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。さらに、開発した方法を活用し、シグナル伝達のin vivoにおける機能と制御を解明していく。

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と共に東洋紡の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“からだが透明”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、

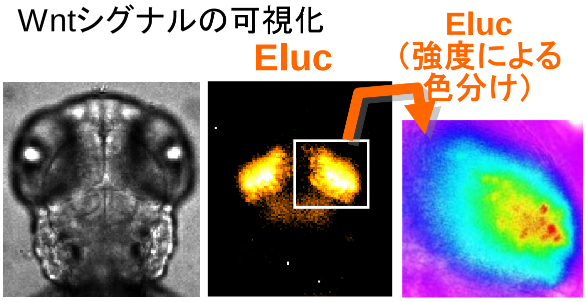
Wnt-SLIZを用いて明らかにする。
④Hedgehogシグナルの活性をin vitroにおいて制御するシグナル分子群が脊椎動物個体において"いつ""どこで""どの程度の強さで"Hedgehogシグナルの活性を調整するのかを、Hedgehog-SLIZを用いて明らかにする。
⑤in vivoにおけるシグナル可視化に適した新たな発光プローブの開発を行う。

3. 結果　研究成果

(1) SLIZの作製：　本研究は、昨年度からの継続課題であり、昨年度までに、dGFPタイプのWntシグナル、Hedgehogシグナル、NFκBシグナルのレポーターと、Eluc(PEST)タイプのWntシグナルレポーターを作製し、これらをゼブラフィッシュに導入している。しかしながら、昨年度までに作製したレポーター導入ゼブラフィッシュは、同一のレポーターであっても、導入した個体によってレポーター強度やレポーターの発現部位が異なるという問題があった。また、レポーター導入個体を継代すると、レポーターの発現部位や強度が変化していくという問題があった。これらの問題は、個体間でレポーターのゲノム挿入部位が違うことと、ゲノムに挿入されたレポーターの数が異なることに起因すると推測された。そこで、本年度はまず、各レポーターをシングルコピーで持つ系統をサザンブロッティングにより選別した。また、選別した系統群から、レポーター強度が強く、かつ、シグナル活性を正しく反映するレポーター活性を示す系統をさらに選別した。これにより、今後の解析に耐えうるSLIZ系統を確立した。

(2) Eluc(PEST)を用いたシグナル可視化:　従来のゼブラフィッシュを用いたin vivoイメージングにおいては、転写から蛍光能の獲得までの時間が比較的長く、また細胞内での安定性が高い、GFP系のレポーターが使用されているため、"in vivo"で今まさに起きつつある現象をリアルタイムで可視化することができていない。また、蛍光イメージングは定量には不向きである。そこで、定量性があり、ダイナミックレンジが広く、また、転写から発光能の獲得までの時間が短い、発光蛋白質である、Eluc(PEST)をレポーターとして用いて、in vivoにおけるWntシグナルの始動と収束の正確な把握を試みた。ゼブラフィッシュにおいて発光を用いてシグナルを可視化した例がこれまでにないため、浜松ホトニクス社より発光イメージングシステム/AEQUORIAをお借りし、発光検出の実験系を確立した。図1に示す通り、Eluc(PEST)タイプのWnt-SLIZの胚を発光基質存在下で飼育することにより、胚を生かしたままでin vivoのWntシグナル強度を測定することに成功した。

図1. Elucを用いたWntシグナルの可視化



(2) Eluc-CPの作製:　上述のEluc(PEST)はタンパク質としての半減期が1〜2時間であるため、Wntシグナルの活動しなくなって1〜2時間の細胞であってもレポーター活性が検出されてしまう。つまり、シグナルの収束を正確に検出するため

には、レポーターに使う発光タンパク質の半減期がより短い必要がある。そこで我々は、半減期が短い発光プローブの作製に取り組んだ。そして、Eluc(PEST)にCL1分解配列を付与することにより、半減期を15分程度まで縮めた“Eluc-CP”の作製に成功した。現在、Eluc-CPを使ったWntシグナルレポーターを組み込んだゼブラフィッシュを作製しており、完成次第、観察を行う予定である。
(3) Wnt-SLIZを用いたWntシグナルの制御機構の解析： 私たちは以前、HIPK2というリン酸化酵素がβカテニンの安定化を介してWntシグナルを促進することを見いだしていた(Develoment 2009)が、HIPK2によるWntシグナル制御のin vivoにおける意義はわかっていなかった。そこで、Wnt-SLIZにおいてHIPK2を機能阻害し、これを調べた。その結果、HIPK2を機能阻害すると受精後8時間以降のventrolateral mesodermでWntシグナルレポーター活性が低下すること、即ち、HIPK2が受精後8時間以降のventrolateral mesodermでWntシグナルを促進することがわかった。さらに、ventrolateral mesodermに注目して解析を進めた結果、HIPK2がventrolateral mesodermでβカテニンを安定化してWntシグナルを促進して、正常な尾部の形成に貢献することが明らかになった（投稿準備中）。
(4) Hedgehog(Hh)-SLIZを用いたHhシグナルの制御機構の解析： 私たちは最近、動物細胞株において、NLKというリン酸化酵素がHhシグナルを抑制することを見いだしている（投稿準備中）が、NLKによるHhシグナル制御のin vivoにおける意義はわかっていなかった。そこで、Hh-SLIZ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時間以降の頭部腹側領域でHhシグナルレポーター活性が亢進すること、即ち、NLKが受精後24時間以降の頭部腹側領域でHhシグナルを抑制することがわかった。さらに、頭部腹側領域に注目して解析を進めた結果、 NLKが迷走運動神経細胞でHhシグナルを促進して、Hhシグナルによる迷走運動神経細胞の増殖を抑制していることが明らかになった（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, 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 Lee W et al. (2009). Homeodomain-interacting protein kinases (Hipks) promote Wnt/Wg signaling through stabilization of beta-catenin/Arm and stimulation of target gene expression. Development. 136, 241-251