

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 6 月 14 日現在

機関番号：82609
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22791043
 研究課題名(和文) Wnt-PCP経路に關与するグアニンヌクレオチド交換因子の神経管形態形成運動制御
 研究課題名(英文) Regulation of morphogenetic movements by a guanine nucleotide-exchange factor involved in Wnt-PCP pathway
 研究代表者
 種子島 幸祐 (TANEGASHIMA KOSUKE)
 公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・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、グアニンヌクレオチド交換因子の一つ WGEF 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、いくつかの 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 have revealed that WGEF, a novel guanine nucleotide exchanging factor, mediates Wnt-PCP pathway during 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, several conditional knockout allele on the WGEF locus was introduced by homologous recombination in the ES cells. Using this ES cell lines, 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
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

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。神経管の形成は、胚の背側領域に誘導された神経領域（神経板）が、中軸に沿って細長く伸長運動（収縮伸張運動）をしながら巻き上がり、筒状に閉じることにより起こる事が知られており、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、収縮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。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。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。

申請者らの両生類胚を用いた研究によってWGEFという新規の遺伝子が、細胞運動を制御するWnt-PCP経路を仲介することによって、神経管の形態形成運動を制御することを明らかにした。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

本研究では、WGEFのコンディショナルノックアウトモデルを作出し、Wnt-PCP経路や神経管形態形成との関係を遺伝学的に解析する。本研究から得られる知見を用いて、複雑な遺伝的、環境的な要素を含む神経管閉鎖障害の分子レベルでの解明につなげたい。本研究により、WGEFのコンディショナルノックアウトモデルを確立する事で、ヒト先天疾患と

の関連およびWnt/Rho経路の生理的意義を解析するモデルを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、申請者が行ってきた両生類胚を用いた神経管形態形成運動とWGEFの機能解析の実験をさらに発展させるため、マウスを哺乳類の遺伝学モデルとして解析を進める。そこで、ES細胞を用いてWGEF遺伝子のexonをloxP配列で挟む様に改変し、Creの発現によるコンディショナルノックアウトマウスを作出する。具体的にはWGEF(flox/+)ES細胞をスクリーニングし、キメラマウスを作出してノックアウトマウスを得る。また、キメラマウスの仔を交配し、WGEFノックアウトマウス胎児を解析することにより、WGEF欠損における神経管の形態形成運動を解析する。

4. 研究成果

(1)組み替えES細胞によるキメラマウスの作出

これまでに単離したES細胞クローン2クローンについて、キメラマウスの作出を行った。しかし、1クローンについてはキメラ率の低いクローンのみしか得る事ができず、もう1クローンについてもそのキメラマウスの仔について組み替えの起こったalleleを検出する事ができなかった。そのため、新たなES細胞クローンが必要である事が明らかとなった。

(2)相同組み替え体ES細胞のスクリーニング

これまでの研究から、WGEF遺伝子座のターゲティング効率が低い可能性が示唆されたため、ターゲティングベクターを再構築し、スクリーニングを再度行った。マウスWGEF遺伝子（ARHGEF19）は染色体4qD3領域に存在し、17個のエクソンからなる。これまでは、開始コドンの存在するExon 3を標的としていたが、GEFの機能ドメインであるDHドメインを標的とするターゲティングベクターと、Exon 3を標的とするが、ホモロジーアームの位置を変えたデザインの計2種のターゲティングベクターをそれぞれBAC組み替え法で作成した。DHドメインを標的とするターゲティングベクターで300クローンのスクリーニングを行ったが、組み替えの起こったクローンを得る事ができなかった。それに対して、Exon 3を同様に標的とするが、ホモロジ

一アームの位置を変えたデザインのターゲティングベクターでは、300 クローンのスクリーニングにおいて、36クローンで3'側の組み替えがPCRで確認された(図1 Primer pair a/b)。このことから、このターゲティングベクターでは組み換え効率が高くなっている事がわかった。これらの36クローンのうち、5'側の組み替えについて、5'側の組み替えをPCRで確認したところ(図1 Primer pair c/d)少なくとも15クローンで5'側の組み替えが起こったときに予想される約8kbのバンドが確認された。これらのPCR産物をloxP配列の挿入により組み込まれるsalIサイトで制限酵素消化して、サザンブロットにより検出した。5'側の組み替えが確認されたクローンでも、salIサイトの挿入が確認されず、5'側のloxPサイトが組み込まれないクローンが存在する事がわかった。しかし、salIサイトの挿入により予想される約1kbのバンドがサザンブロットにより検出されたクローンが7クローン単離でき、これらのクローンは正しく組み替えが起こったES細胞クローン(WGFE(flox/+))であると考えられた。

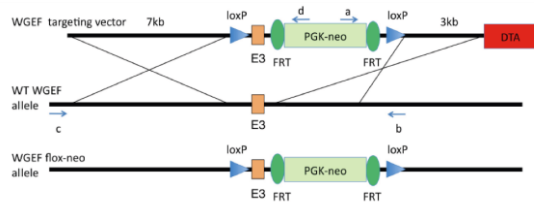


図1 ターゲティングベクターのデザイン WGEF遺伝子を含むBacterial artificial chromosome (BAC) cloneをもとに、BAC組み替え法を用いた方法で作成した。このベクター以外にGEFの機能ドメインであるDHドメインをコードするエクソンを標的とするターゲティングベクターも作成した。ここでは、組み替えクローンが多数単離できたExon3の3'側に選択マーカーとしてLoxPサイトとneoカセットをもつ組み換えカセットを導入し、5'側にLoxPサイトを組み込んだデザインを示した。これにより、Cre遺伝子の発現によるWGEFのコンディショナルな遺伝子破壊を起こさせるようデザインした。

(3)キメラマウスの作成

このWGEF(flox/+)ES細胞のうち4クローンをアグリゲーション法によるキメラマウスの作出に用いた。現在キメラマウス

スが誕生予定である。

現在のところ目標としていた WGEF コンディショナルノックアウトマウスモデルの確立までには至っていないが、WGEF 遺伝子座に相同組み替えを起こしたコンディショナルアリルを持つ ES 細胞クローンを得る事ができた。これまで、最初に使用したターゲティングベクターでは、組み換え効率が低かったが、これは WGEF 近傍遺伝子座の相同組み換え効率が低い事を示している可能性がある。実際に knockout mouse project (KOMP) において WGEF 遺伝子の欠損マウス作成が試みられているものの、相同組み替えを起こした ES 細胞クローンは得られていない (International knockout mouse consortium : http://www.knockoutmouse.org/search_results?criteria=arhgef19). 本研究により、最近になって、WGEF が創傷治癒の過程で働いている事が明らかになり、WGEF を介した Wnt/Rho 経路が実際に神経管形態形成運動以外にも重要な役割を果たしている例が示された。また、神経細胞においては、WGEF 以外に Wnt シグナルを仲介する RhoGEF が発見され、p114-rhoGEF と Lfc 呼ばれる GEF が Wnt/Rho 経路を介した神経突起退縮を制御していることが明らかとなった。これらの結果は RNAi を用いた knockdown 実験をもとにしており、WGEF コンディショナルノックアウトマウスモデルを確立する事で、さらに Wnt/Rho 経路の生理的役割についての理解が深まると考えられる。

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 5 件)

1. Tanegashima K, Suzuki K, Nakayama Y, Tsuji K, Shigenaga, A, Otaka A, Hara T. CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis (2013). FEBS Lett, *in press*. (査読あり)

2. Hara T, Tanegashima K. Pleiotropic functions of the CXC-type chemokine CXCL14 in mammals (2012). J. Biochem.151 469-476 (査読あり)

3. Hong SK, Tanegashima K, Dawid IB. Xlcr2 is required for convergent extension movements during Xenopus development (2011) Int. J. Dev. Biol. 55, 917-921 (査読あり)

4. Tsuji K, Shigenaga A, Sumikawa Y, Tanegashima K, Sato K, Aihara K, Hara T,

Otaka A.
Application of N-C- or C-N-directed sequential native chemical ligation to the preparation of CXCL14 analogs and their biological evaluation (2011).
Bioorg. Med. Chem. 19, 4014-4020 (査読あり)

5. Tanegashima K, Okamoto S, Nakayama Y, Taya C, Shitara H, Ishii R, Yonekawa H, Minokoshi Y, Hara T.
CXCL14 deficiency in mice attenuates obesity and inhibits feeding behavior in a novel environment. (2010)
PLoS One 5 e10321 (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

1. 種子島 幸祐, 鈴木 健司, 原 孝彦
ケモカイン CXCL14 とその受容体を介した脂肪蓄積制御
第 33 回 日本肥満学会 2012 年 10 月 11 日
～2012 年 10 月 12 日 ホテルグランピア京都

2. 種子島 幸祐
新奇ストレス環境における摂食抑制とケモカインシグナル
新学術領域 第三回班会議 (食欲と脂肪蓄積の制御と破綻の分子基盤の解明) 2012 年 08 月 23 日～2012 年 08 月 24 日千里サイエンスセンター

3. 鈴木 健司, 種子島 幸祐, 中山 由紀, 重永 章, 大高 章, 長澤 丘司, 森 正明, 原 孝彦
CXCR4 and Latrophillin-2 are required for CXCL14-mediated chemotaxis
第 34 回 日本分子生物学会 年会 2011. 12. 15 パシフィコ横浜

4. 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
ケモカイン CXCL14 を介した摂食調節機構の解析
第 32 回 日本肥満学会 2011. 9. 23 兵庫県淡路市

5. 種子島 幸祐
新奇ストレス環境における摂食抑制とケモカインシグナル
新学術領域 第二回班会議 (食欲と脂肪蓄積の制御と破綻の分子基盤の解明)
2011. 8. 19 千里サイエンスセンター

6. 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
ケモカインCXCL14を介した摂食調節
第二十四回モロシヌス研究会 2010 年 9 月 17 日-18 日 ホテルグリーンピア南阿蘇、熊本県南阿蘇

[図書] (計 1 件)

種子島 幸祐, 原 孝彦
臨床免疫・アレルギー科 第57巻 増刊号
サイトカインのすべて 「CXCL14」 p. 330-335

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: CXCR4 活性阻害ペプチド及びその用途
発明者: 原孝彦、種子島幸祐、大高章、重永章
権利者: 財団法人東京都医学総合研究所、国立大学法人徳島大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-251758
出願年月日: 2011. 11. 17
国内外の別: 国内/国外 (PCT 出願)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

種子島 幸祐 (TANEGASHIMA KOSUKE)
公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主任研究員
研究者番号: 20507678