

# 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

融合研究機関名：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）

## 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

#### a. 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。

##### (a) 中胚葉の発生と尾芽幹細胞の分化機構に関する研究

1. 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継続する。

2. *Tbx24* は哺乳類には存在しないことがわかっている。*Tbx24* の進化、哺乳類での機能的相同遺伝子を探るため、*tbx24* の制御領域下に他の T-box 遺伝子（マウスの *Tbx6* など）もトランスジェニック魚を作成し、体節形成への影響を調べる。

3. 平成 15 年度秋までに終了したスクリーニングで得られた新規変異体について、相補性検定と表現型の解析を行い変異体系統として確立する。平成 15 年度中には 2 つの尾芽発生異常変異体の原因遺伝子を同定したが、現在解析中の変異体の原因遺伝子をさらに同定する（少

なくとも 2 系統）。

##### (b) 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、解析を継続する。その中で再生に特に重要な機能を持つ遺伝子を選別し、マウス相同遺伝子を単離し、その機能を解析する。

##### (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。

##### (a) 器官形成クロックの分子実体

マウスを用いて H14 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に迫る。

1. *mesp* 遺伝子の発現制御機構の解明：マウスでは上流因子 *Tbx6* が同定されているが、この発現と *Mesp2* の発現には隔たりがあり、その間を埋める機構を解析する。

2. *mesp* 遺伝子の下流遺伝子の単離：下流遺伝子群のエンハンサー解析を行い、*Mesp2* の標的を決定する。

3. これまでに単離された尾芽領域で発現する遺伝子及び、Notch 関連遺伝子のノックアウトマウスを現在までに 10 系統作成した。これらの解析を行うとともに、新たな系統の作成も進める。

ニワトリ、ゼブラフィッシュを用いて

4. ゼブラフィッシュ皮膚紋様：ゼブラフィッシュの皮膚紋様（黒と黄色のストライプ）は黒色素胞と黄色色素胞の相互作用によって生じることが判明し、昨年度までに、ゼブラフィッシュの縞模様形成のコアとなる細胞間相互作用を特定し、それがチューリング波形成の条件を満たしていることを確認した。現在、個々の相互作用を担う分子の特定を進めている。既に模様変異を起こす遺伝子のひとつはクローニングした。今年度は、縞模様形成に関与する遺伝子群が発生の初期に発現しているかどうかを調べ、発生における等間隔パターン形成の過程にチューリング波が働いているかどうかを検証する。

5. *Mesp2* のリアルタイム可視化に成功したので、今後さらに他の遺伝子の可視化を行い、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。

#### (b) コンパートメント成立機構の解明と誘導系の確立

ニワトリの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。

1. 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。

2. 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：上皮化には Rho ファミリー GTPase である Cdc42 と Rac1 が関与する。今年度は、これら両者がどのように関わって、分節境界と細胞極性の変化が調和されるのかについて研究する。分節境界における細胞極性の制御については、Rac1 と Cdc42 のシグナルに加えて、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. これまでの研究に加えてセグメンターの分子実体として反発分子である Eph/ephrin に注目する。Eph シグナルによって細胞内で Rho ファミリー GTPase のスイッチが制御されることが期待される。我々が独自に生み出したセグメンターアッセイ法を用いて、分節境界形成を引き起こす細胞レベルでの分子機構の全容を明らかにする。

4. マウスの系で特異的抗体を用いて、活性化している Notch シグナルを可視化することに成功した。この発現と Mesp2 との発現、Fringe の発現の関係を明らかにし、分節境界を形成するメカニズムを明らかにする。

#### (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 15 年度秋までに変異体のスクリーニングをほぼ終了した。体節・尾芽変異体、心臓血管系、ヒレ形成、骨、左右体軸形成などの変異体を 50 系統以上単離することに成功した。本年度末までに、表現型の記載と相補性検定により有用変異体として少なくとも 20 系統を系統化する。

2. 平成 15 年度ではゼブラフィッシュ胚の胚操作と live imaging 技術を駆使して、細胞間の同調に Notch-Delta のシグナルが利用されていることが判明した。平成 16 年度では、Notch-Delta による相互作用とクロックの伝播を simulate するモデルを完成させて、成果を発表する。

#### b. 融合への取り組みの概要

下記の項目ごとに 16 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。本年度は最終年度にあたるため、年度末に報告会議を開催し、すべての研究の成果について班員、評価委員と総括する予定である。また、12 月には武田および相賀がそれぞれワークショップを主催し、研究成果を班員と共有し研究連携を推進するだけでなく、他の研究者に対しても公開する方針である。

##### (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
a. 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	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	
(2) 中胚葉組織再生の分子メカニズム	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	
b. 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	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	
(2) コンパートメント成立機構の解明及び誘導系の確立	ニワトリを用いた遺伝子の網羅的スクリーニング		組織コンパートメント誘導系の確立		
(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	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	300百万円

II. 平成16年度における研究実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
a. 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	国立遺伝学研究所（現東京大学）  （独）水産総合研究センター養殖研究所 （独）放射線総合医学研究所 国立遺伝学研究所  厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所	◎ 武田 洋幸 成瀬 清 荒木 和男 石川 裕二 相賀 裕美子 小久保 博樹 三井 薫 ○ 菅野 純 高橋 雄 高木 篤也 北嶋 聡 古関 明彦 磯野 協一 工藤 明 今井 義幸 猪早 敬二
(2) 中胚葉組織再生の分子メカニズム	国立遺伝学研究所（現東京大学）  （独）水産総合研究センター養殖研究所 放射線総合医学研究所 国立遺伝学研究所  厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所  （独）理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター 東京工業大学大学院生命理学研究科	◎ 武田 洋幸 成瀬 清 荒木 和男 石川 裕二 相賀 裕美子 小久保 博樹 高橋 雄 北嶋 聡 古関 明彦 磯野 協一

研究項目	担当機関	研究担当者
b. 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	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  国立遺伝学研究所（現東京大学）  （独）理化学研究所発生再生科学総合研究センター	○ 菅野 純 高橋 雄 北嶋 聡 相賀 裕美子 小久保 博樹 三井 薫 ◎ 武田 洋幸 成瀬 清 高橋 淑子 近藤 滋
(2) コンパートメント成立機構の解明と誘導系の確立	国立遺伝学研究所  厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所  （独）理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター 国立遺伝学研究所（現東京大学）  （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）	相賀 裕美子 小久保 博樹 三井 薫 ○ 菅野 純 高橋 雄 古関 明彦 磯野 協一 武田 洋幸 川上 厚志 高橋 淑子
(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  厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所	◎ 武田 洋幸 成瀬 清 相賀 裕美子 小久保 博樹 三井 薫 高橋 雄 北條 美伸
c. 研究マネジメント支援業務	融合研究推進事務局 （国立遺伝学研究所内）	古長谷 百合子 古瀬 寿美子

（注：◎は代表者、○はサブテーマ責任者）

### 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 山村 研一 平野 俊夫 八杉 貞雄 Patrick Tam Jacqueline Deschamps Stephen Wilson	東京工業大学 大学院生命理工学研究科 教授 熊本大学 医学部 教授 大阪大学 大学院医学研究科 教授 東京都立大学 大学院理学研究科 教授 シドニー大学 医学部 教授 オランダ発生生物学研究所 室長  ロンドン大学 教授

（注：○は融合研究評価委員長）

#### 2. 融合研究推進委員会

委員	所属
○ 小原 雄治 長尾 拓 井上 達 武田 洋幸 相賀 裕美子	国立遺伝学研究所 所長事務取扱（所長代行） 厚生労働省 国立医薬品食品衛生研究所 所長 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 国立遺伝学研究所 教授（現東京大学・教授） 国立遺伝学研究所 教授

（注：○は融合研究推進委員長）