

研究報告書

「動物胚の頑強な相似性を保証する発生場スケーリングのシステム制御機序」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 猪股 秀彦

1. 研究のねらい

一つの受精卵から再現性よく個体を形づくるには、多くの複雑なイベントが適切に進行する必要がある。特に、様々な組織・器官の形成(パターン形成)はモルフォゲンの濃度勾配が中心的な役割を果たしている。胚の局所から産生・分泌されたモルフォゲンは濃度に応じて異なる組織を誘導し胚に位置情報を与える。したがって、発生過程において濃度勾配は適切な形状に制御される必要がある。

濃度勾配の形状は主に産生・拡散・分解の3要素によって制御されている。拡散速度が大きいとモルフォゲンは迅速に拡散し緩勾配を形成する。逆に分解速度が大きくなると、遠方に拡散する前に分解され急勾配を形成する。したがって、3要素を変動させることにより様々な形状の勾配を作り出すことができる。一方、3要素以外に勾配形状に大きな影響を与える要素が「胚サイズ」である。産生・拡散・分解の速度が一定であっても、胚サイズが小さければモルフォゲンは胚内に素早く広がり充満してしまう。一方、胚サイズが大きければモルフォゲンはなかなか広がらず、胚の局所に濃度勾配が形成されてしまう。したがって、再現性の高い発生過程を維持するには進化的に胚の大きさは厳密に制御されているはずである。

しかし、多くの生物は厳密に胚サイズを制御するのではなく、他の戦略を採用している可能性が高い。たとえば、アフリカツメガエルの卵サイズは直径が 1mm～1.5mm の範囲で揺らいでいる。さらに、Cooke は 1975 年に非常に奇妙な現象を見いだしている。発生初期に外科的に背側と腹側で胚を半割にすると、背側半割胚から半分のサイズの相似形を維持したオタマジャクシが誕生した。このように胚全体のサイズに応じて局所組織(目、口など)が拡大・縮小する現象を「スケーリング」という。つまり、スケーリングは胚サイズの擾乱に対する頑強性を発生システムに付与していると考えられる。

スケーリングはアフリカツメガエルだけでなく、ホヤ、ショウジョウバエなど他の多くの生物にも普遍的に観察される現象である。しかし、発生システムのスケーリング維持機構は長い間謎であった。本課題では胚サイズがどのようにして分子レベルの情報に変換され、さらにどのような機構がスケーリングを保証しているのか解析を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

アフリカツメガエルの背腹軸形成はオーガナイザーから分泌される Chd(Chordin: コーディン)の濃度勾配にしたがって背側-側方-腹側の3つの異なる領域が形成される。本課題では、胚サイズと Chd の濃度勾配に注目して研究を行った。発生システムがスケーリングを保証するためには、胚のサイズに応じて Chd 勾配の形状が適切に制御される必要がある。3つ

の領域を規定する Chd の閾値が一定であると仮定すると、Chd 勾配は大きな胚では緩勾配を、小さな胚では急勾配を形成する必要がある。

濃度勾配の形状は主に産生・拡散・分解の3要素によって制御されている。拡散速度が大きくなると緩勾配を形成し、分解速度が大きくなると急勾配を形成する。したがって、これら3つの要素を変化させることにより様々な形状の勾配を作り出すことができる。発生過程においては胚サイズ依存的にこれら3つの要素が制御され、適切な傾きの Chd 勾配が構築されていると考えられる。しかし、これら3つの要素は発生過程において常に変動しており、解析することは非常に困難である。そこで、Chd の産生量を変動せずに一定な「背腹軸再構築系」の開発を行った。この系を用いることにより、Chd の産生量を人工的に制御することが可能となる。その結果、産生量を変動させても適切な背腹軸が構築されることから、分解または拡散が Chd 勾配の形状を主に規定していることが示唆された。さらに Chd の拡散・分解速度を定量したところ、Chd の拡散速度は早く積極的な制御を受けていないこと、また分解速度が早く30分以内に半量の Chd 蛋白質が分解されることが示された。このことから、Chd の勾配形状は主に Chd 分解酵素による分解の影響が大きいことが明らかとなった。

Chd 分解酵素には Szl(Sizzled:シズルド)と呼ばれる阻害因子が存在し、分解速度を制御していることが知られている。より詳細な解析から、胚サイズが大きい場合には Szl の濃度が高くなり、逆に胚サイズが小さい場合には Szl 濃度が低下することが示された。以上の結果をふまえて、胚サイズ依存的に Szl 濃度が変化し、さらに Chd の安定性を制御することにより、胚サイズに適した Chd 勾配が構築される「スケーリングモデル」を提唱した。さらに、スケーリングモデルが数理的・実験的に胚内で機能していることを検証し、Cell 誌に報告した。

(2) 詳細

【背腹軸再構築系の開発】

Chd 勾配を胚サイズにスケーリングするには、勾配形状を規定する産生・拡散・分解が重要な要素となる。しかし、これら3要素は発生過程において動的に変動しており解析が困難である。そこで、Chd の産生量が BMP 活性、胚サイズに影響されることなく一定量である発生場を人工的に再構成した。具体的には、2細胞期に胚内の内在性濃度勾配を取り除くために β カテニンの MO(モルフォリノアンチセンスオリゴ:mRNA に直接結合して翻訳を阻害する)をインジェクションし、Chd 産生領域であるオーガナイザーを消失させた(図 1a)。さらに、Chd-MO も同時にインジェクションすることにより Chd の産生も阻害した。その後、8細胞期の1割球に MO 耐性型(MO が結合する領域にサイレント変異を導入したもの)の Chd mRNA をインジェクションし、胚の局所で Chd を発現させることにより胚内に人工的に Chd 勾配を再構成した。In situ 法を用いて再構成した胚を解析したところ、野生胚と同様に Chd の濃度勾配にしたがって背側-側方-腹側の3領域が適切に再構成されることを確認した(図 1b)。さらに、インジェクションする Chd mRNA 量を適切な量から4倍増強させても、背側-側方-腹側の3領域が形成された。このことから、Chd の勾配形状は主に拡散または分解によって制御されている可能性が示された。

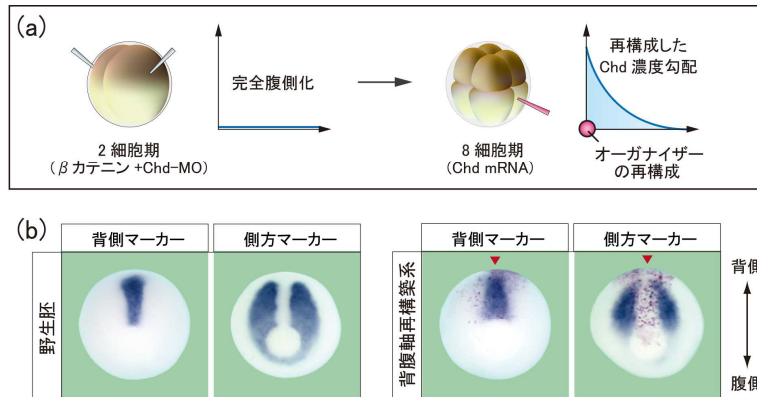


図1 背腹軸の再構築系

(a) 背腹軸再構築系の実験手法。(b) 再構成された勾配に応じて野生胚と同様の背腹パターンを形成する。赤色にラベルされた領域は人工的にオーガナイザーを再構成した部位を示す。

【In vivo における拡散速度、分解速度の定量】

分泌蛋白質の拡散速度および分解速度の定量を in vivo で解析した。拡散速度に関しては FRAP 法(光褪色後蛍光回復法)により解析を行った。Tgf β のシグナルペプチドを付加させた EGFP(分泌型 EGFP)を作成し、その下流に背腹軸形成に関与する様々な分泌蛋白質を付加させ拡散速度を定量した。その結果、Chd、Szl は分泌型 EGFP と同様に速い拡散速度を示し、細胞外マトリックスと結合せずに迅速に胚内に拡散することが明らかとなった。

一方、in vivo における分解速度の定量には新しい手法の開発を行った。HEK293 細胞に強制的に発現させた分泌蛋白質を培養上清から His タグを用いて精製し、等量の精製蛋白質を細胞外領域に相当する胞胚期の胞胚腔にインジェクションした。その後、一定時間培養し胚を溶解した後に C 末端または N 末端抗体を用いて免疫沈降し、反対側の抗体で WB により蛋白質を検出した。これにより、分解されていない全長の蛋白質のみを検出することができる。その結果、Szl 蛋白質は胚内で安定であるが、Chd 蛋白質は 30 分以内に半量が分解されることが明らかとなった。また、Szl により Chd の分解は完全に抑制できることから、Chd の勾配形状は Chd 分解酵素とその阻害因子である Szl により主に制御されていることが示された。

【定量データからスケーリングモデルの構築】

上述した定量結果を用いて新たなスケーリングモデルの構築を行った。Szl の発現は腹側化因子である BMP によって誘導されることが知られている。また、Chd は BMP に直接結合してその活性を抑制する。したがって、Szl は Chd 分解酵素を抑制し Chd がより遠方まで拡散するが、拡散した Chd は Szl 発現領域を抑制する。また、定量結果から Szl は Chd に比べて安定であり、発生過程において胚内に蓄積すると考えられる。

半割を行う発生初期は腹側のみであり、胚全体に Szl が発現している。原腸胚初期になるとオーガナイザーが形成され、背腹パターンの形成が始まる。しかし、野生胚も半割胚もいずれも同じ大きさのオーガナイザーを有するため、半割胚は相対的に背側領域(オーガナイザー)が大きな胚となる。オーガナイザーから分泌された Chd は、野生胚では胚空間が大きいいため Szl を抑制するまでに多くの時間を要する(図 2)。一方、半割胚においては胚サイズが小さいため Chd は迅速に反対側まで拡散し、Szl の発現を短時間で効果的に抑制する。したがって、半割胚は野生胚と比較して Szl 蛋白質の蓄積量が少なく Chd は不安定化する。不安定化した Chd は野生胚に比べてより急勾配を形成し、胚サイズに適した勾配を構築することによってス

ケーリングが保証される。

さらに、上記のスケーリングモデルと定量結果をもとに、反応拡散方程式を用いて数理モデルを構築し、シミュレーション解析を行った(柴田達夫博士との共同研究)。その結果、数理モデルにおいても Szl がスケーリングの要として機能することが示された。また、数理モデルから腹側領域をより大きく切除するとスケーリングが崩壊することが予測されたが、実際に腹側領域を 3/4 切除するとスケーリングは崩壊し背側のみの胚となった。

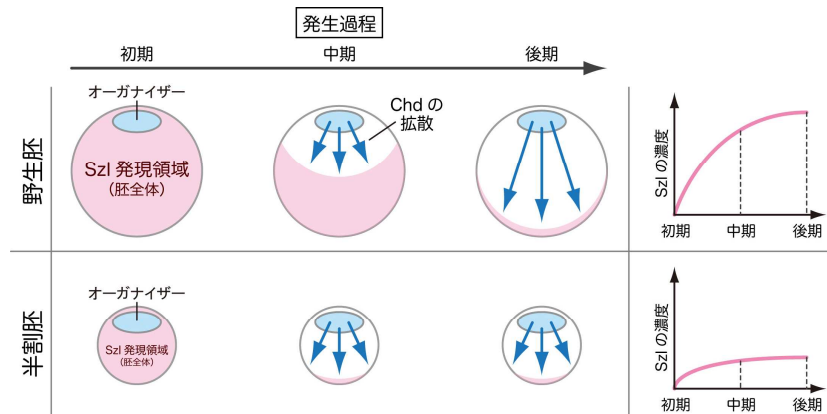


図2 胚サイズに応じて Szl の濃度が変化する
野生胚に比べ半割胚は Chd が迅速に胚全体に拡散し、SzI を抑制するため SzI の蓄積量が減少する。

【スケーリングモデルの検証】

上記で得られたスケーリングモデルが実際に胚内において機能しているか検証を行った。スケーリングモデルでは胚サイズに応じて Chd の安定性が変化し適切な勾配形状をつくと考えている(図 3a)。しかし、Chd の発現量は発生過程において変化するため、Chd の安定性を評価することは困難である。そこで、BMP、胚サイズに影響されることなく Chd の産生量が一定な背腹軸再構築系を用いて解析を行った。背腹軸再構築系を用いて再構成した胚の一部を半割にし、全長胚と半割胚で Chd 蛋白量を比較したところ、Chd の産生量は一定にもかかわらず半割胚において全長の Chd 蛋白量が有意に減少していた(図 3b)。さらに、SzI-MO により SzI の機能を阻害すると全長胚と半割胚の Chd 蛋白量の差は観察されなくなった。このことから、胚サイズは SzI を介して Chd の安定性に変換されることが示され、スケーリングモデルが実際に胚内において機能していることが明らかとなった。

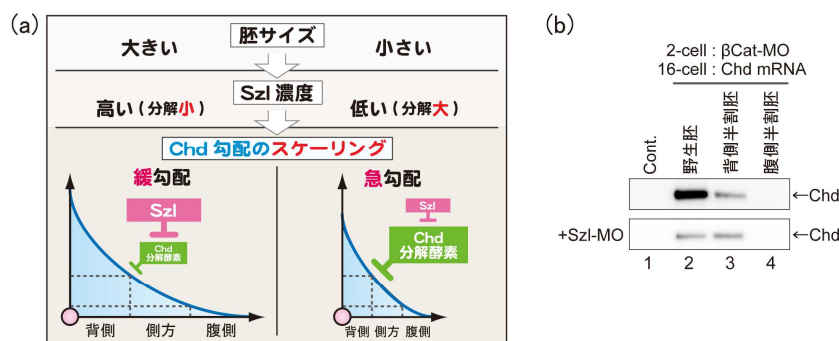


図3 スケーリングモデルと検証実験

- (a) スケーリングモデル、胚のサイズに応じて Szl の蓄積量が変化し Chd の安定性を制御することにより、胚サイズに適した勾配を形成する。
- (b) 背腹軸再構築系を用いた検証実験、野生胚に比べ背側半割胚では Chd の蛋白量が減少する。また、この現象は SzI-MO により抑制される。

3. 今後の展開

本課題により、胚サイズ依存的に濃度勾配がスケーリングされる機構が明らかとなった。しかし、実際の発生過程は発生場が動的に変動・変形しており静的な場ではない。今までの発生学は静的な発生場として濃度勾配のパターン形成を記述してきたが、「胚サイズ」が濃度勾配の形状に重要であるように、「発生場の変動・変形」も勾配形状に大きな影響を与えるはずである。このような動的な発生場において濃度勾配がどのように維持され、適切なパターンを構築しているのか明らかにする必要がある。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本課題の目的であるスケーリングの分子機構を明らかにした論文を発表した。一方、濃度勾配を胚内で直接可視化し、発生過程における勾配形状の動的な変化を検出することはできなかった。その主たる原因として、アフリカツメガエルの透明度の低さがある。最終年度では新たに胚が透明なゼブラフィッシュの系の立ち上げを行い、濃度勾配の可視化を試みている。また、本研究課題の仕事により、新たに理研 CDB のチームリーダーとして新規のラボを立ち上げることができた。

本研究結果は、複数の新聞・ネットなどで取り上げられ、一般の方々にも「スケーリング」という発生システムがもつ巧妙さを配信することができた。「スケーリング」は多くの生物が共通にもつ普遍的な機構であり、その分子メカニズムが明らかとなれば多くの現象に応用可能であると考えられる。近年、ES 細胞を用いた再生医療が注目を集めているが、移植される組織は患者さんのサイズに適した大きさである必要がある。成長を伴う組織のスケーリング(相対成長)を含め、体のサイズと組織の比率は医療分野においても重要な課題である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

背腹軸形成に寄与する分泌タンパク質の計測系をin vivoで構築しました。定量胚サイズ依存的にSzl濃度が変化し、さらにChdの安定性を制御することにより、胚サイズに適したChd勾配が構築される「スケーリングモデル」を提唱し、そのスケーリングモデルが数理的・実験的に胚内で機能していることを検証した(Cell誌発表)ことは、見事な研究の流れと評価します。

今後の展開でも書かれているように、さらに発展的に「発生場の変動・変形」も勾配形状に大きな影響を与えるはずであり、濃度勾配がどのように維持され、適切なパターンを構築しているのかを明らかにすることに、興味が向かいます。成長を伴う組織のスケーリングを含め、体のサイズと組織の比率は、臓器等の再生医療の進展に伴い、理解を深めておく必要があります。その意味でも、このさきがけの成果は、高く評価されます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Inomata H, Shibata T, Haraguchi T, Sasai Y. Scaling of Dorsal-Ventral Patterning by Embryo Size-Dependent Degradation of Spemann's Organizer Signals. *Cell* (2013). 153. 1296-1311.

(2)特許出願
特になし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 猪股秀彦、柴田達夫. サイズの発生学 -濃度勾配のスケーリング-(解説). 生物物理 (2014). 54. 140-146.
2. 猪股秀彦. 動物胚の相似性維持. 生体の科学 (2014). 65. 424-425.
3. 読売新聞. (2013.6.8) 夕刊
4. Inomata H, Shibata T, Sasai Y. Scaling of Dorsal-Ventral Patterning by Embryo Size-Dependent Degradation of Chordin. JSMB/SMB (Japanese Society for Mathematical Biology and the Society for Mathematical Biology). (2014).
5. Inomata H, Shibata T, Sasai Y. Scaling of Dorsal-Ventral Patterning by Embryo Size. 第 37 回日本分子生物学会. (2014).
6. Inomata H, Shibata T, Haraguchi T, Sasai Y. Long-Range Regulation of Chordin Degradation via Sizzled Accumulation Directs Robust Self-Shaping of Embryonic Dorsal-Ventral Pattern. 14th International Xenopus Conference. (2012)