *Xenopus* embryo. *Cell Tissue Res.*, 335: 357-369, 2009. 査読あり

[学会発表] (計 23 件)

① 加藤 尚志, 造血研究の新展開をめざす ~なぜカエルなの?なんて, もう訊かないで. 日本動物学会 第 64 回関東支部大会公開講演会, 2012 年 3 月 17 日, 東邦大学, 東京.

② 奥井 武仁ほか, アフリカツメガエル肝臓の赤血球造血に関わる接着分子の発現. 第 36 回日本比較内分泌学会大会, 2011 年 11 月 23 日, 東京都道府県会館.

③ 坂田 広之ほか, アフリカツメガエル胚前方腹部血島における骨髄球分化制御. 第 81 回日本動物学会大会, 2011 年 9 月 21 日, 旭川大雪クリスタルホール.

④ 栗城 遥ほか, アフリカツメガエル G-CSF の生物活性と特異性. 第 81 回日本動物学会大会, 2011 年 9 月 21 日, 旭川大雪クリスタルホール.

⑤真島 豊ほか, Expression and localization of rdd, a novel secretory protein, in *Xenopus* embryo. 第44回日本発生生物学会, 2011年5月19日, 沖縄コンベンションセンター.

⑥星野 亨ほか, ツメガエル中胚葉分化パターンにかかわる Neptune の予想外の働き. 第81回日本動物学会. 2010年9月24日, 東京大学.

⑦玉木 理絵ほか, *Xenopus* の分泌蛋白質 Rdd は神経冠に由来する組織の分化に必要である. 第81回日本動物学会. 2010年9月24日, 東京大学.

⑧奥井 武仁ほか, 成体アフリカツメガエル肝臓における赤血球前駆細胞の局在と貧血応答. 第72回日本血液学会学術集会, 2010年9月24日, 横浜パシフィコ.

⑨前川 峻ほか, 低温曝露ツメガエルにおける肝臓での赤血球破壊とヘム分解酵素発現量の増大. 第81回日本動物学会大会, 2010年9月24日, 東京大学.

⑩Onda, N. et al., Lipopolysaccharide administration in adult African clawed frog as an animal model for leukocytosis. 39th Annual Scientific Meeting of ISEH-Society for Hematology and Stem Cells. September 15-18, 2010, Melbourne, Australia.

⑪Okui, T. et al., The production and destruction of erythroids in the liver of *Xenopus laevis*. September 15-18, 2010, Melbourne, Australia.

⑫Maeno, M. et al. Distinct mechanisms for differentiation of myeloid cells in the anterior and posterior ventral blood islands in *Xenopus* embryo. 13th International *Xenopus* Conference, September 13, 2010, Fairmont Chateau Lake Louise, Canada.

⑬大竹 亜希子ほか, Functional analysis of VEGF in myeloid cell differentiation in the ventral blood islands in *Xenopus* embryo. 第43回日本発生生物学会, 2010年6月21日, 京都国際会議場.

⑭倉内 孝行ほか, A novel role of Neptune in induction of the hatching gland and neural

crest in the *Xenopus* embryo. 第43回日本発生生物学会, 2010年6月21日, 京都国際会議場.

⑮Okui, T. et al. Hepatic erythropoiesis in adult *Xenopus laevis* during anemia. 51th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec 5, 2009, New Orleans, Louisiana, USA.

⑯目黒 瑞枝ほか, アスパラギン結合型糖鎖を欠失するアフリカツメガエルエリスロポエチンの熱安定性の解析. 第82回日本生化学会大会, 2009年10月14日, 神戸.

⑰加藤 友啓ほか, 末梢好中球増多にともなうアフリカツメガエル好中球産生調節因子の発現の変化. 第80回日本動物学会大会, 2009年9月19日, 静岡グランシップ.

⑱別府 実穂ほか, アフリカツメガエルにおける赤血球系細胞の免疫染色と細胞蛋白質変動の検出. 第80回日本動物学会大会, 2009年9月19日, 静岡グランシップ.

⑲恩田 信洋ほか, リポ多糖投与アフリカツメガエルにおける好中球数の増多と組織貯蔵. 第80回日本動物学会大会, 2009年9月19日, 静岡グランシップ.

⑳松崎 陽子ほか, アフリカツメガエル胚において *nkx2.5* は白血球の分化に関与している. 第80回日本動物学会, 2009年9月17日, 静岡グランシップ.

㉑小坂(野川) 菜美ほか, 両生類造血に学ぶ～アフリカツメガエル血球産生のダイナミクス～. 第日本比較免疫学会第21回学術集会シンポジウム「リンパ球の起源と分化」, 2009年8月5日, 日本大学(神奈川).

㉒小宮山 恭吾ほか, Role of canonical Wnt signal in myeloid cell differentiation in the ventral blood islands of *Xenopus* embryo. 第42回日本発生生物学会, 2009年5月29日, 新潟朱鷺メッセ.

㉓斎藤 吉成ほか, AP-2rep is involved in morphogenesis of the axial mesoderm in *Xenopus* embryo. 第42回日本発生生物学会, 2009年5月28日, 新潟朱鷺メッセ.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前野 貢 (MAENO MITSUGU)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号：10190315

(2) 研究分担者

加藤 尚志 (KATO TAKASHI)
早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授
研究者番号：80350388
(H22→H23：連携研究者)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：