

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月29日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21570223

 研究課題名（和文）新規モデル動物を用いた胚発生における細胞死の可視化と分子機構の解明
 研究課題名（英文）In vivo imaging of embryonic cell death in the new model animal and its molecular analysis

研究代表者

酒巻 和弘（SAKAMAKI KAZUHIRO）

京都大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：20271017

研究成果の概要（和文）：アダプター分子としてアポトーシスのシグナル伝達に關与する FADD について、FADD の発現量を制御することでアフリカツメガエルの胚発生に異状が生じることを認め、胚発生過程において機能分子として働いていることを明らかにした。また、新たに樹立したトランスジェニックカエルがアポトーシスを検出するのに適したモデル動物となることを本研究において確認した。

研究成果の概要（英文）：FADD is an adaptor protein that transmits apoptotic signals in the cell. In this study, we have shown that FADD has multiple functions in *Xenopus* embryos; it plays roles in heart formation as well as apoptosis. We also established a transgenic frog line expressing a biosensor, which is suitable for detecting dying cells, and observed the change of the biosensor in developing embryos when apoptosis was induced.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,210,000	390,000	1,600,000
2012年度	90,000	0	90,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：発生遺伝・細胞死

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究により、脊椎動物の胚発生過程で観察される様々な細胞死に、カスパーゼが関与する可能性が示唆されていた。例えば、ニワトリの肢芽形成時にカスパーゼ阻害剤を指間に埋めておくと、細胞死が抑制されて水かきができるという報告がある。また、カスパーゼ9を欠損したマウス胚では、脳の神経上皮細胞の細胞死が抑制された結果、異常増殖が誘発される。我々が作製したカスパーゼ8を欠損したマウス胚では、心臓・神経管・血管の形成異常が起こる。両遺伝子欠損

マウスは、共に胚性致死であることから、カスパーゼが胚発生に関わっていることが示唆される。しかし、このような変異マウスを使って、胚発生におけるカスパーゼの役割を理解するには、マウス胚の調達や系統維持などに難しさを伴う。一方、胚発生を研究する上で、両生類（特にアフリカツメガエル）は研究材料として適した動物である。受精直後から成体に変態するまで、発生の一部始終を外から眺めることができるために、経時的な観察ができる利点を有している。両生類においても、初期発生の時期や変態期に細胞死

が起こることが明らかにされており、変態期の細胞死はアポトーシスであることも示唆されている。我々のこれまでの研究から、アフリカツメガエル胚においてカスパーゼやアダプター分子 FADD の発現を確認済みである。これらのことを踏まえ、胚発生におけるアポトーシスを解析するには、アフリカツメガエルが“モデル動物”として最適であると考えた。

しかし、カスパーゼの関与の有無を識別し、細胞死が認められる場所を特定するためには、これまでの手法には限界があった。そのため、我々は“トランスジェニックカエル作製技術”を確立し、カスパーゼの活性をモニターできると期待される系統を樹立した。この系統は、カスパーゼの活性化を検出するために作製したモニター基質分子（2種類のCFPとYFPが融合したタンパク質）を全身で発現しているトランスジェニック系統である。既に我々は、モニター基質分子を発現している培養細胞を使って、アポトーシス誘導後の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の変動を指標に、カスパーゼの活性化を生細胞イメージングすることに成功している。同様な計測方法によりこの系統を調べれば、生きた個体でイメージングすることが可能になると考えた。我々が確立したイメージング技術は、トランスジェニックカエルのみならず他のトランスジェニック動物を使って、生体防御等の様々な生命現象において認められる細胞死の検出を可能にする。このような応用面の有用性を考え、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

脊椎動物では、胚発生過程の各発生段階や様々な器官や臓器において、細胞死が起きることは古くから知られていたが、細胞死が起きる分子機構に関しては未だに明確になっていない。胚発生過程における種々の細胞死がアポトーシスに因るものなのか、それともそれ以外の死に方に因るのか解明されずにいる。本研究では、胚発生の形態形成・器官形成時に認められる細胞死が、カスパーゼ依存的なアポトーシスであることを特定し、カスパーゼの活性化機構を分子レベルで明らかにする。本研究では、カスパーゼの活性化を誘導できるアダプター分子 FADD に着目して初期発生における細胞死とアポトーシスシグナル伝達分子の関係を調べる。

また、発生工学の技術を用いて作製したトランスジェニックカエルを用いて、初期発生期・形態形成や器官形成期・変態期の各時期について、カスパーゼの活性化を生きた状態でモニターし、胚発生における活性化状態とアポトーシスの過程を時空間的にイメージングすることに取り組む。アポトーシスが観

察された場所で、その後どのような形態的変化が起きたのか解明する。

3. 研究の方法

(1) 胚発生における細胞死誘導に関わる分子の作用機序の解明

脊椎動物では、胚発生過程の各発生時期に、あるいは様々な器官や臓器において、細胞死が起きることは以前から知られていたが、細胞死の種類や細胞死が起きる分子機構に関してはいまだ明確になっていない。ここでは、胚発生過程で起きる種々の細胞死へのアポトーシス実行因子の関与を明らかにする。また複数知られているアポトーシスのシグナル伝達経路のうち、胚においてどの経路が活性化しているのか特定する。

① アポトーシス実行因子の発現様式の解析：アポトーシス実行因子としてカスパーゼが同定され、またカスパーゼを活性化する上流の因子としてミトコンドリア局在分子やデスレセプター-ファミリーの分子の存在が知られている。本研究では、アフリカツメガエルの胚におけるこれら分子のうち、デスレセプターを介するアポトーシスに必須なアダプター分子 FADD について着目し、その発現様式ならびに機能を RT-PCR 法と *in situ* hybridization によって解析し、ほ乳類で解明されたアポトーシスのシグナル伝達系と比較検討する。

② FADD を発現制御した胚の観察：FADD に対するモルフォリノ-オリゴ DNA をアフリカツメガエル胚に導入して FADD タンパク質の発現を抑制する。その際起きうる胚の形態的異状を顕微鏡観察、或いは組織学的解析により同定する。さらにモルフォリノ-オリゴ DNA による抑制作用を受けない FADD の mRNA を合成し、それをモルフォリノ-オリゴ DNA と同時注入することにより、形態的異状の正常化が認められるか、同様な手法で観察する。

(2) 生きた動物胚を用いたアポトーシスの観察方法の確立

TUNEL 染色法や活性型カスパーゼによって蛍光を発する基質分子を用いて、アポトーシスが起きる場所と時期を推定する。

(3) アポトーシス検出用トランスジェニックカエルを用いた細胞死検出法の確立

モデル動物を使って、*in vivo* でアポトーシスを検出することの有効性を検討する。用いる動物としては、モニター基質分子を全身に発現するトランスジェニックカエルを用いる。

① モニター基質分子の生体における適合性の検討：モニター基質分子(SCAT3)は、細胞死に伴うカスパーゼ3の活性化をモニターするために作製した、CFPとYFPの2つの蛍光タンパク質からなる融合タンパク質である。この融合タンパク質 SCAT3 は、通常 FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)が CFP と YFP 間で観察されるが、リンカー部位にカスパーゼの認識切断配列が挿入されているために、活性型カスパーゼにより認識部位が切断されると、CFP と YFP が解離し FRET が消失する。この原理を用いて、顕微鏡下で FRET の変動を画像解析することで、外から細胞内のカスパーゼの活性化状態をモニターすることができる。SCAT3 を発現しているトランスジェニック胚において、人為的なアポトーシス誘導により、カスパーゼによる SCAT3 の切断が起きているか確認し、個体を解析する上で SCAT3 のモニター分子としての適性を調べる。

② 形態形成・器官形成や変態に伴うアポトーシスの検出：アフリカツメガエルの変態期の尾部の退行はアポトーシスによるもので、退縮部位ではカスパーゼの活性化が起きていることが報告されており、生体で自然に起きているアポトーシスを検出する上で尾部は最適な観察部位である。SCAT3 発現トランスジェニックカエルを使って、顕微鏡下で変態期の尾部について FRET の変動を調べ、検出の有効性を検証する。さらに形態形成や器官形成の時期の胚についても同様に行う。

4. 研究成果

(1) アフリカツメガエル胚における FADD の発現様式を RT-PCR 法と in situ hybridization によって調べた結果、Stage 1～Stage 32 の胚で発現が認められ、特に胚の頭部で強く発現していることが確認された。マウスにおいては、このような胚における発現様式の解析はなされておらず、新しい知見である。

(2) FADD に対するモルフォリノ-オリゴ DNA をアフリカツメガエル胚に導入して FADD タンパク質の発現を抑制すると、心臓形成が異常となることを見出した。さらにモルフォリノ-オリゴ DNA による抑制作用を受けない FADD の mRNA を同時に注入すると、心臓が正常に発生することを認めた。これらのことから、胚発生過程において FADD は、アポトーシス誘導だけでなく、器官形成への関与を示唆している。

(3) 活性型カスパーゼを検出できる蛍光基質分子を用いて、人為的にアポトーシスを誘

導したアフリカツメガエル胚を観察すると、細胞死が起きた細胞において蛍光を発することを確認した。生きた動物胚においてカスパーゼの活性化を特定することが可能であることが判明した。

(4) モニター基質分子(SCAT3)を発現するトランスジェニックカエルの胚を使って、同様に人為的にアポトーシスを誘導すると、細胞死が起きた細胞において FRET の変動が起きていることを確認した。この新しく樹立したモデル動物は、死に逝く細胞においてカスパーゼの活性化を特定可能であることが明らかとなった。

(5) SCAT3 発現トランスジェニックカエルについて、変態期の退行途中の尾を観察すると、尾の根元から先端にむかって FRET の変動が大きくなっていることを見つけた。これは、尾の表皮部分では先端ほどカスパーゼの活性化が起きていることを示唆し、退行時の細胞死とパターンと一致することが分かった。

また、トランスジェニックカエル胚の口形成部位を観察すると、将来開口する部位の細胞において FRET の変動が認められた。しかし、観察時の環境によって胚が影響を受けるため、現時点では口形成部位においてカスパーゼの活性化を正確にモニターできる状態になっておらず、今後さらに検討を必要とした。

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1件)

Kazuhiro Sakamaki, Chiyo Takagi, Atsushi Kitayama, Tomoko Kurata, Takamasa S. Yamamoto, Kumiko Chiba, Katsuya Kominami, Sang-Keek Jung, Katsuya Okawa, Masami Nozaki, Hiroshi Y. Kubota, Naoto Ueno, Multiple functions of FADD in apoptosis, NF- κ B-related signaling, and heart development in *Xenopus* embryos, *Genes to Cells*, 査読有, 17 巻, 2012, 875-896, doi: 10.1111/gtc.12004

[学会発表] (計2件)

① 酒巻和弘、高木知世、木村春奈、鄭祥基、大川克也、上野直人、細胞死誘導アダプター分子 FADD の胚発生における機能解析、第 43 回日本発生生物学会、平成 22 年 6 月 21 日、京都、

② Kazuhiro Sakamaki, Makoto Suzuki, Chiyo Takagi, Yusuke Hara, Katsuya Kominami、

Kumiko Chiba, Hiroshi Y. Kubota, Naoto Ueno,
Analysis of programmed cell death in
Xenopus embryos using a FRET-based
caspase biosensor、第45回日本発生生物学
会、平成24年5月31日、神戸、

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒巻 和弘 (SAKAMAKI KAZUHIRO)

京都大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：20271017

(2) 研究分担者

上野 直人 (UENO NAOTO)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・

教授

研究者番号：40221105