

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890292
 研究課題名(和文) 神経管形態形成運動に関与するグアニン交換因子のマウスモデルを用いた遺伝学的解析
 研究課題名(英文) Genetic analysis of a guanine nucleotide exchanging factor involved in neural tube morphogenesis
 研究代表者
 種子島 幸祐(TANEGASHIMA KOSUKE)
 財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員
 研究者番号：20507678

研究成果の概要(和文)：神経管の形態形成運動の異常は、二分脊椎症や無脳症といった神経管閉鎖障害と深く関連している。これまでの研究により、WGEF という新規の遺伝子が、Wnt-PCP 経路を仲介することによって、両生類胚の神経管の形態形成運動を制御することを明らかにしてきた。本研究ではマウス WGEF 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスの作出を行った。ES 細胞にターゲティングベクターを導入し、スクリーニングすることにより、WGEF 遺伝子のコンディショナルノックアウトアレルをもつ ES 細胞が得られた。さらに、この ES 細胞を用いてキメラマウスを作成した。

研究成果の概要(英文)：Abnormal morphogenesis of the neural tube leads to neural tube defects including spina bifida and anencephaly. We found that a novel guanine nucleotide exchanging factor, WGEF mediates Wnt-PCP pathway, and regulates morphogenic movements of neural tube in the amphibian embryo. In this study, I attempted to generate a conditional knockout mouse of WGEF gene as a mammalian model of neural tube defects. So far, a conditional knockout allele on the WGEF locus was introduced by homologous recombination in the ES cells. Using this ES cells, chimera mice carrying WGEF conditional knockout cells have been generated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：先天異常学、神経管閉鎖障害、発生・分化、脳・神経、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の神経管形態形成運動は、様々な秩序だった細胞運動が組み合わさったダイナミックな発生過程であり、胚の背側領域に誘導されたいくつかの細胞層からなる神経領域（神経板）が、中軸に沿って細長く伸長運動（収斂伸張運動）をしながら巻き上がり、筒状に閉じることにより神経管を形成する。このときの細胞運動が乱れると神経管閉鎖障害が起こり、結果としてヒトの二分脊椎や無脳症といった重篤な先天疾患を引き起こす。この先天疾患は家族歴のある事例が多く存在するため、遺伝的要因を原因として起こるとされているが、現在までにヒトで原因遺伝子が特定された例は存在しない。

神経管の形態形成運動のうち、収斂伸張運動は極性の変化を伴う細胞運動であり、Wnt経路の一つのブランチであるWnt-PCP経路によって制御されていることが明らかになっている。この経路はレセプターであるFrizzled (Fz)、細胞内のシグナル伝達因子であるDishevelled (Dvl)、極性を制御するVangl といった遺伝子によって制御されているが、これらの遺伝子の変異マウスはいずれも神経管の閉鎖に異常が起こることが知られている。さらに、生化学的な実験ではWntによる細胞内シグナル伝達の下流でRhoA, Rac1といったアクチン細胞骨格を制御する低分子量GTPaseの活性化が起こり、細胞移動などが制御されることがわかってきたが、Wnt-PCP経路において低分子量GTPaseの活性化を担う分子が発見されていなかったため、分子メカニズムに不明な点が多く残されていた。我々は、収斂伸張運動の盛んな両生類脊索組織を材料にマイクロアレイ解析を行い、Wnt-PCP経路においてRhoAの活性化を直接担う因子として、グアニンヌクレオチド交換因子の一つWGEFを初めて見いだした。また、両生類胚を用いた実験では、WGEFの機能阻害胚で後方神経管の閉鎖に障害が起こり、二分脊椎の表現型が見られた。このことから、両生類胚では、WGEFによって活性化されるWnt-PCP経路依存的なRhoAの活性化が神経管の形態形成運動に関与していることが示唆された。Wnt-PCP経路は、ショウジョウバエの羽の細胞極性構築にかかわる遺伝子群として同定され、遺伝学的解析が盛んに行われてきた。近年になってこの経路は、脊椎動物の形態形成運動の鍵を握る経路であることが明らかになってきており、WGEFのように脊椎動物特異的なWnt-PCP経路の遺伝子も発見されている。そのため、脊椎動物モデルを用いたWnt-PCP経路の遺伝学的解析も今後の課題で

ある。また、Wnt-PCP経路からRhoの活性化に至る過程は、Rho経路が多様なシグナルの下流に位置するため、特異性のある解析が非常に困難であった。WGEFに着目した研究は、特異性の問題を回避して、WntによるRhoの活性化の形態形成運動における意義を検証できるという点で非常に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

これまで、Wnt-PCP経路依存的なRhoA活性化メカニズムに関する研究は主に両生類、魚類胚を脊椎動物の発生モデルとして用いて行われてきた。これらの知見をヒト先天疾患モデルへと発展させるためには、哺乳類胚を用いた解析が必須である。そこで、本研究ではWGEFノックアウトマウスの作成を行い、哺乳類胚でのWnt-PCP経路依存的なRhoA活性化の神経管形成運動における役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

WGEF遺伝子のノックアウトマウスを作出するため、以下のような方法を用いる。

(1) 相同組み替え用ターゲティングベクターの作成

ターゲティングベクターはWGEF遺伝子を含むBacterial artificial chromosome (BAC) cloneをもとに、BAC組み替え法を用いた方法で作成する。Exon2の3'側に選択マーカーとしてLoxPサイトとneoカセットをもつ組み換えカセットを導入し、5'側にLoxPサイトを組み込むことによってCre遺伝子の発現によるWGEFのコンディショナルな遺伝子破壊を起こさせるようデザインする。BAC組み替え法はこれまでの制限酵素サイトによったターゲティングベクターのデザインよりも効率的であり、短期間でのベクター構築が期待できる。

(2) 相同組み替え体ES細胞のスクリーニング

ES細胞にターゲティングベクターを導入し、組み込まれたクローンをneomycinによって選択することにより、相同組み替えによりWGEF遺伝子座に組み込まれたクローンを得る。相同組み替えによってではなく、ランダムなベクターの挿入によってneomycin耐性になるクローンも存在するため、正しく組み替えによってWGEF遺伝子座にneomycin耐性遺伝子のカセットが組み込まれているクローンを3'側のWGEF遺伝子特異的

プライマーと neomycin 耐性遺伝子プライマーとのPCRによってスクリーニングする。さらに、この ES クローンのゲノム PCR によって、neomycin 耐性遺伝子カセットの 5' 側への LoxP サイトの組み込み、およびターゲティングベクターの 5' 側での組み替えが正しく行われていることを確認する。

(3)キメラマウスの作成

WGEF(flox/+)ES細胞をマウス胚盤胞に微量注入し、キメラマウスの作成を試みる。

4. 研究成果

(1) 相同組み替え用ターゲティングベクターの構築

WGEFターゲティングベクターは、BACの修飾法を用いて構築した。薬剤選択のカセットを含む、BAC修飾用のベクターにWGEFの配列を組み込み、修飾用ベクターの配列とBACの配列で組み換えを起こさせることによって、BAC cloneに目的のLoxPサイトと、neoカセットを組み込んだ。最終的にDTAを含むES細胞導入用のベクターに目的の断片を組み替えにより挿入し、WGEFコンディショナルノックアウトマウスのターゲティングベクターを作出することに成功した。

(2)相同組み替え体ES細胞のスクリーニング

まず、ES細胞の相同組み替え体のスクリーニング条件を検討するため、スクリーニングに使うPCR領域を含む断片をクローニングしたコントロールベクターを作製し、ES細胞に導入して、実際にスクリーニングに用いるプライマーでPCRを行った。その結果、スクリーニングに最適なprimerペアとPCR条件が決定できた。その後、ターゲティングベクターをES細胞に導入して、neomycin耐性クローンを選択し、決定したPCR条件をもとに、WGEF遺伝子座へ相同組み換えでターゲティングベクターが組み込まれたクローンを選択した。3回にわたってスクリーニングを行い、約1800クローンをスクリーニングしたところ、このうち3クローンのES細胞に、WGEF遺伝子座にターゲティングベクターが組み込まれていることがわかった。さらに、このESクローンのゲノムPCRによって、LoxPサイトの組み込み、および5'側の組み替えが正しく行われていることを確認したところ、2クローンの細

胞では、LoxPサイトの組み込みおよび5'側の組み替えが正しく起こっていることがわかった。このようなスクリーニングを経て、WGEFコンディショナルノックアウトマウスを持つES細胞(WGEF(flox/+))を2クローン得ることができた。

(3)キメラマウスの作成

このWGEF(flox/+)ES細胞をマウス胚盤胞に微量注入し、キメラマウスの作成を試みた。早期のスクリーニングで得られた一つ目のクローンからは、1個体のキメラマウスが生まれたものの、2週齢で死亡したため、交配可能なキメラマウスを得ることができなかった。その後のスクリーニングによって得た2つ目のクローンを用いてキメラマウスを作製したところ、4頭のキメラマウスを得ることができた。このキメラマウスの交配により、WGEFノックアウトマウスを作出する予定である。

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 2 件)

- ①Tanegashima K, Suzuki K, Nakayama Y, Hara T. Antibody-assisted enhancement of biological activities of CXCL14 in human monocytic leukemia-derived THP-1 cells and high fat diet-induced obese mice (2010) Exp. Cell. Res. 316, 1263-1270. (査読あり)
- ②Tanegashima K, Zhao H, Rebbert ML, Dawid IB. Coordinated activation of the secretory pathway during notochord formation in the Xenopus embryo (2009) Development. 136, 3543-3548. (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

- ①種子島 幸祐, 岡本 士毅, 中山 由紀, 多屋 長治, 設楽 浩志, 石井 里絵, 米川 博通, 箕越 靖彦, 原 孝彦
CXCL14 deficiency attenuates obesity and inhibits feeding behavior in a novel environment
第三十二回日本分子生物学会 2009年12月10日 パシフィコ横浜
- ②鈴木 健司, 種子島 幸祐, 中山 由紀, 原孝彦
Antibody-assisted enhancement of chemotactic activity of CXCL14 in human

monocytic leukemia-derived THP-1 cells
第三十二回日本分子生物学会 2009年12月
9日 パシフィコ横浜

- ③Hara T, Nakayama Y, Tanegashima K
CXCL14 is required for body weight gain
in female mice
Keystone symposia, Obesity: Novel
Aspects of the Regulation of Body Weight
2009年1月20-25, Faremont Spring Hotel,
Canada
- ④種子島 幸祐、鈴木 健司、原 孝彦
ケモカインCXCL14の生理的役割とシグナ
ル伝達経路の解析
第三十一回日本分子生物学会 2008年12月
11日 神戸ポートアイランド
- ⑤Kosuke Tanegashima, Hui Zhao, Martha
Rebbert and Igor Dawid
Notochord differentiation requires
activation of the Unfolded Protein
Response
12th international Xenopus conference,
2008年9月12日 Leiwent/Trier, Germany

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 種子島 幸祐
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨
床医学総合研究所・主任研究員
研究者番号：20507678
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし