

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657148

研究課題名（和文） 胚発生における最初期の極性獲得機構の解明

研究課題名（英文） Origin of the polarity during mouse development

研究代表者

高岡 勝吉 (TAKAOKA KATSUYOSHI)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：90551044

研究成果の概要（和文）：

我々ヒトやマウスといった哺乳類は、発生段階において極性を獲得すると考えられており、発生初期段階で最初の分子レベルの極性を獲得する。本研究は、4～8 細胞期において、マウス胚が胚発生過程で最初の極性を獲得する現象を新たに提唱し、その機構を解明することを目指し、研究を行った結果、①LFE は 4-16 細胞期の一部の割球で活性があること、②LFE 発現細胞は胚体外組織に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

It is thought that human and mouse embryos acquire the first polarity of body axes during early development. In this study, a new knowledge will be acquired during early mouse embryo development, and be showed the detail of the mechanism. As a results, I showed that

- ① Activity of LFE were shown in some blastomeres of 4-16 cell stage embryos.
- ② LFE positive cells contributed to extra-embryonic tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：極性、着床前胚、転写

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエを含む多くの生物は、卵子の段階で、*bicoid* などの母性効果遺伝子の mRNA が非対称分布し、*bicoid* タンパクが濃度勾配を形成することで、後の形態形成の基盤となる最初の分子レベルでの極性を獲得している。対して、我々ヒトやマウスといった哺乳類は、受精卵の初期段階で非常に高い適応能を有することから、受精卵の初期段階

では極性がないと考えられている。例えば、4細胞期のマウス胚の割球をばらばらにしても、それぞれ別々の完全な個体として生まれてくるが、8細胞期の胚では個体になることができない。すなわち、4細胞期から8細胞期にかけて、割球ごとの全能性が消失し、胚全体として極性を獲得している。以上より、マウス胚では4～8細胞期において最初の極性を獲得していると予想される。しかし、こ

れまでの研究では、解析手段がなかったため、この最初の極性獲得という現象の実体は未知であった。

2. 研究の目的

本研究は、4~8細胞期において、マウス胚が発生過程で最初の極性を獲得する現象を新たに提唱し、その機構を解明することを目的とする。4細胞期のマウス胚は、各割球をばらばらにするとそれぞれ1個体として発生するが、8細胞期ではそのような適応能は見られない。このことから、4~8細胞期にかけてマウス胚が何らかの極性を獲得していると考えられるが、解析手段がなく長年その実体は不明であった。申請者は8~16細胞期特異的に胚の片側の割球での発現を制御している *Lefty1* 上流に存在するエンハンサー(*Lefty1* First polarity Enhancer, LFE)を発見した。本研究は、これらの実験結果を基に①極性獲得機構における LFE の役割と意義、②LFE の発現制御機構について解析し、最初期の極性の獲得機構解明の突破口となる。

我々ヒトやマウスといった哺乳類の胚発生は、極性のない一個の受精卵から発生を開始し、最初の分子レベルの極性を獲得する。それがきっかけとなり、分子レベルでの極性と形態的極性の獲得を繰り返すことで、我々の体は作られている。

本研究では、これまで一般的な仮説であった、極性情報を持たない哺乳類の受精卵が、発生を始めた後にその情報を得るという現象を実証し、マウス胚の最も初期の極性獲得機構を解明する。本研究の完了により得られる、「最も初期の極性獲得機構」の知見は、個体発生にとって本質的な原理の一つであることから、卵割期だけにとどまらず、哺乳類胚発生の様々な局面へ「極性獲得モデル」の一つとして概念を提供すると期待される。さらに、本研究で用いる LFE 領域は、ヒト

にも保存性の高い領域であるため、哺乳類の様々な種に共通の機構が明らかになることが予想される。したがって、本研究の完成により得られた哺乳類胚共通の極性獲得機構の知見を、ショウジョウバエに代表される卵子の段階で極性情報を獲得している他の生物種と比較することで、哺乳類の胚発生がどのように進化してきたかという進化論的な研究にも新たな展開を与えるであろう。

そして、哺乳類胚発生にとって重要な現象である「極性獲得機構」の欠陥は、ヒトの不妊を引き起こすことが予想される。ゆえに、最も初期の極性獲得機構に関係する遺伝的/環境的な欠陥を補うことで、ヒトの不妊治療の一助となりうる。さらに、着床前胚は非常に操作性に優れているというメリットを生かし、本研究の完了により得られた知見や新たな実験方法が、治療法として迅速に臨床の場へ応用される可能性が高い。

そして、本研究は着床前胚を主に扱うため、研究を遂行する過程で開発された技術は、将来の再生医療の現場や不妊治療など臨床の現場へ応用されることは間違いない。

以上より、発生学の本質的な問題が明らかになるという点で学術的にも、またヒトへの応用や着床前胚を扱うという点で臨床的にも、本研究の遂行は卓越した成果が期待できる。

3. 研究の方法

本研究は、マウス胚が4~8細胞期において、胚発生過程で最初の極性を獲得する機構を明らかにする。そのために、まず以下の二点について解析をする。

極性獲得機構におけるLFEの役割と意義

まず、LFE が発現している細胞の意義を調べるため、全細胞トレーシングシステムと

Cre/loxP システムを用いて、リネージ解析し、細胞運命決定地図を作成する。これにより、LFE が発現している細胞が、どのような細胞期のどの割球由来であるか、また将来どのような組織となっているか、そして体軸情報との位置関係が明らかになる。

LFE発現制御機構の解明

まず、エンハンサー解析により、結合因子の同定を行い、得られた因子のノックダウン胚を解析することで、極性獲得機構の全貌を解明する。

4. 研究成果

(1) LFE は内在の *Lefty1* 発現制御機構とは異なる発現制御機構である

まず、*Lefty1* の内在の発現を in situ hybridization 法や *Lefty1* の exon1 に *mcherry* を挿入した *Lefty1-cherry* BAC トランスジェニックマウスを用いて、4 細胞期～16 細胞期の胚において LFE が内在の *Lefty1* の発現を再現しているのか確認した。

しかし、内在の *Lefty1* は、4 細胞期～16 細胞期の胚で発現しておらず、LFE は何かしらの生体现象を再現しているが、内在の *Lefty1* の発現制御機構とは異なる、LFE 独自の発現制御機構を有していることが明らかになった。

(2) LFE が発現した細胞は、胚体外組織へ寄与する

8～16細胞期にLFEが発現した細胞のリネージを調べるために、Cre-loxP システムを用いた。具体的には、4-16 細胞期特異的なエンハンサー-LFE に Cre を結合したトランスジェニックを作製し、LFE(Cre)トランスジェニックマウスを作る。LFE (Cre)マウスと R26R マウスを交配させ、受精後 3 日胚以降の胚で、胚盤胞での内部細胞塊、原始内胚葉、三胚葉などの様々な組織と LFE 由来の細胞の関係や、体軸情報との位置関係を調べた。

結果、LFE 発現細胞は、胚体組織に寄与せず、胚体外組織特異的に寄与していた。

(3)最も初期の極性獲得機構の下流因子を同定する。

下流因子の候補を調べるために、4-16 細胞期で発現する様々な細胞分化標識遺伝子について免疫染色を行った。

(4)エンハンサー解析

LFE の発現制御機構について、現在得ている LFE 領域を基にし、さらに詳細なマッピングを行った。

結果、最小エンハンサーを 109bp にマッピングした。

今後、さらなる詳細なマッピングを行う。

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 3 件)

①発表論文名 : Fluid Flow and Interlinked Feedback Loops Establish Left-Right Asymmetric Decay of *Cer12* mRNA in the Mouse Embryo 著者名 : *Tetsuya Nakamura, Daisuke Saito, Aiko Kawasumi, Kyosuke Shinohara, Yasuko Asai, Katsuyoshi Takaoka, Henglan Dong, Atsuko Takamatsu, Jese Antonio Belo, *Atsushi Mochizuki and Hiroshi Hamada

掲載誌名 : **Nature communications**, 巻号 : 1322、発表年 : 2012 年、査読有

②発表論文名 : Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo 著者名 : *Katsuyoshi Takaoka, *Hiroshi Hamada 掲載誌名 : **Development**, 巻号: 3, 発表年:2012 年、査読有

③発表論文名 : Origin and role of distal visceral endoderm, a group of cells that determines anterior-posterior polarity of the mouse embryo. 著者名 : *Katsuyoshi Takaoka, Masamichi Yamamoto and *Hiroshi Hamada 掲載誌名 : **Nature Cell Biology**, 巻号: vol.13(7), 頁:743-52, 発表年:2011年、査読有

〔学会発表〕(計7件)

①高岡勝吉、「マウス胚における前後軸の起源」、CREST シンポジウム、2013年2月25日、秋葉原

②高岡勝吉、「マウス胚における前後軸の起源」、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、博多

③ Katsuyoshi Takaoka、Origin of Anterior-posterior axis formation in the mouse embryos, Hong Kong Society for Developmental Biology Symposium、2012年11月26日、香港

④高岡勝吉、「マウス胚における前後軸の起源」、新学術領域研究 細胞コミュニティー、2012年11月19日、葉山、神奈川県

⑤ Katsuyoshi Takaoka、Origin of Anterior-posterior axis formation in the mouse embryos、第45回日本発生学会・第64回日本細胞生物学会、2012年5月28日、神戸

⑥高岡勝吉

「マウス胚における前後軸の起源」

新学術領域研究 細胞コミュニティー、2011年11月25日、愛知

⑦ Katsuyoshi Takaoka, Masamichi Yamamoto, Hiroshi Hamada

「Origin and role of distal visceral endoderm, a group of cells that determines anterior-posterior polarity of the mouse embryo」

第44回発生生物学会、2011年5月18~21日、沖縄

〔図書〕(計1件)

①論文名:マウス胚の前後方向を決定する遠位臓側内胚葉の起源と役割

著者名 : * 高岡勝吉、濱田博司

掲載誌名:ライフサイエンス新着論文レビュー First author's 頁1-3, 発表年:2011年、査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高岡 勝吉 (TAKAOKA KATSUYOSHI)
大阪大学・生命機能研究科・助教
研究者番号:90551044

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし