

## 平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな		さが ゆみこ					
研究代表者氏名		相賀 裕美子		所属研究機関・部局・職		国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授	
研究課題名	和文	初期中胚葉の組織化と分節化の分子基盤					
	英文	Molecular bases of heart morphogenesis and somite segmentation					
研究経費		平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位：千円		18,300	17,200	17,200	17,200	17,200	87,100
研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
相賀 裕美子	国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授	発生遺伝学		研究全般			
小久保 博樹	国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助手	発生遺伝学		Notch関連遺伝子と心臓形成（テーマ1）			
高橋 雄	国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官	発生遺伝学		体節形成の分子機構（テーマ2）			
北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官	発生遺伝学		心臓中胚葉の分化機構（テーマ1）			
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>本研究では2つの大きなテーマに取り組む。第1のテーマは、原腸陥入直後、最も初期に形成される中胚葉の発生運命決定機構の解明を目指した研究。第2のテーマは、比較的後期に陥入する沿軸中胚葉が体節を形成する分節メカニズム解明を目指した研究である。</p> <p>まず第1のテーマに関して、我々はすでに転写因子 Mesp1 を発現する初期中胚葉が血管と心臓の前駆細胞を含むことを明らかにしているが、さらに詳細な細胞系譜実験により、これらのサブポピュレーションが分化するメカニズムを明らかにする。</p> <p>第2のテーマでは体節の分節化において Notch シグナル系と転写因子 Mesp2 の関係を明らかにし、体節の分節化における分子機構を解明する。</p>							

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

この研究では2つのテーマに取り組んでいるので、テーマ毎に記述する。

#### テーマ1：初期中胚葉から由来する心臓、血管系の発生、分化の解析

初期中胚葉のうち血管心臓の前駆細胞に発現する転写因子 Mesp1 を利用し、Mesp1-cre による細胞系譜を追跡したところ、心臓前駆細胞の中に Mesp1 で標識されない細胞群があることを見いだした。これらの細胞は心臓の刺激伝導系を形成する細胞の一部に分化することが明らかになり、これらの細胞が心臓の他の細胞とは由来が異なっていることが初めて示された。

また血管心臓形成過程で重要な機能を担っていると思われる Notch 系に焦点を絞った研究も進めている。まず、我々は Notch シグナル標的因子 Hesr1, Hesr2 の遺伝子ノックアウトマウスを作成し、その解析を行った。Hesr1 単独のノックアウトマウスは異常を示さないが、Hesr2 ノックアウトマウスは生後 10 日以内に心臓の肥大を伴って死亡する。このマウスの心臓を生きたまま、エコーを用いて解析したところ、心房と心室の間に存在する弁の不全により、血液が逆流することが明らかになった。このマウスは心奇形のモデルマウスとして有用と思われる。さらに、これら 2 つの遺伝子のダブルノックアウトマウスにおいては、弁の形成が全くおこらず、また心筋の形成に異常を示し、胎生 11 日までに死亡することがわかった。さらに Mesp1-cre を用いて、活性型 Notch1 を強制発現したマウスの解析を行った。このマウスも心臓の異常により胎生 11.5 日で死亡する。心臓の心筋（特に心室）に異常があり心室が凹凸をもった形態を呈している。細胞分化に異常があると考えられるがどのような遺伝子プログラムが進行した結果であるかを解析した。まず、このマウスにおける Notch シグナルを解析するため、活性型 notch1 を特異的に染色する抗体で組織学的に解析したところ、正常マウスでは心内膜にのみ認められるシグナルが心筋層にもはっきりと観察された。また遺伝子発現を解析したところ、Notch の下流遺伝子である hesr1 の発現が上昇していた。一方、hesr2 に関しては発現上昇が認められず、これらの遺伝子の発現制御が異なっていることが示唆された。現在、これらの遺伝子のエンハンサーの解析も進めている。

#### テーマ2：体節中胚葉が分節性を獲得する分子機構の解明

我々はすでに体節の分節性、すなわち体節の前後極性の形成に関与する遺伝子のノックアウトマウスを作成あるいは入手しそれらの遺伝学的解析を進めている。その結果 Dll1 と Dll3 をリガンドとする Notch シグナル系と転写因子である Mesp2 が複雑に相互作用することにより、体節内の前後極性が形成されることが明らかになってきた。この過程をさらに蛋白質の発現レベルで詳細に解析する目的で、YFP 融合蛋白を発現する遺伝子ノックインマウスの作成を試みている。現在までに、Notch1, Dll1, Mesp2, Lunatic fringe に YFP タグをつけたノックインベクターの作成を終了している。しかし Dll1 の融合蛋白質は培養細胞では発現が見られたが、ノックインマウスを作成したところ、発現は観察されず、また蛋白質も機能を喪失しており、Dll1 ノックアウトマウスと全く同じ表現型を示した。しかし Mesp2-YFP 融合蛋白を発現する遺伝子ノックインマウスにおいて非常に発現レベルは低いが、Mesp2-venus の発現が共焦点顕微鏡で観察された。今後時間を追って蛋白局在の詳細を解析する予定である。さらに、Mesp2 転写因子の抗体を作成した。今まで何回かトライして、よい抗体が得られていなかったが、ようやく、組織切片上で Mesp2 蛋白質の同定が可能な抗体が得られた。まず RNA の局在と蛋白質の局在を連続切片で見当たったところ、両者のシグナルはほぼ一致しており、今まで指標にしてきた RNA による解析を、蛋白に置き換えても問題ないことがわかった。さらに、活性型 Notch の抗体を用いて体節形成過程における Notch シグナルの活性を調べた結果、Mesp2 蛋白質の発現と密接な関係があることがわかった。

特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

#### テーマ 1 に関して

我々は Mesp1 発現細胞の細胞系譜の追跡の過程で心臓の刺激伝導系を形成する細胞が、心筋や心内皮とは起源を異にすることを見いだした。これはある意味予想していなかった結果ではある。Mesp1 は原腸陥入で最も初期に形成される中胚葉に発現し、これらの細胞は、胚胎外中胚葉、胚性の血管系及び心臓に寄与することを明らかにしてきた。しかしこの過程で、常に心臓の一部でレポーターの発現がない細胞集団が存在することに気づき、それらの細胞が刺激伝導系のヒス束及パーキンジ繊維に相当することを、明らかにした。これらの細胞は、神経系とよく似た性質を有することから、かつては神経提細胞から由来するとされた時期もあったが、現在では否定されており、ニワトリの実験で、心筋細胞から分化誘導することが可能であることから、心筋の一部が心臓形成過程で誘導により形成されるとされている。しかし今回の我々の発見から、発生の非常に初期から、Mesp1 を発現しない細胞から由来し、ほとんどの心臓構成細胞とは異なった起源をもつことがわかった。しかし残念ながら、Mesp1 でマークできない細胞であるために、その本当の起源に関しては不明である。今後は他の初期心臓マーカーなどの Cre マウスを用いた実験などでこの点を詰める必要がある。

我々は、心臓および血管の初期分化に Notch シグナルが関与しているとの仮定のもとにいくつかの実験を進めている。ゼブラフィッシュの gridlock は Notch の下流で機能し、動脈の形成を促進する。我々は、このマウスホモログである hesr2 のノックアウトマウスを作成し解析したが、血管における異常は検出されず、心臓にのみ異常を示した。ところが同じファミリーに属する hesr1 とのダブルノックアウトマウスにおいては、血管、心臓両方で異常を示し、マウスにおいて、これらの遺伝子の相補的な機能が証明された。しかしながら、活性型の Notch を心血管系に強制発現したマウスにおいては、心臓において hesr1 は誘導されたが、hesr2 の誘導は見られなかった。また血管の異常も見いだされていない。血管の分化には Notch 以外のシグナルも関与しているようである。hesr1, hesr2 を介したシグナル系に関してさらに深く研究を進めていくつもりである。

#### テーマ 2 に関して、

我々は、体節形成過程において、最も重要なプロセスとして、分節直前の未分節中胚葉の前方におけるイベント (体節の前後極性の確立及び分節境界の形成) に関して遺伝子発現を指標にして、詳細な遺伝学的解析を行ってきた。そこで多くの興味深い事実を発見しているが、ひとつは、Delta1 をリガンドにする Notch シグナルと Delta3 をリガンドにする Notch シグナルが拮抗的に働いていることであり、そのうち、Delta1 のシグナル系のみ PS1 依存的であることがわかった。すなわち、Delta3 のシグナルはまだわかっていない Notch 経路を使っている可能性がある。と同時にもしかしたら Delta3 は細胞自立的に機能している可能性も示唆されており、他の Notch 系とは異なったメカニズムが明らかになる可能性がある。さらに、活性型 Notch に対する抗体を使用して、実際に PS1 で活性化された Notch を検出することに成功し、また Mesp2 の蛋白質も同時に調べることにより、Mesp2 と Notch シグナルの関係がより明らかになってきた。我々が RNA を指標にして立てていた仮説は、確証される可能性がある。すなわち、体節の前後極性は転写因子 Mesp2 による Delta を介した Notch シグナルの抑制により確立し、分節境界は Mesp2 と Notch の活性化が同時に働く結果である可能性が高まっている。さらに我々は Mesp2 と YFP との融合蛋白をノックインすることにより、体節形成過程における Mesp2 の挙動を時間を追って解析することを可能にした。マウスを用いて time-laps で発現をおうのは困難を極めるが、in vivo を再現する努力をしておりこのように特異的な転写因子を in vivo で正確に発現を追えた例は非常に少なくインパクトは高いと考えている。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

#### 学術論文

1. Satoshi Kitajima, Sachiko Miyagawa-Tomita, Dina C. Myers, Glenn I. Fishman, Tohru Inoue, Jun Kanno and Yumiko Saga. A distinct developmental origin of the cardiac conduction system in the murine heart. Submitted to Development (under revision).
2. Hiroki Kokubo, Sachiko Miyagawa-Tomita, Hirofumi Tomimatsu, Yasumi Nakashima, Makoto Nakazawa, Yumiko Saga and Randy L. Johnson. Targeted disruption of *hesr2* results in atrio-ventricular valve anomalies that lead to heart dysfunction. Submitted to Circulation research (under revision)
3. Hiroki Kokubo, Sachiko Miyagawa-Tomita, and Yumiko Saga, and Randy, L. Johnson. Submitted to Mouse *hesr1* and *hesr2* genes are redundantly required for cardiogenesis and angiogenesis Submitted to Developmental Biology.
4. Nomura-Kitabayashi, A., Takahashi, Y., Kitajima, S., Inoue, T., Takeda, H., and Saga, Y. Hypomorphic *Mesp* allele distinguishes establishment of rostrocaudal polarity and segment border formation in somitogenesis. Development, 129(10):2473-81, 2002.
5. Takahashi Y, Inoue T, Gossler A, Saga Y. Feedback loops comprising Dll1, Dll3 and *Mesp2*, and differential involvement of *Psen1* are essential for rostrocaudal patterning of somites. Development. 2003 Sep 15;130(18):4259-4268.
6. Yu Takahashi, Satoshi Kitajim, Tohru Inoue, Jun Kanno and Yumiko Saga. Cell-autonomous involvement of *Mesp1* and *Mesp2* in the epithelialization of somitic mesoderm and the requirement for non-cell autonomous functions of these transcription factors in normal segmentation. In preparation

#### 国際会議

1. Yumiko Saga, Takahashi, Y, Inoue, T. Molecular events leading to the establishment of rostro-caudal polarity of somite. Mouse molecular genetics, CSH meeting, USA, August 2002.
2. Kitajima S., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., ue, T., Saga, Y., Cell lineage analysis of *Mesp1*-expressing mesodermal cells in the developing murine heart. CSH symposium "The cardiovascular system" 2002. 5.29-6.3
3. Yumiko Saga. Genetic dissection of somite patterning. SDB meeting, Boston, USA, July, 2003.
4. Yumiko Saga. Dissection of genetic cascade leading to the somite patterning. Swiss-Japanese Meeting, Japan, November, 2003
5. Yumiko Saga. Genetic dissection of somite patterning. Beauty in Embryology, CBD symposium, February, Japan, 2004

#### 学会

1. 小久保 博樹, Randy L. Johnson, 相賀 裕美子. 新規の hairy and E(spl)サブファミリー遺伝子群、*hesr1,2,3* の機能解析。日本発生生物学会第 35 回大会(横浜) 2002.5.21-23
2. 高橋 雄, 井上 達, 相賀 裕美子. 体節形成における分子時計と前後極性の関係: *Mesp2* の役割。日本発生生物学会第 35 回大会(横浜) 2002.5.21-23
3. 北嶋 聡, 富田 幸子, 高木 篤也, 井上 達, 相賀 裕美子. 転写因子 *Mesp1* の発現を指標とした心臓中胚葉の細胞系譜解析。日本発生生物学会第 35 回大会(横浜) 2002.5.21-23
4. 小久保博樹, 富田幸子, 富松宏文, 中澤誠, Randy L. Johnson, 相賀裕美子. 心臓形成における *hesr* 遺伝子群の機能解析。第 25 回日本分子生物学会, 2002. 12.11-14.
5. 高橋 雄, 北嶋 聡, 井上 達, 菅野 純, 相賀 裕美子「転写因子 *Mesp1*, *Mesp2* は体節中胚葉の上皮化に細胞自律的に関与する」日本発生生物学会第 36 回大会, 札幌市, 2003 年 6 月
6. 北嶋 聡, 宮川一富田 幸子, 高橋 雄, 井上 達, 菅野 純, 相賀 裕美子「転写因子 *MesP1* および *MesP2* の心臓中胚葉形成における役割」日本発生生物学会第 36 回大会, 札幌市, 2003 年 6 月
7. 渡辺 裕介, 小久保 博樹, 相賀 裕美子「心血管形成における *Notch1* の機能解析」第 26 回日本分子生物学会, 神戸市, 2003 年 12 月
8. 小久保 博樹, 宮川一富田 幸子, 富松 宏文, 中澤 誠, Randy Johnson, 相賀 裕美子「心臓形成における *hesr* 遺伝子群の機能解析」第 26 回日本分子生物学会, 神戸市, 2003 年 12 月
9. 石川 亜紀, 北嶋 聡, 小久保 博樹, 相賀 裕美子「マウス体節形成過程において機能する新規遺伝子の探索およびその発現解析」第 26 回日本分子生物学会, 神戸市, 2003 年 12 月
10. 森本 充, 相賀 裕美子「未分節中胚葉特異的発現タンパク質 *MesP2* の機能解析」第 26 回日本分子生物学会, 神戸市, 2003 年 12 月
11. 安彦 行人, 原口 清輝, 北嶋 聡, 高橋 雄, 菅野 純, 相賀 裕美子「体節形成に関わる転写因子 *Mes p2* の発現制御機構の解析」第 26 回日本分子生物学会, 神戸市, 2003 年 12 月
12. 高橋 雄, 別所 康全, 影山 龍一郎, 菅野 純, 相賀 裕美子「体節形成における分子時計の振動に対する *Notch* リガンド *Dll1*, *Dll3* の役割」第 26 回日本分子生物学会, 神戸市, 2003 年 12 月