

シグナル可視化ゼブラフィッシュ SLIZ を利用した シグナル伝達の生理学的機能の網羅的解析

九州大学 生体防御医学研究所 細胞統御システム分野
石谷 太

1. はじめに

遺伝子機能の時空間的制御は、細胞内あるいは細胞間の“シグナル伝達”によってなされる。シグナル伝達の破綻は、器官の形成不全などの遺伝子疾患や様々な疾病の発症を引き起こすことが知られており、このため、「シグナル伝達の機能と制御の解明」は非常に重要な研究課題となっている。現在までに、各シグナル伝達経路の分子レベルの制御機構と分子／細胞レベルの機能は、生化学的手法や細胞生物学的手法を用いた解析により、しだいに明らかにされつつある。しかしながら、各シグナル伝達経路が個体において「いつ」「どこで」「どの程度の強さで」働いて、「どのような生命現象をコントロールするのか」は未だに十分に明らかにされていない。その原因の一つに「個体を用いた研究とシグナル伝達研究の融合が不十分なこと」があげられる。そこで本研究では、生きた個体でシグナルを可視化し、「シグナル伝達およびシグナル伝達制御因子の個体レベルの機能を網羅的に把握する方法」を開発する。

2. 方法

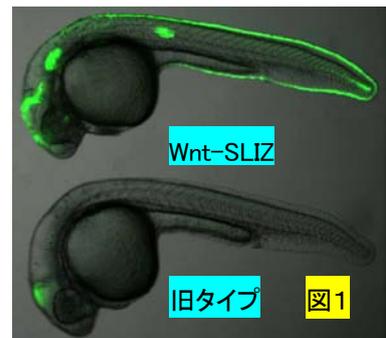
① シグナルの標的遺伝子の発現を蛍光蛋白質の発現に変換して、シグナルの活性を可視化する。「各シグナルの最下流に位置する転写因子のコンセンサスDNA結合配列」と「基本転写因子の結合する basal promoter」、「蛍光蛋白質遺伝子」をつないだレポーター遺伝子を作成する。蛍光蛋白質は、GFPではなく不安定なdestabilized GFP (d2EGFP)を用いる。GFPは非常に安定なので、本研究では、シグナルの増減を正確に判定するためにd2EGFPを使用する。また、シグナルをより高感度で検出するためにdGFPと共に東洋紡が開発した高感度不安定化発光蛋白質ELuc(PEST)も使用する。このようなレポーター遺伝子を“からだか透明”という特長を持つ脊椎動物モデル「ゼブラフィッシュ」に組み込み、ライン化することによりシグナル可視化ゼブラフィッシュ“Signal Live-Imaging Zebrafish (SLIZ)”を作製する。

②各SLIZの蛍光／発光パターンから、『各シグナルの細胞レベル個体レベルにおける機能の網羅的推測』を行う。続いて、推測した各シグナルの新たな機能を実証するために、ゼブラフィッシュ胚において各シグナルの機能欠損／亢進の実験を行い、注目した組織や器官のイベントに影響が起きるか調べる。このような手法により、各シグナルの個体における機能のすべてを明らかにしていく。

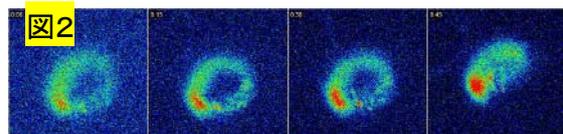
③Wntシグナルの活性をin vitroにおいて制御するシグナル分子群が脊椎動物個体において“いつ”“どこで”“どの程度の強さで” Wntシグナルの活性を調整するのかを、Wnt-SLIZを用いて明らかにする。

3. 結果 研究成果

(1) Wntシグナルの可視化と解析： Wntシグナルは、細胞増殖や幹細胞性の維持において重要な役割を担っている。また、このシグナルの異常な亢進は異常な細胞増殖を引き起こして癌を発生

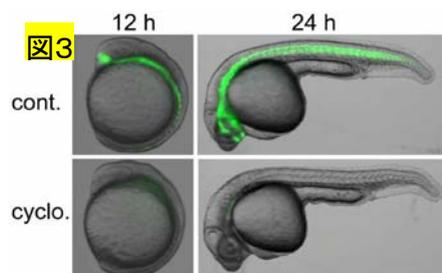


させる。Wntシグナルは、細胞外リガンド分子Wntを細胞が受容することによって活性化され、その活性化に伴い、転写因子Lef1が標的遺伝子の転写を活性化する。Wntシグナルを可視化したゼブラフィッシュは、既に一系統作成されており、この系統では「Lef1のコンセンサスDNA結合配列」を6コピーと「c-fos由来basal promoter」、「d2EGFP」をつないだレポーターが組み込まれている (Dev. Biol., 2003) が、本来Wntシグナルが働くはずの組織でd2EGFPが発現せず、ごく限られた組織でしかd2EGFPが発現しないという問題点があった (図1下)。私はその原因が「basal promoterが特定の遺伝子由来であること」と「Lef1結合配列の少なさ」にあると考え、新たなWnt-SLIZ (Wnt-Signal Live-Imaging Zebrafish) の作製にあたっては、basal promoterにはpromega社のpGL4由来の人工minimal promoterを用い、かつLef1結合配列を6コピーを増やしたレポーター遺伝子をゼブラフィッシュに組み込んで系統化した。新たに作製したWnt-SLIZは、期待通り、Wntシグナルが活動すると予測される領域でd2EGFPを強く発現した (図1)。また、このd2EGFPの発現は、Lef1を機能阻害すると激減したことから、Wntシグナルの活動に依存したものであることが確認できた。次に、レポーターの発現の詳細な解析を行った。d2EGFPのmRNAの発現はWntシグナルが活動し始めると考えられている受精後4時間のオーガナイザー領域で観察できた。しかしながら、蛍光は、4時間では観察できず、受精後9時間付近の後方領域 (将来の体幹部/尾部) で観察され始め、その後、頭部後方まで広がっていき、さらに、受精後18時間付近から前腎管、予定中脳領域、受精後24時間前後から耳、網膜、側線原基、膜鱗、胸鱗原基、神経堤細胞、受精後50時間以降から視床下部や肝臓で観察された (data not shown)。また、中脳領域 (視蓋) と網膜などの神経前駆細胞における蛍光は成長過程の1ヶ月齢の幼魚においても観察された。この可視化により、受精後9時間から幼魚に至るまでのゼブラフィッシュにおけるWntシグナルの活動を、その個体の成長と共にライブで観察することに成功した (投稿準備中)。また私たちは、d2EGFPだけでなく、ヒカリコメツキムシ由来のElucを用いたシグナル可視化にも取り組んだ。この可視化においては、不安定化Eluc、Eluc-PESTをレポーターとして用いた。ElucはGFPだけでなくホタルルシフェラーゼよりも感度がよく、また、d2EGFPよりも転写から発光までの時間が短い、即ち、生のシグナルとのタイムラグが小さいという利点がある。さらにまた、Elucの発光には定量性があり、シグナルの強さの測定が可能になる。図2は



Eluc-PESTでWntシグナルを可視化した魚の受精後、4-5時間の胚の写真で、d2EGFPによるレポーターでは観察できなかった早い時期においても、Wntシグナルの活動を可視化することができた (投稿準備中)。

(2) Hhシグナルの可視化： Hhシグナルは、細胞の増殖分化や胚体の左右非対称性の形成などの個体発生過程だけでなく、食道癌や胃癌などの発症にも関わる重要なシグナル伝達経路である。Hhシグナルが活性化した細胞では、転写因子Gliが転写活性化因子として機能して標的遺伝子の転写を誘導する。Hh-SLIZでは、「8コピーのGliのDNA結合配列、minimal promoter、d2EGFPをつないだレポーター遺伝子」をゼブラフィッシュに組み込み、Gliによる転写誘導を可視化する。現在までにHh-SLIZの系統化を終えており、このHh-SLIZは期待通り、

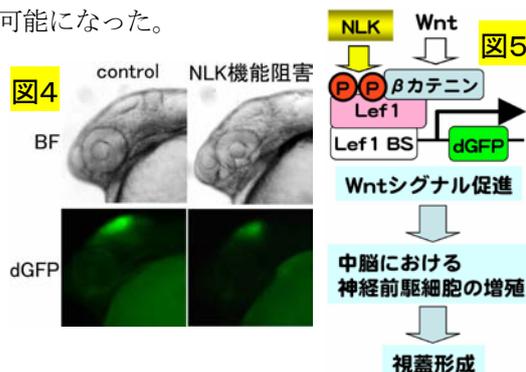


Hhシグナルが活動すると予測される領域でd2EGFPを強く発現した。また、このd2EGFPの発現は、Hhシグナル特異的阻害剤cyclopamine (cyclo.) で処理すると激減したことから、Hhシグナルの活動に依存したものであることが確認できた (図3) (投稿準備中)。

上記以外にもNotchシグナルとNF κ Bの活動の可視化にも取り組んでおり、いずれも同様の方法で可視化に成功しつつある (一過的な可視化には成功済みで、現在系統化中)。したがって、シグナル可視化ゼブラフィッシュ群の作成はまだ途上ではあるものの、「シグナル可視化ゼブラフィッシュ作成の方法論を確立した」と言っても過言でない。また、このシステムの完成により、ダイナミックに変化する個体内におけるシグナル活動の時空間的動態の把握や、細胞運命を決定するシグナルの強さの定量など、様々なアプローチが可能になった。

(3) SLIZを活用したシグナルの機能と制御の解析:

Wntシグナル可視化ゼブラフィッシュを使ったシグナル伝達の分子・細胞・組織レベルの統合的解析にトライした。本解析に耐え得るWnt-SLIZはごく最近完成したので、まずは旧タイプのWntシグナル可視化ゼブラフィッシュを用いて解析を開始した。私たちは以前、NLKというリン酸化酵素がWntシグナル



の転写因子Lef1をリン酸化することを見いだしていた (Nature 1999) が、NLKが*in vivo*においてWntシグナルにどのような影響を与えているのかはわかっていなかった。そこで、Wntシグナル可視化ゼブラフィッシュにおいてNLKを機能阻害し、これを調べた。その結果、NLKを機能阻害すると受精後24時間以降の予定中脳領域でWntシグナルレポーター活性が低下すること、即ち、NLKが受精後24時間以降の中脳領域でWntシグナルを促進することがわかった (図4、5)。さらに、中脳領域に注目して解析を進めた結果、NLKが中脳領域でLef1による転写を促進して神経前駆細胞の分裂増殖を促進し、正常な大きさの視蓋の形成に貢献することが明らかになった (図5) (投稿準備中)。

4. 考察 まとめ

本研究ではWnt, HhシグナルなどのSLIZを作成した。そして、SLIZを用いることで、「シグナルの活動の時空間的動態と個体発生の同時把握」や「シグナルの制御がいつどこでどのように起きるのかを容易に解析すること」が可能になった。私たちは今後、SLIZを用いて、神経系と消化管の構築と維持の過程における「Wnt, Notch, Hhシグナルの機能と制御」、「シグナル間の協調的制御と競合的制御」、「細胞運命決定を規定するシグナルの強さのThreshold (閾値)」の解明を行っていきたい。また一方で、SLIZを用いて、可視化したシグナルの変化と表現型の変化の双方を指標にしたWnt/Hhシグナル特異的阻害剤探索法の開発を行いたい。

5. 参考文献

- ① Dorsky RI et al. (2002). A transgenic Lef1/ β -catenin-dependent reporter is expressed in spatially restricted domains throughout zebrafish development. *Dev. Biol.* 241, 229- 237
- ② Ishitani T. et al. (1999). The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between β -catenin and transcription factor TCF. *Nature* 399, 798-802.