

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770254

研究課題名(和文)着床直後のマウス胚におけるNodal / FGFシグナル標的遺伝子の探索

研究課題名(英文)Screening of the direct target genes of Nodal signaling in the mouse epiblast

研究代表者

沖 真弥 (Oki, Shinya)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90452713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：我々は受精後 5.5 日のマウス胚を Nodal シグナルを抑制するケミカルインヒビターで培養し、単離したエピブラストの網羅的発現解析を行った。その結果、ケミカルインヒビターで発現が変動する遺伝子を複数得ることができ、特に発現が上昇する遺伝子については、神経化に関わる遺伝子も含まれていた。特に初期発生に関わる遺伝子については in situ hybridization 法でも裏付けも行った。本研究により、これまでの Nodal ノックアウトマウスの解析で変動することが知られていた遺伝子のうち、Nodal シグナルによって直接的、または間接的に制御される遺伝子の分類が可能となった。

研究成果の概要(英文)：We performed transcriptome analysis with mouse epiblasts, which were isolated from the E5.5 mouse embryos cultured for short time in the presence or absence of a chemical inhibitor specific to Nodal signaling. As the result, we identified a number of direct target genes whose expression level was altered by the inhibitor. In particular, genes upregulated by the inhibitor included those involved in neural fate decision. We further validated the transcriptome analyses with in situ hybridization method for genes involved in mouse early development. Therefore, we could list the direct target genes of Nodal signaling out of those already known to be altered in Nodal knock-out mice.

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：マウスエピブラスト Nodal 多能性

### 1. 研究開始当初の背景

マウスの胚発生では受精後 4.5 日に着床し、5.5 日までに円筒形の形態を示すようになる。子宮の遠位側にエピプラストと呼ばれる上皮細胞集団が形成され、将来の三胚葉に分化するという、pluripotency を有する。受精後 6.5 日には原条が形成され、そこから脱上皮化して中胚葉と内胚葉が作られ、一方脱上皮化しなかった細胞は外胚葉となり、将来の神経などの元になる。TGF スーパーファミリーに属する分泌因子 Nodal はエピプラストの pluripotency の維持や原条形成、中内胚葉形成、神経化の抑制など、多岐にわたる発生イベントに必須である。これまでに Nodal のノックアウトマウスの解析によってそのような知見が得られてきたが、実際にどのような下流遺伝子の発現を制御しているかはほとんど知られていない。その主な理由は、通常のノックアウトマウスの解析では遺伝子発現の消失から表現型の解析までの間に大きなタイムラグがあるためである。例えば Nodal は受精後 3.5 日より発現が認められるものの、そのノックアウトマウスの解析は 5.5 日以降であるため、そこで発現が変動している遺伝子は Nodal シグナルによって直接的に支配されているのか、または二次的・三次的な効果なのかについて区別できない。

### 2. 研究の目的

Nodal は着床直後のマウスエピプラストにおいて、とても重要な役割を担っている。すなわち受精後 6.0 日までの pluripotency の維持、神経外胚葉への分化の抑制、そして 6.5 日以降の原条形成や中内胚葉の誘導に必須である。この Nodal シグナルによって、これら 3 つのイベントがどのように制御されているかについて詳細な知見を得るためには、Nodal シグナルによって直接的に支配されている遺伝子の同定が必要である。そこで我々は受精後 5.5 日胚を Nodal シグナルのケミカルインヒビターである SB431542 の有無で短時間培養し、網羅的発現解析を行ったのち、阻害剤の有無で発現が変動する遺伝子の同定を行う実験系の構築を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) SB431542 によって発現が変動する遺伝子をスクリーニングするために、既に Nodal シグナルのターゲット遺伝子として知られている Nodal 自身と Nanog 遺伝子をマーカーとし、阻害実験系の構築を試みた。受精後 5.5 日胚を摘出し、全胚培養するさいに SB431542 の濃度や培養時間をさまざまに振り、Nodal と Nanog の発現レベルを in situ hybridization 法で測定した。

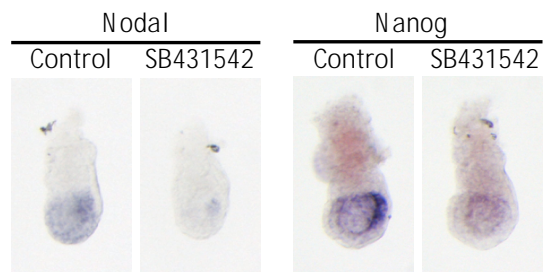
(2) 上記阻害剤培養を行ったマウス胚からエピプラストのみを単離して RNA を抽出し、さらに poly-T ピーズで mRNA を精製した。さらに cDNA を合成し、イルミナ社のシーケンサーで網羅的シーケンス解析を行った。

(3) 上記 mRNA-seq で発現が有意に変動する遺伝子のうち、マウス初期発生に関わりの深い遺伝子を抽出した。それらの中から特に重要と思われる遺伝子については in situ hybridization 法で validation を行った。

(4) 上記までに得られた Nodal シグナル標的候補遺伝子について機能解析を行った。とくにハイスループット性を重視し、機能欠損実験については、siRNA をエピプラストに導入する方法を試みた。機能獲得実験についてはドキシサイクリン依存的に候補遺伝子を発現する ES 細胞を樹立し、キメラ胚の解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) SB431542 の濃度は 20  $\mu$ M が最適であった。これよりも濃い(40  $\mu$ M) 濃度では 5.5 日胚では外見上正常だが、7.5 日胚では奇形を生じた。またそれよりも薄い(10  $\mu$ M) と Nodal や Nanog の発現阻害効果が弱かった。また培養時間については 2 時間程度で Nodal や Nanog の発現が減弱し、4 時間までにそれが顕著となった。したがって今後の mRNA-seq の実験は 20  $\mu$ M SB431542 で 4 時間行うこととした。

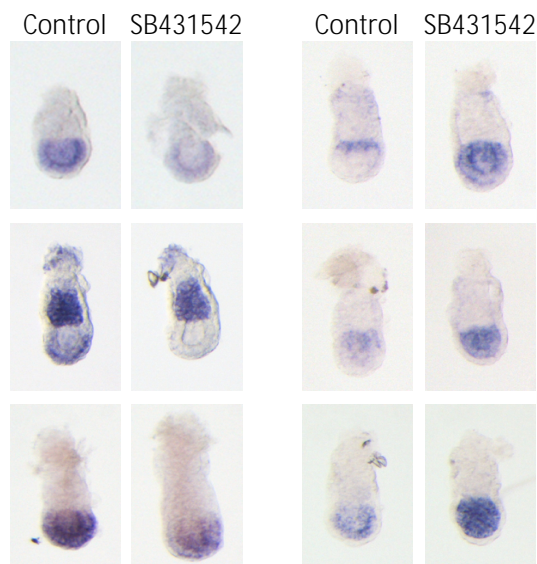


(2) 予備的な実験で、最低でも一度に 50-60 個程度の胚を同時に扱わなければならないことが判明したが、技術的な習熟と迅速性の向上により可能となった。mRNA-seq で得られたカウントデータは FPKM で正規化して遺伝子発現量とした。その結果、既に Nodal シグナルのターゲット遺伝子として知られている Nodal 自身と Nanog は SB431542 で顕著な低下が見られ、いっぽうでハウスキーピング遺伝子等の発現量はほぼ同等であった。また実験手技上、胚体外胚葉や臓側内胚葉のコンタミネーションが心配されていたが、それらのマーカー遺伝子がほとんど検出されなかったため、エピプラストを正確に単離できていることを示している。

SB431542 によって発現が変動したかどうかの判定は FPKM が 1.5 倍以上変動しており、SB431542 の有無での FPKM の平均値が 1 以上であり、さらに分散値よりも小さい場合とした。その時点で発現が変動したと判定された遺伝子について Gene Ontology 解析をしたところ、発生関連遺伝子、特に初期発生関連遺伝子が非常に統計学的有意であった。

(3) 上記で発生関連遺伝子かつ SB431542 によって発現が変動したと判定された遺伝子について、in situ hybridization 法によって

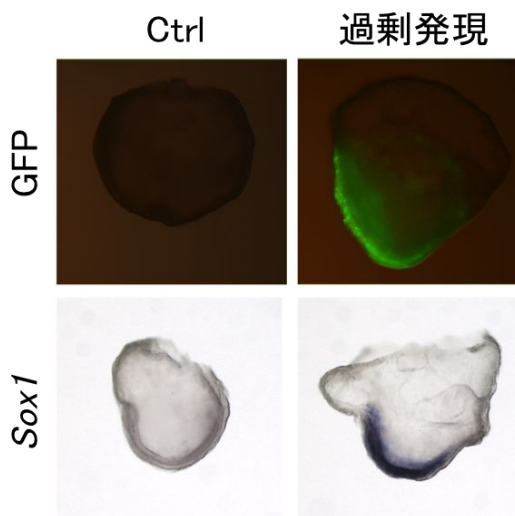
再検証をおこなった。下図の左 2 列は SB431542 によって発現が低下する遺伝子を、右 2 列は上昇する遺伝子を 3 例ずつ示している。



本 mRNA-seq 実験で非常に興味深く感じられたのは、発生学関連遺伝子のうち多くは SB431542 によって発現が低下するが、いくつかは発現が上昇していたことである。これまで Nodal シグナルは転写因子 Smad や Foxh1 を介して標的遺伝子を「活性化」することは知られていたが、「抑制」する例はほとんど知られていない。

(4) Nodal シグナル標的候補遺伝子の機能解析については SB431542 で発現が低下するか、上昇するかで、手法を二つに分けた。まず SB431542 で発現が低下する遺伝子は Nodal シグナルによって正に制御されていると考えられるので、機能欠失実験を試みた。ハイスルーブット性を重視し、siRNA をエピプラストに異所的導入する方法を試みたが、良い方法を確立することはできなかった(前羊膜腔に DNA とトランスフェクション試薬を入れる方法や、DNA 溶液を入れてエレクトロポレーションする、など)。そこでハイスルーブットスクリーニングはあきらめ、特に重要そうに思われる遺伝子を優先的に欠失させるために、現在、最新のゲノム編集技術を使った方法に切り替えて、欠損実験を行う予定である。

また SB431542 で発現が上昇する遺伝子は Nodal シグナルによって負に制御されていると考えられるので、機能獲得実験を試みた。単純な過剰発現だと着床前に発生異常を生じる可能性が考えられたので、ドキシサイクリン誘導性に所与の遺伝子と GFP を発現する遺伝子ユニットを PiggyBac トランスポゾンで ES 細胞に導入し、受精後 5.5 日の ES キメラ胚の解析を行った。その結果、ドキシサイクリンなしでは神経外胚葉マーカ Sox1 はキメラ胚で発現しないが(下図左)、ドキシサイクリンを加えて培養すると GFP の蛍光と共に Sox1 の発現も認められた。



これまでの研究で Nodal のノックアウトマウスはエピプラスト全体が神経外胚葉化することが知られていたが、なぜそのような表現型を示すのかは全く不明であった。今回の我々の研究で SB431542 によって発現が上昇する事が判明した遺伝子は、本来は Nodal シグナルによって発現が抑制されているが、Nodal シグナルの欠失によって過剰に発現されると神経外胚葉を誘導すると考えられる。受精後 6.5 日より Nodal シグナルは後方へシフトするため、この遺伝子は正常胚でもエピプラスト前方の神経外胚葉化を担う機能を有する可能性がある。

#### 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 4 件)

Kitajima K, Oki S, Ohkawa Y, Sumi T, Meno C. Wnt signaling regulates left-right axis formation in the node of mouse embryos. Dev Biol. 2013 Aug 15;380(2):222-32

Sumi T, Oki S, Kitajima K, Meno C. Epiblast ground state is controlled by canonical Wnt/  $\beta$ -catenin signaling in the postimplantation mouse embryo and epiblast stem cells. PLoS One. 2013 May 14;8(5):e63378.

Miki R, Yoshida T, Murata K, Oki S, Kume K, Kume S. Fate maps of ventral and dorsal pancreatic progenitor cells in early somite stage mouse embryos. Mech Dev. 2012 Jan-Feb;128(11-12):597-609

Noda T, Oki S, Kitajima K, Harada T, Komune S, Meno C. Restriction of Wnt signaling in the dorsal otocyst determines semicircular canal formation in the mouse embryo. Dev Biol. 2012 Feb 1;362(1):83-93.

[学会発表](計 3 件)

Shinya Oki and Chikara Meno. Development of a Mac GUI Application to Visualize Published Raw ChIP-seq data. The 61st NIBB Conference "Cellular Community in Mammalian Embryogenesis". 2013. 7/10～7/13. 岡崎コンファレンスセンター

沖 真弥. 既報の次世代シーケンサ解析データを可視化するための簡易ソフトウェア. 定量生物学の会 第六回年会. 2013. 11/22～11/24. 大阪大学吹田キャンパス 銀杏会館

Shinya Oki, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, Chikara Meno. Development of a GUI software to visualize high through-put sequence read archives. 2013. 12/3～12/6. 第 36 回日本分子生物学会年会. 神戸国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dev.med.kyushu-u.ac.jp>

<http://www.devbio.med.kyushu-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

沖 真弥 (OKI, Shinya)

九州大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号:

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし