

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670092

研究課題名(和文)1細胞標識を用いたマウス胚細胞系譜解析

研究課題名(英文)Cell lineage analysis of mouse embryos

研究代表者

竹本 龍也 (TAKEMOTO, Tatsuya)

徳島大学・先端酵素学研究所(オープンイノベ)・助教

研究者番号：30443899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：体を構成する多様な体細胞系列が、胚のエピブラスト(胚盤葉上層)のどの領域に起源するのか、また、どういった細胞分岐によって産み出されるのかを明らかにする。これまでの研究で、これまで重要視されてきた「三胚葉」分離が、あくまで組織の空間配置に過ぎず、最初期の細胞系列分岐ではないことを示した。そこで、マウス胚のエピブラストの1細胞を標識して、その子孫細胞が体のどの領域に分布するのかを詳細な解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we have showed that the neural plate and paraxial mesoderm originate from their common precursors, axial stem cells. This challenges the textbook view where neural plate is generated from ectoderm by separating epidermis. In this study, we studied cell lineage of mouse embryos, especially focusing on the stage of E6-E7.

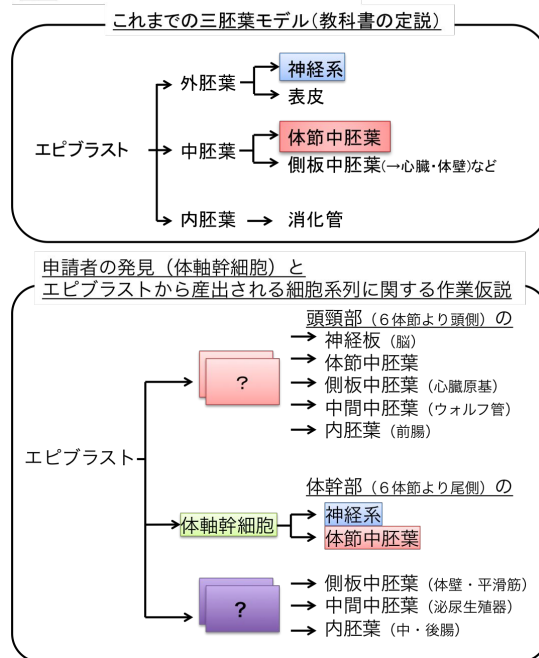
研究分野：発生生物学

キーワード：細胞系譜 原腸陥入

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物において、体を形作る多様な体細胞系列は、胚発生初期に多能性細胞集団(エピプラスト)から産み出される。古典的な三胚葉モデルでは、原腸陥入に伴ってまず外胚葉・中胚葉・内胚葉が産み出されることが、細胞運命の決定に不可欠な第一段階であると考えられてきた。そして、外胚葉からは、神経と表皮が産み出され、中胚葉はさらに分割され、中軸・沿軸・中間・側板・胚体外中胚葉が作られると考えられてきた。しかし申請者はこれまでの研究において、胴部中胚葉と神経板とが共通前駆体細胞・体軸幹細胞から産み出されることを明らかにした(Takemoto et al., 2011 Nature)。この発見は、「三胚葉」があくまで組織の解剖学的な位置を示すに過ぎず、細胞運命の決定や方向付けるものではないことを示している(図1)。そして、エピプラストから産み出される多様な体細胞系列の起源と細胞系譜についてゼロから考え直さないといけないことを示している。

図1:



2. 研究の目的

本研究では、体を形づくる多様な体細胞系列が胚のエピプラストのどの領域に起源して、また、どのような中間的な細胞系列を経由して産み出されるのかを明らかにする。1細胞標識と長時間培養の組み合わせによって、発生初期のエピプラストの1細胞が、器官形成期のどの領域へと分布するのかという細胞運命地図を作製する。さらにエピプラストの1細胞を、胚の異なる領域に移植することによって、細胞の分化能を記述する細胞系譜地図を作製する。

3. 研究の方法

まずは、マウス胚の1細胞標識法の確立を行い、確立した技術を活用して細胞運命地図の作製を行った。

マウス胚E7のエピプラスト(胚盤葉上層)の1細胞を標識する。長時間の培養を行っても標識が消失しないように、一過的な発現ではなく、Cre/loxPシステムを用いた遺伝的組換えを活用した細胞標識を行った。Creリコンビナーゼの発現によって、蛍光タンパク質を発現させるマウス胚(Rosa26R-H2bmCherry)を用いた。マウス胚への局所的な遺伝子導入法としては、トランスフェクション法がこれまで報告されていた。しかしながら、本研究で対象とするエピプラストのような上皮細胞への導入効率は著しく悪いことが分かっていた。このため、本研究では、ニワトリ胚において少数細胞への遺伝子導入法として活用されているエレクトロポレーション法を用いて、1細胞への遺伝子導入を行った。

確立した遺伝子導入法を用いて、発生初期の1細胞がその後の発生において胚のどの領域へと分布するかを解析した。標識した胚(E7)を48~72時間培養して、器官形成期のどの領域に分布するかを解析した。

1細胞標識されたマウス胚を培養して、標識された細胞が胚のどの領域に存在するか解析する。マーカー遺伝子の発現と比較することで、どういった体細胞系列へと寄与したかが理解できる。

4. 研究成果

マウス妊娠7日目の胚を取り出し、原条周辺のエピプラストの標識を行った。遺伝子導入法の確立のため、蛍光タンパク質を発現するプラスミドをエレクトロポレーション法により細胞へと導入した。導入に用いたガラスキャピラリーの先端径や、エレクトロポレーションの電圧、パルス長、パルス回数を検討することで、限定された細胞に導入することに成功した(図2)。より長期にわたる細胞標識を行なうため、Cre/loxPシステムと組み合わせることで、長期細胞標識を行なうことも可能となった。

次に、マウス妊娠7日目胚の原条周辺の少数細胞を標識した。全胚培養によって約48時間培養されたあと、標識細胞の分布を解析した。いずれの組織に寄与したかを、胚における分布のみならず、分化マーカーの発現と比較して解析した。同じ7日目胚でも、発生段階に応じて標識細胞の分布が変化することから、本研究ではLate streak (LS) stage以降、Head fold (HF) stage以前の胚に限定して詳細な解析を行った。また、標識する領域に関しても、原条のnode側半分の周辺領域に限定して解析を行った。

並行して、1細胞移植による細胞系譜解析も実施した。原条付近の細胞を、別の胚の異

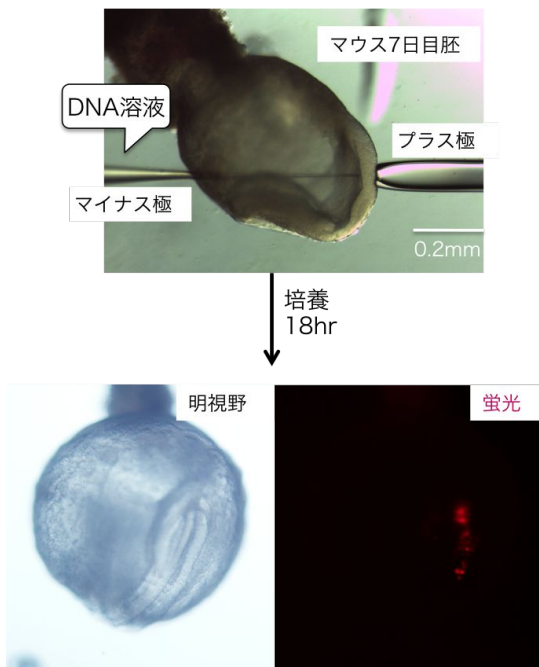


図2：エレクトロポレーション法による1細胞標識・遺伝子操作

遺伝子導入箇所は赤色蛍光タンパク（mCherry）で可視化される胚領域、もしくは、異なる発生段階の胚に移植することで、移植細胞の細胞運命を解析した。マイクロマニピュレーターを活用して、一細胞を操作し、胚のエピプラスのへと移植して、全胚培養によって胚を発生させ、細胞の組織寄与を解析した（図3）。

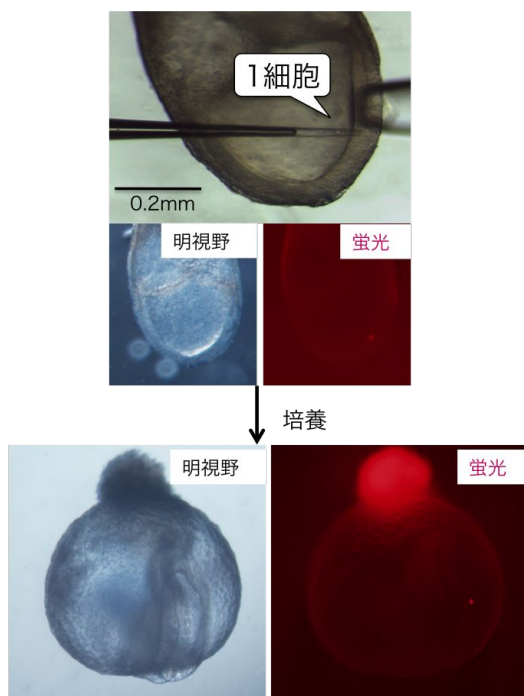


図3：1細胞の細胞移植

1細胞移植の実験例。赤色蛍光標識した1細胞をガラスキャピラリーで胚のエピプラストに移植する。移植細胞は蛍光顕微鏡で確認できる。18時間培養し、移植細胞の位置を調べた。

マウス初期胚の細胞系譜研究は、妊娠6日

目といった、より早い発生段階の解析が盛んに行われてきた。本研究は、これまで解析があまり行われてこなかった原腸陥入中期の細胞運命を理解する上で重要な研究となる。

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)

R26-WntVis reporter mice showing graded response to Wnt signal levels.
Takemoto T, Abe T, Kiyonari H, Nakao K, Furuta Y, Suzuki H, Takada S, Fujimori T, Kondoh H. *Genes to Cells* 21(6):661-669 (2016). doi: 10.1111/gtc.12364. 査読有

Axial level-dependent molecular and cellular mechanisms underlying the genesis of the embryonic neural plate.
 Kondoh H, Takada S, Takemoto T. *Development, Growth & Differentiation*. 58: 427 (2016). doi: 10.1111/dgd.12295. 査読有

Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse.
 Hashimoto M, Yamashita Y, Takemoto T. *Developmental Biology*. 418: 1-9 (2016). doi: 10.1016/j.ydbio.2016.07.017 査読有

Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing.
 Hashimoto M. and Takemoto T. *Scientific Reports*. 5: 11315 (2015). doi: 10.1038/srep11315 査読有

〔学会発表〕(計1件)

High-throughput production of mutant mice by electroporation of CRISPR/Cas9 system
Takemoto T and Hashimoto M.
 Mouse Molecular Genetics 2015
 Cambridge (UK)
 2015年9月19日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等

http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/embr_yology/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹本龍也 (TAKEMOTO, Tatsuya)

徳島大学・先端酵素学研究所・助教

研究者番号：30443899