

## 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25年 6月 2日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570200

研究課題名（和文） 脊椎動物胚の神経プラコードに着目した神経-表皮境界規定機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of mechanism for neural-epidermal boundary formation

研究代表者

道上 達男 (Tatsuo Michiue)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：10282724

研究成果の概要（和文）：

本課題では、脊椎動物胚の神経-表皮境界に位置するプラコードに着目し、特異的遺伝子の解析を、未分化細胞でのプラコード誘導、前駆細胞の挙動追跡による神経-非神経領域境界の明確化の仕組みについて解析を行った。その結果、①PRDM12をノックダウンすることでプラコードマーカーの発現が減少する、②カエル未分化細胞に適切な濃度のBMP抑制因子、Wnt抑制因子を注入することでプラコードが誘導できること、③Xnr3の注入により、神経-表皮境界の細胞に影響が生じることなどを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, ①We analyzed the function of PRDM12. When PRDM12 MO was injected, the expression of several placode formation was specifically inhibited. ② We found that suitable dose of BMP/Wnt inhibitor efficiently induced placode. ③ The analysis of Xnr3 indicated that injection with Xnr3 effected on the shape of cells located in neural-epidermal border region, and that the expression of placode marker and brain marker was altered.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：形態形成

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の初期胚は、いくつかの細胞内シグナリングの制御を受けて基本的なボディパターンが規定される。この際様々な“境界”が生み出され、発生の進行と共に複雑な器官の形が次第に決められていく。神経組織もまた、三胚葉分化の後、原腸陥入期に背側中胚

葉からのシグナルによって外胚葉に誘導される。誘導された神経領域のうち最も広い部分は、将来脳や脊髄に分化する神経板(Neural plate)である。神経板の周囲には、神経堤/神経冠(Neural crest)が規定される。神経冠細胞は神経板由来の細胞とは大きく異なり、神経管閉塞後、細胞単位で胚の腹側

へと大きく移動し、神経細胞、骨・筋肉細胞、色素細胞などに分化する。一般的には神経堤が神経-非神経境界領域としてよく知られており、特に後方の神経領域においては神経堤が実際に神経-非神経境界を形成している。しかし、神経の前方最端部を含む頭部領域においては、神経-非神経の境界は神経堤ではなく、口蓋プラコード(cranial placode)と呼ばれる領域が担っている。口蓋プラコード領域は、BMP,FGF,Wntなどの分泌因子の働きによって初期神経胚期前後に神経板/神経堤と表皮外胚葉の境界部におおまかに配置される。それと同時に、様々なパターンを示すプラコード特異的な遺伝子の発現が起こり、嗅覚、レンズ、小耳、三叉、側線、などの各プラコードにSubdivision(細分化)されていく。細分化されたプラコードの一部は、神経堤細胞と同様に腹側にむけて移動し、脳神経節へと分化して主に頭部における感覚神経として機能する。このように、口蓋プラコードはそれ自身が脳神経節に分化すると同時に、神経-非神経領域境界を形成するという点で非常に興味深い。これまで申請者は、脳の部域を決める分子メカニズムの解析を行ってきた。どこが脳になり、脊髄になるかという初期胚の前後神経パターンニングは、Wntシグナルをはじめとするいくつかの分泌因子の仮想的な濃度勾配によって決められる。実際、申請者自身の解析によって、Wnt経路に関わるいくつかの遺伝子が初期胚の頭部形成に関わることを示してきた。Wnt経路に制御を受け、頭部神経領域で発現する新規因子をマイクロアレイ解析で網羅的に同定し、それらの機能解析について論文に公表した。更には間脳遺伝子Raxの発現が、同じく中枢神経で発現するSox2, Otx2の協調的作用によって制御されていることを示した。この論文は、いずれもヒト眼形成異常疾患の原因となる3遺伝子の連関を分子レベルで示した点で非常に重要である。

## 2. 研究の目的

以上の解析を行う過程で、神経領域前端的な神経-非神経境界、すなわち終脳/口蓋プラコード/表皮がどのような分子メカニズムで決められるかという点に関心を持った。上述の通り、プラコード領域の規定にはいくつかの分泌因子とそのシグナリングが関与すると考えられているが、分泌因子の濃度勾配のみで厳密な境界規定機構を説明することは困難である。実際にはこれに加え、予定プラコード領域での様々な遺伝子の相互作用、更には細胞接着などを始めとする細胞間の相互作用など、複雑な機構が絡み合っただけでなく、プラコード領域が規定されていると考えられる。このような規定機構の複雑性は、神経-非神経境界の決定が最も遅いのが前端部であることか

らも想像される。そのため、前方神経境界(anterior neural border)とも呼ばれるプラコード-表皮境界が決まる仕組みについては、Six1などいくつかの遺伝子との関連が報告されているものの不明な点が多い上、口蓋プラコード領域が各プラコードに細分化される分子機構についてはほとんど明らかになっていない。そこで、口蓋プラコード領域の規定機構を解析することを通し、①プラコードの領域化・分化のメカニズム、②神経領域前端部の神経-非神経境界を形成する機構、以上2点に関する解析を行いたいと考えた。

## 3. 研究の方法

(1) 以前に行った新規脳形成関連遺伝子の網羅的探索において、プラコードの一部のみで発現する遺伝子として、ヒストンメチルトランスフェラーゼと推測されるPRDM12を見出していた。そこで、PRDM12の過剰発現、逆にPRDM12のモルフォリノアンチセンスオリゴによる機能抑制によってプラコード形成にどのような変化を与えるか、既知のプラコードマーカー遺伝子(Six1, Xath3, Pax3, Sox3など)の発現を指標に解析することを試みた。逆に、上記プラコード遺伝子の過剰発現、機能抑制がPRDM12遺伝子の発現にどのような影響が出るかについても解析を行うことにより、PRDM12遺伝子を足がかりとしたプラコード領域規定の遺伝子発現制御ネットワークを記述したいと考えた。また予備実験の結果から、PRDM12の過剰発現は神経化を誘導し、nrp1など神経終分化マーカーの発現を活性化することが分かっている。そこで、PRDM12による神経化がどのようにして起こるか、例えばPRDM12の発現がBMPシグナリングの抑制に関係するかどうかなどの解析を計画した。更に、PRDM12の機能解析としてヒストンメチル化を実際に起こすかどうかを調べる。候補はヒストンH3のK4, K9, K27であり、PRDM12の過剰発現によってリジン残基のトリメチル化が実際に増加するかどうか、特異的抗体などを用いたWestern Blot解析などによって検証することも試みた。

## (2) プラコード特異的に発現する遺伝子の

網羅的探索を行うため、主に以下の二種類の方法によってプラコード遺伝子発現条件を検討することを考えた。(a) Wnt8やBMP4 mRNA、あるいはdkk1などのWnt抑制因子、noggin, dnBMP4 receptorなどのBMP抑制因子について量を変えて胚に注入することでプラコード誘導条件を検討する。具体的には、注入胚由来の外胚葉片を原腸胚期まで培養し、RNAを抽出してRT-PCRを行い、汎プラコードマーカー遺伝子であるSix1の発現が最も上昇する条件を検討した。この条件で得られた外胚葉片では、Six1だけでなく、比較的

初期にプラコードで発現する遺伝子もまた非注入胚より多く発現していることが期待される。(b)もう一つは、Six1 mRNA 注入胚から同様に外胚葉片を切り出し、適当な発生ステージまで培養し、そのサンプルを回収することで、プラコードの領域化、または終分化に関わる遺伝子が得られることが期待された。この外胚葉片については、他のプラコード遺伝子の発現状況を RT-PCR などで調べ、マイクロアレイ解析への使用に妥当かどうかを判断することとした。

以上の条件検討などを行った後、マイクロアレイ解析を実施し、得られた新規遺伝子については、in situ ハイブリダイゼーションによって空間的な発現パターンを調べ、プラコードで特異的な発現が見られるかどうかを検討することを計画した。この際、新たな汎プラコード遺伝子の同定も重要だが、おのおののプラコードに特異的なマーカー遺伝子の同定を目指すこととした。

(3) プラコードの境界規定モデルを検証するため、細胞生物学的な解析を行うことを計画した。

(a) まず、プラコード領域におけるいくつかの細胞接着因子の局在を特異的抗体で検証し、プラコード-表皮境界で発現する細胞接着因子があるかどうか、解析する。具体的にはカドヘリンや N-CAM などが考えられる。これらについては、候補因子が見つければバイオイメージングにもトライしたい。

(b) 別の観点からの解析も試みる。すなわち、いくつかの遺伝子に着目し、それらの発現変化がプラコード領域あるいは神経の境界規定に影響するかどうかを解析することとした。この解析は、ツメガエル胚の利点を生かし、いくつかの細胞接着因子をコードする mRNA を直接予定頭部領域に微量注入することによって、比較的容易に行うことが可能である。

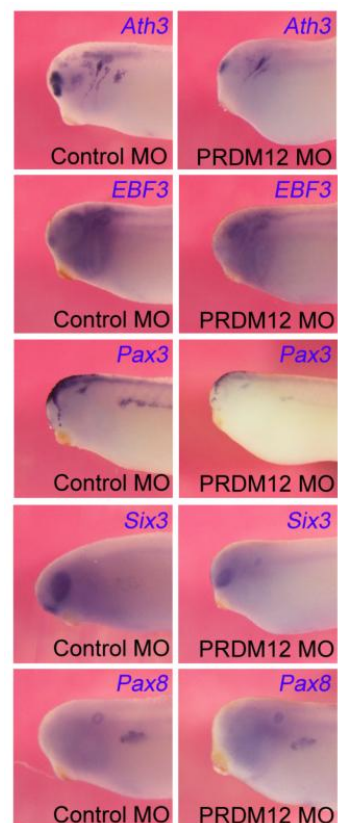
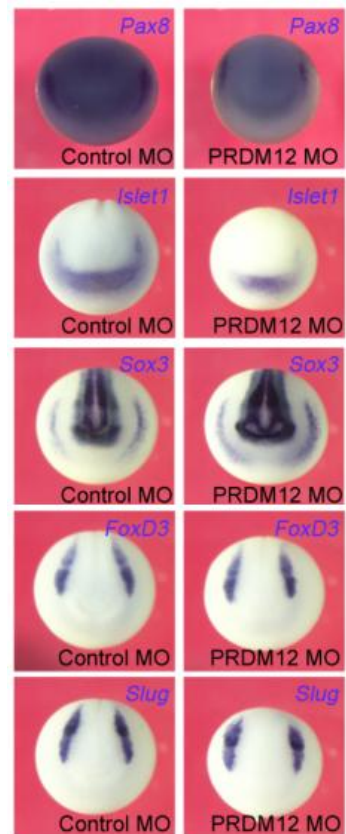
#### 4. 研究成果

##### (1) プラコード遺伝子 PRDM12 の機能解析

まず、PRDM12 の初期胚の頭部形成における役割を示すため、PRDM12MO を用いて PRDM12 のノックダウンの表現型を見ると共に、プラコード形成の変化をいくつかのプラコードマーカーを用いて観察した。その結果、神経胚期においては、Pax8、Islet1 などの発現の現象が明らかになった。興味深いことに、Sox3 の発現は幾分広がっているように見え、プラコード領域における何らかの影響が出ていることが示唆された。ただ、Pax3、FoxD3 など他のプラコードマーカーの発現パターンには大きな変化が見いだせなかった (右カラム図)。同様に、初期幼生におけるプラコードの形態変化が、PRDM12 MO によって影響を

受けるかどうかについて、解析を行った。具体的には、EB3 と呼ばれる別のプラコードマーカーを用い、3 日胚における脳神経の伸長を観察したところ、特に三叉神経、側板神経の伸長に異常が生じることが明らかとなった (右下図)。更に、表皮-境界規定に関連づけて更に解析を進めた。野生型 PRDM12 mRNA を異所的に発現させたところ、プラコードと隣接する神経堤領域の分化抑制が表現型、転写レベルで観察された。興味深いことに、ヒストンメチル化ドメイン変異 PRDM12、DNA 結合領域欠損 PRDM12 を強制発現させた場合には、野生

型 PRDM12 で引き起こされる神経堤の分化抑制が見られなかった。このことから、PRDM12 は PR/SET ドメインと ZNF ドメインを介して、神経堤特異的に発現する遺伝子を抑制することで、プラコードの領域化を引き起こしている可能性が示唆された。現在、PRDM12 によるヒストンメチル化の



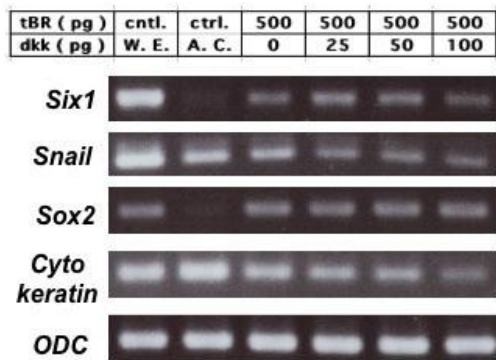
状況の変化が生じるかどうか、メチル化ヒストン抗体(抗 H3K4, K9, K27 抗体)を用いた Western 解析などを行っているが、大きなメチル化状況の変化を見いだすには至っていない。

(2) 未分化細胞からのプラコード遺伝子誘導系の開発

プラコード特異的に発現する遺伝子の探索を目的として、ツメガエルアニマルキャップに様々な因子を作用させるとことで汎プラコードマーカーが最も多く発現する、いわゆるプラコード誘導条件を探索することを試みた。主に手法は2種類である。

(a)アニマルキャップに、BMP 阻害因子としてよく知られている Noggin タンパク質を 25 ng/ml の濃度で処理し、Six1 の発現の誘導が見られるかどうかを確認したところ、Six1 の誘導を確認することが出来た。この誘導系においては、LiCl などの Wnt 経路を促進するような処理を行うことで、six1 の発現量を増加させることができた。

(b)次に、Wnt 阻害因子 dkk-1, BMP 阻害因子 tBR を注入した胚由来のアニマルキャップを用い、six1 誘導が最も効率的に引き起こされる条件を詳細に検討した。その結果、tBR を 700 pg, dkk-1 を 50pg 胚に注入した場合に、最も six1 の発現量が上昇することが確認できた(下図)。また、当該条件において、mRNA の非注入時と six1 の発現量の差が最も大きい発生ステージに関しても詳しく解析を行った結果、後期原腸胚期が最も二者の差が大きいことを見出した。また、他の様々なプラコードマーカー (Xath3, Pax3 など)、神経堤マーカー (snail: 下図)、神経板マーカー (sox2: 上図)などの発現の変化を詳細に検討すると、多少異なる発現パターンを示すものの、他のマーカーもほぼ同様の挙動を示すことが明らかとなった。これらの結果は、Wnt・BMP 両シグナルによるプラコード領域の規定は、非常に微妙な差によって実現していることを示唆している。以上の結果より、当初は新規遺伝子探索に入る予定であったが、むしろシグナリングと境界規定の仕組みをより詳細に解析を行った方がよいとの判断に至



り、現在も、より細かな条件設定をすることで、上記の作業仮説を検討している。

なお、プラコード誘導のために用いている BMP 阻害因子として、tBR 以外に chordin(chd)でも行ったところ、tBR よりは活性が強く、40 pg の胚への注入によって six1 などプラコード遺伝子の効率的な発現が観察された。

(3) 神経-表皮境界の規定に関与する遺伝子の解析

細胞運動に関係する因子として申請者が想定している Xnr3 遺伝子について、この遺伝子の過剰発現によるプラコード遺伝子 Six1 の発現変化を観察した。その結果、Xnr3 を予定神経外胚葉の、特に腹側領域で過剰発現させると、Six1 の発現パターンが変化した。この結果は、プラコード領域の形成過程を明らかにする上で重要な知見であると期待される。

更に、Xnr3 の発現による神経・表皮境界への影響に関して、解析を行った。その結果興味深いことに、Xnr3 の微量注入によって、神経・表皮境界のみで特異的に神経領域形成時の細胞運動の阻害が引き起こされることを見出した。更に、細胞の形態そのものにも、Xnr3 注入によって大きく影響を受けることが分かった。これらの結果は、プラコード形成を伴う神経-表皮の境界規定に、細胞形態の変化を伴う細胞運動が重要な役割を果たすことを示しており、重要な知見である。

また、神経パターンの一般性を解析する目的で、レチノイン酸シグナルに関わる因子が神経領域の形成にどのような役割を果たすかについて解析を行った。その結果、レチノイン酸シグナルを阻害する転写因子 COUP-TF が、実際に神経のパターンに影響を与え、かつその作用はレチノイン酸代謝酵素 Cyp26C と協調的であることを見出した。

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 10 件)

1. Morita M, Yamashita S, Matsukawa S, Haramoto Y, Takahashi S, Asashima M, Michiue T.\* (2013). Xnr3 affects brain patterning via cell migration in the neural-epidermal tissue boundary during early Xenopus embryogenesis. Int J Dev Biol. in press.

2. Nejjigane S, Takahashi S, Haramoto Y, Michiue T, Asashima M. (2013). Hippo signaling components, Mst1 and Mst2, act as a switch between self-renewal and differentiation in Xenopus hemangioblast. Int J Dev Biol. in press.

3. Ninomiya N, Michiue T, Asashima M, Kurisaki A. (2013). BMP signaling regulates the differentiation of mouse embryonic stem cells into lung epithelial cell lineages. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 49: 230–237.
4. Goto T, Michiue T, Ito Y, Asashima M. (2013). Characterization of CXC-type chemokine molecules in early *Xenopus laevis* development. *Int J Dev Biol.* 57:41–47.
5. Miyazaki A, Ishii K, Yamashita S, Nejigane S, Matsukawa S, Ito Y, Onuma Y, Asashima M, Michiue T.\* (2012). mNanog possesses dorsal mesoderm-inducing ability by modulating both BMP and Activin/nodal signaling in *Xenopus* ectodermal cells. *PLoS One.* 7. e46630.
6. Tanibe M, Ishiura S, Asashima M, Michiue T.\* (2012). xCOUP-TF-B regulates xCyp26 transcription and modulates RA signaling for anterior neural patterning in *Xenopus*. *Int J Dev Biol.* 56. 239–244.
7. Moriyama Y, Ohata Y, Mori S, Matsukawa S, Michiue T, Asashima M, Kuroda H. (2011) Rapamycin treatment causes developmental delay, pigmentation defects, and gastrointestinal malformation on *Xenopus* embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 404. 974–8.
8. Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. (2010). Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder- and Serum-Free Defined Conditions. *PLoS One.* 5. e14099.
9. Aihara Y, Hayashi Y, Hirata M, Arika N, Shibata S, Nagoshi N, Nakanishi M, Ohnuma K, Warashina M, Michiue T, Uchiyama H, Okano H, Asashima M, Furue MK. (2010). Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture. *Int J Dev Biol.* 54. 1287–94.
10. Yamagishi M, Ito Y, Ariizumi T, Komazaki S, Danno H, Michiue T, Asashima M. (2010) Claudin5 genes encoding tight junction proteins are required for *Xenopus* heart formation. *Dev. Growth Differ.* 52. 665–675.

[学会発表] (計 11 件)  
(国際学会 5 件)

1. Miyazaki A, Ishii K, Yamashita S,

- Nejigane S, Matsukawa S, Ito Y, Onuma Y, Asashima M, Michiue T. (2012). mNanog possesses dorsal mesoderm-inducing ability by modulating both BMP and Activin/nodal signaling in *Xenopus* ectodermal cells. 14th international *Xenopus* conference. (Hyeres, France)
2. Nejigane S, Michiue T, Asashima M. (2012). 14th international *Xenopus* conference. (Hyeres, France)
3. Michiue T, Terada R, Ninomiya H, Takahashi S, Ohnuma K, Kusuda-Furue M, Miyajima A, Asashima M. (2012). Induction of pancreatic cells from human iPS cells in a serum-free monolayer condition. 10th International Society for Stem Cell Research annual meeting (Yokohama, Japan)
4. Aihara Y, Ito Y, Kurisaki A, Hayashi Y, Nejigane S, Uchiyama H, Michiue T, Furue-Kusuda M, Asashima M. (2012). Analysis of regulatory factors during early neural crest cell differentiation from mouse embryonic stem cells. 10th International Society for Stem Cell Research annual meeting (Yokohama, Japan)
5. Aihara Y, Hayashi Y, Hirata M, Arika N, Shibata S, Nagoshi N, Nakanishi M, Ohnuma K, Warashina M, Michiue T, Uchiyama H, Okano H, Asashima M, Kusuda-Furue M. (2011). Establishment of an efficient neural crest cell induction system from mouse embryonic stem cells in defined medium. 9th International Society for Stem Cell Research annual meeting.

(国内学会 6 件)

1. 森田真梨子ら、ツメガエルの初期神経パターンニングにおける Xnr3 の役割 第四回ツメガエル研究会関東支部会、2010 年 7 月、東京
2. 森田真梨子ら、The role of Xnr3 in the neural patterning in *Xenopus*. 第 44 回日本発生生物学会、2011 年 5 月、宜野湾 (沖縄)
3. 宮崎綾ら、ツメガエル胚において中胚葉誘導反応能を調整する因子の同定 第 82 回日本動物学会、2011 年 9 月、旭川 (北海道)
4. ツメガエル初期胚の原腸陥入における XRhoGEF3 の役割 第 82 回日本動物学会、2011 年 9 月、旭川 (北海道)
5. 森田真梨子、道上達男 ツメガエル胚の発生初期に於いて Xnr3 が神経パターンニングに及ぼす影響 第 5 回日本ツメガエル研究集会、2011 年 10 月、熱海
6. 道上達男、谷邊美早紀 *Xenopus* 初期胚の頭部形成におけるレチノイン酸シグナリング調節因子の解析 第 5 回日本ツメガエル研究集会、2011 年 10 月、熱海

〔図書〕（計 5 件）

1. Asashima M, Michiue T, Ohnuma K, Nakajima Y, Ito Y. (2011) Mechanobiology During Vertebrate Organ Development. Mechanosensing Biology. (ed. Noda M) 21-38. Springer.
2. キャンベル生物学 原書第9版 第40章, 47章 丸善出版(翻訳; 2013)
3. 理系総合のための生命科学 P195-205 羊土社 (2013)
4. イラストで徹底理解する シグナル伝達 キーワード事典 (山本雅、仙波憲太郎、山梨裕司 編) 300-308. 羊土社 (2012)
5. 道上 達男 院ナビ! 生命系逆引き研究室案内 (小宮山 宏監修) 38-42. 東京図書 (2010)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

道上 達男 (Tatsuo Michiue)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号: 10282724

### (2) 研究分担者

黒田 裕樹 (Hiroki Kuroda)

静岡大学大学院教育学研究科・准教授

研究者番号: 70402229

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: