

平成 31 年 2 月 11 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 598

氏 名

長尾 勇治

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: バース (国名: 英国)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

魚類色素細胞における sox 遺伝子を介した多様な細胞への運命決定機構の解明

3. 派遣期間: 平成 29 年 4 月 8 日 ~ 平成 31 年 2 月 6 日

4. 受入機関名及び部局名

University of Bath, Department of Biology and Biochemistry

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入****も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【目的および概要】ひとつの幹細胞から多様な細胞が生み出される仕組みを理解することは発生生物学において重要な課題のひとつである。脊椎動物に特有で、発生の初期に形成される神経堤細胞は個体発生を通じて多種多様な細胞種を産生する多能性幹細胞の集まりである。神経堤細胞派生物のひとつである色素細胞は、それ自体の欠損は個体の生存には直接関係しないため、神経堤細胞発生および幹細胞発生の基本原理を理解するためのモデルとして長い間様々な生物種を用いて研究が続けられてきた。特に魚類には、哺乳類とは違い、複数の色素細胞種が存在しており、小型モデル魚類として広く研究に用いられるゼブラフィッシュでは3種類(黒、黄および虹)、またメダカでは4種類(ゼブラフィッシュの3種類に加えて、白)が存在している。それらは自然な着色により簡単に各細胞種を区別できることから、魚類色素細胞は運命決定のモデル細胞系として優れている。

色素細胞形成に関わる遺伝子は多数報告されている。中でも Sox10 は生物種に広く存在する転写遺伝子として働く SOX 遺伝子ファミリーのひとつであり、色素細胞を含む神経堤細胞発生に深く関わっている。受入研究者である Robert Kelsh 博士の研究室ではこれまでに、ゼブラフィッシュにおいて Sox10 の欠損は全ての色素細胞 (および他の神経堤細胞派生物) の欠損を引き起こすことを明らかにしている。派遣者はこれまでに黄色素細胞の欠損と白色素細胞の増加

を示すメダカ変異体の解析から Sox5 がそれら 2 種の色素細胞の運命選択を担うスイッチとなることを明らかにした。一方マウスでは黒色素細胞の発生過程において Sox5 が Sox10 の働きを抑制することが報告されている。そこで、魚類においては、Sox5 と Sox10 の相互作用が黒色素細胞のみならず、他の色素細胞でも働いているのではないか、という仮説が立てられた。また、先述のようにゼブラフィッシュは色素細胞を 3 種類持つのに対し、メダカは 4 種類と違いがあり、双方を比較解析することで、Sox5 および Sox10 の役割をより普遍的な原理として理解しようと試みている。

本研究の前身として、派遣者は 2014-2016 年度まで JSPS 頭脳循環を加速する戦略的国際研究ネットワーク推進プログラムの採択課題「統合イメージングサイエンス研究拠点：サブアトムダイナミクスから脳機能までを捉える」の援助の下、Robert Kelsh 博士とともに遺伝学的解析を行っており、1)メダカでは Sox10 が、マウスやゼブラフィッシュ同様に色素細胞の発生に必須であること、2)メダカ Sox5 は Sox10 の機能を抑制（黒色素細胞、虹色素細胞）あるいは協調的に調節（黄色素細胞、白色素細胞）していること、そして、3)ゼブラフィッシュではすべての色素細胞において Sox5 が Sox10 に対して抑制的に作用すること、を明らかにした。

海外特別研究員として派遣開始後は、まだ知見の少ない黄色素細胞および白色素細胞系譜に関して、より詳細な分子メカニズムの解明をするため、黄色素細胞および白色素細胞のマスタ一遺伝子を明らかにし、それら遺伝子に対する Sox5 と Sox10 の相互作用の分子メカニズムの解明を目的とした。

【研究成果】

1) Sox5 を異所的に発現する遺伝子組換えメダカを用いた Sox5 過剰発現実験

これまでの解析から、黄色素細胞において Sox5 の Sox10 に対する作用がメダカ（協調的）とゼブラフィッシュ（抑制的）が異なることが明らかになった。また、メダカはゼブラフィッシュにはない白色素細胞を持つが、これまでの研究により黄色素細胞と白色素細胞は共通の前駆細胞より形成されることが明らかとなっている。Sox5 欠損変異体メダカでは黄色素細胞が欠損することから、Sox5 の発現が維持される共通前駆細胞が黄色素細胞になると考えているが、直接的な検証はできていなかった。そこで共通前駆細胞での発現が見られる遺伝子 *pax7a* のプロモーターを用いて、Sox5 を共通前駆細胞で強制発現させる遺伝子組換えメダカ

Tg(pax7a:loxp-dsred-loxp-sox5) を作製した。このメダカは通常では赤色蛍光タンパク質 Dsred を黄白共通前駆細胞（および黄色素細胞と白色素細胞）において発現するが、Cre リコンビナーゼの存在下では loxp 配列に挟まれた Dsred が相同組換えにより切り出され、代わりに Sox5 が発現するようになる。

Cre を発現させた *sox5^{-/-};Tg(pax7a:loxp-dsred-loxp-sox5)* において、黄色素細胞の形成を観察することができた。また、白色素細胞の減少も同時に観察された。一方で、*sox5^{+/+};Tg(pax7a:loxp-dsred-loxp-sox5)* に Cre を発現させると、明らかな白色素細胞の減少を観察することができた。一方変異型 Sox5 を発現する *Tg(pax7a:loxp-dsred-loxp-sox5^{MT})* を用いて同様の実験を行った際には、色素細胞の形成に一切の影響を与えなかったことから、メダカ Sox5 は黄白共通前駆細胞から黄色素細胞の形成を促進し、逆に白色素細胞の形成を抑制することが明らかとなった。また、これは同時にメダカ Sox5 の機能はゼブラフィッシュにはない色素細胞種（白色素細胞）の出現とともに新たに獲得された機能であることが推察された。

概要に記載した内容に以上の結果を加え、成果をまとめた論文が、PLOS Genetics (6. 研究発表(1).1)に掲載された。また、2018年9月にフランス・レンヌで開かれた 21th European Society Pigment Cell Research にてポスター発表 (6. 研究発表(2).1) により意見交換を行った。

2) 黄・白色素細胞の遺伝子マーカーの大規模スクリーニング

色素細胞発生における研究は、ほとんどが全ての脊椎動物に存在する黒色素細胞によるものである。また、受入研究室では近年ゼブラフィッシュを用いて、虹色素細胞の研究が進められている。その一方で、黄色素細胞や一部の魚類のみで観察されている白色素細胞に関する知見は少ない。そこで Sox5 および Sox10 の標的遺伝子を同定するために、黄色素細胞および白色素細胞が光る *Tg(slc2a15b:gfp)* を日本より入手し、FACS により両色素細胞を分離し、CHIP シークエンス解析あるいは RNA シークエンス解析をする予定であった。しかし、魚の入手が不可能であったため（**生物の国際輸送において、現状日本の法制度が英国のもとめる『動物健康証明書』の発行に対して対応しておらず、正式な手続きを踏んで英国にて入手することが不可能であった**）、独自に黄色素細胞および白色素細胞の遺伝子マーカー *gch* のプロモーター領域を利用した *Tg(gch:gfp)* および *Tg(slc2a15b:gfp)* を作製することにした。これらのプラスミドコンストラクトの作製自体は成功したが、*Tg(gch:gfp)* は一過性顕微注入では黄色素細胞および白色素細胞での蛍光を観察することができなかった。また、*Tg(slc2a15b:gfp)* は F0 世代ではわずかにそれらの細胞での蛍光を観察することができたが、F1 世代へ組み換え遺伝子を伝えることができなかった。そのため、残りの期間では本計画の遂行は難しいと判断したため、当初の計画を変更し、事項の計画を立案し、研究を継続した。

3) 神経系およびグリア細胞における Sox10 および Sox5 の役割の検証

Kelsh 研究室では色素細胞の研究のみならず、神経堤細胞由来の神経およびグリアの発生に関する研究も進められている。これまでに、マウスの中枢神経系においては、すでに Sox5 と Sox10 の相互作用がその発生に関係していることが報告されている (Kwan et al., 2008; Lai et al., 2008)。また、ゼブラフィッシュとマウスにおいては Sox10 の変異は色素細胞のみならず、神経堤細胞由来の神経およびグリアの発生に影響を与えることが知られている。そこで、色素細胞で見られる Sox5 と Sox10 の相互作用モデルが、他の細胞種においても機能しているのかを明らかにするため、これまでに用いてきた変異体を用いて、神経・グリア細胞の表現型の解析も進めた。

まず、はじめに、抗 HuC 抗体を用いた免疫染色によりメダカ *sox10* 変異体胚における後根神経節 (DRG) を調べたところ、ゼブラフィッシュ *sox10* 変異体同様に、神経節数が著しく減少することが確認された。また、メダカ *sox10;sox5* 二重変異体を用いて調べたところ、神経節数は野生型よりは減少するが、*sox10* 単一変異体よりも増加していることが観察され、神経堤細胞由来の神経においても色素細胞と同様に Sox5 が Sox10 と競合的に作用していることが明らかとなった。また、*sox10* 変異体では抗 HuC 抗体により検出することができる腸管神経が完全に欠損していたが、*sox10;sox5* 二重変異体においてはわずかに腸管神経が観察される個体が観察された。次いで、グリア細胞の観察を試みようとしたが、現在のところ、グリア細胞に特異的な遺伝子マーカーは発見されていない。そこで、*sox10* を遺伝子マーカーとして、whole mount in situ hybridization (WISH) 法により *sox10* 遺伝子が発現している頭部と posterior lateral line nerves (PLLns) において、グリア細胞の一つであるシュワン細胞の観察を行ったところ、

神経細胞と同様に、*sox10* 変異体における細胞数の減少と *sox10;sox5* 二重変異体における回復が観察された。

次いで、ゼブラフィッシュの *sox10* および *sox5* 変異体を用いての解析も行った。抗 HuC 抗体陽性の DRG 数と、*foxd3* RNA アンチセンスプローブを用いた WISH 法による頭部および PLLns のシュワン細胞の数において、メダカと同様の結果が得られた。一方で腸管神経においては、*sox10* 単一変異体と *sox5;sox10* 二重変異体のどちらにおいても、抗 HuC 抗体陽性の神経細胞は観察することができなかった。

以上のことから、ゼブラフィッシュとメダカの双方で神経堤細胞由来の神経およびグリアにおいても Sox5 と Sox10 が競合的に作用していることが明らかとなった。この結果は Sox5 と Sox10 の相互作用が神経堤細胞において色素細胞のみならず、他の細胞種においても広く関わっていることを初めて示している。本成果はこれから論文としてまとめ、発表する予定である。

4) その他

また、本派遣期間中に知り合ったドイツの研究者の依頼により CRISPR/Cas9 法を用いて、メダカ変異体の作製を行った。申請者のテーマではないので詳細は省くが、目的遺伝子の機能欠損が予想される変異体の単離に成功したので、近い将来、この変異体を用いた研究の成果報告が論文としてまとめられると思われる。