

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14521

研究課題名(和文) 胞胚腔の液成分の同定と胚発生における役割

研究課題名(英文) Identification of blastocoel fluid components and its function in early development

研究代表者

近藤 真理子 (KONDO, Mariko)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：70372414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：後生動物の初期胚における胞胚腔の役割は未だ不明である。本研究では、胞胚腔が細胞増殖や胚の組織間の情報伝達の場となっているのではないかという仮説を立て、アフリカツメガエル胚を用い、プロテオーム解析による胞胚腔液に含まれる成分の同定によって、検証することを目的とした。胞胚腔液を解析した結果、鉄イオンの恒常性に関わるタンパク質やタンパク質分解酵素などが見つかった。しかし、予想と異なり、シグナル伝達に関わるリガンドタンパク質は同定できず、仮説を支持するデータは得られなかった。すなわち、胞胚腔は初期発生で不要となったタンパク質を処理する場として機能していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The role of the blastocoel in early embryos are unknown. In this study, we hypothesized that it functions as the space which is used for signaling between tissues or for cell proliferation, and tried to verify this using proteomics of the blastocoel fluid. We identified proteins that are involved in iron ion transport or homeostasis, proteinases, etc. However, we could not detect ligand proteins involved in cell signaling, and our hypothesis was not supported. The results suggested that the blastocoel may be utilized as a pool to digest unnecessary proteins during early embryogenesis.

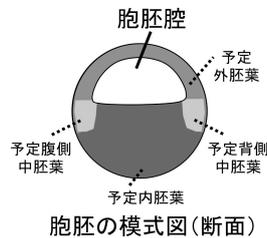
研究分野：発生学

キーワード：アフリカツメガエル 胞胚腔 初期発生 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の胞胚は約 1000~5000 個の細胞からなり、その動物極側の中央に胞胚腔とよばれる「空所」が存在し(下図)、胞胚腔液で満たされている。胞胚腔液の役割としては、

(1) その内圧を高めて、胚を球形に保つこと、(2) 帯域の予定中胚葉と植物極側の予定内胚葉から動物極側の予定外胚葉を隔てる役割を担うこと



が推察される。一方で、胞胚腔液には、各予定胚葉から漏れ出た成長因子やそれに結合する調節タンパク質など、細胞の増殖に関わったり細胞間の情報伝達に関わったりするタンパク質が含まれていることも想像でき、胞胚腔が情報伝達の場として機能していることも推察される。しかし、これまで両生類の胞胚腔液に関する知見は非常に乏しい。

アフリカツメガエルは発生学の材料には適しているが、全ゲノム情報が整備されていなかったため、分化誘導因子などの蛋白質レベルでの解析はできない状況であった。しかし、申請者は日米共同で行われているアフリカツメガエルのゲノムプロジェクトに深く関与しており、全ゲノムの解読が終了しプロテオーム解析が可能となる見通しがたった。そこでようやく胞胚腔液のタンパク質を LC-MS で網羅的に解析することが可能となり、胞胚腔の機能解析に迫れることになった。

2. 研究の目的

カエルの胞胚腔の役割を解明するため、胞胚腔液の成分を質量分析による解析で明らかにし、それをもとに、胞胚腔ではどのような生物学的な現象が起こっているかを推定する。胞胚腔液の成分分析はほ乳類でしか行われておらず、網羅的な解析は最近発表された、ヒトの胚盤胞液だけである(Jensen et al., 2013)。それによれば 286 個のタンパク質が見つかり、熱ショック蛋白質などが含まれていた。しかし、ほ乳類の胚盤胞と両生類の胞胚は構造的に異なり、発生における役割に大きな相違があると考えられる。発生学の基本とされる両生類において胞胚腔が発生にどのような役割を持つのかを、胞胚腔液の解析から明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

1) 胞胚腔液の採取

ゲノム情報が整備されつつあるアフリカツメガエルの胚を胞胚期あるいはそれ以降のステージまで発生させる。ガラスマイクロ

ピペットを胞胚腔に差し込み、胞胚腔液を採取する。採取した胞胚腔液は微量なので、蒸発を防ぐためにあらかじめ用意したシリコンオイルの中に滴下し、タンパク質の分解を防ぐためにプロテアーゼ阻害剤カクテルを加え、集めて解析に用いる。胞胚腔液を採取した際に予定外胚葉の細胞を吸い込んだりしていないことは、顕微鏡で観察して確認する。

2) LC および MS を利用したプロテオーム解析

得られた胞胚腔液を陽イオンクロマトグラフィで分離し、さらに逆層クロマトグラフィでサンプルを展開してから MALDI-TOF/TOF などの方法で質量分析を行う。最近利用可能になったアフリカツメガエルゲノム情報および RNA-seq 情報を参照し、MASCOT-SEQUENT などプロテオーム解析を行う。これによって、胞胚腔液に含まれる蛋白質の同定を行う。得られた情報を gene ontology 解析や文献的に調べることで、胞胚腔の中でどのような現象が生じているか考察する。

3) アフリカツメガエルゲノム情報の整備と遺伝子解析

日米の合同チームで解読したアフリカツメガエルのゲノム情報は未完成な部分もある。そこで、アセンブルされたゲノム情報をもとに作成された遺伝子モデルの検証や配列の修正を、初期発生に関わる遺伝子、例えば *hox* 遺伝子などの転写因子、を中心に行った。また、胞胚腔がシグナル伝達に関与する可能性を考え細胞外基質に関わる遺伝子にも着目した。

4. 研究成果

①アフリカツメガエル胞胚腔液の採取方法の検討

アフリカツメガエルの胞胚の容積は約 1 マイクロリットルとすると、胞胚腔は stage 9 ではその 1/5 から 1/6 の容積に、stage 10 では 1/4 から 1/5 の容積に相当するので、200 から 250 ナノリットルの胞胚腔液があると推測した。採取は通常の卵へのインジェクションに用いる系を利用し、胚をフィコール溶液中に置き、針で吸い取る方法を採用した。胞胚腔液を採取しても他の細胞を吸わないように、1つの胚あたりの液量は 100 ナノリットルを目安にして実施し、ほぼ期待通りの液量が得られた。しかし、得た胞胚腔液には若干の混入物があり、顕微鏡下で観察すると白い卵黄成分を含む細胞であると考えられた。そこで、方法を改善し、吸引の速度をゆっくりにし、1個の胞胚から吸引する液量を減らすことにした。プラスチックシャーレにパラフィルムの断片を付着させ、その上にミネラルオイルの油滴を作った。この油滴にプロテアーゼ阻害剤カクテル 2 マイクロリットルを入れ、採取した微量の胞胚腔液を加えるこ

とにした。約 40 個の胞胚の胞胚腔液を一つにまとめた。1つの胚から 50 ナノリットルの胞胚腔液を採取できることがわかった。採取した胞胚腔液は静置してシリコンオイルをできるだけ吸わないようにチューブにとり、さらに低速で遠心してその上清だけを今後の解析に使うこととした。

②LC および MS を利用したプロテオーム解析

得られた胞胚腔液は基礎生物学研究所・重信博士のグループに解析を依頼した。

プロテアーゼインヒビター入りの胞胚腔液約 10 マイクロリットルをゲル電気泳動したところ、約 75 kDa のあたりにバンドが見られた以外にはバンドは検出されなかった。泳動したタンパク質をゲル内消化し、ゲルを 5 つに切り分けてそれぞれからタンパク質を回収し、LC-MS で調べた結果、それぞれから複数のタンパク質の存在が予測された。以下に同定されたタンパク質の一部と機能などを挙げる。

タンパク質	機能・性質
vitellogenin	卵黄成分前駆体
serotransferrin-B precursor	鉄イオンの輸送、恒常性の調節
ferritin heavy chain	
ferritin light chain	
trypsin	タンパク質分解
leucine aminopeptidase 3L	
cathepsin B	
calcium transporter 2	イオンチャンネル
voltage-dependent Ca channel beta subunit	
Eno3-prov protein	糖代謝
alpha enolase	
aldose reductase	炭水化物代謝
intelectin	糖タンパク質
E3 ubiquitin protein ligase	タンパク質分解(プロテアソーム経路)

まず、vitellogenin が同定されたことから、完全に細胞の混入は防げなかったことが予測された。

約 75 kDa と予想したバンドを含むゲルからは serotransferrin-B precursor (予想分子量は約 77 kDa) が検出された。他にも鉄イオンの輸送などに関わる ferritin タンパク質が得られたことから、鉄の恒常性に関与するタンパク質が胞胚腔液に多量に存在する可能性が考えられた。また、タンパク質分解に関わる酵素 (トリプシンなど) が同定されたことから、胞胚腔がタンパク質の分解の場になっていることが推定された。

一方、シグナル伝達に関わるリガンドタン

パク質は同定できず、胞胚腔がリガンドの通り道の場合として機能するという申請者の予想 (仮説) を支持するデータは得られなかった。まだ機能未知のタンパク質が数多く同定されたため、今後、それらを詳しく調べる必要があると考えられる。

タンパク質の分解に関わる分子が同定されたことは、不要なタンパク質を処理する場として胞胚腔が使われる可能性を示唆している。すなわち、発生の途中で不要となった細胞がアポトーシスをおこし、それらが胞胚腔で処理されている可能性が考えられる。すると、本解析で keratin、E3 ubiquitin protein ligase、aldose reductase、enolase など細胞内で機能するタンパク質も同定されることが説明できる。今後は胞胚腔液に濃縮されて存在するタンパク質を同定するための解析、例えば胚の動物極側の組織 (アニマルキャップ) と胞胚腔液のプロテオームを比較するなどの解析を行うべきであると考えられる。

③アフリカツメガエルゲノム情報の整備と遺伝子解析

プロテオーム解析にはゲノム情報やトランスクリプトーム情報が不可欠である。2016 年 10 月にアフリカツメガエルの全ゲノム解読が完了し、論文として発表した (Session et al., 2016)。ゲノムデータ及び遺伝子モデルの検証は機械的にはなされたものの、マニュアルでの検証を行う余地が残されていた。そこで、初期発生に関与すると考えられる *hox* 遺伝子を始めとした転写因子 (Watanabe et al., 2017; Haramoto et al., 2017; Mawaribuchi et al., 2017; Kondo et al., 2017) の解析を行った。これらの解析を通し、機械的な解析では発見されなかった遺伝子を見つけ出したり遺伝子モデルの誤りを修正したりすることができた。また、*hox* 遺伝子については偽遺伝子の同定や発現解析を行った (Kondo et al., 2017)。

一方、胞胚腔の発生学的な意義を明らかにするため、胞胚の細胞外基質を変化することで胞胚腔液の成分が変化するか否かの検討を行うことを視野に入れ、研究を進めることにした。細胞外基質としてはヘパラン硫酸に注目し、その生合成の過程で使われる 5 種類の修飾酵素の活性を操作することで種々の修飾を持つヘパラン硫酸をもつ胞胚における胞胚腔液の成分を解析することとした。それにより胞胚腔液の成分がどのように制御されているのかを明らかにできるのではないかと考えられる。

ヘパラン硫酸修飾酵素の一つ、NDST は既にクローニングしてあったので、その他の 4 つの修飾酵素遺伝子 (Glce, Hs2st, Hs6st, Hs3st) のクローニングをまず行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kondo M., Yamamoto T., Takahashi S., Taira M. (2017)

Comprehensive analyses of Hox gene expression in *Xenopus laevis* embryos and adult tissues.

Dev Growth Diff. 59: 526-539 (査読有)

2. Watanabe, M., Yasuoka, Y., Mawaribuchi, S., Kuretani, A., Ito, M., Kondo, M., Ochi, H., Ogino, H., Fukui, A., Taira, M., and Kinoshita, T. (2017)

Conservatism and variability of gene expression profiles among homeologous transcription factors in *Xenopus laevis*.

Dev Biol. 426: 301-324

doi: 10.1016/j.ydbio.2016.09.017. (査読有)

3. Haramoto, Y., Saijyo, T., Tanaka, T., Furuno, N., Suzuki, A., Ito, Y., Kondo, M., Taira, M., Takahashi, S. (2017)

Identification and comparative analyses of Siamois cluster genes in *Xenopus laevis* and *tropicalis*.

Dev Biol. 426:374-383

doi: 10.1016/j.ydbio.2016.07.015. (査読有)

4. Mawaribuchi, S., Takahashi, S., Wada, M., Uno, Y., Matsuda, Y., Kondo, M., Fukui, A., Takamatsu, N., Taira, M., and Ito, M. (2017)

Sex chromosome differentiation and the W and Z-specific loci in *Xenopus laevis*.

Dev Biol. 426:393-400.

doi: 10.1016/j.ydbio.2016.06.015. (査読有)

5. Session, A., Uno, Y., Kwon, T., Takahashi, S. (74名中6番目),, Kondo M. (74名中10番目),, *Harland, R., *Taira, M., and *Rokhsar, D. (2016)

Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*.

Nature. 2016 Oct 19; 538 (7625) : 336-343. (Article)

DOI: 10.1038/nature19840 (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

1. Mariko Kondo, Megumi Matsuo, Kento Igarashi, Yoshikazu Haramoto, Takayoshi Yamamoto, Yuuri Yasuoka, Masanori Taira.

No temporal collinearity is evident for de novo transcription of Hox cluster genes in *Xenopus tropicalis* whole embryos.

International Symposium at Hiroshima University, "Amphibian development, regeneration, evolution and beyond." (2018年3月13~14日)

広島大学 (東広島) (oral presentation, invited)

2. 近藤真理子, 松尾恵、五十嵐健人、山元孝佳、原本悦和、安岡有理、平良眞規.

ツメガエルにおいて hox クラスター遺伝子の temporal collinearity は認められない
第40回日本分子生物学会年会 (ConBio2017) (2017年12月6~9日)
神戸ポートアイランド (神戸)

3. 近藤真理子, 松尾恵、原本悦和、安岡有理、山元孝佳、五十嵐健人、平良眞規.

ツメガエルにおいて hox 遺伝子の temporal collinearity は存在するか

日本動物学会第88回富山大会 (2017年9月21~23日)

富山県民会館 (富山)

4. Kondo M., Matsuo M., Yamamoto T., Takahashi S., Taira M.

Expression analyses of *Xenopus* Hox clusters and lack of "temporal collinearity"

日本発生生物学会第50回大会 (2017年5月10~13日)

船堀タワーホール (東京)

5. Mariko Kondo, Takayoshi Yamamoto, Shuji Takahashi, Masanori Taira

Structural and expression analyses of the *Xenopus laevis* Hox clusters

16th International *Xenopus* Conference (2016年8月28日~9月1日)

Orthodox Academy of Crete, Chania, Greece

6. Mariko Kondo, Takayoshi Yamamoto, Shuji Takahashi, Yoshikazu Haramoto, Masanori Taira

Structural and expression analyses of the *Xenopus laevis* Hox clusters

第2回次世代両生類研究会 (2016年8月8-9日)

岡崎コンファレンスセンター (岡崎)

7. 近藤真理子, 山元孝佳、高橋秀治、平良眞規

Xenopus laevis 全ゲノム解析: 異質四倍体化によって生じた8つの hox クラスターの構造と遺伝子発現の解析

第38回日本分子生物学会年会 (2015年12月1日~4日)

神戸ポートアイランド (神戸)

8. 回瀬 修治, 和田 美加子, 高橋 秀治, 宇野 好宣, 松田 洋一, 近藤 真理子, 福井 彰雅, 高松 信彦, 平良 眞規, 伊藤 道彦

Xenopus laevis 全ゲノム解析: アフリカツメガエルの性染色体と W および Z 特異的領域の解析

第38回日本分子生物学会年会 (2015年12月1日~4日)

神戸ポートアイランド (神戸)

9. 高橋 秀治, 豊田 敦, 宇野 好宣, 黒木 陽子, 彦坂 暁, 原本 悦和, 田中 利明, 西城 智仁, 野口 英樹, 松田 洋一, 近藤 真理子, 藤山 秋佐夫, 上野 直人, 平良 眞規, 浅島 誠

Xenopus laevis 全ゲノム解析 : アフリカツメガエル nodal5 と nodal6 遺伝子クラスターについての解析

第 38 回 日本分子生物学会年会(2015 年 12 月 1 日~4 日)

神戸ポートアイランド (神戸)

10. 西城 智仁, 原本 悦和, 田中 利明, 古野 伸明, 鈴木 厚, 近藤 真理子, 平良 眞規, 高橋 秀治

Xenopus laevis 全ゲノム解析 : アフリカツメガエルの *siamois* ファミリー遺伝子クラスターについての解析

第 38 回 日本分子生物学会年会(2015 年 12 月 1 日~4 日)

神戸ポートアイランド (神戸)

11. 渡部 稔, 回渕 修治, 安岡 有理, 伊藤 道彦, 近藤 真理子, 越智 陽城, 荻野 肇, 福井 彰雅, 平良 眞規, 木下 勉

Xenopus laevis 全ゲノム解析 : 転写因子をコードする遺伝子群の初期発生および成体器官における発現パターンの解析

第 38 回 日本分子生物学会年会(2015 年 12 月 1 日~4 日)

神戸ポートアイランド (神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 真理子 (KONDO, Mariko)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号 : 70372414

(2) 研究分担者

高橋 秀治 (TAKAHASHI, Shuji)

広島大学・理学研究科・特任准教授

研究者番号 : 90447318