

研究題目 ノックインマウスによるモルフォゲン拡散の意義の解明

研究組織

研究代表者： 高田 慎治 (基礎生物学研究所)
共同研究者： 竹本 龍也 (徳島大学先端酵素学研究所)
研究分担者： 三井 優輔 (基礎生物学研究所)
 畠山 宙大 (基礎生物学研究所)

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて、モルフォゲン分子である Wnt3a を非拡散性ものに人為的に置換したノックインマウスを作成し、組織形成におけるモルフォゲン分子の拡散の意義を検討する。

[1-2]研究の方法・経過

Wnt を含む分泌性シグナル蛋白質（以下、分泌シグナル）は、細胞の増殖、分化、移動などを制御する。一般的にこれら分泌シグナルは、パラクラインとして周囲の細胞を制御しており、発生生物学の古典的概念の一つであるモルフォゲンの分子実態とも考えられている。従来、分泌シグナルの空間分布は、産生細胞から分泌された分泌シグナルと細胞膜や細胞外基質中の分子との相互作用により規定され、産生細胞を中心に濃度勾配を呈するものと考えられてきた。しかし、近年のイメージング観察等の結果は、従来考えられていたような単純なモデルでは説明し難い分泌シグナルの動態を示唆しており、分泌シグナルの空間分布とその制御機構の実態を新たな視点や方法論を駆使して理解することが求められている。

研究代表者らは、Wnt 蛋白質の分子的特性についての研究を進める中で、Wnt はホモ 3 量体構造を基本単位とする高分子複合体を形成して分泌されること、そしてこの複合体は Wnt 受容体や Wnt 結合蛋白質である sFRP との相互作用により容易に解離し、リガンド・リセプター複合体や Wnt と sFRP が結合したヘテロ複合体を形成することを明らかにした。さらに、ホモ 3 量体が集合した Wnt 多量体は運動性が乏しくほとんど拡散しないのに対し、多量体が sFRP により解離し sFRP と Wnt3a のヘテロ複合体を形成するようになると、拡散性が高まることも明らかになった。これらの結果をもとに、現在我々は Wnt は元々は拡散性の低いホモ多量体として分泌され、Wnt の会合状態が変化するような条件下においてのみ拡散性を亢進するという、Wnt シグナルの空間制御を理解する上での基盤となるというモデルを世界に先駆けて提唱しているところである。一方、発生過程のマウス胚において Wnt 蛋白質の拡散を詳細に観察したところ、産生細胞から分泌された Wnt が拡散により濃度勾配を形成し、周囲の細胞の分化運命を制御するという従来定説に加え、Wnt が拡散することなく機能する可能性を示唆する結果が得

られた。以上の結果から、Wnt 蛋白質の拡散の意義について詳細に検討する必要性が生じた。この問題を直接的に検討するため、内在性の Wnt3a を非拡散性の人工タンパク質に置換したマウス個体を作成し、拡散しない Wnt3a 蛋白質によって本来の内在性 Wnt3a 蛋白質の機能をどの程度代替できるのかを検討することにした。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

細胞膜結合型の Wnt3a 蛋白質を発現するように設計したターゲティング用プラスミドを 3 種類作成し、CRISPR/Cas9 法によりマウス Wnt3a 遺伝子座へのノックインを試みた。具体的には、1 本鎖 DNA を、ニックング酵素を用いてターゲティング用プラスミドから調製し、Cas9 タンパク質、ガイド RNA と共にエレクトロポレーションによりマウス受精卵に導入した。エレクトロポレーションは、通常のゲノム編集（遺伝子破壊など）の条件である 30V、3msec ON、7 回パルスの他、複数の条件を検討した。エレクトロポレーションを行った胚は、2 細胞期に仮親の卵管に移植した。産まれた個体について、ジェノタイピングを行ったが、目的個体の樹立には至っていない。Cas9 によるゲノム切断は効率的に起こっていることから、ガイド RNA の選別に問題はないと考え、引き続き、ノックインマウスの作製を行っているところである。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今

後の発展性

エレクトロポレーションを用いたゲノム編集技術により、比較的長い DNA 領域を組み込むノックインマウス個体を作成することは、未だ発展途上の技術であり、高度な技術水準が要求される。本研究においてノックインのための方法論が確立できれば、それは同様な研究を希望する多くの研究者に対しても大いに有益であると考えられる。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

1) Hatakeyama, Y., Shinozuka, T., Mii, Y., & Takada, S. “Lineage analysis of roof plate cells during the development of mouse spinal cord”: 第 51 回日本発生生物学会、第 70 回日本細胞生物学会合同年会（東京）、6 月 5 日-6 月 8 日、2018 年

[3-3] 成果資料等

なし

【4】今後の課題等

ゲノム編集の条件をより詳細に検討することにより、ノックイン個体が作成できる可能性はあるので、引き続き検討を続ける。また、予定するノックイン個体が樹立できた場合には、Wnt 蛋白質の拡散の意義について個体レベルでの解析を進めることが重要である。