

オーガンリソースとしての中胚葉細胞と器官形成クロックの研究

融合研究機関：厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所

国立遺伝学研究所

研究総括責任者：武田 洋幸（東京大学大学院理学系研究科教授）

I 研究の全体計画

1. 研究の趣旨

中胚葉性器官のリソースとして、幹細胞システムが機能している初期胚の尾芽組織およびその尾芽より供給された細胞群が繰り返し構造を獲得する体節形成に注目した。尾芽組織・体節形成領域で発現する遺伝子、突然変異体の網羅的単離をメダカを用いて行うとともに、メダカで得られた重要遺伝子の機能をマウスを用いた遺伝子破壊により解析する。小型魚類研究で実績のある国立遺伝学研究所とノックアウトマウスを用いた研究で実績のある国立医薬品食品衛生研究所が有機的に融合して研究を進めることにより、幹細胞システムの維持や器官形成クロックの分子実体を明らかにする。また、魚類の強力な再生能力に注目した研究も実施する。本研究により中胚葉性幹細胞の増殖・分化・再生の基盤技術を確立する。

2. 開放的融合研究の概要

1. 研究の概要

(1) 中胚葉性幹細胞の成立と自己組織化のメカニズム

中胚葉の発生過程、尾芽幹細胞の成立と分化方向の決定過程、ヒレ再生過程等で発現する遺伝子群の網羅的単離と解析を行う。

① 中胚葉の発生と尾芽幹細胞の分化機構に関する研究

中胚葉の発生と尾芽幹細胞の分化で必須な遺伝子を単離しこれら遺伝子産物の機能解析を行う。ゼブラフィッシュ体節形成変異体の原因遺伝子として同定された *tbx24* の制御領域と下流の遺伝子群の解析を行う。スクリーニングで得られた新規変異体の表現型の解析を行うと同時に、現在解析中の変異体の原因遺伝子を同定する（少なくとも2系統）。

② 中胚葉組織再生の分子メカニズム

小型魚類のヒレ再生過程を遺伝子レベルで詳細に検討して中胚葉幹細胞の分化・増殖・自己組織化のメカニズムを解明する。ヒレ再生特異的遺伝子について、DNAマイクロアレイにより得られたヒレ再生3日目、10日目に特異性を持つ遺伝子を同定、解析する。その中で再生に特に重要な機能を持つ遺伝子を選別し、マウスの相同遺伝子を単

離し、ノックアウトマウスの作成を開始する。

(2) 器官形成クロックの分子メカニズム

マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュの尾芽および体節をモデルとして、器官形成クロックの実体解明と組織コンパートメントの形成機構の解明を目指す。

① 器官形成クロックの分子実体

マウスを用いて平成14年度までの研究で、器官形成クロックの構成要素であるNotchシグナルと *mesp* 遺伝子の相互作用が明らかになったので、*mesp* 遺伝子からクロックの分子実体実態に迫る。

a *mesp* 遺伝子の発現制御機構の解明

b *mesp* 遺伝子の下流遺伝子の単離

c これまでに単離された尾芽領域で発現する遺伝子のノックアウトマウスの作成（現在8系統作成中）ニワトリ、ゼブラフィッシュを用いて

d ゼブラフィッシュ皮膚紋様：皮膚の微細構造とパターンを作り出す組織の同定、紋様形成異常のゼブラフィッシュ変異体、*leopard* と *obelix* の原因遺伝子の同定を目指す。

e 体節形成波をリアルタイムで可視化する技術に挑戦する。

(2) コンパートメント成立機構の解明と誘導系の確立

ニワトリに利点を最大限に利用して、分節境界（コンパートメント）形成過程におけるセグメンター作用、上皮化のシグナルとその機構を解析する。

a 体節形成を制御するシグナル分子：これまでに得られた体節中胚葉特異的シグナル分子cDNAについて体節中胚葉内に強制発現させて機能解析を行う。

b セグメンターの成立機構と背腹軸極性：分節境界で作用する、背腹軸に沿った細胞間相互作用とセグメンターとの関連を明らかにする研究をさらに発展させる。

c 分節時に見られる細胞極性（上皮化）の制御機構と細胞挙動の可視化：分節境界における細胞極性の制御について、*Rac1* と *Cdc42* のシグナルと、分節に重要な役割をもつことが知られている *Paraxis* などの転写因子との関連を明らかにする。またダイナミックな挙動を見せるニワトリ体節中胚葉の細胞極性の変化を、タイムラプスを用いて直接可視化する。

(3) 突然変異体のスクリーニングとクロック関連遺伝子の機能解析

① 平成14年度に引き続き、変異体のスクリーニングを大規模に行い、体節・尾芽変異体、心臓血管系、ヒレ形成などの変異体の単離を行う。本年度末までに、本研究に有

用な突然変異体を少なくとも20系統を得る。

② ゼブラフィッシュ胚の胚操作とlive imaging技術を駆使して、器官形成クロックの波の伝播機構の解析を進める。

2. 融合への取り組みの概要

・下記の項目ごとに15年度に行う予定の施策について記述する。

(1) 研究総括責任者の指導性

主に統括責任者（武田・現東京大学）および国立遺伝学研究所（遺伝研）のマウス研究チームのリーダー（相賀）が融合研究機関である国立医薬品食品衛生研究所（国立衛研）を頻繁に訪問し、それぞれの研究機関における研究の進捗状況を報告し、意見交換を行う。

(2) サブテーマ間の連携

外来研究員を含めたサブテーマ担当研究者は、遺伝研

や国立衛研への訪問だけでなく学会等のあらゆる機会を捉えて討論を重ねて研究を進めている。平成15年度中に全体会議を開催し、サブテーマ間の連携状況や個別テーマの進捗状況を課題担当者および研究員全員が把握できるようにする。

(3) 融合への取り組み

遺伝研で行っているメダカの突然変異体の単離に関しては、国立衛研の研究員および外部研究者（非常勤職員）が遺伝研に滞在し、共同で変異体のスクリーニングをおこなっている。また、研究成果、研究経費の執行状況を両研究機関の代表が常に把握するように努めている。

(4) 融合研究推進委員会における支援の取り組み

主に統括責任者（武田・現東京大学）および国立遺伝学研究所（遺伝研）の代表者（相賀）が融合研究推進委員会の各委員と必要に応じて協議して融合研究を円滑に進める。

3. 年次計画

研究項目	12年度	13年度	14年度	15年度	16年度
1. 中胚葉性幹細胞の成立と自己組織化のメカニズム (1) 中胚葉の発生と尾芽幹細胞の分化機構 (2) 中胚葉組織再生の分子メカニズム	立ち上げ	メダカ突然変異体のスクリーニング スクリーニング		大規模スクリーニング	
	尾芽幹細胞特異的及びヒレ再生遺伝子の網羅的スクリーニング	マウス相同遺伝子の単離		ノックアウトマウスの作成と解析	
2. 器官形成クロックの分子メカニズム (1) 器官形成クロックの分子実体 (2) コンパートメント成立機構の解明及び誘導系の確立 (3) 突然変異体のスクリーニングとクロック関連遺伝子の機能解析	器官形成クロックの上流及び下流遺伝子の探索			ノックアウトマウスの作成と解析	
	ニワトリを用いたセグメンター細胞の解析	組織コンパートメント誘導系の確立			
	立ち上げ	メダカ突然変異体のスクリーニング スクリーニング		大規模スクリーニング	
所要経費（合計）	307百万円	310百万円	310百万円	324百万円	

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
(3) 突然変異体のスクリーニングとクロック関連遺伝子の機能解析	国立遺伝学研究所（現東京大学）	武 田 洋 幸 川 上 厚 志 高 橋 淑 子
	(独)理化学研究所発生再生科学総合研究センター 国立遺伝学研究所（現東京大学）	武 田 洋 幸 成 瀬 清
3. 研究マネジメント支援業務	国立遺伝学研究所	相 賀 裕美子 小久保 博 樹 三 井 薫
	厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所	高 橋 雄
	融合研究推進事務局（国立遺伝学研究所内）	長 野 葉 子 古長谷 百合子 古 瀬 寿美子

Ⅲ 融合研究評価委員会・融合研究推進委員会

(1) 融合研究評価委員会

委 員	所 属
○赤 池 敏 宏	東京工業大学 大学院生命理工学研究科 教授
山 村 研 一	熊本大学 医学部 教授
平 野 俊 夫	大阪大学 大学院医学研究科 教授
八 杉 貞 雄	東京都立大学 大学院理学研究科 教授
Patrick Tam	オーストラリア シドニー大学 医学部 教授
Jacqueline Deschamps	オランダ 発生生物学研究所 室長
Stephen Wilson	イギリス ロンドン大学 教授

(注：○は研究評価委員長)

(2) 融合研究推進委員会

委 員	所 属
○堀 田 凱 樹	国立遺伝学研究所 所長
長 尾 拓	厚生労働省 国立医薬品食品衛生研究所 所長
井 上 達	厚生労働省 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター長
武 田 洋 幸	国立遺伝学研究所 教授（現東京大学 教授）
相 賀 裕美子	国立遺伝学研究所 教授

(注：○は研究推進委員長)