

脊椎動物胚の尾芽における多分化能細胞  
からの神経発生機構の研究

2021年9月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）  
理工学専攻生命科学コース（指導教員 弥益 恭）

結川 達也

目次

概要	1
緒言	3
材料と方法	8
第 1 部 尾芽領域における尾芽形成遺伝子の発現解析	25
要旨	
序論	
結果	
考察	
第 2 部 体軸の伸長における Pou5f3 の役割の遺伝学的検討	38
要旨	
序論	
結果	
考察	
第 3 部 尾芽及び神経管後端の発生制御における分泌性因子及び tbxta の役割	54
要旨	
序論	
結果	
考察	
第 4 部 pou5f3 の発現領域を決定する発現制御機構の検討	61
要旨	
序論	
結果	
考察	
第 5 部 体軸後方形成における soxB1 遺伝子の役割の検討	67
要旨	
序論	
結果	
考察	
結論	76
謝辞	78
参考文献	79
図の説明	87
図表	95

## 概要

脊椎動物の胚発生において、頭部より後方における胚体の伸長は、胚の後端部における中胚葉性組織、神経管など、様々な組織の新たな産生により進行する。この際には尾芽領域における幹細胞の存在が想定されているが、この部位での多分化能の維持、そして各種組織への特異化を制御する遺伝子制御ネットワークの詳細は不明である。本研究では、*Oct4* 相同 Class V POU 遺伝子であるゼブラフィッシュ *pou5f3* が体節形成期に胚の後端で継続的に発現することに着目し、体軸伸長の遺伝子機構を *pou5f3* の役割に注目して検討した。

まず、胚後端における *pou5f3* の発現を *in situ* hybridization (ISH) により詳細に検討し、原腸形成直後の初期体節期では、*pou5f3* は尾芽領域の主として背側で発現すること、体節形成中期になると、その発現は神経管後端領域に限定され、神経管において広く見られる *sox3* の発現とは相補的な関係になること、その一方で、胚後端に位置する尾芽での *tbxta* の発現と明瞭な境界を形成することを示した。さらに、尾芽および胚後端の形成に関与すると予想される各種遺伝子の尾芽周辺での発現の詳細、特に *pou5f3* の発現との位置関係を明らかにした。以上の結果は、尾芽細胞は神経組織に特異化されて神経管に移行すると同時に *pou5f3* の制御下で神経分化を進行させることを示唆した（第 1 部）。

次に、胚体伸長における *pou5f3* の機能を検討するため、加温誘導性 dominant-interfering 遺伝子 (*en-pou5f3*) により *pou5f3* の機能を原腸形成終了以降の胚で阻害し、その効果を検討したところ脊索、体節、そして神経管の形態的な異常が確認された。体節形成期での誘導時期を初期から中期まで変えるにつれ、異常の部位が体軸伸長と対応して後方に移動することから、*pou5f3* が、尾芽において胚体組織が新たに生じる際に必要である一方、既存の体軸の維持には不要であることを示唆した。また、誘導胚において尾芽形成に関わる遺伝子の発現を ISH で検討することで、*pou5f3* は、多能性維持遺伝子の発現には抑制的であること、尾芽維持遺伝子である *tbxta* の発現を維持するとともに、神経細胞分化を推進すること、中胚葉前駆細胞への分化には抑制的に働くことを見出した。同様の結果は、*pou5f3* 変異体を用いた検討、*Pou5f3* の活性化実験からも得られている。以上は、*PouV* 遺伝子が、脊椎動物胚共通の胚構造である尾芽において幹細胞の分化制御、特に神経分化に関わることを示唆するものである（第 2 部）。

一方、尾芽発生に関与することが示唆されている各種シグナル分泌因子の遺伝子発現について ISH で検討し、主要な Wnt/FGF/BMP シグナル遺伝子は全て尾芽周辺で発現することを確認した。これらの分泌シグナルの役割については薬剤処理実験により検討し、Wnt/FGF/BMP シグナルがいずれも尾芽形成遺伝子の発現制御を通じて、尾芽発生に関与することを示した。一方、尾芽未分化状態の維持に関わるとされる *tbxta* の役割を検討するため、mRNA 注入による強制発現が尾芽形成に及ぼす効果を調べ、*tbxta* が神経管後端での *pou5f3* 発現には影響せず、*sox2* の発現を抑制することを見出した（第 3 部）。

*pou5f3* 遺伝子の発現を制御する機構については、培養細胞を用いた reporter アッセイを

行った. *pou5f3* と *soxB1* 遺伝子の相乗作用に注目したところ, *pou5f3* と *sox3*, *pou5f3* と *sox19a* は相乗的に転写を活性化するが, *pou5f3* と *sox2* には明瞭な相乗作用は見られなかった. 一方で *soxB1* 遺伝子間では相乗作用が確認できなかった. 従って, *pou5f3* の発現制御において, *sox3* と *sox19a* は各々 *pou5f3* 自身と相乗的に活性化能を持つが, *sox3* と *sox19a* は互いに独立して働くことが示唆された. また, *pou5f3* と同様に神経管後端で発現する *nkx1.2la* は *pou5f3* の発現に顕著に抑制的である一方, 脊索及び尾芽で *pou5f3* と相補的に発現する *tbxta* については *pou5f3* の発現に影響しないことが確認された (第 4 部).

最後に, *pou5f3* と協調して尾芽形成とその発生に働くと考えられる *soxB1* の働きを検討するため, *sox3* および *sox19a* をゲノム編集技術により遺伝子破壊した. これらの変異について, 単独ホモ接合体胚では顕著な形態的異常が観察されなかったが, *sox3* と *sox19a* の 2 重ホモ変異体胚において尾部の伸長異常が確認された. 従って, *sox3* と *sox19a* はいずれも正常な尾部発生に必要であるが, 両者には機能的相補性があることが示された (第 5 部).

本研究を通じての以上の一連の結果は, 脊椎動物の体軸伸長における *pou5f3* を中心とした遺伝子機構の理解に大きく貢献しうると考える.

## 緒言

近年, ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞が, 基礎科学的な重要性からのみならず, 再生医療などへの応用という視点からも注目されている (Yamanaka, 2008; Gouti et al., 2014). ES 細胞 (胚性幹細胞) は胎盤などの胚体外組織を除く全ての組織に分化可能な細胞集団であり, ES 細胞を樹立するためには, 胚盤胞などの初期胚が必要となる (Strelchenko et al., 2004). 一方の iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) は, 体細胞へ多能性遺伝子 (*Oct4*, *Klf4*, *Sox2*, *c-Myc*) を導入することで作製される. この細胞も ES 細胞のように非常に多くの細胞に分化することが可能であるとともに自己複製能を備えており, 分裂増殖を経ても多能性を維持する (Yamanaka, 2008).

一方, 成体の各種成熟組織・器官内にも, 様々な種類の細胞, 組織への分化能を持つ多分化能細胞が存在することが知られる (Kolf et al., 2007; Koch et al., 2017). 成体幹細胞は, 幹細胞ニッチと呼ばれる特殊な微小環境内で維持されており, ニッチを形成する細胞が産生する傍分泌因子や接触分泌因子を介して幹細胞の増殖と分化が制御される (Jones and Wagers, 2008). 幹細胞ニッチの 1 つであり, 多くのタイプの血球を産生する造血幹細胞ニッチにおいては, Wnt 群やアンギオポエチン, そして幹細胞因子などを含む傍分泌因子の複雑な組み合わせが, Notch とインテグリンによる細胞表面シグナルと協働して幹細胞の増殖と分化を制御する (Spiegel et al., 2008). こうした幹細胞は, 培養系における細胞分化の詳細な研究において優れた実験系を提供したが, それのみならず, 各種疾患の治療法の開発, 人工的条件での臓器・組織の生産, そしてこれらの損傷部位の再生医療などの可能性が開けつつある.

また, 発生過程にある胚の各領域, 組織においても様々なタイプの幹細胞集団が見出されている. 脊椎動物胚の場合, 胚体後端において新たな分化細胞群を産生し続け, 胚の体軸伸長を行う尾芽において, 多分化能幹細胞の存在が想定された (尾芽幹細胞). しかしその一方で, 尾芽自体が多様な細胞群の集合体であるともされ, その実体については必ずしも明らかではない (Yoshikawa et al., 1997).

尾芽細胞の多分化能については未だに議論があるが, 少なくとも脊髄の神経細胞や様々な中胚葉組織などを生み出す多分化能を持ち, 体軸の伸長に貢献する細胞集団が存在することは広く受け入れられており (Martin and Kimelman, 2011), このように神経と中胚葉両方の分化能を持つ細胞は現在, 神経中胚葉前駆細胞 (neuromesodermal progenitors, NMPs) と呼ばれている (Cambray and Wilson, 2002, 2007; Tsakiridis and Wilson, 2015).

胚体後方構造の発生, 体軸伸長での尾芽領域の役割については主としてマウス, ニワトリ, ゼブラフィッシュなどで研究が行われてきた. マウスやニワトリのような羊膜類の場合, 体軸伸長は, 原腸形成の場である原条とその周辺のエピブラスト (胚盤葉上層) から供給される細胞によって行われる. マウスでは, 体幹部の複数の体細胞系列に寄与する原条周辺の幹細胞領域として, 後方側方エピブラスト (caudal lateral epiblast, CLE), ノー

ド・原条境界 (node-streak border, NSB), 脊索・神経管尾端境界 (chordoneural hinge, CNH) が示唆されている (Cambray and Wilson, 2002; Cambray and Wilson, 2007; Wymeersch et al., 2016; Kondoh et al., 2016). これらの中で, CLE と NSB の細胞は主として体幹部の神経管と体節中胚葉に寄与するのに対し, CNH の細胞は尾側の神経管と体節中胚葉に寄与するとされる (Rodrigo et al., 2018; Koch et al., 2017). また, 後方神経板と沿軸中胚葉はともに尾芽にある多分化能幹細胞に由来することが示されている (Koch et al., 2017).

一方, 真骨魚類であるゼブラフィッシュを用いた研究では, 尾芽細胞は均一ではなく, 脊索や底板などへ分化する中軸前駆細胞 (midline progenitor cells, MPCs), 体節, 神経管などへ分化する後方壁前駆細胞 (posterior wall progenitor cells, PWPCs) など, 異なる幹細胞集団が存在することが示唆された (Row et al., 2015). MPCs は脊索のすぐ後方に存在し, 背側 MPCs と腹側 MPCs という 2 種類の細胞集団から構成されるとされる (Row et al., 2015). 一方の PWPCs は, MPCs よりも後方の尾芽末端領域に存在し, Wnt シグナル非制御下で脊髄を生み出し, Wnt シグナルがある場合には中胚葉組織を生み出すと考えられている (Row et al., 2015).

前述したように, 脊椎動物胚の尾芽には少なくとも後方の神経板と沿軸中胚葉を生み出す多分化能細胞として NMPs が知られるが (Bouldin et al., 2015), NMPs の多能性の維持については *sox2* と *tbxt* (*Brachyury/T*) の共発現が重要であり, これら 2 遺伝子は相互発現抑制の関係にあるとされる (Koch et al., 2017). マウス胚 NMPs の場合, *sox2* が活性化した状態では神経系組織に, *tbx6* が活性化すると中胚葉系組織に分化する (Kondoh et al., 2016). NMPs の多分化能自体は *wnt3a* と *tbxt* によって維持されており, これらの遺伝子の産物が *sox2* と *tbx6* の両方を活性化するが, *tbx6* が *wnt3a* による *sox2* の活性化を阻害した場合, NMPs が中胚葉組織に分化すると考えられている (Takemoto et al., 2011; Koch et al., 2017). 実際, マウスの *tbx6* 変異体では複数の神経管が異所的に形成されることから (Takemoto et al., 2011), *tbx6* は NMPs からの中胚葉への分化方向の選択に重要であるといえる. さらに *tbx6* と *sox2* が共発現する領域には NMPs から中胚葉組織への移行状態にある細胞集団が存在することも示されている (Javali et al., 2017).

ゼブラフィッシュ尾芽幹細胞の多分化能性の維持にも, *tbxt* の相同遺伝子である *tbxta* と *sox2* の共発現が重要であることが報告された (Goto et al., 2017). 従って, *tbxta/tbxt* と *sox2* が尾芽細胞の維持で重要である点は脊椎動物で共通と考えられる. ゼブラフィッシュの場合, 尾芽細胞は尾芽由来の Wnt が作用する条件下で中胚葉性組織へ分化することが示唆された (Martin and Kimelman, 2011). この際, 中胚葉前駆細胞への分化には *tbx16* が必要であり (Fior et al., 2012), その後の中胚葉分化には *tbxta* 及び *mesogenin1* (*mshn1*) が関与するとされる (Fior et al., 2012; Bouldin et al., 2015). 一方, 尾芽幹細胞から神経前駆細胞への分化には *soxB1* 遺伝子の 1 つである *sox2* が関わっており (Bouldin et al., 2015), その後の神経分化については *neurog1* などの proneural 遺伝子が働く (Fig. 1).

尾芽の発生においては, 他の様々な発生過程と同様, 様々な分泌性シグナルが関わるこ

とも知られている (Martin and Kimelman, 2011; Goto et al., 2017; Sharma et al., 2017). 上に述べたように、尾芽の多分化能細胞が中胚葉前駆体に分化する際、そして生じた中胚葉前駆体が沿軸中胚葉に分化する際には、Wnt シグナルが必要とされる (Martin and Kimelman, 2011). 一方、FGF シグナルは尾芽において、神経板の後方化、そして後方の沿軸中胚葉の形成などに関わる (Goto et al., 2017). また、BMP シグナルは尾芽の多分化能細胞が中胚葉組織に分化する際の上皮間充織転換に関わり、尾芽からの中胚葉分化に関与する (Anderson et al., 2016; Sharma et al., 2017).

ゼブラフィッシュ胚においては、MPCs の発生が分泌性シグナルにより背側と腹側で異なる制御を受けることが示された. 背側 MPCs の分化は Wnt シグナルによって仲介された *sox2* の発現抑制によって調節されており、Wnt シグナルがない場合では底板、Wnt シグナルがある場合は脊索を生み出すとされる (Row et al., 2015). これに対し、腹側 MPC の分化は Notch シグナルによって調節されており、Notch シグナルがない場合では脊索、Notch シグナルがある場合は下索を生み出す (Row et al., 2015). さらに、PWPCs は前述したように Wnt シグナルがない場合では脊髄を生み出し、Wnt シグナルがある場合には中胚葉組織を生み出すと考えられている (Row et al., 2015).

以上のように、尾芽を構成する細胞群とその分化制御についてはマウスやゼブラフィッシュで研究が進んでいる。しかし、尾芽領域における異なる細胞集団の実体、その分化を制御するシグナルや転写制御因子などの遺伝子機構、そして分布や移動などそれらの細胞の挙動についての詳細は不明である。特に、尾芽細胞の未分化・多分化能を維持する仕組み、そして中胚葉と脊髄神経細胞の分化選択の機構についても解決にはほど遠いのが現状であろう。

なお、脊椎動物における体軸伸長を理解する上で留意すべきこととして、初期発生、そして尾芽による体軸伸長の様式が種間で多様であることが挙げられる。羊膜類であるマウスでは胴部伸長と尾部伸長の過程が区別されており、胴部は胚盤葉由来の細胞から、尾部は尾芽由来の細胞から形成され、胚盤葉で胴部伸長が完了した後に尾部伸長が開始されるが (Aires et al., 2016), 魚類や両生類では胴部伸長と尾部伸長に明確な違いが見られない。両生類であるサンショウウオでは、羊膜類や魚類のいずれとも異なり、神経板の後方領域が尾芽を形成し、この神経板後方領域の一部が前方に折り返すことで体節などの中胚葉組織が形成される (Taniguchi et al., 2016).

その一方で、胴尾部の伸長を原腸形成の継続で説明できること、尾部の形成が *eversion* とよばれる形態形成運動で説明できることなど、異なる脊椎動物種間での共通性も指摘されている (Kanki & Ho, 1997). 実際、上述したように、魚から哺乳類まで、尾芽細胞からの細胞分化、そして体軸伸長を制御する機構には保存された面も多いと考えられる。従って、尾芽幹細胞の多分化能、未分化状態の維持、そしてその分化方向の決定に関わる細胞レベル、遺伝子レベルでの機構にも共通性があると予想される。

尾芽における細胞の多分化能、あるいは幹細胞的性格を考えると、尾芽による体軸伸長

については、冒頭で述べたように、初期胚細胞や ES 細胞などの多能性との関連性が注目される。マウス *oct4* は PouV 型 POU 転写因子をコードしており（系統的命名法では *pou5f1*），初期胚細胞や胚性幹細胞（ES 細胞）の未分化状態，多能性の維持に必須の遺伝子であると考えられている。*oct4* は初期卵割ですべての割球の核に発現しており，やがてその発現は内部細胞塊に限定されるようになる。実際，内部細胞塊の多能性は Oct4 を含む 3 つの転写因子（Oct4, Sox2, Nanog）によって維持される（Boyer et al., 2005）。また，ES 細胞においても，Oct4, Sox2, Nanog が協調して多能性を維持するための遺伝子群を活性化し，分化につながるタンパク質をコードする遺伝子を抑制することが示唆されている（Marson et al., 2008 ; Young, 2011）。さらに，前述したように *oct4* は *klf4*, *sox2*, *c-myc* とともに体細胞のリプログラミングによる人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の作製でも重要である（Yamanaka, 2008）。この際には，*oct4* と *sox2* は多能性の確立に働き，分化を阻害する Nanog などの転写因子遺伝子を活性化する一方，*klf4* は細胞死の抑制に働き，*c-myc* はクロマチン構造を緩めて Oct4, Sox2, Nanog のアクセスを容易にすることが知られる（Nishikawa et al., 2008）。

POU 転写因子は動物界で広く分布しており，PouI から PouVI までの 6 グループに分類されるが，PouV グループは脊椎動物のみで知られる（David et al., 2014）。主要な PouV 型転写因子としては，Oct4 に代表される Pou5f1 型に加え，Pou5f3 型が知られる。最も原始的な有顎類である軟骨魚において既に *pou5f1* と *pou5f3* が存在するが，その後の進化では，脊椎動物の各系統ごとに保持される遺伝子が異なる（Frankenberg & Renfree, 2013）。シーラカンス，両生類（有尾類），爬虫類（カメ），有袋類，単孔類はこれら 2 遺伝子を両方現在でも保有するが，哺乳類の真獣類や爬虫類（ヘビ，トカゲ）は *pou5f1* のみを受け継いでおり，魚類（真骨魚を初めとする条鰭類），鳥類，両生類（無尾類）は現在 *pou5f3* のみを持っている（Frankenberg & Renfree, 2013）。両生類の場合，*Xenopus* では 3 種の *pou5f3* 型遺伝子が同定されており（*pou5f3.1*, *pou5f3.2*, *pou5f3.3*），進化の過程では比較的最近にさらに重複したものと考えられている。*pou5f3.1* と *pou5f3.2* は初期の原腸胚の段階から胚性遺伝子として活性化され，その発現は尾芽の段階まで続くのに対し，*pou5f3.3* は母性発現を示し，その転写産物は原腸胚の段階で消失するなど，subfunctionalization が起きているといえる（Nishitani et al., 2015）。

ゼブラフィッシュ *pou5f3* は当初 PouIII/PouV 相同遺伝子として同定され，発現や機能の解析が行われた（Takeda et al., 1994 ; Hauptmann & Gerster, 1995）。この遺伝子は，胚発生初期では胚全体で母性発現を示すが，原腸形成終了期から初期体節形成期にかけて，発現が局在していき，前・中脳中軸領域，後脳の第 1/2 および第 4 菱脳節領域，後脳とその後方神経板の中軸部位，そして尾芽領域において，主としてプロニューラルクラスター周辺で見られる（Inomata et al., 2019）。体節形成中期以降になると，発現は頭部では消失し，胴尾部の伸長が進行する期間，神経管後端でのみ継続的にみられる。

その後，大規模変異体スクリーニングにより同定された峡谷欠損変異 *spiel-ohne grenzen*



(*spg*, Schier et al., 1996)の原因遺伝子が *pou5f3* であることが明らかとなった (Belting et al., 2001; Burgess et al., 2002). *spg* 変異体を用いた発生遺伝学的解析から, *pou5f3* は, 中脳後脳境界 (MHB: Midbrain-Hindbrain Boundary) の形成や後脳の領域化のみならず (Belting et al., 2001; Burgess et al., 2002; Hauptmann et al., 2002; Reim & Brand 2002), 初期胚での背腹軸の決定, 内胚葉の形成, そして原腸形成など (Lunde et al., 2004; Reim et al., 2004; Reim & Brand 2006), 様々な発生過程を制御することが示唆されている. 特に注目すべきは *spg* 変異体において尾部の伸張不全が観察されていることであり (Burgess et al., 2002), このことから *pou5f3* が胴尾部の伸張に重要であることが予測された.

一方, Khan らは, Pou5f3 の胚での役割を検討することを目的として, ショウジョウバエ Engrailed の転写抑制領域 (EnR) を融合させた *pou5f3* キメラ遺伝子 (*en-pou5f3*) を *hsp70l* 由来 heat shock promoter (hsp) 制御下に置き (Hsp-En-Pou5f3, *en-pou5f3*), これをゼブラフィッシュゲノムに導入した [*Tg(hsp70l:en-pou5f3)*; Khan et al., 2012a, 2012b]. Pou5f3 は転写活性化因子と考えられるため (Khan et al., 2012a; Kobayashi et al., 2018), この Transgenic (Tg) 系統の胚では, 加温処理で *en-pou5f3* を誘導することにより, 内在 Pou5f3 転写因子の機能をドミナントに阻害することが可能である (Khan et al., 2012a). 実際, これを用いた一連の解析の結果, *pou5f3* は卵割期から初期体節形成期にかけての特定発生段階ごとに, 中内胚葉分化, 背腹軸決定, 収斂伸長運動など, 異なる発生過程の制御に関わることが明らかとなったが (Khan et al., 2012a, 2012b), この研究の過程で, Pou5f3 が体節形成期においては胴尾部形成を制御することが示唆された (Khan et al., 2012b).

これらのことから, ゼブラフィッシュ *pou5f3* 遺伝子は, 胴尾部の伸張が進行する体節形成期において, 尾芽での存在が予想される多分化能細胞の維持, あるいは尾芽幹細胞の中胚葉性組織や神経性組織への分化において機能することが予想された. こうした状況を受け, 本研究では, 尾芽幹細胞の維持と分化のしくみの遺伝子機構を, Pou5f3 に焦点を当てて明らかにすることを目的とした.

## 材料と方法

### 実験動物

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*; RW 系統) の成魚は, 水温約 27°Cにおいて, 明期 14 時間-暗期 10 時間の明暗サイクルの下で飼育した. ゼブラフィッシュの胚を得る際は, 明期終了の約 2-3 時間前にガラス球を敷いた交配用水槽へ雌雄魚を数匹ずつ移し, 翌朝, 点灯から 1-2 時間後にサイフォンと網を用いて胚を回収した. こうして回収した胚は 25°C, 28°C, または 32°Cで飼育した. 発生段階については受精後の時間 (hours post-fertilization, hpf), または Kimmel らにしたがって表記する (Kimmel et al., 1995). なお, prim-5 期以降で観察を行う際は, 必要に応じて 1-phenyl-2-thiourea (PTU, Nacalai Tesque; 最終濃度 0.03 mg/mL) を飼育水に添加し, メラニン合成を阻害した.

成魚や胚の扱いについては, 埼玉大学動物実験委員会の承認を得た上で, 埼玉大学動物実験規則に従って行った.

### 用いた Transgenic (Tg) 魚及び変異体系統

加温誘導性の抑制型 Pou5f3 タンパク質遺伝子 *hsp70l:en-pou5f3* (旧称 *hsp70l:EnR-pou24N*, 以下 *en-pou5f3*) をゲノムに持つ Tg 系統魚 (*Tg(hsp70l:en-pou5f3)*) はヘミ接合体として維持した (岡本, 2003; 田井, 2004). 継代にあたっては, 胚の飼育は 25°Cで行い, 成魚は飼育温度を通常より低めに設定したうえで, 野生型魚と同様明期 14 時間-暗期 10 時間の条件下で飼育した.

本研究において TALEN 法により作製した *sox3* 変異体魚および CRISPR/Cas9 法で作製した *sox19a* 変異体魚についてはいずれもヘテロ接合体として維持した. 継代にあたって, 胚の飼育は 28.5°Cで行い, 成魚は飼育温度を通常どおりに設定したうえで, 野生型魚と同様明期 14 時間-暗期 10 時間の条件下で飼育した. 一方, 所属研究室ではやはり CRISPR/Cas9 法により *pou5f3* 変異体魚が作製されており (佐藤, 2018), この系統もヘテロ接合体として 28.5°Cで維持した.

### 基本的な遺伝子工学的手法

大腸菌の培養, plasmid の調製, トランスフォーメーション, 核酸の電気泳動など, 一般的な遺伝子工学的手法については, 基本的に Sambrook らに従った (Sambrook et al., 1989). Polymerase chain reaction (PCR) については, 特に言及がない場合, 研究室で調製した Taq polymerase を用いた.

### Agarose ゲル電気泳動による DNA 断片の分離

Agarose ゲル電気泳動により分離した DNA 断片の抽出については, AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (250)を用いて行った. 実際の手法としては, まず目的のバンドを agarose

ゲルからカミソリを用いて切り出し、1.5 mL チューブに回収した。続いて、回収したゲルの重さを測定し、ゲルの重さの3倍量(1 gに3 mL)のDE-A溶液(キット付属)を加え、チューブを75°Cで2分間加熱した。その後、vortexを行ってから、再びチューブを75°Cで2分間加熱し、再度vortexを行い、ゲルを溶液に完全に溶かした。続いて、DE-Aの半量のDE-B溶液(キット付属)を加え、チューブ中の全量を2 mL チューブにセットしたカラムに加え、14,000 rpm、室温で1分間遠心した。落下液を捨てた上、500 µL buffer w1(キット付属)をカラムに加え、室温、14,000 rpmで1分間遠心した。その後、落下液を捨て、600 µL buffer w2(キット付属)をカラムに加え、室温、14,000 rpmで30秒間遠心した。落下液を除去した上で再度カラムを同様にbuffer w2で洗浄し、遠心後の落下液を除去後、カラム内の液を切るためにそのまま再度室温、14,000 rpmで1分間遠心した。続いて、カラムを新しい1.5 mL チューブに移し、これに10 mM Tris-HCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH8.0 (TE)を20 µL加え、5分間室温で静置した後、室温、14,000 rpmで1分間遠心することでDNA断片の溶出を行った。

#### DNA断片のベクターへの組み込みとクローニング

DNA断片のベクターへの組み込みにはTaKaRa DNA ligation Kit ver2.1を用いた。反応時は、DNA断片と直鎖化プラスミド断片(5~10 ng)をモル比5:1となるように混合し、Kit添付のsolution Iを5 µL加え、滅菌Milli-Q水(Merck-Millipore)(以下MQ水)またはTEで総液量を10 µLとし、16°Cで2時間静置した。その後、この混合液にkit solution IIIを1 µL加え、competent cell (DH5 $\alpha$ )を25~75 µL加えて氷上で30分間静置した上、42°Cで45秒間加熱し、直ちに氷上で3分間冷却した。この菌液を、50 mg/mL ampicillin液(50 µL)塗布済みのLBプレートに広げ、37°Cで一晩インキュベートし、コロニーを得た。

#### cDNAの合成に用いるゼブラフィッシュ胚RNAの抽出

cDNA クローニングの対象とする遺伝子が発現している発生段階のゼブラフィッシュ胚を20~30個ずつ1.5 mL チューブに移し、飼育水を取り除いたのち、1 mL ISOGEN(Wako)を加えてvortexし、さらに針とシリンジを用いて胚を完全に破碎した。室温で5分間放置した後、chloroformを200 µL加えてvortexし、さらに室温で2分間放置した上、14,000 rpm、4°Cで15分間遠心した。遠心終了後、上層を新しい1.5 mL チューブに移し、isopropanolを0.8倍量加えて混和した上、室温で5分間静置し、14,000 rpm、4°Cで10分間遠心した。上清を取り除いた後、ペレットに70% ethanolを1 mL加え、14,000 rpm、4°Cで5分間遠心した。上清を取り除き、ペレットを10分間程度室温で風乾したのち、40 µL MQ水に溶解した。得られた全RNA液の濃度はBioSpec-nano(Shimadzu)を用いて測定した。

#### cDNAの合成

精製した胚由来全 RNA (約 500 ng, 3  $\mu$ L) に 6  $\mu$ L 2.5 mM dNTP mix (Roche), 4  $\mu$ L 5x FS バッファー (Invitrogen), 2  $\mu$ L 0.1 M dithiothreitol (DTT, Invitrogen), 2  $\mu$ L 20 mM oligo-dT primer (Invitrogen) を加えて混和し, 70°C で 5 分間加熱処理した. これを室温に戻し, 1  $\mu$ L RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ L, TOYOBO) と 2  $\mu$ L M-MLV (200 U/ $\mu$ L, Invitrogen) を加え, 37°C で 1 時間保温した. 反応後, 98°C で 5 分間加温して酵素を失活させ, ethanol 沈殿により, cDNA を回収した.

#### 遺伝子 cDNA の増幅とクローニング

特定の遺伝子に対する cDNA の増幅については PrimeSTAR GXL Polymerase (TaKaRa), または KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を用いた.

前者の場合, 上述のように調製した cDNA 液 2  $\mu$ L に, 10  $\mu$ L 5x PrimeSTAR GXL Buffer (TaKaRa), 4  $\mu$ L 2.5 mM dNTP Mixture (TaKaRa), そして 1  $\mu$ L PrimeSTAR GXL Polymerase (1.25 U/ $\mu$ L) を加え, 増幅すべき遺伝子に対するプライマー対 (Table 1A) の 100 pmole/ $\mu$ L 液を各々 1  $\mu$ L ずつ加えた後, PCR を行った [95°C, 1 分間; 95°C, 30 秒間-54°C~60°C, 30 秒間-68°C, 1~2 分間 (30 cycle); 68°C, 5 分間].

KOD-Plus-Neo を用いる場合は, 調製した cDNA 液 2  $\mu$ L に, 5  $\mu$ L 10x PCR Buffer for KOD-Plus-Neo (TOYOBO), 5  $\mu$ L 2 mM dNTPs (TOYOBO), 3  $\mu$ L 25 mM MgSO<sub>4</sub> (TOYOBO), 1  $\mu$ L KOD-Plus-Neo (1 U/ $\mu$ L) を加え, 増幅すべき遺伝子に対するプライマー対 (Table 1A) の液を各々 1  $\mu$ L (100 pmole/ $\mu$ L) ずつ加えた後, PCR を行った [94°C, 2 分間; 98°C, 10 秒間-54°C~63°C, 30 秒間-68°C, 1~2 分間 (30 cycle); 68°C, 5 分間].

以上のように増幅された PCR 断片は, プライマーの 5'末端にある制限配列タグと対応する制限酵素で消化した後 (Table 1A), 同じ制限酵素で処理した pCS2+に組み込み, 前述のように大腸菌に導入してコロニーを得た.

#### コロニーPCR 法によるプラスミドへの DNA 断片の組み込みの確認

出現したコロニーについて, 目的の挿入配列を保有しているかどうかをコロニーPCR 法によって確認した. まず, MQ 水を 10  $\mu$ L ずつマイクロチューブに分注し, これに出現したコロニーを個別に拾って移し, 懸濁した. この懸濁液 1  $\mu$ L に, あらかじめ調製した PCR カクテル (1 クローンあたり以下の液を混合; 2  $\mu$ L 5x Green Go Taq buffer, 1  $\mu$ L 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ L 2.5 mM dNTP mix, 0.05  $\mu$ L x2 100 mM primers, 5.3  $\mu$ L MQ 水, 0.1  $\mu$ L Taq polymerase) 9  $\mu$ L を加え, PCR を行った [95°C, 7 分間; 95°C, 30 秒間-54°C~60°C, 30 秒間-72°C, 1~2 分間 (28 cycle); 72°C, 5 分間]. 反応後, 得られた増幅産物を 1% agarose ゲルで電気泳動し, 目的の cDNA 断片が組み込まれているかどうかを確認した.

#### 高純度プラスミドの精製

高純度のプラスミドを精製する場合、適切な抗生物質（最終濃度 50-100 µg/mL）を含む 3 mL LB 液体培地（10 g/L polypeptone, 10 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl）にプラスミドを取り込んだ大腸菌のシングルコロニーを植菌し、37°Cで一晩振とう培養した。翌朝、1.5 mL マイクロチューブに約 1.5 mL 大腸菌懸濁液を移し、室温、14000 rpm で 3 分間遠心した。上清を除去した上で残りの懸濁液を加え、同様に遠心した上で上清を除いた。以下、高純度のプラスミドを精製する場合、NucleoSpin Plasmid QuickPure (TaKaRa)または FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN) を用いた。

NucleoSpin の場合、得られたペレットに 250 µL A1 Buffer を加え、vortex により大腸菌を懸濁した後、250 µL A2 Buffer を加えて 7 回ゆっくり転倒混和した。これに 300 µL A3 Buffer を加えてさらに混和し、室温、14000 rpm で 3 分間遠心した。一方、NucleoSpin 付属のカラムと 2 mL のマイクロチューブを必要数用意し、カラムを 2 mL チューブに装着した上で上清をカラムに加え、室温、14000 rpm で 3 分間遠心した。落下液を捨てた上、450 µL AQ Buffer をカラムに加え、室温、14000 rpm で 3 分間遠心して洗浄した。その後、カラムを新しいマイクロチューブに移した上、カラムのゲル表面の中央に 50 µL 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (Tris-EDTA Buffer, TE)を加えて 1 分間静置し、室温、14000 rpm で 3 分間遠心することでプラスミド DNA を溶出させた。

FavorPrep の場合、得られたペレットに 250 µL FAPD1 Buffer を加え、ピペッティングにより大腸菌を懸濁した後、250 µL FAPD2 Buffer を加えて 7 回ゆっくり転倒混和した。混和後 2~5 分室温で静置したうえ、これに 350 µL FAPD3 Buffer を加えてさらに混和し、室温、14000 rpm で 10 分間遠心した。一方、FavorPrep 付属のカラムと付属のマイクロチューブを必要数用意し、カラムを付属のチューブに装着した上で上清をカラムに加え、室温、14000 rpm で 30 秒間遠心した。落下液を捨てた上、400 µL W1 Buffer をカラムに加え、室温、14000 rpm で 30 秒間遠心した。さらに、落下液を捨てた上、700 µL Wash Buffer をカラムに加え、室温、14000 rpm で 30 秒間遠心して洗浄した。落下液を捨てた上、室温、14000 rpm で 3 分間遠心することでカラム内の液を除去した。その後、カラムを新しいマイクロチューブに移した上、カラムのゲル表面の中央に 50 µL 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (Tris-EDTA Buffer, TE)を加えて 1 分間静置し、室温、14000 rpm で 1 分間遠心することでプラスミド DNA を溶出させた。

#### アルカリ SDS 法によるプラスミド DNA の精製

通常のプラスミドの精製ではアルカリ sodium dodecyl sulfate (SDS) 法を用いた (Sambrook et al., 1989)。まず、plasmid を取り込んだ大腸菌のシングルコロニーを上述したように 3 mL LB 培地に植菌して 37°Cで一晩振とう培養した。翌朝、1.5 mL マイクロチューブに約 1.5 mL 大腸菌懸濁液を移し、室温、14000 rpm で 3 分間遠心した。上清を除去した上で残りの懸濁液を加え、同様に遠心した。得られたペレットに 100 µL の氷冷した Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)を加え、大腸菌を

懸濁した後、用時調製した 200  $\mu$ L の Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS)を加えて、10 回程度転倒混和を行った。そこに氷冷した 150  $\mu$ L Solution III (3 M potassium acetate, 5 M acetic acid)を加え、チューブを逆向きにした状態で 10 秒間 vortex し、氷上に 5 分間静置した。その後、4°C, 14000 rpm で 5 分間遠心し、新しい 1.5 mL マイクロチューブに回収した上清に 450  $\mu$ L の isopropanol を加えて混合した上、氷上に 5 分間静置した。続いて、4°C, 14000 rpm で 5 分間遠心し、得られたペレットを TE に溶かし、さらに 0.5  $\mu$ L の 10 mg/mL RNase (Ribonuclease A from bovine pancreas, SIGMA, 最終濃度 50  $\mu$ g/mL)を加えて、37°C で 30~60 分間反応させた。これに 100  $\mu$ L の 2.5 M NaCl, 20% polyethylene glycol (PEG)を加えて、vortex し、氷上に 30~60 分間静置してから、4°C, 14000 rpm で 10 分間遠心した。得られたペレットを 100  $\mu$ L TE に溶かし、さらに 100  $\mu$ L の Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol (25: 24: 1, P/C/I)を加えてよく混合し、室温, 14000 rpm で 5 分間遠心して、得られた上清を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移した。回収した上清に 10  $\mu$ L 3 M sodium acetate, pH 5.2, 250  $\mu$ L 99.5% ethanol を加えて混合し、-20°C で 30 分間以上静置した。その後、4°C, 14000 rpm で 15 分間遠心し、得られた沈殿を 70% ethanol で洗浄後、50  $\mu$ L TE にプラスミド DNA を溶かした。

#### シーケンス反応

精製プラスミドについて、その構造を確認するためにシーケンス反応を行った。配列を確認したいプラスミド (DNA 200-300 ng) に 3.75  $\mu$ L 5x Big Dye Sequencing buffer, 0.5  $\mu$ L Ready Reaction Mix, 1.0  $\mu$ L sequence primer を加え、MQ 水で 20  $\mu$ L にメスアップした。これを PCR で増幅 (96°C, 1 分間 ; 96°C, 10 秒 – 50°C, 5 秒 – 60°C, 2 分間; 25 cycle ; 16°C) した後、5  $\mu$ L 125 mM EDTA, pH 8.0 と 60  $\mu$ L 99.5% ethanol を加え、vortex した上で室温において 25 分間遠心した。得られたペレットに 200  $\mu$ L 70% ethanol を加え、室温で 10 分間遠心した後、上清を除去し、風乾した。これに 25  $\mu$ L Hi-Di Formamide を加えて vortex した後、95°C で 3 分間加熱し、氷冷した上で ABI-3130 (Applied Biosystems) を使ってシーケンスを決定した。

#### Direct sequencing

TALEN 法または CRISPR/Cas9 法で変異を導入した胚、あるいは成魚から、Hot shot 法でゲノム DNA を抽出したうえ、抽出液 3  $\mu$ L を鋳型とし、HMA で用いたプライマーセットにより同様に変異部位を PCR で増幅した (反応液 ; 50  $\mu$ L)。

得られた PCR 産物は、PCR Clean-Up Mini Kit (FAVORGEN)を用いて以下のように精製した。まず、得られた PCR 産物を 1.5 mL チューブに移し、5 倍量の FAPC Buffer を加えて vortex で混和した上、コレクションチューブ (キット付属) に装着した FAPC カラム (キット付属) に全量アプライし、14,000 rpm で 1 分間遠心した。ろ液を除去し、FAPC カラムに Wash Buffer (キット付属) を 600  $\mu$ L アプライし、14,000 rpm で 1 分間遠心し

ろ液を除去し、さらに 14,000 rpm で 3 分間遠心することでカラム中に残った液を除去した。このカラムを 1.5 mL チューブ（キット付属）に装着し、40  $\mu$ L の TE2 を FAPC カラムの膜中央へアプライし、2 分間静置した。その後、14,000 rpm で 1 分間遠心し、DNA を溶出した。

こうして得られた精製 DNA 断片液 5  $\mu$ L を鋳型として、上述のように配列決定を行った。得られたシーケンスデータでは野生型のゲノム由来の波形と変異体ゲノム由来の波形が重なって表示されるため、野生型由来の波形を目視で除くことで、変異体の配列を決定した。

### Heat shock による転写抑制型 Pou5f3 遺伝子 (*en-pou5f3*) の誘導

転写抑制型 Pou5f3 遺伝子の誘導実験においては、まず *en-pou5f3* をヘミ接合体として保有する *Tg(hsp70l:en-pou5f3)* 魚 (*en-pou5f3<sup>+/+</sup>* 魚) と野生型魚を交配し、得られた子孫ヘミ接合体胚を後期原腸胚期あるいは体節形成期まで発生させた後、water bath 中で 37°C において 60 分間加温処理した。加温処理直後に死亡した胚は除去し、生存胚は 28.5°C の環境に戻して培養を続けた上、任意の発生段階において *en-pou5f3* 誘導の効果を形態レベル、遺伝子レベルで検討した。なお、加温誘導直後に死亡する胚の割合は通常 2% 以下であった。

### 体節形成期における *en-pou5f3* 誘導の形態的効果の経時的な検討

*en-pou5f3* をヘミ接合体として保有する Tg 魚 (*en-pou5f3<sup>+/+</sup>* 魚) と野生型魚を交配し、得られた子孫胚について、後期原腸胚期から体節形成期にかけての異なる時期で、前述したように heat shock 処理をした。処理胚の 24 hpf での形態により、観察した胚を野生型、峡部異常、峡部欠損、心臓異常、胴尾部異常に分類し、その数を計測した。胴尾部については、異常が観察されなかったものを TTB- (TTB, Trunk- Tail Bending)、第 20 体節より後方で尾部の屈曲が観察されたものを TTB+、第 15 体節から第 19 体節の間で尾部の屈曲が観察されたものを TTB++, 第 14 体節より前方で胴尾部の屈曲が観察されたものを TTB+++ と分類し、その胚を計数した。

### Whole mount in situ hybridization (WISH) 法

胚内における遺伝子の発現を調べるために、基本的に Schulte-Merker らの方法にしたがって WISH を行った (Schulte-Merker et al., 1992)。

#### (1) プローブの Digoxigenin (DIG) 標識

DIG 標識 RNA プローブの合成は、RNA transcription kit (STRATAGENE) と Digoxigenin RNA labeling mix (Roche) を用いて以下のように行った。まず、鋳型となる cDNA プラスミドを cDNA の 5' 側上流にある制限部位で切断した上、溶液 100  $\mu$ L に対して、10  $\mu$ L 10% SDS, 2.5  $\mu$ L Proteinase K を加え、37°C で 1 時間保温した。得られた Proteinase

K 処理済みの直鎖化プラスミド DNA 1  $\mu\text{g}$  に 2  $\mu\text{L}$  10 x transcription buffer (Roche) を加え、さらに 2  $\mu\text{L}$  10 x DIG RNA labeling mix, 1  $\mu\text{L}$  RNase inhibitor (40 U/ $\mu\text{L}$ , TOYOBO), 1  $\mu\text{L}$  RNA polymerase を加えて混合し、滅菌 RNase-free 水 (オートクレーブを行った MQ 水を RNA グレードで使用) で総量を 20  $\mu\text{L}$  とした後、37°C で 2-3 時間保温した。これに 1  $\mu\text{L}$  RNase-free DNaseI (Ambion) を加えて 37°C で保温し、2  $\mu\text{L}$  0.5 M EDTA, pH8.0, 2.5  $\mu\text{L}$  4 M LiCl, 75  $\mu\text{L}$  99.5% ethanol を加えて -20°C で 30 分以上冷却した。さらに、4°C, 14,000rpm で 15 分間遠心して RNA を回収し、70% ethanol で洗浄した上、風乾を行い、最終的に 50  $\mu\text{L}$  もしくは 100  $\mu\text{L}$  の MQ 水にペレットを溶かした。なお、用いた RNA polymerase は、T7 RNA polymerase (50 U/ $\mu\text{L}$ , STRATEGENE), または SP6 RNA polymerase (50 U/ $\mu\text{L}$ , STRATEGENE) である。合成したプローブのサイズ確認と濃度測定については、1% agarose ゲルで電気泳動と BioSpec-nano (Shimadzu) で行った。

## (2) 胚の固定

ゼブラフィッシュ胚を 4% paraformaldehyde/137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (phosphate-buffered saline, PBS) 中で 4°C において一晩固定し、卵殻をピンセットで除去した。その後、100% methanol に置換し、使用時まで -20°C で保存した。なお、24 hpf 以降の胚については固定前にピンセットを用いて卵殻を除去した。

## (3) ハイブリダイゼーション

100% methanol 中に保存した固定胚をそのままの状態でいったん室温に戻し、引き続いて以下の操作を室温で行った。まず、固定胚を 50% methanol/PBST (0.1% Tween-20 in PBS) に 5 分間浸し、その後 PBST で 5 分間ずつ 2 度洗浄した。なお、24 hpf 以降の胚の場合、さらに 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Proteinase K/PBST により 3 分間処理し、その後 4% paraformaldehyde/PBS による 20 分間の再固定、PBST による 5 分間ずつ 2 度の洗浄を行った。

引き続き、固定胚に 300  $\mu\text{L}$  hybridization buffer [50% formamide, 5 x SSC (SSC; 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), 0.1% Tween-20, 5 mg/mL yeast RNA, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  heparin] を加え、65°C で 1 時間保温した (プレハイブリダイゼーション)。その後、プローブ (0.1-0.5 ng/ $\mu\text{L}$ ) を含む 250  $\mu\text{L}$  hybridization buffer に置換し、65°C で一晩保温した。なお、プローブは hybridization buffer 中において予め 68°C で 15 分間加熱して用いた。翌日 hybridization buffer を除去し、50% formamide/2 x SSCT (0.1% Tween-20 in 2 x SSC) 中で 20 分間ずつ 2 回、2 x SSCT 中で 15 分間、0.2 x SSCT 中で 25 分間ずつ 2 回洗浄した。これらの操作は全て 65°C で行った。

## (4) 抗体処理及び発色反応

0.2 x SSCT を除去し、固定胚に blocking solution [1% blocking reagent (Roche) in



MABT (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH7.5)]を加え、室温で1時間処理した。その後、AP-抗 DIG 抗体 (Anti-Digoxigenin-AP-Fab fragments, Roche)を blocking solution で 5000 倍に希釈して加え、4℃で一晩反応させた。翌日抗体液を除いた上、固定胚を室温において MABT で 15 分間ずつ 6 度洗浄した。

発色反応は BCIP-NBT 発色キット (Nacalai Tesque) を用いて以下のように行った。まず、staining buffer (100 mM Tris-HCl, pH9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20) により胚を室温で 5 分間ずつ 2 度洗浄し、500 μL 発色液に移した上、遮光条件下で室温または 37℃において 1-3 時間発色反応させた。十分発色が得られたことを確認した上、胚を PBST で 2 回洗浄し、500 μL 0.1 M glycine-HCl, pH2.2 で 20 分間処理し、発色を停止した。処理胚を 30% glycerol, 50% glycerol, 75% glycerol に段階的に置換して胚を透明化し、顕微鏡観察及び写真撮影を行った。なお、染色胚は 75% glycerol 中で 4℃にて保存した。

### Two-color WISH 法

2 種の遺伝子の発現を染め分ける場合、各々を DIG 標識プローブと fluorescein 標識プローブで検出した。

#### (1) fluorescein 標識プローブの調製

基本的には DIG 標識プローブと同様、RNA transcription kit (STRATAGENE)と Fluorescein RNA labeling mix (Roche)を用い、T7 RNA polymerase (50 U/μL STRATAGENE)または SP6 RNA polymerase (50 U/μL STRATAGENE)により、fluorescein 標識プローブを以下のように合成した。

まず、前述したように鋳型 plasmid を cDNA の 5'側にある制限部位で切断して直鎖化し、Proteinase K 処理を行った。得られた鋳型 plasmid DNA 1 μg に、2 μL 10 x transcription buffer (Roche)を加え、さらに 2 μL 10 x Fluorescein RNA labeling mix, 1 μL RNase inhibitor (40 U/μL, TOYOBO), 1 μL RNA polymerase を加えて混合し、滅菌 RNase-free 水 (オートクレーブを行った MQ 水を RNA グレードで使用)で総量を 20 μL とした後、37℃で 2-3 時間保温した。これに 1 μL RNase-free DNaseI (Ambion)を加えて 37℃で保温し、2 μL 0.5 M EDTA, pH8.0, 2.5 μL 4 M LiCl, 75 μL 99.5% ethanol を加えて -20℃で 30 分間以上冷却した。さらに、4℃, 14,000rpm で 15 分間遠心して RNA を回収し、70% ethanol で洗浄した上、風乾を行い、最終的に 50 μL の MQ 水にペレットを溶かした。合成したプローブのサイズ確認と濃度測定については、1% agarose ゲルで電気泳動と BioSpec-nano (Shimadzu) を用いて行った。

#### (2) ハイブリダイゼーションと染色

基本的には前述したようにハイブリダイゼーション処理を行った。まず、固定胚を hybridization buffer 中で 65℃において1時間加温した上(プレハイブリダイゼーション),

加熱変性した DIG 標識プローブと fluorescein 標識プローブを加え（各々0.1-0.5 ng/μL），65℃でさらに一晩反応させた．翌日，50% formamide/2 x SSCT，2 x SSCT，0.2 x SSCT で胚を順次洗浄し，MABT を加えて室温で 5 分間処理した後，blocking solution を加えて室温で 1 時間静置した．その後，AP-抗 Fluorescein 抗体液（Anti-Fluorescein-AP Fab fragment, Roche を blocking solution で 5000 倍に希釈）を加えて 4℃で一晩抗体処理した．翌日抗体液を除き，固定胚を MABT で室温にて 15 分間ずつ 6 度洗浄した．

引き続き，胚を以下のように Fast-Red で染色した．Fast-Red staining buffer（100 mM Tris-HCl, pH 8.2, 0.1% Tween-20）により，胚を室温にて 5 分間ずつ 2 度洗浄した．得られた胚を，Fast red staining solution（one Fast red tablet and one Fast red staining buffer in 1 mL MQ 水）500 μL に移し，室温または 37℃で 10 分~3 時間発色反応させた．発色を確認した上，胚を PBST で 2 回洗浄し，500 μL 0.1 M glycine-HCl, pH 2.2 で 30 分間以上処理することにより，発色の停止と AP-抗 Fluorescein 抗体の除去を行い，さらに PBST で 1 回，MABT で 1 回洗浄した．

引き続き，胚に blocking solution を加えて室温で 1 時間静置し，AP-抗 DIG 抗体液を加え，4℃で一晩静置した．翌日抗体液を除いた上，胚を MABT で室温にて 15 分間ずつ 6 度洗浄した．この胚について，前述したように BCIP-NBT 発色キットを用いた発色反応を行い，0.1 M glycine-HCl, pH 2.2 で発色を停止した．その後は前述したように 30% glycerol, 50% glycerol, 80% glycerol で段階的に置換して胚を透明化し，後述するように顕微鏡観察及び写真撮影を行った．

### Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法

2 種の遺伝子の発現領域を，各々 DIG 標識プローブと fluorescein 標識プローブ，Tyramide Signal Amplification Kits（#2 Alexa Fluor 488 及び#6 Alexa Fluor 647, Thermo Fisher Scientific Inc.）を用いて以下のように染色した．

まずゼブラフィッシュの固定胚について，前述のように DIG/fluorescein 標識 RNA プローブとのハイブリダイゼーションを行い，十分に胚を洗浄した．その後，blocking solution を用いて胚を処理し，Anti-Digoxigenin-POD antibody, Fab fragments (Roche)（1:1000 に希釈）を加えて緩やかに振とうしつつ一晩 4℃で反応させた．翌日，胚を MABT で 15 分間ずつ 4 回，PBST で 15 分 2 回ずつ洗浄した後，1 サンプルにつき 200 μL [0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を増幅緩衝液 1:200 に希釈) 2 μL, Alexa Fluor 647 Tyramide 原液 2 μL, 添付の増幅緩衝液を 196 μL] を加えて胚を室温で 3 時間処理した．この処理胚をさらに PBST で 5 分間ずつ 3 度洗浄した後，0.1 M glycine-HCl pH 2.2 中に移し，30 分間ずつ 2 回，振とうした．

引き続き，胚を MABT で 5 分間ずつ 2 度洗浄した上，blocking solution に置換し，室温で 1 時間振とうした．その後，Peroxidase-conjugated IgG Fraction Monoclonal Mouse Anti-Fluorescein (FITC, Jackson Immuno Research laboratories, Inc) を blocking

solution で 1:1000 に希釈した抗体液 1 mL に置換した上、さらに緩やかに振とうしつづ一晚 4℃ で反応させた。この胚を MABT で 15 分間ずつ 4 回、PBST で 15 分間ずつ 2 回洗浄した後、Alexa Fluor 488 Tyramide 原液を Alexa Fluor 647 Tyramide と同様に希釈して調製した反応液 200  $\mu$ L により室温において 3 時間処理した。この胚をさらに PBST で 5 分間ずつ 3 度洗浄した後、退色を防ぐため 2% 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), 50% glycerol 中に移し、観察まで 4℃ で保存した。

### FISH 染色胚の核染色

FISH 法により染色を行った胚について、Hoechst 33258, Pentahydrate (bis-Benzimide, Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて以下のように核染色を行った。

まず 2% 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), 50% glycerol 中の FISH 染色胚を、25% glycerol in PBST で 5 分間処理した。その後、PBST で 5 分間ずつ 2 回洗浄し、さらに MABT で 5 分間洗浄した上、1 mL 核染色液 (0.3  $\mu$ L 10 mg/mL Hoechst stock, 1 mL MABT) に移し、室温で 30 分間振とうした。これを PBST で 5 分間ずつ 3 回洗浄した上、退色を防ぐため 2% 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), 50% glycerol 中に移し、観察まで 4℃ で保存した。

### 胚からのゲノム DNA の抽出 (Hot Shot 法)

生体胚、あるいは染色胚を個別にマイクロチューブに移し、20  $\mu$ L の用時調製 50 mM NaOH を加えて 95℃ で 20 分間加熱した上、これを氷上で冷却し、1 M Tris-HCl, pH 8.0 を 1/10 量加えて混和し、中和した。これを遠心し、得られた上清をゲノム DNA 液として genotyping に用いた。

### *en-pou5f3* 配列を含む Tg 胚の genotyping

*en-pou5f3*<sup>+/+</sup> 魚と野生型魚を交配して得られた子孫胚は、50% が *en-pou5f3*<sup>+/+</sup>、残り 50% が *en-pou5f3*<sup>-/-</sup> (野生型 sibling) であると期待されるが、形態的に *en-pou5f3*<sup>+/+</sup> 胚を判別することはできない。そこで WISH 染色胚、あるいは生体胚から個別に Hot shot 法により DNA を抽出し、genotyping を行った (Khan et al., 2012a, 2012b)。

まず、胚から個別に得た DNA 液 1  $\mu$ L にあらかじめ調製した PCR カクテル (1 サンプルあたり 2  $\mu$ L 5x Green Go Taq buffer, 1  $\mu$ L 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ L 2.5 mM dNTP mix, 0.05  $\mu$ L x2 100  $\mu$ M primers, 5.3  $\mu$ L MQ 水, 0.1  $\mu$ L Taq polymerase) を 9  $\mu$ L 加えた上、PCR により、*en-pou5f3* に由来する配列 (201 bp) を増幅した [95℃, 3 分間 ; 95℃, 30 秒間 – 54℃, 30 秒間 – 72℃, 20 秒間 (33cycle) ; 72℃, 5 分間] (Eng-s, Pou2-as ; Table 1B)。なお、DNA 抽出に関する positive control として、ゼブラフィッシュ第 3 染色体上の配列 (fe37b04, 約 180 bp) も同時に増幅した [95℃, 3 分間 ; 95℃, 30 秒間 – 56℃, 30 秒間 – 72℃, 30 秒間 (33cycle) ; 72℃, 5 分間] (fe37b04-F, fe37b04-R ; Table 1B)。得ら

れた増幅 DNA を 2% agarose gel 電気泳動により検出することで *en-pou5f3* 保有胚と野生型 sibling 胚を同定した。

### TALEN のデザインと作製

変異導入すべき遺伝子 (*sox3*) のコード配列上に, Old TALEN Targeter (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen-old>) を用いて, 標的部位を 3 か所設定した。標的部位の選定に際しては, ターゲット遺伝子のコード領域内で N 末端に近く, 各 TALEN 結合領域のサイズが 16~20 モジュール, 結合配列間のスペーサー配列の長さが 12~16 bp となるものを検索した。

TALEN 法では一つの標的部位に対して Left TALEN と Right TALEN を設定するが, それぞれ複数のクラスターから成っており, クラスターは多数のモジュールから構成されている (Fig. 14B)。TALEN 作製において, モジュールからクラスターを作製するアセンブリー反応を STEP1, クラスターどうしを連結させて一つの TALEN 遺伝子を作製するアセンブリー反応を STEP2 とした。これらのアセンブリー反応については Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit” (Addgene) を用いて行った。

STEP1 では, マイクロチューブに 150 ng vector plasmid [pFUS-A2A, pFUS-A2B, pFUS-A3A, pFUS-A3B, pFUS-BX (1-6)], 150 ng 各モジュール plasmid (Table 3), 2  $\mu$ L T4 DNA Ligase Reaction Buffer (NEB), 1  $\mu$ L Quick ligase (NEB), 1  $\mu$ L *BsaI* を加え, MQ 水で全量 20  $\mu$ L とした上, STEP1 ligation 反応 [37°C, 5 分間–16°C, 10 分間 (10cycle); 37°C, 5 分間; 80°C, 5 分間] を行った。得られた ligation 反応液を宿主菌 (DH5 $\alpha$ ) にトランスフォームし, 40  $\mu$ L 20 mg/mL X-Gal (Wako), 8  $\mu$ L 20% isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Wako), 50  $\mu$ L 50 mg/mL spectinomycin (Wako) を塗布した LB プレート上で一晩培養した。生じたコロニーごとにコロニーPCR 反応を行い [95°C, 7 分間; 95°C, 30 秒間–54°C, 30 秒間–72°C, 40 秒間 (30cycle); 72°C, 5 分間] を行い, PCR 産物の 2% agarose 電気泳動の分離パターン (6 本のラダー状のバンドパターン) とシーケンス (Table 1C) によりクラスターの完成を確認した。

STEP2 では, マイクロチューブに 75 ng vector plasmid (pCS-TAL3-DD, pCS-TAL3-RR), 150 ng 各クラスター plasmid (Table 3), 2  $\mu$ L T4 buffer, 1  $\mu$ L Quick ligase, 1  $\mu$ L *BsmBI* を加え, MQ 水で全量 20  $\mu$ L とし, STEP2 ligation 反応 [37°C, 5 分間–16°C, 10 分間 (10cycle); 37°C, 5 分間; 80°C, 5 分間] を行った。得られた反応液を宿主菌 (DH5 $\alpha$ ) に導入し, 40  $\mu$ L 20 mg/mL X-Gal (Wako), 8  $\mu$ L 20% isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Wako), 50  $\mu$ L 50 mg/mL ampicillin (Wako) を塗布した LB プレート上で一晩培養した。生じたコロニーごとにコロニーPCR を行った上 [95°C, 7 分間; 95°C, 30 秒間–54°C, 30 秒間–72°C, 2 分間 (30cycle); 72°C, 5 分間], PCR 産物の電気泳動 (2% agarose) の分離パターン (約 2 kb のバンドと低分子量側でのラダー状のバンドパターン) とシーケンス (Table 1D) によりクラスターどうしの連結を確認し

た. STEP2 の確認としては, 完成した TALEN 遺伝子を *HindIII* によりプラスミドから切り出し, 1% agarose gel 電気泳動により確認した. この電気泳動では, アセンブリーが成功している場合, 約 4 kb と 3 kb の 2 本のバンドが期待された.

#### CRISPR/Cas9 法で用いる gRNA の設計と合成用鋳型コンストラクトの作製

変異導入の対象とする遺伝子 (*sox19a*) のコード配列上で, PAM 配列 (5'-NGG-3', アンチセンス鎖の場合 3'-CCN-5') を基準に標的部位 (23 bp) を CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>)により検討した. CRISPRdirect で表示された候補の中から作製する gRNA 配列を 2 種類選び (オフターゲット作用が低いと予想された配列), 各々について gRNA の配列の最初の 2 塩基を GG に替えたうえ, *BsmBI* の突出末端を付加したオリゴをデザインした (Table 1G). 合成したセンス鎖, アンチセンス鎖のオリゴ DNA (各々 50  $\mu$ M) を 0.2 mL PCR チューブに 1  $\mu$ L ずつ加え, さらに 10x アニーリングバッファー (400 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl) を 1  $\mu$ L, TE2 (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1 mM EDTA)を 7  $\mu$ L 加え, 95°C, 5 分間; 75°C, 25 分間; 60°C, 25 分間; 45°C, 20 分間; 35°C, 20 分間; 25°Cの温度条件で処理した. これによりアニールしたオリゴについては, 15% polyacrylamide gel (PAGE)で泳動してアニーリングを確認した.

引き続き, 新しい 0.2 mL PCR チューブに得られた 2 本鎖オリゴ液を 0.5  $\mu$ L, pT7-gRNA ベクターを 50 ng, 10x T4 DNA Ligase バッファーを 0.2  $\mu$ L, *BsmBI* (10 U/ $\mu$ L, NEB) を 0.1  $\mu$ L, Quick Ligase (NEB) を 0.1  $\mu$ L 加え, TE2 で総量を 2  $\mu$ L とし, サーマルサイクラーを用い, 37°C, 5 分間-16°C, 10 分間 (5 cycle); 4°Cの条件で反応させた. その後, チューブに 0.2  $\mu$ L 10x 3.1 バッファーと 0.1  $\mu$ L *BsmBI* を加え, 55°C, 45 分間; 80°C, 10 分間; 4°Cの条件で処理し, 反応液を大腸菌 (DH5 $\alpha$ ) にトランスフォームし, アンピシリンプレート上に広げて一晩培養した.

翌日, プレート上のコロニーを数個拾い, 各コロニーを 10  $\mu$ L MQ 水に懸濁した上, 以下のようにコロニーPCRを行った. まず, 0.2 mL PCR チューブにこの懸濁液を 0.5  $\mu$ L を加え, さらに, 1 サンプルあたり pT7-gRNA DNA を 0.5  $\mu$ L (50-100 ng), 5x Go Taq バッファーを 2.0  $\mu$ L, 25 mM MgCl<sub>2</sub> を 1.0  $\mu$ L, 2.5 mM dNTPs を 0.5  $\mu$ L, 5.0  $\mu$ M M13 forward primer を 1.0  $\mu$ L, 5.0  $\mu$ M M13 reverse primer を 1.0  $\mu$ L, Taq ポリメラーゼを 0.1  $\mu$ L, MQ 水を 3.5  $\mu$ L 加え, 95°C, 7 分間; 95°C, 30 秒間-57°C, 30 秒間-72°C, 20 秒間 (25cycle); 72°C, 1 分間; 95°C, 5 分間; 75°C, 10 分間, 55°C, 10 分間; 16°Cの条件で反応を行った. この PCR 産物を 4  $\mu$ L ずつ 2% Agarose ゲルで電気泳動し, gRNA 鋳型 DNA の挿入によって生じるシフトバンドを確認した. 確認されたコロニーについて, 3 mL の液体 LB 培地 (+3  $\mu$ L 50 mg/mL Amp) で一晩培養し, 培養液からプラスミドの抽出を行った. 抽出した plasmid については, M13 forward primer を用いたシーケンスにより構造を確認した.

### gRNA の合成

gRNA 合成用鋳型プラスミドを用い、gRNA の合成を MAXIscript® *In Vitro* Transcription Kit (Ambion) により以下のように行った。まず、*Bam*HI 消化と Proteinase K 処理で調製した 1 µg 直鎖化 gRNA 鋳型プラスミドに 2 µL 10x Transcription Buffer, 1 µL 10 mM ATP, 1 µL 10 mM CTP, 1 µL 10 mM GTP, 1 µL 10 mM UTP, 2 µL T7 Enzyme Mix (キットに付属) を加え、diethylpyrocarbonate 処理 MQ 水 (DEPC-MQ) で全量 20 µL とした。これを 37°C で 1 時間保温して転写反応を行った後、1 µL RNase-free DNaseI (ToYoBo) を加え、さらに 37°C で 15 分間保温した。その後、30 µL Nuclease-free Water と 5 µL 5 M ammonium acetate (MEGAscript SP6 kit に付属) を加えて vortex し、さらに 99.5% ethanol を 165 µL (3 倍量) 加えて vortex を行った上、-20°C で 30 分間以上静置した。その後、4°C, 14000 rpm で 15 分間遠心し、得られた沈殿を 70% ethanol で洗浄し、風乾後 50 µL DEPC-MQ に溶かした。このチューブに 5 µL 5 M ammonium acetate, 99.5% ethanol を 165 µL (3 倍量) 加え、vortex を行ってから -20°C で 30 分間以上静置した。これを 4°C, 14000 rpm で 15 分間遠心し、得られた沈殿を 70% ethanol で洗浄し、風乾後に 15 µL DEPC-MQ に溶かした。

### mRNA 合成

Cas9 を含めた本研究における mRNA の合成は全て、SP6 MEGAscript Kit (Ambion) を用いて行った。まず、*Not*I 消化と Proteinase K 処理した 2 µg 直鎖化鋳型 plasmid に 2 µL 10x reaction buffer, 2 µL 10x ATP, 2 µL 10x CTP, 2 µL 10x UTP, 2 µL 10x 1/5GTP, 2 µL CAP analog, 2 µL Enzyme Mix を加え、MQ で全量 20 µL とした。これを 37°C で 2 時間保温した後、1 µL RNase-free DNaseI (ToYoBo) を加え、さらに 37°C で 15 分間保温した。その後、30 µL Nuclease-free Water と 30 µL LiCl precipitation soln (いずれもキット付属) を加え、-20°C で 30 分間保存した上、4°C, 14,000 rpm で 20 分間遠心して沈殿を得た。これを 70% ethanol で洗浄し、20 µL MQ に溶かした。

### 顕微注入

顕微注入用の針として、専用ガラス管 (G-1, 1x 90mm, NARISHIGE) をマイクロピペット製作器 (PG-7, NARISHIGE) でキャピラリーとし、実体顕微鏡下で先端を剃刀で斜めに切断して用いた。この針の先端から phenol red 液 (最終濃度 0.1%, Gibco BRL) と混合した注入液を充填し、1-8 細胞期胚の割球の 1 つ、または卵黄に mRNA を 100 pg ずつ顕微注入した (1.4 nL/embryo)。

### Heteroduplex mobility assay (HMA) による変異導入の確認

TALEN 法及び CRISPR/Cas9 法による塩基の挿入、欠失を検出するために HMA を行った (Ota et al., 2013)。まず、TALEN mRNA または *Cas9* mRNA/gRNA を顕微注入した

胚の各々から、前述した Hot Shot 法により個別にゲノム DNA を抽出した。0.2 mL PCR チューブにこのゲノム DNA 液 1  $\mu$ L を加え、さらに、1 サンプルあたり 5x Go Taq バッファを 2.0  $\mu$ L, 25 mM MgCl<sub>2</sub> を 1.0  $\mu$ L, 2.5 mM dNTPs を 0.5  $\mu$ L, 変異導入部位の両側に結合するプライマー対 (Table 1E-F) を 1.0  $\mu$ L, Taq ポリメラーゼを 0.1  $\mu$ L, MQ 水を 3.5  $\mu$ L 加え、PCR [95°C, 1 分間 ; 95°C, 30 秒間—56-60°C, 30 秒間—72°C, 20 秒間 (30cycle) ; 72°C, 5 分間 ; 95°C, 3 分間 ; 75°C, 5 分間 ; 16°C] を行い、得られた増幅産物を 2% agarose/TBE ゲル,あるいは PAGE (15%または 5%) で電気泳動 (4°C, 200 V) した。

#### EGFP レポーターコンストラクトの *pou5f3* 上流へのノックイン

Heat shock promoter 制御下にある *egfp* 配列 (Hsp-*egfp*) を *pou5f3* 遺伝子上流にノックインするため、ラット由来外来配列 (Mbait) を Hsp-*egfp* の上流に配置したノックインプラスミド (pMbait-Hsp-*egfp*) を、*pou5f3* 上流に対する gRNA である *pou5f3*-5'-1 gRNA (Table 1G) とともに胚に導入した (大柳, 2021 ; Kimura et al., 2014)。

まず、7 ng/ $\mu$ L pMbait-Hsp-*egfp*, 7 ng/ $\mu$ L *pou5f3*-5'-1 gRNA, 7 ng/ $\mu$ L Mbait-gRNA, 150 ng/ $\mu$ L Cas9 mRNA を含む混合液を調製した。これに 1/20 量の Phenol Red を加え、受精卵に顕微注入した。その後、顕微注入胚について EGFP の蛍光の発現率をスコアリングした。

#### TALEN 法及び CRISPR/Cas9 法によって作製された変異体の交配実験と系統化

本研究では、TALEN mRNA または Cas9 mRNA/gRNA の顕微注入をゼブラフィッシュ胚に行い、この導入胚 (G<sub>0</sub> 胚) の一部について HMA による変異導入の確認を行った。G<sub>0</sub> 胚で変異導入が確認された場合、ゲノム抽出を行わなかった残りの胚をさらに飼育し、成魚となった段階 (G<sub>0</sub> 成魚) で fin clip と Hot shot 法により個別にゲノム DNA を抽出した。これを鋳型に再び HMA による変異導入の確認を行い、変異が確認された個体のみを成魚の状態で維持した。

この G<sub>0</sub> 成魚と野生型魚の交配を行い、得られた子孫胚 (G<sub>1</sub> 胚) の一部について、やはり Hot shot 法で抽出したゲノム DNA を用いて HMA による変異の有無についての確認を行った。変異が確認された G<sub>1</sub> 胚のゲノムについては、上述の Direct sequencing 法を用いて、変異部位のシーケンス解析を行い、実際にどのような変異が導入されたのかを検討した。

また、変異が確認された場合、残りの G<sub>1</sub> sibling 胚を飼育し、成魚となった段階 (G<sub>1</sub> 成魚) で、再び HMA による変異導入の確認と Direct sequencing 法による変異部位のシーケンス解析を行い、各 G<sub>1</sub> 成魚の変異の構造を確定した。

変異体の継代は、ヘテロ接合体魚と野生型魚を交配し、得られた子孫個体が成熟した段階で HMA により変異の有無を確認することで行った。

#### ERT2/tamoxifen 系による胚内での Pou5f3 転写因子の活性化

所属研究室で以前に作製された pCS2-pou5f3 プラスミド (中本, 2017) から *EcoRI/XbaI* 消化で *pou5f3* cDNA 配列を切り出し, これを, やはり以前に作製された pCS4-MCS-ERT2-p2A-mCherry (池田, 2017) の multicloning site (MCS) 内にある *EcoRI/XbaI* 部位に組み込んだ (pCS4-*pou5f3-ERT2-p2A-mCherry*). このプラスミドを鋳型 DNA として *pou5f3-ERT2* mRNA を合成し, 受精卵に顕微注射したうえ (400 pg/胚), この胚をさらに 28.5°C で培養した.

一方, 24-well plate (新品; Thermo, 144530) の各ウェルの底に 1% Agarose in 1/3 Ringer solution を薄く敷き (500  $\mu$ L), *pou2-ERT2* mRNA 注入胚を卵殻除去した上で移した (1 mL E3 飼育液/well). その後, 4-hydroxytamoxifen ストック液 (25 mM in ethanol) (4-OHT, SIGMA-ALDRICH) を 10 倍希釈した上, 各 well に 2  $\mu$ L ずつ (最終濃度: 5  $\mu$ M) 加え, 28.5°C において 2 時間遮光条件で培養した. その後直ちに胚を 4% paraformaldehyde で固定し, WISH または FISH による遺伝子発現解析を行った. 場合により, 処理液を速やかに回収した上で処理胚を傷つけないように 4-5 回洗浄し, 飼育水中で培養を続けた上, 24 hpf において, 生体胚の形状の観察を行った.

#### 薬剤処理実験

通常条件において 14 hpf まで培養した胚について, 100  $\mu$ M IWR-1 (ストック液; 20 mM, SIGMA; Wnt シグナル阻害剤), 20  $\mu$ M BIO (ストック液; 10 mM, CAYMAN CHEMICAL COMPANY; Wnt シグナル活性化剤), 50  $\mu$ M SU5402 (ストック液; 25 mM, Wako; FGF シグナル阻害剤), 20  $\mu$ M Dorsomorphin (ストック液; 5 mM, Wako; BMP シグナル阻害剤) により 18 hpf まで 28.5°C の条件で処理した. ストック液の溶媒は全て dimethyl sulfoxide (DMSO) であり, 対照胚は DMSO で同様に処理した (0.5%). なお, 処理時の飼育には E3 飼育液を用いた. 処理後, 4% paraformaldehyde により胚を固定し, WISH によって効果の検討を行った.

#### 顕微鏡観察と写真撮影

WISH で染色した胚は, glycerol 溶液ごとホールスライドガラスに取り, ブルーシートを背景とし, 落射照明を用いて蛍光実体顕微鏡 (Leica, MZFLIII) により観察した. 写真撮影には, 冷却 CCD カメラ (Pixera Pro500D) と iWorks 2.0 (Pixera), または冷却 CCD カメラ (Leica, DFC300FX) と Leica Application Suite Version 3.3.1 (Leica Microsystems[Switzerland] Limited.) を用いた.

生体胚の観察と写真撮影については, 卵殻を除去した上, 2% methylcellulose を加えたスライドガラスにマウントし, 透過照明を用いる他は WISH 染色胚と同様に行った.

FISH 染色胚については, まず 2% 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), 50% glycerol で置換した状態で卵黄を取り除いた. 一方, 新しい長形カバーガラス (24 mm x 60 mm, MICRO COVER GLASS 200Pcs., MATSUNAMI) に白色ワセリン (WaKo) またはシリコ



ーングリース・コンパウンド（東レ・ダウコーニング）を 2 本のストライプ状に塗ってスパーサーとし、これら 2 本のワセリンスパーサーの間に卵黄除去胚を移した上、潰さないように注意しながらカバーガラス（18 mm x 18 mm, MICRO COVER GLASS 200Pcs., MATSUNAMI）をかぶせた。これを、共焦点レーザー走査顕微鏡（FV-1000D, Olympus）により、適切なレーザー光の照射を行いつつ 10~40 倍の倍率（対物レンズ）で観察し、FV10-ASW 3.1 (Olympus)ソフトウェアを用いて撮影した。波長は Alexa Fluor 488 と Alexa Fluor 647 を用いたが、核染色を行った胚の場合には、Alexa Fluor 405 の波長での観察・撮影も並行して行った。

### Luciferase 解析

培養細胞系を用いた Luciferase 解析は、すべて P19C6 細胞（マウス胚性癌細胞由来, Gao et al., 2001）を用いて以下のように行った。

#### (1) 細胞の培養と継代

P19C6細胞は37℃, 5% CO<sub>2</sub>の条件下, Dulbecco 変法 Eagle 培地 (with L-glutamine, with sodium pyruvate, Wako ; 以下 DMEM) に Fetal Bovine Serum; FBS (Bio West)を加えたものを培地として, 25 cm<sup>2</sup>培養フラスコ (Cell Culture Flask, 25 cm<sup>2</sup>, vent cap; 日本ジェネティクス) で継代した。実際に継代する際には, まずアスピレーターで培地を吸い取り, 細胞を 5 mL Phosphate-buffered saline; PBS (-) (日水製薬株式会社) で洗浄したうえ, 再度アスピレーターでこれを除去した。さらに 0.25% (w/v) trypsin-1 mmol/l EDTA-4Na 溶液 (Wako) を 300 μL 加え, 37℃で 3 分間保温した後, 10% FBS/DMEM を 5 mL 加え, ピペティングで細胞を培地に懸濁した。一方, あらかじめ新しいフラスコに 10% FBS/DMEM を 5 mL 入れ, 細胞懸濁液を 150 μL もしくは 35 μL 加えた。細胞の継代は通常 3 日もしくは 4 日ごとに行った。

#### (2) 細胞へのトランスフェクション

トランスフェクションを行う際は, 継代時と同様に trypsin 処理により細胞をフラスコから回収し, 10% FBS/DMEM に懸濁した (25 cm<sup>2</sup> フラスコからの細胞を 5 mL に懸濁)。これを 1000 rpm で 5 分間遠心し, 沈殿を再び FBS 含有 DMEM に懸濁した上, 500 μL 細胞懸濁液と等量の 0.5% Trypan Blue Stain Solution (Nacalai Tesque)を混合した。血球計算盤を用いて生細胞数を計測した上, 細胞懸濁液の濃度を  $7.0 \times 10^4$  cells/mL になるように調製した。この細胞懸濁液を Tissue Culture Test plate 96F (96 well) (TPP)の各ウェルに 80 μL ずつ分注し ( $5.6 \times 10^3$  cells/well), 15-16 時間培養した (実験群ごとに 3 ウェルずつ準備し, Triplicate で Luciferase 活性を測定)。

一方, 細胞に導入する遺伝子 DNA は以下のように調製した。まず, 1.4 μL reporter プラスミド DNA (70 ng; 20 ng/well), DNA 導入量補正用内部コントロールである 1 μL Renilla luciferase vector DNA (pGL4.75, 0.14 ng; 0.04 ng/well), そして 0.7 μL effector プ

ラスミド DNA (35ng; 10 ng/well)を混合した。上述のように調製した混合液に、DNA 1  $\mu$ g あたり Serum free medium (DMEM, FBS (-))を 100  $\mu$ L, 1 mg/mL Polyethylenimine (PEI, linear, MW 25000, Polysciences Inc.)を 4  $\mu$ L 加えて混和し、室温で 10 分間静置した。この混合液を 3 等分し、各々を上述した細胞 1 ウェルごとに加え、24 時間培養した。

### (3) Luciferase 解析

Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega)を用い、添付のプロトコルに従って Luciferase 解析を以下のように行った。まず、Dual-Glo Luciferase Substrate (Promega) 1 bottle と Dual-Glo Luciferase Buffer (Promega) 10 mL を混合して Dual-Glo Luciferase Reagent を調製し、これを DMEM (FBS(-))と 1:1 で混合した。一方、アスピレーターを用いて細胞培養中の各ウェルから培地を吸引除去した上、各ウェルに上述した混合液を 16  $\mu$ L ずつ加え、遮光条件下、室温で 10 分間シェイカーにより振とうした。この細胞溶解液を測定用の 96 ウェルプレートに移し、GloMax-Multi+Detection System (Promega)により、Firefly Luciferase (FF-Luc)の発光を 1 秒間計測した。続いて、Stop&Glo Buffer (Promega) と Stop&Glo Substrate を 100:1 で混ぜた混合液を準備し、これを 8  $\mu$ L ずつ各ウェルに加え、25°Cで 10 分間静置した上で *Renilla* Luciferase (RL-Luc)の発光を 0.5 秒間計測した。

計測値より RL-Luc 活性に対する FF-Luc 活性の比 (FF-Luc/RL-Luc) を算出し (1 つの実験群において 3 点)、実験群ごとに平均値と標準偏差を求めた。各 effector 遺伝子の効果については、reporter 遺伝子 DNA のみを導入した場合 (コントロール) の値を 1 とした際の相対値で示した。測定値の統計的な検定については二標本 t 検定により行った。

## 第 1 部 尾芽領域における尾芽形成遺伝子の発現解析

### 要旨

尾芽とは、脊椎動物胚の後端に共通して見られる特殊な細胞集団であり、この領域には体幹部や尾部の神経組織や中胚葉組織などを生み出す多分化能細胞が存在すると考えられている。しかしながら、尾芽幹細胞の維持、そして神経・中胚葉組織への分化の決定のしくみはまだ解明されていない。本研究では、ゼブラフィッシュ胚において、PouV 型転写因子遺伝子 *pou5f3* および各種発生制御遺伝子の尾芽周辺部での発現を詳細に検討した。

初期体節形成期の胚については single-color WISH で検討しており、まず本研究で注目する *pou5f3* が尾芽の背側領域で発現することを示した。さらに、この尾芽背側領域では *soxB1* 遺伝子である *sox3* と *sox19a*、プロニューラル遺伝子である *neurog1* などの神経発生遺伝子が発現していることも確認された。BMP シグナル阻害により神経分化誘導を担う *chordin* についても尾芽背側領域で同様に発現が見られた。一方、尾芽の多能性維持と中胚葉分化に関わる *tbxta* は尾芽全体で発現が見られ、*wnt3a*, *fgf8a* についても尾芽全体で発現が見られた。さらに、*bmp2b* と *gdf11* については尾芽腹側領域で発現が確認された。中期体節形成期での発現について two-color WISH および FISH により検討したところ、*tbxta* の発現が尾芽及び脊索特異的に見られた。一方、*sox3* は神経管で広く発現するが、その後端では発現が見られず、この後端領域では代わりに *pou5f3* が発現し、尾芽での *tbxta* の発現と鮮明な境界を作っていた。*neurog1* も *sox3* と同様に神経管で広く発現するが、その後端では発現が見られないのに対し、*sox2* は尾芽から神経管後端にかけて発現が見られ、*sox19a* は神経管後端を含めた神経管全体で発現が見られた。また、*chordin* については *pou5f3* と同様に神経管後端で特異的に発現が見られた。以上の結果に基づき、神経管後端の *pou5f3* 発現領域を尾芽幹細胞から神経細胞への分化過渡領域である transition zone, その前方の *sox3* 発現領域を maturation zone と命名した。

## 序論

脊椎動物胚の後端には尾芽と呼ばれる特殊な細胞集団が存在しており、この尾芽には少なくとも後方の神経板と沿軸中胚葉を生み出す多分化能細胞として NMPs が知られる (Bouldin et al., 2015). NMPs の多能性の維持については *sox2* と *tbxt* (*Brachyury/T*) の共発現が重要であるとされており、実際にマウス胚において *sox2* と *tbxt* は共に尾芽で発現する (Koch et al., 2017). マウスにおいて、*sox2* が活性化した状態では神経系組織に、*tbx6* が活性化すると中胚葉系組織に分化することが示されており (Kondoh et al., 2016), *tbx6* が NMPs で *sox2* と共発現することも確認されている (Javali et al., 2017). 一方、ゼブラフィッシュの尾芽幹細胞の多分化能性の維持にも、*tbxt* の相同遺伝子である *tbxta* と *sox2* の共発現が重要であると報告された (Goto et al., 2017). また、尾芽から中胚葉前駆細胞への分化には *tbx16* が必要であり (Fior et al., 2012), その後の中胚葉分化には *tbxta* などが関与することが報告された (Fior et al., 2012; Bouldin et al., 2015). さらに、尾芽幹細胞から神経前駆細胞への分化には *soxB1* 遺伝子の 1 つである *sox2* が関わっており (Bouldin et al., 2015)、その後の神経分化は *neurog1* などの proneural 遺伝子が働く.

また、ゼブラフィッシュでの研究では、尾芽細胞は均一ではなく、脊索や底板などへ分化する MPCs, 体節, 神経管などへ分化する PWPCs など、異なる幹細胞集団が存在することが示唆された (Row et al., 2015). MPCs は脊索のすぐ後方に存在し、MPCs は背側 MPCs と腹側 MPCs という 2 種類の細胞集団から構成されるとされる (Row et al., 2015). PWPCs は、MPCs よりも後方の尾芽末端領域に存在し、Wnt シグナルがない場合では脊髄を生み出し、Wnt シグナルがある場合には中胚葉組織を生み出すと考えられている (Row et al., 2015).

これらの知見を踏まえて、本研究では初期体節期および中期体節期のゼブラフィッシュ胚での尾芽形成遺伝子の発現について、WISH もしくは FISH により解析を行った.

## 結果

### 初期体節期のゼブラフィッシュ胚における *pou5f3* および他の尾芽形成遺伝子の発現

本研究では、尾芽形成に関わる遺伝子の相互作用を知るための手がかりとして、まず、尾芽が形態的に明らかになる初期体節形成期（3-somite 期）において、尾芽の発生に関わると予想される遺伝子の発現を、尾芽周辺に注目して WISH により検討した。まず、哺乳類で多能性の維持や未分化状態維持に関わるとされる遺伝子（*Oct4*, *sox2*, *myc*, *nanog*, *klf4*, *sall4*）の相同遺伝子に注目した。*Oct4* 相同遺伝子である *pou5f3* については、前方の中脳・後脳原基に加え、尾芽の背側領域で発現が見られた（Fig. 2Aa）。神経前駆細胞の維持や神経誘導に関わる転写因子をコードする *soxB1* 遺伝子の場合、神経板の様々な領域で発現が見られた（Okuda et al., 2006; Inomata et al., 2020）。後方胚領域に注目したところ、*sox2* については尾芽での発現は見られなかったが（Fig. 2Ab）、*sox3* は弱く（Fig. 2Ac）、ゼブラフィッシュ特有の *soxB1* である *sox19a* は強く（Fig. 2Ad）、*pou5f3* と同様、尾芽の背側領域で発現が見られた。一方、iPS 作製に使用され、Kruppel 様転写因子をコードする *klf4* のゼブラフィッシュ相同遺伝子である *klf17*（Gardiner et al., 2005）、同じく iPS 作製に使用され、転写因子をコードする *myc* (*myca*)（Stewart, 1984）、そして ES 細胞の多能性に関わるとされる転写因子をコードする *nanog*（Chambers et al., 2003）の場合、尾芽では発現が見られなかった（Fig. 2Ae-g）。ES 細胞において *Oct4* と協調して多能性維持に働くジンクフィンガー転写因子遺伝子 *sall4*（Zhang et al., 2006）は尾芽全体で強く発現していた（Fig. 2Ah）。以上のように初期体節形成期において、*pou5f3* に加え、*soxB1* 遺伝子である *sox3* と *sox19a* および *sall4* が、尾芽領域、特にその背側で発現するのに対し、その他の多能性遺伝子は尾芽での発現が見られなかった。

上述した *soxB1* 遺伝子は、神経誘導時に神経板で広く発現し、神経前駆細胞の形成と維持に関わるとされる。また、ゼブラフィッシュにおいて *sall4* が *pou5f3* の発現を直接制御することによって、神経分化に関与することが示唆されている（Dong et al., 2017）。そこで、その後の神経分化を制御する遺伝子についても発現を検討した。まず、プロニューラル遺伝子 *neurog1*、そしてプロニューラル遺伝子で誘導され、神経発生に抑制的に働く *delta4* については、*pou5f3* や *soxB1* などと同様、尾芽の背側領域で発現するのに対し（Fig. 2Ba, c）、Delta の受容体として神経分化抑制に働く Notch の遺伝子の 1 つ *notch1a* は尾芽全体で発現していた（Fig. 2Bb）。一方、一般的には Notch シグナル等の制御で神経分化に抑制的に働く bHLH-O 型遺伝子 *her* (*her4.1* と *her9*) の発現はいずれも尾芽の背側領域で見られた（Fig. 2Bd, e）。

尾芽の背側は、その後の脊髄後端に対応する後方神経外胚葉と密接な関係にあると考えられるが、以上の神経発生遺伝子の発現はこのことを支持する。また、このことは、*pou5f3* がこの時期の尾芽の予定神経領域で発現することを示唆しており、この遺伝子と神経発生との関わりが予想される。

一方、中胚葉の特異化と脊索形成 (Bouldin et al., 2015), そして尾芽幹細胞の維持 (Koch et al., 2017) に関わるとされる T-box 転写因子遺伝子 *Brachyury/T/tbxt* と相同とされる *tbxta* の発現が尾芽全体で強く見られた (Fig. 2Ca). 沿軸中胚葉の特異化に関わる *tbx16* についても (Bouldin et al., 2015), 沿軸中胚葉に加えて尾芽全体で強く発現が見られた (Fig. 2Cb). さらに、胚体後方神経系および中胚葉の形成に関わる homeobox 遺伝子 *cdx4* が (Shimizu et al., 2005), 尾芽全体で強く発現していた (Fig. 2Cc).

尾芽の発生を制御する分泌因子としては Wnt, FGF, BMP などが知られるため (Martin and Kimelman, 2011 ; Goto et al., 2017 ; Sharma et al., 2017), これらをコードする遺伝子の発現についても尾芽周辺で検討した. 主要 FGF シグナル遺伝子 *fgf8a* は胞胚期に中胚葉誘導に関わり (Leeberg et al., 2019), 尾芽で発現して神経板の後方化, そして後方の沿軸中胚葉の形成などにも関わるが (Goto et al., 2017), 実際, この時期の尾芽全域で発現が見られた (Fig. 2Da). 一方, やはり後方形成に関わる Wnt シグナル遺伝子 *wnt3a* の発現は尾芽後端の表層外胚葉に局限していた (Fig. 2Db). マウスにおいて尾芽からの体軸伸長に関わっており (Aires et al., 2018), *bmp11* としても知られる TGF- $\beta$  ファミリー遺伝子 *gdf11* については尾芽中央付近から腹側領域にかけて発現が見られた (Fig. 2De). また, 主要 BMP ファミリー遺伝子であり, マウスの尾芽において中胚葉分化に重要であることが知られる (Anderson et al., 2016 ; Sharma et al., 2017) *bmp2b* の発現は, 主として尾芽の腹側領域で観察された (Fig. 2Dd). 一方, BMP シグナルの阻害因子である Chordin の遺伝子 (*chrd*) は, *pou5f3* や神経発生遺伝子と同様, 尾芽の背側領域で発現が見られた (Fig. 2De). 以上のように, 尾芽形成への関与が知られる主要シグナル分子遺伝子や *cdx* 遺伝子が初期体節期の尾芽で発現し, *pou5f3* の発現領域と近接することを今回明らかにした.

#### 中期体節期のゼブラフィッシュ胚における *pou5f3* および他の尾芽形成遺伝子の発現

続いて, 尾芽が維持されつつ体軸が伸長する中期体節形成期 (18-somite 期) において, 尾芽形成や体軸伸長に関わる遺伝子の一部について, 尾芽周辺での発現をまず通常の WISH より検討した (Fig. 3). *pou5f3* については神経管後端領域で発現し, その発現レベルは前方に向けて徐々に低下していた (Fig. 3A). 多能性関連遺伝子 *klf17* は, 尾芽周辺の表皮で発現が見られるのに対し, 尾芽本体では発現が見られなかった (Fig. 3B). *myca* についても尾芽周辺では発現が観察されず, むしろその前方の中胚葉領域で広く発現が見られた (Fig. 3C). 一方, 神経前駆細胞の形成, そして尾芽の未分化細胞の維持に重要とされる *sox2* は, 神経管後端, そして腹側にある中胚葉組織で発現が見られた (Fig. 3D). *sox3* は神経管で発現が広範に見られたが, 後端付近で後方に向けて発現が徐々に低下していた (Fig. 3E). *neurog1* もやはり神経管で広範に発現するが, 背側及び腹側に顕著であり, これらは各々感覚神経 (Rohon-Beard 細胞), 運動神経に相当すると考えられる (Fig. 3F). ただし, この遺伝子も神経管後端では発現していなかった.

後方形成遺伝子の *cdx4* は尾芽全体から後方神経管にかけて発現が見られた (Fig. 3G).

*tbxta* は尾芽全体及び脊索で強く発現し (Fig. 3H), *fgf8a* は尾芽領域の中でも後端に局限して発現が見られており, そのパターンには *tbxta* との共通性が見られる (Fig. 3I). *chrd* については *pou5f3* と同様神経管の後端領域でのみ発現が見られた (Fig. 3J).

次に, *pou5f3* 及び 2 種の *soxB1* 遺伝子 (*sox2*, *sox3*) の 18-somite 期における尾芽周辺での発現を, 上述したように発現が脊索及び尾芽に限定されている *tbxta* の発現を基準として two-color WISH により比較した. まず, *pou5f3* の神経管後端での発現は *tbxta* の尾芽, 脊索での発現領域と密接しており, 両者に重なりは見られなかった (Fig. 4A). 神経管後端及び腹側中胚葉における *sox2* の発現は, 尾芽での *tbxta* の発現と密接であり, 発現には重なりが見られた (Fig. 4B). 一方, *sox3* の神経管での発現と尾芽での *tbxta* の発現との間にはギャップが見られており (Fig. 4C), この神経管後端領域において *sox3* の発現レベルは後方に向けて徐々に低下するという勾配を示した.

尾芽形成遺伝子の発現領域をさらに特定するため, 本研究では, 共焦点レーザー顕微鏡を用いた two-color FISH による検討も行った (Fig. 5). 既に述べたように, この時期, *tbxta* の発現は尾芽と脊索に局限して観察されており (Fig. 5), この発現を基準として他の制御遺伝子の発現を検討した. まず, *pou5f3* の発現はやはり神経管後端に局限して観察された. この発現は, 後方と腹側で各々 *tbxta* の尾芽, 脊索での発現領域と接して明瞭な発現境界を作っており, 重なりは見られないのに対し, 上述したように前方に向かっては発現が勾配を作って低下していた (Fig. 5Aa). *sox2* の発現は, 腹側中胚葉に加え, 神経管, そして尾芽領域で見られており, 尾芽での *tbxta* の発現領域とは重なりが見られた (Fig. 5Ab). 実際, マウスでは尾芽領域の神経中胚葉前駆細胞で *tbxt* と *sox2* の共発現が知られており (Koch et al., 2017), ゼブラフィッシュでも両者の相互作用が知られている (Bouldin et al., 2015). 一方, *sox3* の発現は神経管で前後に広く見られるが, 神経管の後端領域で後方に向けて発現が徐々に低下して消失しており, 尾芽での *tbxta* の発現との間にギャップが見られた (Fig. 5Ac). おもしろいことに, *pou5f3* の神経管後端での発現はこの *sox3* 発現低下領域とほぼ一致する (Fig. 5Ad). *sox19a* は, *sox2*, *sox3* のいずれとも異なり, 神経管後端を含めて神経管全域で発現するが, *tbxta* との発現の重なりはなく, 明瞭な発現境界が見られた (Fig. 5Ae). 以上のように, 中期体節期において, *pou5f3* は, 尾芽で生じた神経前駆細胞が進入する神経管後端領域で特異的に発現している. また, これらの神経前駆細胞がさらに神経管内で神経細胞に成熟すると推定される *pou5f3* 領域の前方神経管領域で *sox3* の発現が上昇するといえる. なお, 同じ *soxB1* 遺伝子であっても, 尾芽周辺での発現については *sox2*, *sox3*, *sox19a* で明確に異なっていることも確認された.

マウス及びゼブラフィッシュの脊髄発生において神経分化への関与が示唆されている *nkx1.2la* (Bae et al., 2004 ; Cunningham et al., 2016 ; Rodrigo et al., 2018) もすでに知られているように神経管後端で発現し, *tbxta* 領域とは重なりのない境界を形成していた (Fig. 5Ba). この発現は *pou5f3* の神経管後端での発現と重なるが, 特に神経管内の腹側で相対的に強かった (Fig. 5Bb). *sall4* については神経管全域で強く発現するが, 加えてそ

の後方に位置する尾芽全体と内胚葉でも弱いながら発現しており、尾芽での発現は *tbxta* の発現領域と重なる (Fig. 5Bc). つまり, *sall4* は尾芽では *tbxta*, 神経管後端では *pou5f3* と共発現する. プロニューラル遺伝子である *neurog1* は, 神経管において背側の感覚ニューロン領域と腹側の運動ニューロン前駆細胞で発現することが確認されたが, *pou5f3* が発現する神経管の後端と尾芽では発現がなく (Fig. 5Bd), 神経管後端の *pou5f3* 発現領域ではまだ神経分化が始まっていないと考えられる.

尾芽発生の調節分泌因子である *wnt3a* と *fgf8a* についても, 18-somite 期において同様に発現解析を行った (Fig. 5Ca, b). その結果, *wnt3a* は *tbxta* と同様尾芽で発現しており, 神経管後端での *pou5f3* の発現と接して重なりのない明瞭な境界を形成していた (Fig. 5Ca). *fgf8a* についても尾芽で発現しており, この発現は, 神経管後端での *pou5f3* の発現とは部分的に重なりがあるものの, やはり基本的には相補的な関係にあった (Fig. 5Cb). なお, *wnt3a* と *fgf8a* は *pou5f3* が発現しない神経管の背側領域 (蓋板), あるいはそれを覆う表層外胚葉でも発現が見られている. *gdf11* については, *tbxta* の発現する尾芽領域の特に後方領域で発現が確認された (Fig. 5Cc). BMP 遺伝子の中で代表的な *bmp2b* については, 尾芽の表層外胚葉で発現が見られた (Fig. 5Cd). 一方, BMP の拮抗因子遺伝子である *chrd* については, 発現が *pou5f3* と同様に神経管後端領域に局在しており, この領域は BMP シグナルが排除されていると考えられる (Fig. 5Ce). ただし, *pou5f3* とは異なり, *chrd* の発現領域と *tbxta* の発現する脊索領域の間の神経管腹側にはギャップがあり, *chrd* は底板では発現しないといえる (Fig. 5Ce).

#### 体節形成期における *pou5f3* 及び *soxB1* の発現の経時的観察

以上は体節形成初期である 3-somite 期, そして中期の 18-somite 期について *pou5f3*, *soxB1* の発現を調べたものであるが, さらにこれらの遺伝子について体節形成中期から後期 (12-somite 期から 25-somite 期) における発現を WISH により経時的に観察した. まず, *pou5f3* の発現については, この時期を通じて神経管後端を境界として前方に低下するという発現勾配が継続的に見られた (Fig. 6A). *sox2* の発現については, 12-somite 期と 15-somite 期では, 上述した 18-somite 期での観察と対応して, 神経管後方から, 尾芽領域の後端, そしてさらに尾芽周辺の腹側中胚葉までまたがる胚後端領域で発現が広く見られた. しかし, 20-somite 期以降, 尾芽での発現は消失し, 神経管後端と腹側中胚葉で発現が見られた (Fig. 6B). *sox3* については, 調べた体節形成期の全ての時期において, 神経管での発現はほぼ同様であり, ほぼ全域で見られるが, 神経管後端については後方に向けて徐々に低下する (Fig. 6C). *sox19a* の場合, 12-somite 期から 25-somite 期にかけて, 神経管全体で継続的に強く発現しているが, 特に神経管後端で発現がやや強い傾向が見られた (Fig. 6D).

以上のように, 体節形成中期から後期にかけて, *pou5f3*, *sox3*, *sox19a* については神経管に発現が限定され, 時期による発現領域の顕著な変化はないのに対し, *sox2* については体



節形成初期では後方神経管から尾芽，そして内胚葉にいたる領域で発現するという特徴が見られた．尾芽におけるこの特徴的な発現は 15-somite 期以降消失する．また，同じ *soxB1* 遺伝子であっても，*sox2*, *sox3*, *sox19a* は発現領域が異なっており，WISH で見る限り，*sox19a* の発現が相対的に強いと言える．

## 考察

### 脊椎動物胚での胴尾部伸張に関わる尾芽の多分化能幹細胞と Pou5f3 の関わり

脊椎動物の発生において、胚の後端にある尾芽は、神経細胞や中胚葉細胞など、体軸を構成する細胞を生み出すことで、体軸の伸張に関わっており、多分化能を持つと考えられる (Tzouanacou et al., 2009). 近年の研究から、この領域には多分化能を持つ幹細胞 (尾芽幹細胞) の存在が予想されてきた。しかしながら、体軸が伸長するに際し、どのように胚後端で尾芽の多分化能細胞が維持されるか、そしてその後、どのように幹細胞の分化の方向が決定され、成熟するかは分かっていない。

これに関連して興味深いことに、哺乳類では初期胚や ES 細胞の多能性維持に不可欠とされる *Oct4* の相同遺伝子 *pou5f3* が、多くの脊椎動物胚において尾芽や神経管後端に発現することが知られる (Aires et al., 2016; Cao et al., 2004; Lavial et al., 2007; Morrison & Brickman, 2006). この *pou5f3* は、ゼブラフィッシュでの変異体 (*spg*) を用いた解析により多様な初期発生過程に関わることが明らかにされているが、その一つとして尾部伸長への関与が示唆されている (Khan et al., 2012; Onichtchouk, 2016). さらに、所属研究室は以前、dominant interfering *pou5f3* (*en-pou5f3*) の誘導による *pou5f3* の機能阻害実験により、この遺伝子が、体節形成期において、進行中の胴尾部伸長を制御することを示した (Khan et al., 2012a, 2012b). 第 1 部では、尾芽での幹細胞の維持と分化の制御に関わる遺伝子機構を知る手がかりを得るため、尾芽発生への関与が予想される遺伝子の尾芽周辺での発現の詳細について、*pou5f3* に注目しつつ解析を行った。

### 尾芽が形成される体節形成初期での尾芽関連遺伝子の発現

まず、哺乳類で多能性に関わるとされる遺伝子のゼブラフィッシュ胚尾部での発現を検討した。初期体節期 (3-somite 期) の場合、*Oct4* 相同の *pou5f3* は、尾芽では主として背側領域で発現が観察された。やはり多能性を担うとされる *sox2* は、尾芽での発現は見られないのに対し、同じ *soxB1* 遺伝子である *sox3* 及び *sox19a* はやはり尾芽の背側領域で発現が観察された。*klf4* の相同遺伝子 *klf17*, *myc* と相同の *myca*, そして *nanog* については尾芽で発現がなかったが、やはり多能性との関連性が哺乳類で知られる *sall4* は尾芽全体で発現が見られた。従って、初期体節期の尾芽領域と哺乳類多能性細胞との間で、部分的に類似性があると言える。

なお、*soxB1* は一般に神経誘導で発現が出現し、神経前駆細胞の分化に関わるとされる (Okuda et al., 2006). *sall4* についても、多能性への関与に加え、神経発生制御因子としての役割が知られる (Zhang et al., 2006). 実際、今回、プロニューラル遺伝子である *neurog1*, そして一般的に神経分化細胞で発現する *deltaA* と *her* 遺伝子が、*pou5f3* が特に強く発現する尾芽の背側領域で同様に発現することが確認されており、*pou5f3* は初期体節期において、尾芽内の予定神経領域に発現するといえる。なお、*notch1a* は尾芽全体で広く

発現しており、尾芽全域が Delta シグナルの受容領域となっていると推定される。

一方、中胚葉形成遺伝子であるとともに、マウスにおいて、*sox2* とともに *bud* 維持の中心的遺伝子とされる *Brachyury/T* (Koch et al., 2017) の相同遺伝子 *tbxta* が、尾芽全体で強く発現していた。つまり尾芽の背側領域で *sox2* と共発現しており、尾芽細胞の維持がゼブラフィッシュでも *sox2-tbxt/tbxta* の協調作用により同様に行われているという知見と対応する。なお、沿軸中胚葉の特異化に関わる *tbx16* (Bouldin et al., 2015) もやはり尾芽全域で発現しており、このことから、初期体節期においては、尾芽の背側ではまだ予定神経領域と中胚葉領域が完全には分離していないことが窺われる。一方で、尾芽の腹側領域は *tbxta* および *tbx16* が発現する一方で *sox2* は発現していないことから、すでに中胚葉にある程度特異化されていると考えられるが、尾芽の背側と腹側で明瞭な境界は認められず、過渡的状态にあるといえる。なお、後方神経系および中胚葉の形成に関わる *cdx4* については (Shimizu et al., 2005)、後方領域でも尾芽全域で強く発現しており、神経系、中胚葉領域を問わず、尾芽形成に重要であることが予想される。

一方で、尾芽細胞の維持、あるいはその分化には各種分泌シグナルの関与が知られる。尾芽細胞は、Wnt シグナルがない場合では脊髄を生み出し、Wnt シグナルがある場合には中胚葉組織を生み出す (Row et al., 2015)。このように尾芽形成には Wnt シグナルが関与するが、今回、主要 Wnt シグナル遺伝子 *wnt3a* が尾芽の表層に限定的に発現していることを観察しており、Wnt3a は外胚葉から中胚葉への働きかけに関わると推定される。一方、尾芽からの後方形成に重要であると考えられている主要 FGF シグナル遺伝子 *fgf8a* は (Goto et al., 2017; Koch et al., 2017)、*tbxta* と同様尾芽全体で強い発現が見られた。一方、マウス胚で尾芽からの体軸伸長に関わる TGF- $\beta$  ファミリー遺伝子 *gdf11* (Aires et al., 2018)、そして主要な BMP 遺伝子である *bmp2b* は尾芽の腹側領域で発現しており、腹側尾芽領域の発生に BMP シグナルに関わる可能性がある。おもしろいことに、一般に BMP シグナルの阻害因子である Chordin の遺伝子 *chrd* は、*pou5f3* が強く発現する尾芽背側領域を後端として神経板領域で広く発現しており、この尾芽背側領域では、*chrd* の働きにより、腹側からの BMP シグナルが阻害されていると考えられる。

#### 体軸が伸長する体節形成中期における尾芽関連転写因子遺伝子の発現

体軸が伸長する体節形成中期 (18-somite 期) については、single-color WISH に加えて 2-color WISH 及び 2-color FISH も併せて行い、尾芽関連遺伝子の発現を検討した。この時期になると、*tbxta* の発現は脊索に加えて尾芽領域に限定されていた。このことは、*tbxt/tbxta* が尾芽の維持に関わるとする従来の知見と対応する (Koch et al., 2017)。さらに、この時期では注目する *pou5f3* の発現が神経管後端に限定されることを明らかにした。前述したように、初期体節期における尾芽での *pou5f3* の発現領域は、ほぼ予定神経領域の後端に対応するため、発現パターンは体節形成期を通じて基本的には連続しており、役割にも共通性があると考えられる。ただし、この時期には尾芽全域で発現する *tbxta* と接して

明瞭な境界をつくっており、胚の後端は体節形成初期と異なり、*pou5f3* の発現する予定神経領域と *tbxta* が発現する尾芽領域に明確に分離している。

多能性維持遺伝子の中で *klf17* と *myca* は、初期体節期同様、尾芽本体では発現しない。しかしやはり多能性に関わる *sall4* については (Zhang et al., 2006), *tbxta* の発現する尾芽全域で見られており、尾芽細胞の多分化能との関連が注目される。注目すべきこととして、*sall4* はさらに神経管でも発現が見られた。これに関連して、*sall4* は多能性の維持とともに神経分化にも抑制的に関与するとされる (Zhang et al., 2006; Tahara et al., 2019)。なお、*Xenopus* においては、*sall4* が *pou5f3* の発現を抑え、さらに神経発生を正に制御することが示唆されている (Exner et al., 2017; Young et al., 2014)。尾芽周辺領域での *sall4* の役割、*pou5f3* との関係が注目される。

体節形成中期において、*pou5f3* が発現する神経管後端領域は、尾芽で神経分化を選択した神経前駆細胞が神経管に移行する領域 (transition zone) と考えられるため、神経分化を選択して神経管に入る神経前駆細胞は同時に *pou5f3* を発現すると考えられる (Fig. 7)。*soxB1* 遺伝子の中で、*sox2* と *sox19a* はこの時期になると、以前に記載されているように頭部領域で発現するほか (Okuda et al., 2006)、神経管後端でも発現することを今回確認した。したがって、これらの *soxB1* は transition zone において *pou5f3* とともに神経前駆細胞で発現することになる。一方、*sox3* については状況がやや異なっており、今回、この遺伝子が、神経管のほぼ全域で発現するが、*pou5f3* が発現する神経管後端の transition zone では発現が非常に弱いことを見出した。

関連して、上述のように、*sall4* の発現領域は transition zone での *pou5f3* の発現、尾芽での *tbxta* の発現のいずれとも重なる。このことから、*sall4* は初期体節期の尾芽のみならず、この時期でも尾芽領域及び transition zone において神経細胞への分化に関与する可能性がある。なお、*en-pou5f3* 誘導による *pou5f3* の機能阻害実験では、内在 *pou5f3* が transition zone で *sall4* の発現を活性化することが示唆されており、*pou5f3* は神経管領域での *sall4* 発現の上昇に関与している可能性がある。一方で *pou5f3* が *sall4* の下流で制御されるという報告もあり (Exner et al., 2017; Young et al., 2014)、これらの 2 遺伝子は相互に依存しているのかもしれない。

NK-2 ファミリー遺伝子である *nkx1.2* は、マウスの脊髄発生において神経管後端で発現し、尾芽からの神経分化に関与することが示されており (Rodrigo et al., 2018 ; Cunningham et al., 2016 ; Koch et al., 2017)、ゼブラフィッシュ相同遺伝子 *nkx1.2la* も初期体節期の後方神経外胚葉で発現することが知られる (Bae et al., 2004; Okuda et al., 2010)。今回、*nkx1.2la* が 18-somite 期において、神経管後端で腹側領域を中心として発現し、尾芽での *tbxta* の発現と境界を作ることを明らかにした。このことから、*nkx1.2la* が、特に神経管の transition zone 腹側で *pou5f3* と同様に神経管内での尾芽幹細胞からの神経分化開始期で働いていると推測される。

以上のように、体節形成中期において、*pou5f3* は *tbxta* の発現する尾芽未分化細胞では

発現しないのに対し、神経分化を選択して尾芽から神経管に移行する transition zone での神経前駆細胞で一過的に発現し、*sox2*, *sox19a*, *sall4*, *nkx1.2la* などとともに神経細胞の分化を推進すると考えられる。ただし、この transition zone では、プロニューラル遺伝子 *neurog1* は発現しておらず、特異化はされているものの、未分化状態といえる。その一方、*neurog1* は transition zone より前方の神経管全域、特に背側の感覚ニューロン領域と腹側の運動神経領域において、強く発現する。神経管の後方領域において、*pou5f3* の発現は前方に向けて徐々に低下する一方で、*sox3* の発現が上昇することから、*pou5f3* の発現低下、*sox3* の発現上昇、そして *neurog1* の発現で特徴付けられる神経管領域は maturation zone といえる (Fig. 7)。すなわち、transition zone で神経分化が特異化された神経前駆細胞は、この maturation zone において実際の神経分化を進行させると考えられる。おもしろいことに、maturation zone では神経前駆細胞の成熟とともに *sox2* の発現は消失するが、*sox19a* と *sall4* の発現は持続する。

まとめると、未分化尾芽細胞が脊髄神経細胞に特異化される神経管後端、すなわち transition zone は、*sox2*, *sox19a* の発現と *sox3* の不在、*pou5f3* の発現で特徴付けられており、*pou5f3* は、体節形成中期には transition zone における未分化尾芽幹細胞から神経前駆細胞への分化の進行において一過的に重要な役割を持っていると推測される。*soxB1* については、*sox2* は尾芽細胞の維持に続いて、transition zone においては *pou5f3* とともに神経前駆細胞の特異化に働き、*sox3* はむしろ *neurog1* などとともに *pou5f3* により生じた神経前駆細胞の maturation zone におけるその後の成熟に関与すると考えられる。なお、*sox19a* は神経管で強く発現することから、神経特異化初期からその後の神経分化まで、神経管での神経発生すべてに関与すると考えられるが、transition zone での発現が強いことから、神経前駆細胞の特異化でも重要と推定される。*pou5f3* の発現が一過的に起きた後につづいて *sox3*、そして *neurog1* が発現する、という時間経過は、神経誘導後の後脳領域で見られる神経発生過程と対応する (Inomata et al., 2020)。また、内在 *pou5f3* が *sox3* と *neurog1* の発現を活性化することが *en-pou5f3* 誘導実験から推定されており (第2部)、この結果とも対応する。

注目すべきこととして、*sox2*, *sox3*, *sox19a* は同じ *soxB1* 遺伝子でありながら、尾芽、神経管後端周辺での発現領域が異なっており、尾芽幹細胞からの神経分化における役割も異なっていると思われる。*soxB1* 遺伝子の胚での発現が相互に異なることはゼブラフィッシュの前方神経板、*Xenopus* でも知られており (Inomata et al., 2020; Nitta et al., 2006)、*Xenopus* では実際に発現制御機構の違いが指摘されている (Rogers et al., 2008)。ただし、これらの遺伝子産物にタンパク質としての生化学的違いがあるかについては不明である。以前、ゼブラフィッシュ初期胚において SoxB1 の機能は重複していることが示唆されたが (Okuda et al., 2010)、一方で、培養系での転写制御における Pou5f3 との協調性に関して Sox2 と Sox3 で違いがあることが知られている (Kobayashi et al., 2018)。本研究でも *sox2* は *sox3* や *sox19a* と異なり、細胞培養系において明確な *pou5f3* の転写調節能を示さなかつ

た（第4部）．尾芽や神経管の発生における役割の違いの可能性も今後の課題であろう．

#### 体軸が伸長する体節形成中期における尾芽関連成長因子遺伝子の発現

分泌性シグナル分子遺伝子の中で、*fgf8a* と *wnt3a* はいずれも尾芽細胞の分化、特に沿軸中胚葉の形成に関与するとされる（Goto et al., 2017）．今回、中期体節期において、*fgf8a* が尾芽全域で広く発現しており、その発現は部分的に *pou5f3* の発現後端と重なって神経管・尾芽境界をまたぐことを示した．従って、*Fgf8a* はこの時期での神経管・尾芽境界の画定には直接関わらず、尾芽からの分泌因子として尾芽の維持、そして transition zone での神経前駆細胞の形成にも関与するといえる．一方、*wnt3a* の発現は尾芽に限定されて *pou5f3* と明確に発現境界を作っており、*wnt3a* は尾芽細胞の維持に加えて、境界画定に関与する可能性がある．なお、*fgf8a* 及び *wnt3a* は神経管最背側、あるいは背側表層外胚葉でも発現するのに対し、*pou5f3* の発現はこの領域からは排除されている．transition zone での神経発生は、神経管背側領域からの Fgf/Wnt シグナルによる制御も受けると予想される．実際、本研究の各種シグナル阻害・活性化実験において、神経管での *sox2*, *sox3* の発現変動が観察された（第3部）．

BMP シグナルはマウスの尾芽において中胚葉分化に重要であることが知られる（Anderson et al., 2016 ; Sharma et al., 2017）．今回主要遺伝子である *bmp2b* の発現が尾芽の表層外胚葉で見られており、この表層外胚葉からの BMP シグナルが *pou5f3* の発現制御に関与する可能性がある．尾芽の多分化能細胞が中胚葉組織に分化する際の上皮間充織転換において BMP シグナルが必要とされており（Sharma et al., 2017）、BMP シグナルが尾芽細胞の中胚葉分化の選択に寄与するかもしれない．関連して、今回、BMP 阻害因子遺伝子である *chrd*（Piccolo et al., 1996）が神経管後端で発現することを見出しており、transition zone での神経分化の推進や維持には神経分化抑制活性を持つ BMP の阻害が必要であることが示唆される．一方、やはり TGF- $\beta$  ファミリーに属する *gdf11* の場合、マウス胚において尾芽で発現し（McPherron et al., 1999）、尾芽形成を誘導することが知られているが（Aires et al., 2019）、今回、ゼブラフィッシュ胚においても尾芽後方領域で発現することが確認された．このことから、*gdf11* はマウス胚と同様にゼブラフィッシュ胚においても尾芽形成の誘導に関与すると推測される．

#### 体節形成中期から後期における *pou5f3* 及び *soxB1* 遺伝子の発現の経時的変化

*pou5f3* と *soxB1* 遺伝子に改めて注目し、体節形成中期から後期（12-somite 期から 25-somite 期）における発現を経時的に観察した結果、18-somite 期で観察された *pou5f3* の神経管後端での発現、*sox3* と *sox19a* 各々の神経管における特異的発現は、体節形成期を通じて維持されていた．

一方、*sox2* については大きな変化が体節形成期の尾芽周辺において観察された．すなわち、12-15-somite 期では後方神経管、腹側中胚葉に加えて尾芽領域で発現が見られるが、

その後の体節形成後期になると尾芽での発現は大きく低下する。18-somite 期での発現はその過渡的段階を見たものといえる。このことから、体節形成期の中でも *sox2* の尾芽における役割が変化している可能性が示唆された。なお、*sox2* の発現は、3-somite 期では尾芽、後方神経板を含めて後方で観察されておらず、この遺伝子の尾芽での発現は体節形成中期に特有といえる。前述したように、この時期の尾芽では *sox2* と *tbxta* が共発現しており、この時期の尾芽の状況はこれまで知られる NMPs の状況によく似ている。この時期特異的な尾芽での *sox2* の役割については今後の検討課題といえる。

さらに、*pou5f3* が発現する神経管後端の transition zone に注目すると、体節形成期を通じ、*sox3* の発現はその前方にある神経管領域に比べて顕著に弱い、*sox19a* は常に強く発現していた。以上のように、共通して神経前駆領域の形成に関わるとされる *soxB1* のグループであっても (Kamachi et al., 2009)、遺伝子ごとに尾芽周辺において発現領域が異なっていることが明らかになった。体節形成期の神経管における神経発生での役割、そして *pou5f3* との関係において、*soxB1* 遺伝子は各々異なっていると考えられる。なお、*soxB1* 遺伝子は一般に神経の初期発生に重要であるとされるが、本研究の観察において、*sox2* については体節形成期において胚後端にある腹側中胚葉組織でも発現が継続的に見られており、この遺伝子は他の *soxB1* 遺伝子とは異なって中胚葉組織の分化にも関係している可能性がある。

## 第 2 部 体軸の伸長における Pou5f3 の役割の遺伝学的検討

### 要旨

尾芽とは、脊椎動物胚の後端に共通して見られる特殊な領域であり、尾芽に存在する細胞は多分化能を持つ細胞としての性質が予想される。本研究の第 1 部では、マウス PouV 型 POU 転写因子遺伝子 *Oct4* に対応する *pou5f3* が、ゼブラフィッシュ胚において、bud 期以降の尾芽、そして神経管の後端で継続的に発現することを明らかにしており、*pou5f3* が尾芽幹細胞の維持や分化、その後の脊髄の伸長に関わりを持つと推測された。第 2 部では、胚後方の発生における *pou5f3* の役割を遺伝学的に検討するため、Loss-of-function 実験および Gain-of-function 実験を行った。

まず、転写抑制型 Pou5f3 (Pou5f3) の遺伝子 (*en-pou5f3*) を加温誘導できる Tg 魚 ([*Tg(hsp70l:en-pou5f3)*]) の胚において、*pou5f3* の機能を原腸形成終了以降の異なる時期で阻害したところ、体軸伸長が著しく妨げられ、脊索、体節、そして神経管の形態異常が確認された。機能阻害により異常が生じる部位は体軸伸長とともに後方に移動することから、*pou5f3* は、尾芽から胴尾部が新たに生じる際に必要である一方、既存の体軸の維持には不要であることを示唆した。同様の体軸伸長異常は *pou5f3* 変異体でも観察された。*en-pou5f3* 誘導胚において、多能性、神経分化、中胚葉形成に関わる遺伝子の発現を WISH で検討したところ、*pou5f3*, *klf17*, *myca*, *nanog*, *notch1a*, *deltaA*, *her9*, *tbx6*, *tbx16*, *wnt3a*, *gdf11*, *bmp2b*, *cdx4* の発現上昇、*sall4*, *sox2*, *sox3*, *sox19a*, *neurog1*, *ebf2*, *tbxta*, *fgf8a*, *chrd* の発現減少が見られた。同様の結果は *pou5f3* 変異体胚でも得られており、*pou5f3* は多能性維持遺伝子の発現には抑制的であること、尾芽において尾芽幹細胞からの神経細胞分化を推進する一方で、中胚葉前駆細胞への分化には抑制的に働くことを見出した。さらに今回、Pou5f3 の C 末に改変エストロゲン受容体 (ERT2) が連結された融合タンパク質遺伝子 (*pou5f3-ERT2*) を作製し、選択的 estrogen 受容体モジュレーターである tamoxifen (4-OHT) による処理と組み合わせることで、Pou5f3 タンパク質の時期特異的な活性化を行ったところ、*sox3* と *tbxta* の発現上昇が観察された。

以上の結果は、哺乳類では多能性維持に関わるとされる PouV 遺伝子が、脊椎動物胚共通の胚構造である尾芽において幹細胞の分化制御、特に神経分化に関わることを示唆するものである。



## 序論

マウス *oct4* は PouV 型 POU 転写因子をコードしており、初期胚細胞や ES 細胞の未分化状態、多能性の維持に必須の遺伝子であると考えられている。*oct4* のゼブラフィッシュでの相同遺伝子である *pou5f3* は、胚発生初期では胚全体で母性発現を示すが、原腸形成終了期から初期体節形成期にかけて、発現が局在していき、前・中脳中軸領域、後脳の第 1/2 および第 4 菱脳節領域、後脳とその後方神経板の中軸部位、そして尾芽領域において、主としてプロニューラルクラスター周辺で見られる (Inomata et al., 2019)。体節形成中期以降になると、発現は頭部では消失し、尾芽、そして神経管後端でのみ、胴尾部の伸張が進行する期間、継続的にみられる。ゼブラフィッシュ *pou5f3* の機能については、変異体解析で以前に遺伝学的に調べられており、*pou5f3* は、MHB の形成や後脳の領域化 (Belting et al., 2001; Burgess et al., 2002; Hauptmann et al., 2002; Reim & Brand 2002)、初期胚での背腹軸の決定、内胚葉の形成、原腸形成など (Lunde et al., 2004; Reim et al., 2004; Reim & Brand 2006)、様々な発生過程を制御することが示唆された。さらにこれらに加えて変異体において尾部の伸張不全が観察された (Burgess et al., 2002)。この観察は *pou5f3* が胴尾部の伸張に重要であることを示唆していたが、この研究ではその意味は不明であった。

一方、所属研究室では、*Pou5f3* の胚での役割を検討することを目的として、Heat shock promoter (hsp; *hsp70l* 由来, Hallolan et al., 2000) の制御下にある転写抑制型改変 *Pou5f3* (En-*Pou5f3*) 遺伝子のゼブラフィッシュ生殖系列への導入が行われた (Khan et al., 2012a, b, Fig. 8A)。樹立された Tg 魚 [*Tg(hsp70l:en-pou5f3)*] の胚を加温処理することで誘導される En-*Pou5f3* は、*Pou5f3* の結合配列に結合し、内在 *Pou5f3* の制御下にある下流遺伝子の発現を抑制すると期待される (Fig. 8A)。*Pou5f3* は主として転写活性化因子と考えられており (Khan et al., 2012a; Kobayashi et al., 2018)、En-*Pou5f3* はドミナントに内在 *Pou5f3* の機能を阻害することになる (dominant-interfering 遺伝子)。実際、*en-pou5f3* は誘導時期によって異なる形態的異常 (峡部異常、峡部欠損、胴尾部異常など) を誘発する。特に、初期体節形成期で *en-pou5f3* 誘導を行った場合に、胴尾部の顕著な伸張異常が生じることから (Khan et al., 2012b)、体節形成期において、*pou5f3* が尾芽による胴尾部伸張に関与すると予想された。

これらのことから、ゼブラフィッシュ *pou5f3* 遺伝子は、胴尾部の伸張が進行する体節形成期において、尾芽での存在が予想される多分化能細胞の維持、あるいは尾芽幹細胞の中胚葉性組織や神経性組織への分化において機能することが予想された。こうした状況を受け、本研究では、尾芽幹細胞の維持と分化のしくみの遺伝子機構を、*Pou5f3* に焦点を当てて明らかにすることを目指した。

## 結果

### Dominant-interfering 遺伝子の加温誘導による Pou5f3 の発生での役割の検討

Pou5f3 の胚での胴尾部伸長における役割を検討するために、今回、*en-pou5f3* ヘミ接合体と野生型魚の交配で得られた胚において、90% epiboly 期から 18-somite 期までの異なる時期で加温誘導を行った。この場合、半分 (50%) の胚が *en-pou5f3* を保有すると予想される。24 hpf で誘導胚の胴尾部について形態観察を行ったところ、調べた全ての誘導時期について、すでに観察されたように (Khan et al., 2012) 体軸の伸長異常が観察された。おもしろいことに、誘導時期により胴尾部の伸長異常の起きる位置が異なっており、誘導時期が早いほど伸長異常は前方 (近位部) で観察された。この状況をより定量的に把握するため、胴尾部が正常な胚を TTB- (TTB stands for Trunk-Tail Bending)、尾部先端部 (第 20 体節より後方) でのみ屈曲が観察されたものを TTB+, 胴尾部中央部 (第 15~19 体節の間) で屈曲が観察されたものを TTB++, 胴尾部近位部 (第 14 体節より前方) で屈曲が観察されたものを TTB+++ と分類し、誘導時期ごとの伸長異常をスコアした (Fig. 8B)。

まず、胴尾部の前方 (近位部) からの屈曲 (TTB++) は 90% epiboly 期での *en-pou5f3* 誘導で多く見られ (20.8%)、その割合は誘導時期を遅らせるにつれて徐々に減少して 10-somite 期では見られなくなったが、胴尾部中央での屈曲 (TTB++) は 90% epiboly 期から 3-somite 期まで比較的高率で見られ (18.8%–26.0%)、それ以降の誘導では出現率が低下した。これに対し、先端部 (遠位部) で屈曲が見られる胚 (TTB+) は、初期 (90% epiboly 期) での誘導では割合が低い (8.3%)、徐々に増加し、10-somite 期と 18-somite 期で最も高かった (各々 36.5% と 31.3%)。これらと対応して正常胚は 10-somite 期以降増大した (Fig. 8C)。なお、予想されるように最大異常率は約 50% だった。

以上のように、体節形成期において、*pou5f3* の機能阻害の時期が早いほど近位部側で伸長異常が起きており、この異常部位は、体節形成期における体軸伸長に伴って、前方から後方に移動する。これらのことから、*pou5f3* が体軸伸張に関与すること、特に尾芽での胚体の新生に関与することが示された。また、いったん形成された胴尾部のその後の発生には関与しないと考えられる。

### Pou5f3 の機能阻害時に見られる中軸構造の異常

*en-pou5f3* の誘導で観察された胴尾部の伸長異常は、脊髄、体節、脊索などの中軸構造の形成異常を示唆する。そこで、90% epiboly 期で *en-pou5f3* 誘導を行った胚において、脳及び脊髄のマーカーである *sox19a*、体節 (筋節) マーカーである *myod*、そして脊索マーカー *tbxta* の発現を WISH で検討し (Fig. 8D-F)、染色後に野生型胚と Tg 胚を PCR-genotyping で区別した (Fig. 8G)。

まず、脊髄については、*pou5f3* の機能阻害胚において、不規則な屈曲や不均一な *sox19a* の発現が主として後方において見られた (Fig. 8D)。体節については、前方から後方に向け

での胚体全域で体節の背腹軸に沿った幅の減少が見られたが、特に屈曲部より後方で、前後の体節の間隔が狭くなるなどの顕著な分節パターン異常が見られた (Fig. 8E). 一方、脊索については、機能阻害胚の前後に沿った全域において、不規則な屈曲やくびれが見られており、特に屈曲部より後方が大幅に短縮していた (Fig. 8F). なお、神経管での *sox19a* の発現、体節での *myod* の発現、脊索での *tbxta* の発現の強さ自体は機能阻害胚でもほぼ正常であり、いったん形成された中軸構造の分化状態の維持には *pou5f3* は不要といえる (Fig. 8D-F). これらの結果は、*pou5f3* の機能阻害は主として屈曲部より後方での体軸形成において異常を引き起こすことを示す.

### Pou5f3 の機能阻害が多能性遺伝子の発現におよぼす影響の検討

第1部で述べたように、ゼブラフィッシュ *pou5f3* の発現は、bud 期においては尾芽前方の神経領域、胴尾部の伸張が進行する体節形成期を通じては神経管後端において継続的に見られる. この時期に *pou5f3* がどのような働きを持つのかを遺伝子レベルで調べるため、初期体節期 (3-somite 期)、あるいは中期体節期 (18-somite 期) において、*en-pou5f3* 誘導を行い、尾芽の発生に関与すると予想される遺伝子の発現への影響を WISH で検討し、染色胚での *en-pou5f3* 配列の有無は genotyping で確認した. なお、*en-pou5f3* は機能抑制型であり、内在 *pou5f3* 遺伝子の働きは *en-pou5f3* 誘導の効果とは逆と考えることができる.

検討すべき対象として、*pou5f3* が尾芽において多能性遺伝子の発現に関与する可能性が想定されたことから、最初に哺乳類において多能性維持に重要とされる遺伝子に注目した. まず、*en-pou5f3* を 3-somite 期で誘導した胚において、内在 *pou5f3* の発現を 5'-UTR プロローブにより検討したところ、神経板前方に拡大していた. 一方、尾芽周辺での発現については、わずかに上昇しているように見られたが、明らかな異常は見られなかった (Fig. 9A). 18-somite 期において誘導した場合も同様の結果が観察された (Fig. 9B). *pou5f3* は、神経板前方において自身の発現を前方神経板で抑制するが、後方領域においては自身の発現にはほとんど関与しないといえる.

*klf17* は (Chambers et al., 2003; Takahashi & Yamanaka, 2006)、体節形成期において、孵化腺や側板中胚葉で発現するが (Gardiner et al., 2005; Thisse et al., 2004)、3-somite 期に *en-pou5f3* を誘導した胚では尾芽、腹側領域を含む胚全域で発現が異所的に活性化された (Fig. 9C). 18-somite 期での誘導でも同様の異所的発現が見られた (Fig. 9D). 同じく哺乳類において多能性維持に重要とされる *nanog* について 3-somite 期と 18-somite 期で検討したところ、いずれの時期でも、*nanog* の発現が正常胚では見られず (Xu et al., 2012)、誘導胚では尾芽を含めて胚体全域で活性化された (Fig. 9E, F). 哺乳類では山中因子の 1 つであり、一般的には細胞増殖に関係するとされる *myc* の相同遺伝子 (*myca*) の場合、正常胚でも見られる体節での発現に加え (Thisse et al., 2004)、3-somite 期と 18-somite 期で *en-pou5f3* を誘導した胚では体節に挟まれた脊索領域でも異所的に観察された (Fig. 9G, H). 尾芽での *myca* の発現については、3-somite 期でわずかに上昇しているように見られ

たが、顕著な変化は確認されなかった (Fig. 9G).

多能性及び神経発生制御に関与するされる *sall4* について (Zhang et al., 2006), *en-pou5f3* 誘導効果を 3-somite 期と 18-somite 期で検討したところ、尾芽を含む胚体全域で発現が顕著に抑制されており (Fig. 9I, J), 内在 *pou5f3* はゼブラフィッシュ胚の各領域において *sall4* を活性化していると考えられる.

*soxB1* (*sox2*, *sox3*, *sox19a*) について 3-somite 期および 18-somite 期で同様に検討したところ、いずれの *soxB1*, いずれの時期についても神経板・神経管での発現が神経管後端を含めて全域で低下していた (Fig. 9K-P). なお, 3-somite 期での *en-pou5f3* 誘導により見られる神経板前方での *sox2* と *sox3* の発現低下は, 以前の観察と一致する (Inomata et al., 2020). これらの結果は, 内在の *pou5f3* が神経管での *soxB1* の発現を正に制御していることを示唆している.

#### Pou5f3 の機能阻害が神経発生遺伝子の発現におよぼす影響の検討

マウス, ゼブラフィッシュなどで, *sall4* および *soxB1* は, 多能性とは別に神経発生を正に制御することが知られており (Koch et al., 2017; Bouldin et al., 2015), これらの遺伝子の *en-pou5f3* による抑制は, *pou5f3* が神経管後端で神経発生を推し進める可能性を示す. 実際, Inomata らは以前に後脳での神経発生に *pou5f3* が必要であることを明らかにした (Inomata et al., 2020). そこで, 本研究では, 尾芽, 神経管後端における *pou5f3* と神経発生との関係をさらに検討するために, *en-pou5f3* を誘導した胚後方における神経分化制御遺伝子の発現を検討した. まず, *neurog1* の場合, *en-pou5f3* を 3-somite 期, 18-somite 期のいずれの時期で誘導しても, 神経板・神経管後端での発現 (Korzh et al., 1998) が顕著に低下した (Fig. 10A, B). 別のプロニューラル遺伝子である *ebf2* についても, 神経管後端での発現が (Bally-Cuif et al., 1998), *en-pou5f3* の 3-somite 期での誘導後, 低下した (Fig. 10C). 一方, 神経分化抑制遺伝子 *notch1a* は, 3-somite 期において神経板内のプロニューラルクラスターなどで発現するが (Hsiao et al., 2007), *en-pou5f3* を 3-somite 期で誘導した場合, 胚の全域で発現が強く活性化された (Fig. 10D). Notch シグナルのリガンド遺伝子 *deltaA* も, 3-somite 期において神経板のプロニューラルクラスターで発現するが (Haddon et al., 1998), *en-pou5f3* 誘導胚の神経板ではやはり, 後方を含めて全域で発現が強く活性化された (Fig. 10E). *her* 遺伝子である *her9* は 3-somite 期において本来神経板で発現するが, *en-pou5f3* 誘導胚においては神経板全域で強く活性化され, 腹側表皮でも活性化が見られた (Fig. 10F).

以上の結果から, 神経前駆体細胞の形成とその分化に関わると考えられる *soxB1* 遺伝子, そしてプロニューラル遺伝子の発現は内在 *pou5f3* により活性化される, あるいは維持されているのに対し, 神経分化抑制に働く Notch 関連遺伝子である *notch1a* と *deltaA*, やはり神経発生を抑制する *her* 遺伝子の一つである *her9* の発現は, 内在 *pou5f3* により抑制されていることが示唆された.

### Pou5f3 の機能阻害が中胚葉形成遺伝子の発現におよぼす影響

尾芽においては神経細胞とともに中胚葉細胞が分化する (Tzouanacou et al., 2009, Koch et al., 2017). そこで、ゼブラフィッシュ尾芽における *pou5f3* と中胚葉分化との関係を検討するため、*en-pou5f3* を 3-somite 期、または 18-somite 期で誘導した胚における中胚葉分化制御遺伝子の発現についても検討した。まず、初期中胚葉及び尾芽のマーカーである *tbxta* (Bouldin et al., 2015) の発現は、いずれの誘導時期でも脊索ではほぼ正常であるが、尾芽で大きく低下した (Fig. 11A, B). 尾芽幹細胞から中胚葉前駆体細胞への分化に関わるとされる *tbx6* (Fior et al., 2012) は未分節中胚葉で発現するが (Nikaido et al., 2002), *en-pou5f3* の誘導を行った胚では、いずれの時期でも尾芽を含む胚体全域で発現が強く活性化された (Fig. 11C, D). 一方、尾芽と体節板で発現する *tbx16* については (Griffin et al., 1998), 3-somite 期で *en-pou5f3* を誘導した場合、脊索で異所的に活性化されたが、その他の領域では特に効果が見られず (Fig. 11E), 18-somite 期での誘導ではほぼ正常な発現が観察された (Fig. 11F). 以上の結果から、尾芽幹細胞の維持を行う *tbxta* は *pou5f3* により尾芽で正の制御を受けるのに対し、脊索での発現には *pou5f3* は関与しないこと、*tbx6* の発現は *pou5f3* により抑制されることが推定される。つまり、*pou5f3* は尾芽の維持を行う一方で、沿軸中胚葉細胞の発生には抑制的である。ただし、*tbx16* の発現に関して、*pou5f3* は尾芽では関与せず、脊索からの排除に必要と考えられる。

### Pou5f3 の機能阻害が分泌因子遺伝子の発現におよぼす影響の検討

次に、尾芽の発生を制御すると考えられる成長因子遺伝子の発現における *pou5f3* の役割を、やはり 3-somite 期、または 18-somite 期で検討した。尾芽由来の Wnt が作用する条件下で、尾芽幹細胞は中胚葉性組織へ分化することが示唆されており (Martin and Kimelman, 2011), 特に後方形成の主要 Wnt 遺伝子である *wnt3a* の発現は、尾芽に加え、頭部の中脳と後脳などで見られる。今回、3-somite 期で *en-pou5f3* を誘導したところ、胚前方で *wnt3a* の発現が強く活性化され、胚後方においてもわずかに活性化されたが、尾芽領域に限定すると発現に異常は見られなかった (Fig. 11G). 一方、18-somite 期で *en-pou5f3* を誘導した胚では尾芽を含めた胚全域で発現が強く活性化された (Fig. 11H).

FGF シグナルも尾芽からの後方形成に重要であると考えられている (Goto et al., 2017; Koch et al., 2017). そこで主要 FGF 遺伝子 *fgf8a* を検討したところ、前述したように正常胚の尾芽で発現が見られたが、*en-pou5f3* を誘導すると、いずれの時期でも尾芽領域での発現は抑制された (Fig. 11I, J). したがって、*fgf8a* は尾芽において *pou5f3* により活性化されていると推定される。

TGF- $\beta$  ファミリー因子である Gdf11 は、マウスにおいて尾芽からの体軸伸長に関わることが知られる (Aires et al., 2018). そこで、*gdf11* についても、3-somite 期、18-somite 期の各々で *en-pou5f3* を誘導した胚において発現検討を行った。その結果、いずれの時期

でも尾芽を含む胚全域で発現が活性化されており (Fig. 11K, L), *gdf11* は胚全域で *pou5f3* により抑制されていると考えられる。

BMP シグナルも尾芽からの中胚葉形成に重要であるとされる (Sharma et al., 2017). そこで, *bmp* 遺伝子の 1 つであり, 様々な胚発生の局面で働き, 尾芽周辺でも発現する *bmp2b* についても *en-pou5f3* 誘導胚で発現を検討した. その結果, いずれの時期で誘導した胚でも胚全域で発現が活性化されており (Fig. 11M, N), *bmp2b* もやはり胚全域で *pou5f3* により抑制されていると考えられる. 一方, BMP シグナル阻害因子遺伝子 *chrd* の発現への *pou5f3* の関与を, やはり 3-somite 期と 18-somite 期で *en-pou5f3* 誘導により検討したところ, いずれの時期でも尾芽での発現が低下しており (Fig. 11O, P), *pou5f3* は *chrd* の発現を正に制御することで BMP シグナルを抑制すると推定される. なお, 尾芽以外の領域ではむしろ発現が上昇しており, 尾芽と他領域で *chrd* の発現における *pou5f3* の役割は逆といえる.

最後に, ES 細胞やマウス胚盤胞などにおいて, *Oct4* との相互発現抑制を通じた細胞分化への関与が示されている *cdx* 遺伝子に注目した (Ralston & Rossant, 2008). *en-pou5f3* 誘導胚における *cdx4* の発現検討を行ったところ, 3-somite 期では後方領域での発現が低下する一方, 本来発現しない前方領域で異所的発現が見られた (Fig. 11Q). しかし, 18-somite 期では全域で発現上昇が見られている. この結果は, 内在 *pou5f3* は初期体節期においては前方領域での *cdx4* の発現には抑制的, 後方での *cdx4* の発現には促進的であるが, 体節形成中期になると全域で *cdx4* の抑制に働くことを示唆する.

#### *en-pou5f3* 誘導胚での *tbxta* と *sox3* の発現の two-color FISH による発現検討

*pou5f3* の機能阻害が尾芽周辺で *tbxta* と *sox3* の発現に及ぼす効果を, 同じ胚において two-color FISH によってさらに解析した. なお, 前述したように, 遺伝子ごとに行った single-color WISH では *en-pou5f3* 誘導によって *tbxta* と *sox3* はいずれも尾芽での発現が低下している.

18-somite 期で *en-pou5f3* 誘導を行ったところ, 尾芽周辺で通常の *tbxta* と *sox3* の発現パターンを示す胚 (4/8) に加え, 両遺伝子とも発現が低下した胚 (4/8) が見られた (Fig. 12A). これらの胚について genotyping を行ったところ, 正常な *tbxta/sox3* の発現を示した胚は全て野生型, 発現低下胚が *en-pou5f3* 保有胚であった (Fig. 12B). この結果から, 内在 *pou5f3* は, 確かに尾芽周辺において *tbxta* と *sox3* の両方の発現に必要であることが確認された.

#### *pou5f3* 変異体における尾芽形成の異常

前述したように, 以前に *pou5f3* 変異体において尾部伸長異常が観察された (Burgess et al., 2002). この異常をさらに検討するために, 所属研究室の佐藤は CRISPR/Cas9 法を用いて開始コドンのすぐ後方に 7 bp 欠損によりフレームシフトを導入し, 新たに *pou5f3* の

変異体を作製した (*pou5f3*<sup>Δ7</sup>) (Fig. 13A) (佐藤, 2018). この遺伝子産物は全 472 アミノ酸中 N 末側 46 アミノ酸のみからなり, ホメオドメイン, POU 特異的ドメインを欠くことから完全機能欠損変異と考えられる. 実際, 得られたホモ変異体では, 既存の *pou5f3* 変異体で報告された (Schier et al., 1996) 峡部欠損が観察されていた (佐藤, 2018).

今回改めて *pou5f3* ヘテロ接合体 (*pou5f3*<sup>+Δ7</sup>) の交配で得られた胚について, 3 dpf で形態観察を行ったところ, 一部の胚 (19%, n=212) で尾部の伸長異常の胚が見られた (Fig. 13B). **genotyping** を行ったところ, 尾部異常が見られた胚 (8 個) は全てホモ変異体であり, ランダムに選んだ正常胚 8 個の中で 2 個が野生型胚 (+/+), 5 個がヘテロ変異体, 1 個がホモ変異体だった (Fig. 13C). 従って, 新たに作製された *pou5f3*<sup>Δ7</sup> 変異ホモ接合体においても尾部伸長異常が確認された.

続いて, ヘテロ接合体の交配で得られた胚について尾芽関連遺伝子の発現を 18-somite 期で WISH により染色し, さらに **genotyping** した. まず, 多能性維持遺伝子である *klf17*, *nanog*, *myca* については, 第 1 部で述べたように正常胚の尾芽では発現が見られないが, ホモ変異体胚でも同様であった (Fig. 14A-C). *pou5f3* 自身の発現については, ホモ変異体胚でも神経管後端での発現に異常は見られなかった (Fig. 14D). *sox2* の発現は, 野生型胚やヘテロ変異体胚と比べてホモ変異体胚でやや高い傾向が見られたが (Fig. 14E), *sox3* の発現には特に異常は見られなかった (Fig. 14F). 一方, 神経発生を正に制御する *nkx1.2la* と *neurog1* についてはホモ変異体の神経管後端で発現が大きく減少した (Fig. 14G, H). *notch1a* の発現には特に変化が見られていない (Fig. 14I). *pou5f3* 自身, *sox3*, *notch1a* の尾芽での発現については ImageJ 解析を行ったが, 有意な発現変化は確認されていない (data not shown).

尾芽と中胚葉分化に関係する *tbxta* の発現については, ホモ変異体胚においてやや尾芽で減少しているように観察されたが (Fig. 14J), ImageJ 解析において有意な発現変化は確認されなかった (data not shown). *tbx16* の発現は後方脊索領域で高い傾向が見られた (Fig. 14K). 一方, *tbx6* の発現については, ホモ変異体胚でも特に異常は見られなかった (Fig. 14L).

分泌シグナル分子遺伝子についても同様に検討したところ, *fgf8a* の尾芽前方領域での発現がホモ変異体胚で顕著に低下していた (Fig. 14M). 一方, *wnt3a* の発現は尾芽において特に異常は見られなかった (Fig. 14N). また, *bmp* 遺伝子の 1 つである *gdf11* についても特に発現変化は見られなかったが (Fig. 14O), *chrd* の発現は, ホモ変異体の神経管後端で顕著に減少した (Fig. 14P). *gdf11* や *wnt3a* の尾芽での発現についても, ImageJ 解析を行ったが, 有意な発現変化は確認されていない (data not shown).

以上のように, *pou5f3* 変異体での遺伝子レベルの表現型は必ずしも顕著とは言えないが, *nkx1.2la* や *neurog1*, そして *chordin* の神経管後端における発現は *pou5f3* に強く依存することが示された.

### Pou5f3 の尾芽形成における役割の Gain-of-function 解析

以上の実験では *en-pou5f3* の誘導による *pou5f3* 機能阻害胚および *pou5f3* 変異体の表現型解析により、尾芽発生における *pou5f3* の役割の検討を試みた。遺伝子の機能解析にはこうした loss-of-function に加え、gain-of-function 実験が重要となる。そのため、Pou5f3 の C 末に改変エストロゲン受容体 (ERT2) が連結された融合タンパク質遺伝子 (*pou5f3-ERT2*) を作製し、選択的 estrogen 受容体モジュレーターである tamoxifen (4-OHT) による処理と組み合わせることで、Pou5f3 転写因子の時期特異的な活性化を行った。

まず、*pou5f3-ERT2* の mRNA をゼブラフィッシュ胚に導入し、18-somite 期から 2 時間 4-OHT で処理して Pou5f3 を活性化させた胚について、*tbxta* と *sox3* の発現を two-color FISH で検討したところ (Fig. 15A), 4-OHT 処理をしなかったコントロール胚と比較して、いずれの遺伝子についても尾芽周辺で活性化が見られた (Fig. 15B)。なお、*tbxta* については発現領域自体の変化は特に見られていないが、*sox3* の発現領域は、活性化胚において神経管のより後方に広がっていた (Fig. 15B)。従って、*en-pou5f3* 誘導実験で示唆されたように、*pou5f3* が *tbxta* と *sox3* の尾芽周辺での発現を活性化することが確認された。また、*pou5f3* の働きは *sox3* の神経管での発現に十分であるが、*tbxta* の発現領域は *pou5f3* 以外の因子にも依存して決定されることが示唆された。

なお、18-somite 期から 2 時間の 4-OHT 処理によって Pou5f3 を活性化させた胚について、さらに 24 hpf まで発生させ、形態観察を行ったところ、活性化を行わなかった胚のみならず (26/26)、Pou5f3 活性化胚もほとんどが正常胚であった (34/37) (Fig. 15C)。このことから、18-somite 期において、尾部形成を含めた胚発生において Pou5f3 単独では顕著な形態異常を起こさず、Pou5f3 は他の制御因子との協調作用を必要とすると考えられる。



## 考察

### 体節形成初期での内在 *pou5f3* の機能阻害が胴尾部伸張に及ぼす効果

第1部で述べたように、*pou5f3* は、初期体節期では *tbxta* を発現する尾芽領域内においてその背側にある予定神経領域で発現しており、尾芽全域で発現する *tbxta* と部分的に共発現するが、中期体節期になると発現は神経管後端に局限し、*tbxta* を発現する尾芽領域と明確な発現境界を形成する。この特異的発現は、*pou5f3* が尾芽細胞の予定神経領域への分化選択とその後の神経前駆細胞の発生に寄与することを示唆する。

第2部では、この可能性をさらに検討するため、*pou5f3* の dominant-interfering 遺伝子 (*en-pou5f3*) の誘導による一連の機能阻害実験を行った。まず、体節形成期の異なる時期で *en-pou5f3* 誘導により内在 *pou5f3* を機能阻害したところ、発生段階が早いほどより前方（近位部）で胴尾部の伸張異常が生じ、体軸伸長が進行するにつれて、生じる伸長異常の部位は後方（遠位部）に移動した。神経管、体節、そして脊索の形成を各々マーカー遺伝子 (*sox19a*, *myod*, *tbxta*) の発現検討の結果、胴尾部異常胚では神経管の異常な形成、体節のパターンの異常やサイズ縮小、脊索の不規則な屈曲やくびれが見られた。これらの結果から、*en-pou5f3* 誘導による胴尾部の伸張異常の原因の少なくとも一部は中軸構造（神経管、脊索、体節など）の形成不全であるといえる。また、*Pou5f3* の機能阻害の結果として異常を起こす部位は、胚体の伸長とともに後方に移っていることから、*pou5f3* が体軸の伸長に関わるのは胚後端に限定されると考えられる。

胚胴尾部の構造が尾芽に由来すること (Row et al., 2015 ; Koch et al., 2017), *pou5f3* が尾芽及び神経管後端で特異的に発現することから、*pou5f3* は尾芽・神経管後端から前方への細胞の供給と胚体幹部の新生、結果としての体軸の伸長に貢献すると推測された。なお、いったんこの領域で生じた体軸構造のその後の発生は *pou5f3* の機能を必要としないと考えられる。体節形成中期では *pou5f3* の発現が神経管後端に限定されるにもかかわらず、脊索や体節の形成が異常となる点は興味深い。脊索の伸長や沿軸中胚葉の形成が神経管の発生にも依存することを示すのかも知れない。

### *pou5f3* 変異体における体軸伸長異常

以前に *pou5f3* 変異体における発生異常の1つとして、尾部の伸長異常が観察されているが、簡潔な記載のみであり、詳細な検討はない (Burgess et al., 2002)。そこで本研究では所属研究室で最近作製された *pou5f3* の機能欠損変異体を用い (佐藤, 2018), 尾芽形成を検討した。この変異体ではフレームシフトの結果、ホメオドメイン、POU 特異的ドメインを欠くことから、null 変異体と考えられる。実際、この変異体系統のホモ接合体では、以前に *spg* 変異体で観察された峡部欠損が確認されている。今回、この *pou5f3* 変異体胚においても尾部の伸長不全という異常を改めて確認しており、このことは *pou5f3* の尾部形成への関与をさらに支持している。

### 尾芽周辺での多分化能関連遺伝子の発現における Pou5f3 の役割

上述したように、本研究ではまず、dominant-interfering 遺伝子により時期特異的に *pou5f3* を機能阻害することで、*pou5f3* が胴尾部の伸長に関与することを形態的に示した。この結果は、マウス *Oct4* の多能性維持における重要性、そしてゼブラフィッシュ *pou5f3* が尾芽、そして神経管後端で継続的に発現することも考慮すると、*pou5f3* は尾芽幹細胞の維持、そして特に脊髄神経細胞への特異化とその後の神経前駆細胞の発生に関わる可能性を支持する。そこで引き続き、尾芽が出現する初期体節期、および体軸が伸長する中期体節期において *en-pou5f3* 誘導により内在 *pou5f3* を阻害し、多能性・多分化能に関係すると考えられる様々な制御遺伝子について、胚での発現を検討した。

まず、初期体節期である 3-somite 期において *en-pou5f3* を誘導したところ、多能性関連遺伝子 *klf17* の発現が (Chambers et al., 2003 ; Takahashi & Yamada, 2006)、胚体全域で活性化された。*nanog* (Chambers et al., 2003) についても同様に発現が胚体全域で活性化された。*myca* (Stewart, 1984) については本来発現のない脊索領域で異所的発現が見られた。*en-pou5f3* がドミナントに働くことから、Pou5f3 はこの時期において、これら多能性関連遺伝子の発現を胚全域、または脊索で抑制していると予想される。このことは、*pou5f3* が尾芽や脊索で細胞の多分化能を阻害し、結果的に分化を促進する可能性を示唆する。この点は哺乳類初期胚や ES 細胞での *Oct4* の役割とは異なっているが、いわゆる多能性維持遺伝子が初期胚以降脊椎動物の発生において果たす役割が不明な現在、解釈には気をつける必要がある。

なお、*pou5f3* 自身の内在発現については、*en-pou5f3* 誘導胚において、発現が神経板前方で広く活性化されたが、尾芽を含む後方領域において発現変動は見られておらず、*pou5f3* は神経板では自身に抑制的であるが、尾芽領域では特に自己調節能を持たないといえる。また、これら多能性遺伝子の *en-pou5f3* 誘導胚における発現変動については、中期体節期においても同様に観察されており、これらの遺伝子の役割や発現制御は体節形成期の過程で大きく変わっていないと推定される。

なお、*sox2* および *sall4* もマウスでは多能性維持遺伝子として知られるが (Boyer et al., 2005)、これらの遺伝子の神経板での発現は、後端を含め、*en-pou5f3* 誘導により逆に抑制された。さらに他の *soxB1* 遺伝子 (*sox3*, *sox19a*) の発現も同様に神経板全域で抑制された。これらの結果から、内在 *pou5f3* は尾芽を含む神経板全域で *soxB1* 遺伝子と *sall4* の発現を活性化、あるいは維持していること、*pou5f3* はこれらの遺伝子の発現に必要不可欠であることが窺える。さらに、*pou5f3-ERT2* を用いた実験も *pou5f3* が直接 *sox3* を活性化することを示している。

以上の *en-pou5f3* 誘導実験の結果から、*pou5f3* は *soxB1* 遺伝子と *sall4* を除く多能性維持遺伝子には主に抑制的に働く一方、*soxB1* 及び *sall4* の発現は基本的に正に制御するといえる。また、この *pou5f3* の機能は体節形成初期と中期で共通していると考えられる。

多能性維持遺伝子の発現制御における *pou5f3* の役割をさらに検討するため、*pou5f3* 変異体での発現についても 18-somite 期で検討したところ、*klf17*, *nanog*, *myca*, *pou5f3* の発現には特に異常が見られなかった。ただし、下でまた論じるが、今回、変異体では *en-pou5f3* 誘導胚と比べて明確な表現型が得られていない。変異体で多能性遺伝子の発現に異常が無いことについては、慎重に考える必要がある。

#### 尾芽および神経管後端での神経発生における Pou5f3 の役割の検討

*soxB1* は、多能性維持とは別に、初期神経発生の制御でも重要である。神経誘導後の神経板に発現し、神経前駆細胞を維持する一方でその後の神経分化と成熟を抑制するほか (Graham et al., 2003 ; Thiel et al., 2013 ; Pevny et al., 1998), 成体神経幹細胞の維持における *sox2* の重要性も知られる (Koch et al., 2017; Javali et al., 2017)。前述したように、今回の研究でゼブラフィッシュ胚の神経管後方から尾芽にかけて、*sox2*, *sox19a* が発現することが明らかになっており、これらの *soxB1* 遺伝子が、尾芽から進入した未分化細胞の神経管後端にある transition zone での神経発生の開始に関わる可能性がある。

今回の *en-pou5f3* 誘導による機能障害で得られた結果から *soxB1* の発現が *pou5f3* により活性化されることが示唆されており、*soxB1* による初期神経発生の開始において、*pou5f3* の存在が必要であると考えられる。実際、Pou5f3-ERT2 を用いた gain-of-function 実験は、*pou5f3* が直接 *sox3* を活性化することを示している。さらに、2 種のプロニューラル遺伝子 (*neurog1*, *ebf2*) も、体節形成初期、中期での *en-pou5f3* 誘導の結果により、発現が *pou5f3* に依存することが示された。一方、神経前駆体からの神経分化に抑制的に関わる Notch 関連遺伝子 (*notch1a* と *delta4*) (Haddon et al., 1998 ; Cornell et al., 2002) については *en-pou5f3* により発現が活性化されており、*pou5f3* は神経分化を抑制する Notch 関連遺伝子の発現については抑制的である。以上から、Pou5f3 は尾芽幹細胞から神経前駆体細胞への分化とその後の神経発生を推進すると考えられる。

*pou5f3* 変異体の 18-somite 期での解析では、*en-pou5f3* 誘導胚において顕著な発現低下が見られた *sox2* と *sox3* については、変異体では明確な発現異常が見られていない。ただ、*sox2* については *en-pou5f3* 誘導胚とは逆に発現の若干の上昇が見られている。全体として、変異体では *en-pou5f3* 誘導胚と比べて明確な表現型が得られていないが、この問題は後で考察する。一方、変異体では *nkx1.2la* と *neurog1* の発現が神経管後端で発現が減少することが観察され、変異体で得られたこれらの結果は *en-pou5f3* 誘導により得られた結果と対応する。つまり、内在 *pou5f3* は神経管後端において *neurog1* と *nkx1.2la* の発現を活性化すると考えられる。なお、*sox19a*, *sall4*, *delta*, *her* などの発現については今回変異体では検討しておらず、今後の課題であろう。

以上より、*pou5f3* は transition zone では *soxB1* の発現を活性化することで尾芽幹細胞から神経前駆細胞への分化に促進的に働き、transition zone より前方の maturation zone におけるその後の神経分化では *pou5f3* はプロニューラル遺伝子の活性化と Notch 関連遺伝

子の抑制を行うことでも神経分化を促進していると考えられる。

#### 尾芽領域での中胚葉細胞の発生における Pou5f3 の役割の検討

尾芽領域では、多分化能幹細胞より神経系細胞の出現と並行して中胚葉系の細胞が分化する (Bouldin et al., 2015)。そこで本研究では、尾芽細胞の維持、あるいは中胚葉前駆体細胞から中胚葉性組織への分化に関わる遺伝子についても、*en-pou5f3* 誘導胚での発現を体節形成初期と中期で検討した。その結果、中胚葉形成や脊索形成、尾芽での多分化能の維持に重要とされる *tbxta* の発現が (Row et al., 2016)、いずれの誘導時期でも脊索では変動せず、尾芽のみで顕著に低下した。さらに、*pou5f3-ERT2* を用いた実験も *pou5f3* が直接 *tbxta* を活性化することを示している。したがって、*pou5f3* は尾芽の未分化細胞の維持に必要である一方で、その後の脊索の維持には関与しないと考えられる。

一方で、尾芽幹細胞から中胚葉前駆体細胞への分化に重要とされ、主として沿軸中胚葉で発現する *tbx6* の発現が (Nikaido et al., 2002)、*en-pou5f3* 誘導胚では広範囲に活性化された。尾芽と体節板で発現して *sox2* を抑制するとされる *tbx16* (Bouldin et al., 2015) については、脊索で異所的に発現が上昇した。*tbx16* の脊索における異所的発現は *pou5f3* 変異体でも観察された。*tbx6* についてはホモ変異体胚で顕著な発現変動は見られなかったが、この点はさらなる検討が必要である。

以上の結果から、*pou5f3* は尾芽領域で *tbxta* を活性化することで未分化細胞の維持に関わり、*tbx6* および *tbx16* の発現を抑えることで尾芽幹細胞から中胚葉前駆体細胞への分化において抑制的に働くと考えられる。沿軸中胚葉で発現する *tbx16* の発現が *en-pou5f3* 誘導胚では脊索でも異所的に見られることは、*pou5f3* が脊索 - 沿軸中胚葉の分離にも関与する可能性を示唆する。なお、初期体節期での *en-pou5f3* 誘導によって伸長中の脊索での *tbxta* の発現と体節での *myod* の発現が不規則となり、脊索と体節の形成に異常が生じることも、*Pou5f3* が幹細胞の分化に加え、脊索と沿軸中胚葉の分化にも関わることに対応する。

#### 尾芽周辺での分泌因子遺伝子の発現における pou5f3 の役割

尾芽発生は Wnt シグナル (Martin and Kimelman, 2012)、FGF シグナル (Goto et al., 2017)、BMP シグナル (Sharma et al., 2017)、そして GDF11 シグナル (Aires et al., 2018) による制御を受けることが知られている。そこで今回、シグナルごとに、代表的な分泌遺伝子の発現制御への *pou5f3* の関与を検討した。*wnt3a* の尾芽周辺での発現については、初期体節期、中期体節期のいずれでも *en-pou5f3* を誘導した際、胚体全域で顕著に上昇していた。この結果は、胚において、*pou5f3* が *wnt3a* の発現を抑制することを示唆する。なお、変異体胚では *wnt3a* の発現に異常は見られていない。一方、*fgf8a* (Goto et al., 2017) については *en-pou5f3* 誘導による *pou5f3* の機能抑制の結果、沿軸中胚葉および尾芽の両方で顕著に抑制された。*fgf8a* の発現低下は *pou5f3* 変異体でも観察されており、*pou5f3* の胚後端の発生における役割の少なくとも一部は *fgf8a* の発現維持によると考えられる。

一方, *bmp2b* と *gdf11* については, *en-pou5f3* 誘導胚において, 尾芽を含めて胚体全体で発現上昇が見られた. このことから, *pou5f3* は *bmp2b* と *gdf11* の発現には抑制的であると考えられ, これは神経管後端で発現するという *pou5f3* 発現領域検討の結果と一致する. しかしながら, 発現変動は必ずしも顕著とは言えず, また, *pou5f3* 変異体胚では発現変化が見られなかったことから, 今後さらに検討する必要がある. BMP シグナルと関連して, おもしろいことに, *chrd* の発現が, *en-pou5f3* 誘導胚及び *pou5f3* 変異体胚の尾芽および神経管後端で顕著に低下しており, 内在 *pou5f3* は, *chrd* の発現を正に制御することでも BMP シグナルを抑制し, 神経分化を促進していると考えられる.

#### 後方形成遺伝子 *cdx* の発現における *pou5f3* の役割

*caudal/cdx* ファミリー遺伝子は, ショウジョウバエ (Macdonald and Struhl, 1986), そして脊椎動物の胚で後方の形成に働くことが知られる (Shimizu et al., 2005 ; Beck & Stringer 2010). ゼブラフィッシュでは *cdx1a*, *cdx1b*, *cdx4* が知られており, これらは他の脊椎動物同様尾芽を含めた後方領域で発現し (Warga et al., 2013), 尾芽を含む胚体後方神経系および中胚葉の形成に関わる (Shimizu et al., 2015). 実際, ゼブラフィッシュの場合, *cdx* 変異体において後方構造が減少すること (Davidson et al., 2003 ; Golling et al., 2002 ; Shimizu et al., 2005), *cdx* 遺伝子が Wnt シグナルや FGF シグナルによって正の制御を受けることが報告された (Shimizu et al., 2005). 一方, 初期胚細胞や ES 細胞などにおいて *Cdx* は *Oct4* との間で相互発現抑制の関係にあり, 多能性維持に関わる *Oct4* とは対照的に *Cdx* は栄養外胚葉で発現し, この領域の発生に必要である (Nes et al., 2006).

以上の知見から, *cdx* が, 尾芽, あるいは神経管後端の発生において *pou5f3* と協調的に働くことが予想されたため, 本研究では *cdx4* の発現への *pou5f3* の関与を検討した. *cdx4* は, 3-somite 期において胚後方で広く発現が見られるが, *en-pou5f3* 誘導胚ではこの時期, 後方での発現は低下する一方で, おもしろいことに胚前方領域で広く異所的に活性化された. 従って, *pou5f3* は, *cdx* の前方での発現については抑制的に働くのに対し, 胚後方での発現については正の制御を行い, 結果的に胚後方の形成を促進して正常な前後軸のパターン形成に寄与すると考えられる. 従って, ここで注目する尾芽発生, 神経管後端の発生においても *pou5f3* は同様に正の制御を行う可能性があるが, 詳細についてはさらに変異体解析が必要であろう.

*cdx* の発現制御において Pou5f3 の役割が尾芽領域と胚前方領域で大きく異なることは興味深い. 前方で見られる *cdx* 発現の抑制作用はマウス初期胚や ES 細胞で見られるものと対応するが, 後方では *cdx* の活性化という逆の働きを持つことになる. *cdx* 遺伝子の転写制御で *pou5f3* が領域により異なる働きを持つ機構は不明であるが, 前後パターンに関わる各種因子 (retinoic acid, Wnt シグナル, FGF シグナル, Hox 遺伝子など) の共存の有無, あるいは epigenetic な機構に起因すると思われる.

### 尾芽周辺での *sox3* 及び *tbxta* の発現における内在 *pou5f3* の役割

上述したように、*en-pou5f3* 誘導により *sox3* と *tbxta* の尾芽での発現がともに減少することから、内在 *pou5f3* は *sox3* と *tbxta* のこの領域での発現に必要であることが示唆された。これと対応して、Pou5f3-ERT2 の 18-somite 期での tamoxifen による活性化により *sox3* と *tbxta* の発現がともに増加した。このことは、Pou5f3 が *sox3* と *tbxta* の発現を尾芽周辺で活性状態にすることを直接示しており、*pou5f3* は尾芽周辺での *sox3* と *tbxta* の発現に必要であるのみならず、十分であるといえる。

なお、Pou5f3 活性化胚において、*sox3* の発現は全体として強くなるのみならず、神経管後端の transition zone 相当領域まで広がった。しかし、神経管以外での異所的発現は見られていない。従って、*sox3* の発現は活性化 Pou5f3 により transition zone でも発現しうるが、この領域では本来 Pou5f3 による活性化と拮抗する抑制機構があると考えられる。一方の *tbxta* の発現上昇については、あくまでも尾芽領域と脊索に限定されており、他の領域では発現に異常が見られていない。transition zone を含めた他の領域では、他の因子が *tbxta* の発現を抑制している、あるいは *tbxta* の発現に必要な他の因子が存在しないと考えられる。

さらに考察すると、尾芽において何らかの機構で神経方向へ特異化にされて transition zone に移行した細胞では *pou5f3* が活性化され、これがさらに *sox3* の発現を徐々に誘導している可能性がある。Transition zone での *sox3* の低発現については、活性化 Pou5f3 が大量にあれば増強されうることを考慮すると、必ずしも抑制されているわけではなく、単にこの領域で初めて内在 Pou5f3 により転写活性化された直後の段階にあるためであり、前方に移行するに伴い、*sox3* の発現はさらに上昇し、maturation zone の状態になるのかもしれない。一方、*tbxta* の発現領域については、Pou5f3 以外の因子によって尾芽領域、脊索領域、神経管領域が区別されていると考えられる。この領域を決定する因子、そして Pou5f3 の作用を無効にする機構については今後の検討課題である。

なお、18-somite 期で Pou5f3 活性化を行った胚でも、24 hpf の発生段階でコントロール胚と比較して特に形態異常は見られていない。この時期の Pou5f3 活性化では、*sox3* 及び *tbxta* の発現変化が引き起こされるが、その発現変化のほとんどは本来の発現領域内での発現上昇であって異所的といえるのは transition zone のみであるため、脊索や神経管の大規模な形態異常は見られないと推測される。また、*sox3* 及び *tbxta* の発現変化が一過的であるために形態には影響しないことも考えられる。

### Pou5f3 機能阻害胚と変異体胚で見られる遺伝子レベルの表現型の違い

今回、変異体では *en-pou5f3* 誘導胚と比べて明確な表現型が得られていない。その理由として、まず、変異体胚における他の遺伝子による Pou5f3 機能の補完が考えられる。この可能性を検討するために、変異体胚において、Pou5f3 以外の他の POU 遺伝子の発現が増加しているのかを WISH で調べる必要がある。*pou5f3* 変異が異所的ストップコドンの出現によることから(佐藤, 2018), いわゆる転写適応の関与も排除できないが(Sztaf & Stainier,

2020), この変異体では峡部欠損や尾部伸長異常など, 既に知られる形態異常が観察されることから, その影響は限定的と思われる. 別の理由として, *en-pou5f3* 誘導胚において Pou5f3 以外の POU 遺伝子の機能が非特異的に抑制されている可能性も考えられる. この可能性についても, 今後さらに検討していく必要がある.

### 第3部 尾芽及び神経管後端の発生制御における分泌性因子及び *tbxta* の役割の検討

#### 要旨

ゼブラフィッシュにおいて、尾芽における幹細胞様細胞の維持には様々な転写因子遺伝子の関与が知られており、*sox2*や*tbxta*により多分化能が維持され、*soxB1*や*tbx16*などの働きで神経系または中胚葉の系列へ特異化され、各系列のその後の分化にはプロニューラル遺伝子、あるいはmyogenic遺伝子などの中胚葉分化遺伝子が関与する。一方で、これらの過程に関わる分泌因子も明らかになりつつあり、Wnt, FGF, そしてBMPの尾芽発生への関与が示唆されている。

本研究では、尾芽領域の発生における各種シグナル分泌因子の役割について検討するため、体節形成期のゼブラフィッシュ胚（14 hpf～18 hpf）を、各種シグナル伝達を修飾する薬剤（Wnt シグナル阻害剤 IWR-1, Wnt シグナル活性化剤 BIO, FGF シグナル阻害剤 SU5402, BMP シグナル阻害剤 Dorsomorphin）で処理し、胚における尾芽形成制御遺伝子の発現への影響をWISHにより検討した。その結果、Wnt シグナル阻害胚では、*tbxta*の尾芽での発現が減少し、神経管における*sox2*の発現、尾芽周辺での*fgf8a*の発現が上昇した。Wnt シグナル活性化胚では予想通り阻害胚とは逆の効果が見られた。一方、FGF シグナル阻害胚では、神経管における*sox2*, *sox3*, 尾芽での*wnt3a*の発現が上昇した。BMP シグナル阻害胚では、尾芽周辺における*wnt3a*, *fgf8a*の発現が減少し、神経管における*sox2*, 尾芽における*tbxta*の発現が上昇した。これらのことから、Wnt/FGF/BMP シグナルは尾芽形成遺伝子の発現制御を通じて、尾芽発生に関与することが示唆された。

さらに、本研究において、尾芽幹細胞での多能性維持に重要であると考えられる*tbxta*の機能解析のため、mRNAの注入による強制発現実験を行ったところ、強制発現胚において、神経管における*sox2*, 未分節中胚葉領域における*myod*, 尾芽周辺における*fgf8a*の発現減少、脊索領域での*tbx16*の発現上昇が見られた。その一方で、*pou5f3*, *sox3*, *neurog1*, *wnt3a*については発現に特に異常は生じていない。これらの結果から、尾芽周辺領域において、*tbxta*は、尾芽の維持において協調的に働く*sox2*の発現には抑制的であり、*pou5f3*の発現については関与しないこと、*myod*, *fgf8a*, *tbx16*の発現の制御にも関わることが明らかになった。



## 序論

尾芽の発生において、Wnt/FGF/BMP シグナルなどの各種シグナルが関わることが知られている (Martin and Kimelman, 2011 ; Goto et al., 2017 ; Sharma et al., 2017). 尾芽の多分化能細胞が中胚葉前駆体に分化する際には、Wnt シグナルの存在が必要とされている (Martin and Kimelman, 2011). また、尾芽から生じた中胚葉前駆体が沿軸中胚葉に分化する際にも Wnt シグナルが働く (Martin and Kimelman, 2011). さらに、Wnt シグナルは尾芽からの脊索の分化にも必要とされる (Row et al., 2015). 一方、FGF シグナルは尾芽において、神経板の後方化、そして後方の沿軸中胚葉の形成などを制御する (Goto et al., 2017). さらに、FGF シグナルは尾芽からの中胚葉分化において Wnt シグナルと共に働くと考えられている (Koch et al., 2017). また、BMP シグナルは尾芽の多分化能細胞が中胚葉組織に分化する際の上皮間充織転換に関わり、尾芽からの中胚葉分化に必要であるとされる (Anderson et al., 2016 ; Sharma et al., 2017). さらに、*bmp11* としても知られる TGF- $\beta$  ファミリー遺伝子 *gdf11* については、マウスにおいて尾芽からの体軸伸長に関わることが知られる (Aires et al., 2018). 一方、尾芽幹細胞の多分化能性の維持には、尾芽での *tbxta* と *sox2* の共発現が重要であることが報告された (Goto et al., 2017). また、尾芽の多分化能細胞からの中胚葉分化にも *tbxta* が働くとされる (Bouldin et al., 2015 ; Koch et al., 2017).

今回、これらシグナルに関わる遺伝子 (*wnt3a*, *fgf8a*, *bmp2b*, *gdf11* など) 及び *tbxta* の尾芽周辺での発現を WISH および FISH を用いて詳細に解析した (第 1 部). その結果、*tbxta* が尾芽特異的に発現することを改めて確認し、この *tbxta* 発現領域が各種分泌因子遺伝子を含む各種尾芽形成遺伝子の発現と密接な関係にあることを確認した. また、分泌因子遺伝子の尾芽での発現パターンは多様であり、遺伝子ごとに異なっていることを見出した. また、*pou5f3* 機能阻害胚において、これら分泌因子遺伝子の発現を検討したところ (第 2 部), *wnt3a*, *bmp2b*, *gdf11* については発現の上昇が、*fgf8a* については発現の低下が見られた. このことから、内在 Pou5f3 は *wnt3a*, *bmp2b*, *gdf11* の発現は抑制する一方、*fgf8a* の発現は活性化すると考えられた.

これらの知見を踏まえて、第 3 部ではまず、尾芽におけるシグナル分泌因子の役割を直接検討するため、体節形成期のゼブラフィッシュ胚を、Wnt シグナル、FGF シグナル、そして BMP シグナルを修飾する薬剤で処理し、胚における尾芽形成制御遺伝子の発現への影響を WISH により検討した. また、mRNA 導入による *tbxta* の強制発現の効果を検討することで *tbxta* の役割を直接検討することを試みた.

## 結果

### 細胞内シグナル経路を修飾する各種薬剤の尾芽発生への影響

前述した正常胚での遺伝子発現領域の検討（第 1 部）、*pou5f3* 機能阻害胚についての遺伝子発現解析（第 2 部）などの結果から、ゼブラフィッシュ胚での尾芽発生におけるシグナル分泌因子の関与が示唆された。第 3 部では尾芽におけるシグナル分泌因子の役割を直接検討するため、体節形成期のゼブラフィッシュ胚（14 hpf～18 hpf）を、Wnt シグナル、FGF シグナル、そして BMP シグナルを修飾する薬剤（Wnt シグナル阻害剤 IWR-1, Wnt シグナル活性化剤 BIO, FGF シグナル阻害剤 SU5402, BMP シグナル阻害剤 Dorsomorphin）で処理し、胚における尾芽形成制御遺伝子の発現への影響を WISH により検討した。

まず、*pou5f3* の神経管後端での発現については、いずれの薬剤での処理でも異常は見られなかった（Fig. 16A）。一方、*soxB1* 遺伝子である *sox2* の神経管後端と腹側中胚葉での発現はいずれも、Wnt シグナル阻害で上昇、Wnt シグナル活性化で減少した。阻害胚においては単に発現が強くなるのみではなく、尾芽まで発現が拡大した。FGF シグナル、BMP シグナルのいずれについても、阻害剤処理で *sox2* 発現の増強と尾芽への拡大が見られた（Fig. 16B）。同じ *soxB1* 遺伝子である *sox3* の発現については、Wnt 阻害では特に異常は見られなかったが、Wnt 活性化で *sox2* とは逆に上昇が見られた。FGF シグナル阻害では顕著な *sox3* の発現上昇が見られたが、BMP 阻害では特に異常は見られていない（Fig. 16C）。なお、発現上昇についてはいずれのシグナル阻害でも神経管後端に限定されており、尾芽や中胚葉での異所的発現は観察されなかった。

*tbxta* の尾芽での発現は、Wnt 阻害で顕著に減少したが、Wnt 活性化では明らかな異常は認められておらず、FGF 阻害でも異常は見られなかった。BMP シグナル阻害では発現領域の尾芽での大幅な拡大が観察された。なお、いずれの処理でも脊索での発現については異常が見られていない（Fig. 16D）。また、沿軸中胚葉形成遺伝子である *tbx16* の発現は全ての処理胚で正常だった（Fig. 16E）。

尾芽では中胚葉分化を制御するとされるシグナル分泌因子遺伝子 *wnt3a* の尾芽での発現については、Wnt シグナルの阻害、活性化のいずれでも特に異常は見られなかったが、FGF シグナル阻害では顕著に上昇し、BMP 阻害では減少した（Fig. 16F）。なお、BMP 阻害胚では、後方胚領域で弱いながら広範な異所的発現が見られている。神経板の後方化、そして後方の沿軸中胚葉の形成を制御するとされる *fgf8a* の尾芽での発現については、Wnt 阻害で強く上昇する一方、Wnt の活性化で大幅に減少した。FGF シグナル阻害剤では特に異常は見られないが、BMP 阻害胚では発現が低下した（Fig. 16G）。

以上の結果から、尾芽幹細胞の維持や分化に関わると考えられる制御遺伝子の多くが、これら 3 通りのシグナルの少なくとも一つにより発現制御を受けているといえる。

### 尾芽維持遺伝子 *tbxta* による尾芽形成遺伝子発現の制御

*sox2* とともに尾芽細胞の維持に重要とされる *tbxta* について、その尾芽発生での機能を解析するために、1細胞期で *tbxta* の mRNA を胚に注入し、14-somite 期で WISH により尾芽形成遺伝子の発現解析を行った。まず、本研究で注目する *pou5f3* の発現については、コントロール胚と比較して顕著な違いは見られなかった (Fig. 17A)。一方、尾芽細胞の維持に加えて初期神経発生において重要であるとされる *sox2* の発現を検討したところ、*tbxta* の強制発現胚で全体に減少しており、特に尾芽での発現の消失が顕著だった (Fig. 17B)。対照的に、同じく *soxB1* である *sox3* の発現については、特に発現異常は見られなかった (Fig. 17C)。また、プロニューラル遺伝子である *neurog1* の神経管での発現についても、強制発現胚で異常は特に見られなかった (Fig. 17D)。

一方、中胚葉形成遺伝子である *tbx16* については、*tbxta* 強制発現胚において、沿軸中胚葉に加えて脊索領域で弱いながら異所的発現が観察された (Fig. 17E)。やはり沿軸中胚葉、そして体節で発現する *myod* については、胚後方領域で発現低下が見られた (Fig. 17F)。シグナル分泌因子遺伝子の場合、尾芽での *wnt3a* の発現については *tbxta* 強制発現胚で異常は見られなかったが (Fig. 17G)、*fgf8a* については、尾芽周辺領域において強制発現胚で発現の減少が観察された (Fig. 17H)。以上のように、尾芽周辺領域において、*tbxta* は *sox2*, *myod*, *fgf8a* の発現を抑制する一方、*tbx16* の発現は活性化していることが示唆された。

## 考察

### 分泌性シグナルの尾芽発生における役割

今回、各種分泌性シグナルを修飾する薬剤で体節形成期に処理した胚についての WISH 解析により、調べた尾芽形成制御遺伝子の多くが Wnt, FGF, あるいは BMP シグナルにより発現制御を受けることが示された。実際、これらのシグナル因子遺伝子は尾芽周辺で発現していることをすでに確認しており（第 1 部）、実際に尾芽周辺での発生を制御すると考えられる。

今回注目する *pou5f3* の神経管後端での発現については、Wnt/FGF/BMP シグナルのいずれの修飾によっても異常が見られておらず、これらのシグナルには依存しないと考えられる。*pou5f3* は体節形成期での尾芽発生において、Wnt/FGF/BMP シグナルとは別経路で制御される、あるいはこれらのシグナルの上流で働くと考えられるが、発生のより早い時期ではこれらのシグナルににより制御されている可能性もあり、今後の課題である。

*soxB1* 遺伝子の場合、*sox2* は Wnt, FGF, BMP シグナルの全てについて、阻害剤により発現が神経管後端と腹側中胚葉で上昇し、さらに尾芽で異所的に発現が観察された。従って、これらは全て胚においては *sox2* の発現に抑制的であり、特に尾芽において *sox2* の発現をこの時期排除していると考えられる。*sox2* は、尾芽の多能性の維持と神経分化に重要である一方 (Koch et al., 2017), Wnt, FGF, BMP シグナルがいずれも尾芽からの中胚葉分化に関わるとされており (Goto et al., 2017; Sharma et al., 2017), 今回の結果はこれらの知見と一致する。その一方で、*sox3* の神経管での発現の場合、FGF 阻害剤による発現上昇は同様に見られるが、BMP 阻害剤では明らかな効果が見られず、Wnt シグナルによっては特に神経管後端で活性化された。従って、神経管での *sox3* の発現は、FGF によっては *sox2* と同様に抑制されるが、BMP による制御はなく、Wnt によっては逆に活性化されると推定される。こうした各種分泌シグナルへの応答能の違いが *sox2* と *sox3* の発現部位の違い、そして *sox2* の特徴的な発現変動の要因の一部と推定される。今後、*soxB1* 遺伝子間の Wnt シグナルによる調節の違いについてはさらに検討する必要がある。

*tbxta* の尾芽での発現については、Wnt シグナル阻害による発現減少が見られた一方、BMP 阻害では発現上昇が見られた。一方、FGF シグナルの阻害は *tbxta* 発現に影響を与えなかった。これらのことから、*tbxta* は Wnt シグナルにより活性化されるが、BMP シグナルによっては抑制され、FGF シグナルの制御は受けないと考えられる。*tbxta* とは対照的に *tbx16* についてはシグナル修飾の効果は明確ではなかった点も興味深く、異なる制御を受けるといえる。なお、*sox2* と *tbxta* が共通して BMP シグナルにより抑制されることから、BMP シグナルは尾芽での多分化能維持には抑制的と考えられる。

本研究では、尾芽形成への関与が知られる成長因子遺伝子自身の発現制御における各種シグナルの役割についても、同様の薬剤処理実験により検討された。その結果、*wnt3a* の発現は、Wnt シグナルの阻害、活性化のいずれでも特に異常は見られなかったが、FGF シ

グナル阻害では顕著に上昇し、BMP 阻害では減少した。*fgf8a* の発現については、Wnt 阻害で強く上昇する一方、Wnt の活性化で大幅に減少した。また、FGF シグナル阻害剤では特に異常が見られないが、BMP 阻害胚では発現が低下した。

従って、*wnt3a* は FGF シグナルにより強く抑制される一方、*fgf8a* は Wnt シグナルにより抑制される。この結果から、尾芽周辺での Wnt-FGF シグナル間の相互抑制機構の存在が示唆された。一方、BMP シグナルは Wnt 遺伝子 (*wnt3a*)、FGF 遺伝子 (*fgf8a*)、を共に活性化することを示唆しており、このことも、各シグナル間の相互調節機構 (クロストーク) の存在を示している。

#### 尾芽維持遺伝子 *tbxta* の尾芽形成遺伝子発現への役割

尾芽で発現し、その多分化能の維持に重要とされる *tbxta* について (Koch et al., 2017), 尾芽での機能を胚内で直接検討するために、mRNA の注入による強制発現実験を行った。まず、注目する *pou5f3* の神経管後端の発現については、強制発現胚で特に変化は見られず、*pou5f3* の発現は *tbxta* による制御を受けないと考えられる。

*soxB1* 遺伝子について検討したところ、*tbxta* 過剰発現により *sox2* の発現低下が見られ、この発現抑制は特に尾芽で顕著だった。尾芽幹細胞の多分化能の維持、そして神経分化、中胚葉分化の制御において、*tbxta* と *sox2* は協調的に働く一方で相互抑制の関係にあることが知られており (Koch et al., 2017), 今回観察した *tbxta* による *sox2* の抑制結果はこれまでの知見と一致する。*sox2* による *tbxta* の発現制御についても改めて検討すべきであろう。なお、*sox3* については、*tbxta* 過剰発現による発現異常が観察されておらず、*sox2* とは異なり、*sox3* は *tbxta* によって発現を抑制されないことが示された。*soxB1* 遺伝子間での *tbxta* による発現制御の違いについても今後さらに検討していく必要がある。プロニューラル遺伝子である *neurog1* の発現も *tbxta* 過剰発現による影響を受けておらず、*tbxta* は神経管後端 (transition zone) より前方で発現する神経分化遺伝子の発現には関与しないと考えられる。

今回、尾芽と未分節沿軸中胚葉で発現する *tbx16* については、*tbxta* 過剰発現胚の脊索領域で弱いながら異所的に発現が観察された。このことから、*tbxta* 過剰発現により脊索領域が部分的に沿軸中胚葉化したように思われる。しかし、*tbxta* は脊索でも発現する遺伝子であるため、*tbxta* 過剰発現胚ではむしろ脊索領域の拡大が予想され、この結果は意外である。一方、やはり沿軸中胚葉、そして体節で発現する *myod* については、*tbxta* の過剰発現胚で発現が減少したことから、*tbxta* の過剰発現により尾芽からの脊索への分化が促進される一方、沿軸中胚葉への分化が抑制されたとも考えられる。このことは *tbxta* と *myod* の発現パターンとも一致するが、*myod* と *tbx16* の *tbxta* 過剰発現への反応の違い、そして *tbx16* の脊索領域での異所的発現のメカニズムについては、今後の課題であろう。

尾芽と未分節中胚葉、そして各体節の後方で発現する *fgf8a* の発現は、*tbxta* 過剰発現により低下することが観察されており、*myod* の発現低下と同様に、*tbxta* の過剰発現により

脊索への分化が促進されたことに起因するかもしれない。一方、尾芽で発現する *wnt3a* の発現は *tbxta* 過剰発現胚で変化が見られておらず、*tbxta* は *wnt3a* の尾芽での発現において十分ではない。Wnt 阻害剤実験の結果と合わせると、尾芽発生において *wnt3a* は *tbxta* の上流で働くと考えられる。

## 第 4 部 *pou5f3* の転写制御機構に関する reporter 解析

### 要旨

本研究において、尾芽形成、体軸伸長、そして神経管の伸長への *pou5f3* の関与が示された。従って、体節形成期におけるこの遺伝子の尾芽・神経管後端特異的な発現の制御機構を明らかにすることが、脊椎動物における後方構造の形成の理解に重要である。

第 4 部では、*pou5f3* の転写制御のメカニズムを解明するため、胚での時間的、領域的発現に重要とされる遺伝子上流 2.4 kb DNA (-2.2 ~ATG) を連結させた luciferase 遺伝子 (Luc-2.2) を *pou5f3* の発現の指標として、各種脳形成遺伝子の効果を培養系で検討した (P19C6 細胞)。まず、Luc-2.2 の発現制御における *pou5f3* 自身と *soxB1* 遺伝子の相乗作用に注目したところ、*pou5f3* と *sox3*、*pou5f3* と *sox19a* は相乗的に転写を活性化するが、*pou5f3* と *sox2* には明瞭な相乗作用は見られなかった。一方で Luc-2.2 の発現において、*soxB1* 遺伝子間では相乗作用が確認できなかった。従って、*pou5f3* の発現制御において、*sox3* と *sox19a* は各々 *pou5f3* と相乗的に活性化する能力を持つが、*sox3* と *sox19a* は互いに独立して働くと考えられる。

さらに、神経板の状況を反映する *sox3* と *pou5f3* 自身の共存状態において、各種脳形成遺伝子の Luc-2.2 発現への効果を同様に培養系で検討した。まず、*pou5f3* と同様に神経管後端で発現する *nkx1.2la* については、*pou5f3* の発現に顕著に抑制的であることが示された。さらに、やはり尾芽での発現が知られる *gbx2* についても強い抑制効果を示した。一方、脊索及び尾芽で *pou5f3* と相補的に発現する *tbxta* については第 3 部で示した *tbxta* 過剰発現実験の結果で予想されるように Luc-2.2 の発現に影響しなかった。

## 序論

第 1 部での WISH 及び FISH による発現解析から, *pou5f3* は体節形成期において神経管後端で特異的に発現することが確認された. この *pou5f3* 発現領域を本研究では transition zone と命名し, transition zone よりも前方の神経管領域では *sox3*, *neurog1* の発現が見られ, この領域を maturation zone とした. すなわち, transition zone で神経分化が特異化された神経前駆細胞は, maturation zone において実際の神経分化を進行させると考えられた. この尾芽幹細胞から神経分化が起きる初期段階である transition zone で *pou5f3* が特異的に発現するメカニズムを解明することは, 尾芽からの神経分化の制御機構を理解するために必要である.

以前の *pou5f3* 発現制御に関する研究において, *pou5f3* の主要な転写調節領域が転写開始点の上流 2.2 kb までの DNA 配列に存在するとされた (Parvin et al., 2008). また, この *pou5f3* 転写調節領域にはレチノイン酸応答領域が存在することも示された (Parvin et al., 2008). さらに, 所属研究室の先行研究において, *pou5f3* の発現制御のメカニズムを明らかにするため, *pou5f3* 上流 2.4 kb (-2.2 kb~ATG) を Luciferase (Luc) 遺伝子につないだレポーターコンストラクト (Luc-2.2) のマウス胚性腫瘍細胞 (P19) における発現を検討したところ, Luc-2.2 の発現が, *pou5f3* と *sox3* により相乗的に活性化されることが示された (Kobayashi et al., 2018).

*sox2* や *sox3* などから構成される *soxB1* 遺伝子ファミリーは, 神経前駆細胞の特異化や維持, そしてその後の神経幹細胞の増殖と分化を制御することが知られている (Archer et al., 2011; Dee et al., 2008). マウス ES 細胞では, 多能性維持に関わる *nanog*, *Oct4* などの転写調節において, SoxB1 転写因子である Sox2 と Oct4 が転写調節領域内の隣接した部位に結合し, これらが協調的に転写を活性化するとされる (Kuroda et al., 2005).

しかしながら, 尾芽での *pou5f3* の発現制御に関する研究は現在のところ行われていない. 一方, 第 1 部での尾芽周辺での発現領域の検討から, 尾芽での *pou5f3* 発現制御には *tbxta*, *soxB1*, *nkx1.2la* などが関与することが予想された. そこで今回, *pou5f3* の尾芽での転写制御メカニズムを解明するため, *pou5f3* 自身と *soxB1* 遺伝子の相乗作用に注目して, 細胞培養系を用いた検討を行った. また, *pou5f3* と同様に神経管後端で発現する *nkx1.2la*, 脊索及び尾芽で *pou5f3* と相補的に発現する *tbxta* についても, *pou5f3* 発現制御への役割を培養細胞系で検討した.



## 結果

### *pou5f3* 上流プロモーター領域による転写制御における *soxB1* の働き

本研究では尾芽形成における *pou5f3* の発現制御のメカニズムについて明らかにするため、*pou5f3* 上流 2.4 kb (-2.2 kb~ATG) を Luciferase (Luc) 遺伝子につないだレポーターコンストラクト (Luc-2.2) のマウス胚性腫瘍細胞 (P19) における発現を、様々な尾芽形成制御遺伝子発現コンストラクトの存在下で測定した。この実験系を用いた所属研究室の先行研究において、Luc-2.2 の発現が、*pou5f3* と *sox3* により相乗的に活性化されることが示されている (Kobayashi et al., 2018)。ゼブラフィッシュ胚の神経板・神経管では *sox3*、そして *sox19a* が広く発現しており、体節形成中期でも神経管の後端でも低レベルながら発現が見られる (Inomata et al., 2020; 第 1 部)。また、体節形成初期の尾芽背側部、そして体節形成中期の神経管後端では *pou5f3* が発現する (第 1 部)。従って、*pou5f3* と *sox3/sox19a* が共発現する条件での Luc-2.2 の発現は、尾芽、あるいは神経管後端での *pou5f3* の発現制御を反映することが期待される。本研究でもこの条件下での Luc-2.2 の発現を制御する遺伝子の検討を試みた。

まず、この実験系において、Luc-2.2 の発現への *sox3* と *pou5f3* の効果について確認を試みた。その結果、*sox3* は、単独では弱い活性化のみを示すが、*pou5f3* と共存することで相乗的な活性化を示した (Fig. 18A, C)。さらに、同様の *pou5f3* との相乗的活性化がゼブラフィッシュ特有の *soxB1* である *sox19a* についても今回初めて見出された (Fig. 18B)。なお、Kobayashi らによればやはり *soxB1* 遺伝子である *sox2* については相乗性が低いとされており (Kobayashi et al., 2018)、同様に検討したところ、今回の実験では、*sox2* の導入量を 2 倍にしても *pou5f3* との相乗効果がほとんど認められなかった (Fig. 19A)。

次に、Luc-2.2 の発現制御における *soxB1* 遺伝子間の相互作用の可能性を検討するため、改めて *pou5f3* 存在下での Luc-2.2 の活性化を、異なる組み合わせの *sox3*, *sox2*, *sox19a* の存在下で検討した (Fig. 19A, B)。まず、*sox3* と *sox2* の効果を、各々単独、あるいは共存下で調べた。*sox3* と *sox2* はいずれも、すでに観察されたように単独ではほとんど活性化能を示さない (Kobayashi et al., 2018)。*pou5f3* との相乗効果については、この実験でも *sox3* についてのみ観察された。そして問題とする *sox2* と *sox3* の間での相乗作用も確認されなかった (Fig. 19A)。

一方、*sox19a* については、*sox2*, *sox3* と同様、単独での Luc-2.2 活性化は観察されず、*pou5f3* との相乗作用については上述したように *sox3* と同様に見られた (Fig. 19B)。そして、この *pou5f3* との相乗作用は *sox3* と *sox19a* が共導入された場合、各々単独よりわずかに増強された。ただし、この増強効果は軽微なものだった (Fig. 19B)。これらの結果から、*pou5f3* の発現制御には、*sox3* と *sox19a* が促進的に関わり、さらにこの効果はいずれの *soxB1* についても *pou5f3* と相乗的であるが、これらは各々独立して作用することが示された。

### Pou5f3 の転写制御における尾芽形成遺伝子の作用

培養系での Luc-2.2 を用いたレポーター解析を、尾芽形成遺伝子について行った。前述したように、神経板、神経管では *sox3*, そして *sox19a* が広く発現しており, *pou5f3* 自身については初期体節期には尾芽領域, その後は神経管後端で発現している (第 1 部)。したがって *sox3/sox19a* と *pou5f3* の共存状態が *pou5f3* の発現制御に対応すると考えられたため, 今回, *sox3/sox19a* と *pou5f3* の共存下での Luc-2.2 の発現に注目した。

まず Luc-2.2 の発現制御における尾芽, 脊索形成遺伝子 *tbxta* の共導入効果を検討したところ, *sox3/sox19a*, そして *pou5f3* が共存するかに依らず, Luc-2.2 の発現への影響はほとんど見られなかった (Fig. 18A, B)。この結果は, *pou5f3* の転写制御に *tbxta* は直接には関与しないことを示唆する。一方, *pou5f3* と同様神経管後端で発現する *nkx1.2la* は, *pou5f3* と *sox3/sox19a* の共存時に見られる Luc2.2 の発現を強く抑制した (Fig. 18A-C)。この結果は, *nkx1.2la* の発現が *pou5f3* と同様に神経管後端で見られることを踏まえると意外であるが興味深い。*gbx2* ホメオボックス遺伝子もやはり尾芽周辺での発現が報告されており (Rinn et al., 2003; Cunningham et al., 2016), 先行研究 (小林, 2015) で *pou5f3* 発現に対する抑制的効果が観察されたが, 今回このことが再確認された (Fig. 18C)。

## 考察

### 培養系を用いた *pou5f3* の転写制御機構の検討

第 1 部での尾芽周辺の遺伝子発現解析から, *pou5f3* は体節形成期において神経管後端で発現することを見出した. また, 第 2 部での時期特異的な *pou5f3* 機能阻害実験から, *pou5f3* は尾芽多分化能細胞からの神経分化を促進することが示された. これらのことから, 神経管後端の *pou5f3* 発現領域において尾芽の多分化能細胞は神経分化に特異化された神経前駆細胞になると予想された. つまり, 尾芽からの神経分化の制御機構を理解するためには, 神経管後端で特異的に *pou5f3* が発現するメカニズムを解明することが重要である.

以前の *pou5f3* の発現制御に関する研究において, *pou5f3* の主要な転写調節領域が転写開始点の上流 2.2 kb までの DNA 配列に存在するとされ (Parvin et al., 2008), 所属研究室の先行研究において *pou5f3* 上流 2.4 kb (-2.2 kb~ATG) を Luciferase (Luc) 遺伝子につないだレポーターコンストラクト (Luc-2.2) のマウス胚性腫瘍細胞 (P19) における発現を検討したところ, Luc-2.2 の発現が, *pou5f3* と *sox3* により相乗的に活性化されることが示された (Kobayashi et al., 2018). 本研究においても, 尾芽あるいは神経管後端での *pou5f3* の発現制御メカニズムを解明するため, Luc-2.2 の発現を制御する遺伝子の検討を試みた.

### *pou5f3* の発現制御における SoxB1 転写因子の役割

*sox2* や *sox3* などから構成される *soxB1* 遺伝子ファミリーは, 神経前駆細胞の特異化や維持, そしてその後の神経幹細胞の増殖と分化を制御することが知られている (Archer et al., 2011; Dee et al., 2008). マウス ES 細胞では, 多能性維持に関わる *nanog*, *Oct4* などの転写調節において, SoxB1 転写因子である Sox2 と Oct4 が転写調節領域内の隣接した部位に結合し, これらが協調的に転写を活性化することが知られている (Kuroda et al., 2005). ゼブラフィッシュにおいても, 所属研究室の先行研究において, *pou5f3* の転写調節に関して, Pou5f3 と Sox3 が相乗的に転写を活性化することが示されていた (Kobayashi et al., 2018).

本研究の Luciferase 解析においてはまず, *pou5f3* の転写調節における *soxB1* の関わりを再検討した. まず, Luc-2.2 の制御における *pou5f3* と *sox3* の作用を検討したところ, *pou5f3* 単独, そして *sox3* 単独では弱い活性化しか見られないが, 両者が共存することで転写活性化が顕著になった. したがって, *pou5f3* と *sox3* による相乗的転写活性化が確認されたといえる.

一方, *sox2* については, 以前の研究では弱いながら Luc-2.2 の活性化において *pou5f3* との相乗的効果を示していたが, 今回の解析ではこうした相乗効果はほとんど見られなかった. 前回の結果との違いの原因は不明であるが, いずれにしろ *sox2* については *pou5f3* との協調作用はあるとしても軽微なものと考えられる. 本研究ではさらに第 3 の *soxB1* 遺伝

子としてゼブラフィッシュで知られる *sox19a* について新たに検討した。この遺伝子は神経管後端を含めた神経管全体で発現が強く見られており、やはり *pou5f3* の発現への関与が予想される。検討の結果、*sox19a* についても *sox3* と同様に *pou5f3* と顕著な相乗的活性化を行うことが確認された。従って、神経板において、*pou5f3* の転写は、この遺伝子自身と *sox3/sox19a* の相乗的作用に依存すると考えられる。

一方、*soxB1* は哺乳類では 3 種 (*sox1*, *sox2*, *sox3*)、ゼブラフィッシュでは 5 種 (*sox1*, *sox2*, *sox3*, *sox19a*, *sox19b*) が知られ、神経板では *sox1-3*, *sox19a* の発現が知られるが、こうした複数の *soxB1* の役割の違いについては必ずしも明らかではない。これらが同等の機能を持つのか、各々異なる機能を持ち、相互作用があるかについても十分な研究があるとはいえないと思われる。

Luc-2.2 の転写制御における *soxB1* の働きについても相乗性があるか不明であるため、今回この可能性について検討を試みた。まず、*pou5f3* 存在下での Luc-2.2 発現における *sox3-sox2* 相乗作用について調べたが、明らかな相乗的効果は確認されなかった。*sox3* と *sox19a* の間での相乗的効果についてはやや増強効果見られるが、顕著ではなかった。したがって、少なくとも *pou5f3* の転写制御において *soxB1* 遺伝子間で顕著な相乗性はなく、*sox3* と *sox19a* はそれぞれ独立して働くと推測される。

#### *pou5f3* の発現制御における尾芽形成遺伝子の役割

今回、この実験系において、*sox3* と *pou5f3* の共存下での Luc-2.2 の発現に注目し、尾芽形成に関連する遺伝子 (*tbxta*, *nkx1.2la*) が *pou5f3* の転写制御に直接関与するかを検討した。前述したように、今回、*sox3* と *pou5f3* の共存が実際の *pou5f3* 発現細胞の状態を再現すると考える。

結果として *pou5f3* の転写において、*tbxta* による直接の制御はほとんどないのに対し、*nkx1.2la* により強く抑制されることが示された。*pou5f3* の発現が *tbxta* による制御を受けないことは、本研究での発現領域の解析、そして *in vivo* での *tbxta* 過剰発現実験の結果と矛盾しない。当初、*pou5f3* が神経管後端に限定される機構として尾芽で発現する *tbxta* による抑制が想定されたが、少なくとも直接働く可能性はほぼ否定された。一方、*nkx1.2la* により *pou5f3* の発現が抑制されるという結果は、*nkx1.2la* と *pou5f3* がともに神経管後端で発現するという発現解析の結果から考えると意外である。*pou5f3* の発現が尾芽から排除され、神経管後端に限局する分子的機構については今後の課題である。また、今回、*pou5f3* の発現は *gbx2* により強く抑制されることも示された。この結果は先行研究の結果 (小林, 2015) ととも一致しており、やはり *pou5f3* 発現に対して *gbx2* は抑制的に働くと考えられる。実際、*gbx2* が尾芽周辺で発現することが既に報告されている (Rinn et al., 2003; Cunningham et al., 2016)。ただし、*gbx2* の尾芽発生における役割は分かっておらず、さらに詳細な研究が必要であろう。

## 第 5 部 胚体後方領域の形成における *soxB1* 遺伝子の役割についての遺伝学的検討

### 要旨

哺乳類の PouV 転写 Oct4 が初期 ES 細胞の多能性維持に関わるが、ゼブラフィッシュ胚においては、本研究でこれまで示したように *Oct4* 相同遺伝子の *pou5f3* が体幹部、そして特に脊髄の伸長に関与すると考えられる。また、脊椎動物の発生において、*soxB1* が神経分化、そして神経管形成で重要であること、*Oct4/pou5f3* は発生制御において、*soxB1* と協調的に働くことが知られる。本研究では、尾芽と胚体後方の発生における *soxB1* の役割を検討するために、ゲノム編集技術を用いて *sox3* と *sox19a* の変異体の作製と表現型の解析に取り組んだ。

まず、*sox3* については TALEN 法により機能ドメインである High-mobility group box domain (HMG box ドメイン) の N 末端領域に欠失を導入し、子孫の系統化を行ったところ、標的部位に 7 bp の欠損が確認された (*sox3<sup>Δ7</sup>*)。一方、*sox19a* については CRISPR/Cas9 法により遺伝子破壊を行い、HMG box ドメインの N 末端領域に 13 bp の欠失をもつ変異体系統を樹立した (*sox19a<sup>Δ13</sup>*)。これらの変異はいずれも HMG box ドメインより下流でフレームシフトを起こすため、機能欠損変異と考えられる。まず、各々についての単独ホモ変異体を作製したところ、顕著な形態異常は観察されなかった。そこで各々のヘテロ接合体の交配により *sox3/sox19a* の 2 重ヘテロ変異体を作製し、これらの交配を行って子孫胚で形態観察を行ったところ、2 重ホモ変異体では浮き袋の欠損と胴尾部伸長異常が観察された。また、*sox3/sox19a* の 2 重ホモ変異体について、bud 期での *neurog1* の発現を WISH により検討したところ、神経板において発現減少が確認された。このことから、*sox3* と *sox19a* はいずれも胴尾部伸長に関わり、プロニューラル遺伝子の発現活性化に関わるが、両者には機能的相補性があると考えられる。

## 序論

本研究では第 1 部での WISH 及び FISH による発現解析の結果から, *pou5f3* が尾芽と接する神経管後端で発現することを確認した. また, 第 2 部での時期特異的 *pou5f3* 機能阻害により, *pou5f3* は尾芽から胴尾部が新たに生じる際に必要である一方, 既存の体軸の維持には不要であること, *pou5f3* は *soxB1* 遺伝子やプロニューラル遺伝子の発現を活性化することで尾芽幹細胞からの神経細胞分化を推進することを見出した.

胚発生において *soxB1* 遺伝子ファミリーは, 神経前駆細胞の特異化と維持, その後の神経分化の抑制, そして神経幹細胞の増殖と分化を制御することが知られている (Archer et al., 2011). 特に *sox2* については尾芽発生への関与も示唆されており, *tbxta* とともに尾芽の多能性維持に必要であるとともに, 尾芽からの神経分化にも関わるとされる (Koch et al., 2017; Bouldin et al., 2015).

マウス ES 細胞では, 多能性維持に関わる *nanog*, *Oct4* などの遺伝子の転写調節において, *SoxB1* 転写因子である *Sox2* と *Oct4* が転写調節領域内の隣接した部位に結合し, これらが協調的に転写を活性化することが知られている (Ambrosetti et al., 2020). また, ゼブラフィッシュを用いた所属研究室の先行研究においても, *pou5f3* 上流 DNA の転写調節能に関して, *Pou5f3* と *Sox3* が相乗的に転写を活性化することが示されている (Kobayashi et al., 2018). さらに, マウスの尾芽幹細胞の維持においては *Sox2* と *Brachyury* (Koch et al., 2017), ゼブラフィッシュでは *sox2* と *tbxta* の共発現がともに重要であるとされ, さらに尾芽からの神経分化には *sox2* が重要であると考えられている (Bouldin et al., 2015).

本研究の尾芽周辺での発現解析において (第 1 部), *soxB1* 遺伝子である *sox2*, *sox3*, *sox19a* の発現が尾芽から神経管にかけて発現すること, ただし, それぞれの発現パターンには違いがあり, *sox3* は神経管で広く発現するが, その後端では発現が見られないのに対し, *sox2* は尾芽から神経管後端にかけて発現が見られ, *sox19a* は神経管後端を含めた神経管全体で発現が見られた. 特に *sox2* については発現がダイナミックに変動し, この遺伝子のみは一過的に尾芽領域で発現することを示している. また, 本研究の *pou5f3* 機能阻害胚での発現検討の結果から, *sox2*, *sox3*, *sox19a* の発現は *pou5f3* に依存することが示された (第 2 部). さらに, 培養系でのレポーターアッセイにより, *pou5f3* の転写制御において, すでに以前に観察された *sox3* の *pou5f3* との協調作用に加え, *sox19a* も *pou5f3* との協調的に働くことを示した (第 4 部).

これらのことから, 本研究で注目する *pou5f3* と *soxB1* 遺伝子は体軸伸長, そして脊髄発生において密接な関係にあり, されに尾芽発生においても *soxB1* 遺伝子の役割は大きいと推測された. 第 5 部では, この *soxB1* 遺伝子の尾芽発生, そして体軸伸長における役割を検討するため, *soxB1* 変異体の作製と表現型解析に取り組んだ.

## 結果

### sox3を標的としたTALEN遺伝子の作製

尾芽および神経管後端の発生については *soxB1* 遺伝子群の関与が想定される。これらの役割について、遺伝学的に検討するため、本研究では機能欠損変異体の作製と表現型解析に取り組んだ。*sox3*についてはTALEN法による遺伝子破壊に取り組んだ。まず、*sox3*のコード領域において、機能ドメインであるHMG boxのN末端領域に相当する部分に標的部位を3か所設定し、それぞれの標的部位に対応する左右のTALEN遺伝子を設計した(N末端側から *sox3*-TALEN-1, *sox3*-TALEN-2, *sox3*-TALEN-3 ; Fig. 20A)。TALENについては、標的部位を2か所に設定するために特異性が高く、オフターゲット効果の危険性は比較的低いと考えられる(Cermak et al., 2011)。実際には、最もN末端側に位置する *sox3*-TALEN-1についてTALENの作製を行った。

TALENの作製には、2~6個のモジュールから1つのクラスターを作るSTEP1とクラスターどうしをさらに連結させるSTEP2の2段階があり(Fig. 20B)、それぞれの反応をLeft TALENとRight TALENの各々について行った。まず、STEP1において、各TALENごとに3種類のクラスター、合計6種類のクラスター(Left TALEN; Left-C1, Left-C2, Left-C3; Right TALEN; Right-C1, Right-C2, Right-C3)をそれぞれ6個のモジュールから作製した。STEP1の反応後、大腸菌に導入し、得られたコロニー各々についてコロニーPCRを行った上、増幅産物をagaroseゲルで泳動したところ、モジュール数に対応する数のラダーバンドが全てのクラスターで確認された(Fig. 21A)。同定されたコロニーから得られたプラスミドDNAの配列決定により、正しくモジュールが連結されていることが確認された(data not shown)。

続いて、Left TALENとRight TALENのそれぞれについて、3つのクラスターの連結反応を行った(STEP2)。反応液を大腸菌に導入して得られたコロニー各々についてコロニーPCRを行った上、やはり産物をagaroseゲルで電気泳動したところ、予想される2000 bp付近のバンドが生じ、さらに低分子量側で100 bp間隔のラダーバンドが、Left TALENとRight TALENの両方について見られた(Fig. 21B)。これらの得られたDNA各々について、*HindIII*で消化して泳動したところ、正しくTALENが作製された場合に予想される4300 bpと2900 bp付近のバンドが見られた(佐藤, 2018)(Fig. 21C)。最終的にはシーケンス反応により正しくクラスターが連結されていることが確認された(data not shown)。

### TALEN法によるsox3を標的とした遺伝子破壊

完成した左右の *sox3*-TALEN-1の遺伝子について、mRNAの合成を行い、合成した2種のmRNAを各胚に100 pgずつ顕微注入した。その後、24 hpfの時期に導入胚(G<sub>0</sub>)の一部について(n=15)、各々からゲノムDNAを抽出した。並行して*egfp* mRNAのみを各胚に100 pgずつ注入し、この対照胚についてもゲノムDNAの抽出を行った。これらの抽出

DNA について、標的配列をはさむ領域を PCR で増幅し、産物を 2% Agarose ゲルと 15% polyacrylamide ゲルの両方で泳動したところ (HMA) (Ota et al., 2013), 対照胚の場合は野生型ゲノムに由来するバンドが見られたが (116 bp), TALEN 導入胚ではこれに加えて上方に複数のシフトバンドを生じた (12/15, Fig. 21D). この結果から, *sox3*-TALEN-1 の導入により, この TALEN の標的配列において *sox3* の破壊が起きたと考えられる. そこで, 残りの G<sub>0</sub> 胚を発生させ, 成熟魚についてあらためて fin clip でゲノム DNA を抽出し, 個体ごとに HMA を行ったところ (n=7), 全ての個体で遺伝子破壊が検出された (data not shown).

以上のように *sox3* に欠失が導入されたことが確認された G<sub>0</sub> 成魚 (1 個体) を野生型魚と交配し, 得られた次世代胚 (G<sub>1</sub> 胚) の一部について, さらに HMA により変異導入の確認を行ったところ, G<sub>1</sub> 胚についてもシフトバンドが確認されており (2/6, Fig. 21E), 変異が次世代に引き継がれたと考えられる. この G<sub>1</sub> 胚において得られた PCR 産物の塩基配列を決定したところ, *sox3* の機能ドメインの N 末端領域に 7 bp のフレームシフト欠失 ( $\Delta 7$ ) が確認されたため (Fig. 21F), 残りの G<sub>1</sub> 胚を成熟させて系統化を行った (*sox3* <sup>$\Delta 7$</sup> ). この変異体では Sox3 の HMG box ドメインの内部, アミノ末端から 21 番目のアミノ酸 (バリン) が壊れており, 結果的に C 末側が欠損するため, 機能欠損変異と予想される. なお, この変異体系統は第 3 世代で National Bioresource Project/NBRP (理研) に寄託されている.

#### *sox19a* を標的とした CRISPR/Cas9 法による遺伝子破壊

次に, 神経管全域で発現しており, やはり *pou5f3* との関係が予想される *sox19a* について, CRISPR/Cas9 法による破壊を試みた. まず, *sox19a* の機能ドメイン (HMG box ドメイン) の N 末端領域に標的部位を設定した (Fig. 22A). この標的部位に対する gRNA 合成 plasmid を作製し, これを鋳型として gRNA を合成した. 一方, Cas9 mRNA も合成した上, アガロースゲル電気泳動で合成が成功していることを確認した (Fig. 22B).

合成した Cas9 mRNA (250 pg/胚) と *sox19a* gRNA (12.5 pg/胚) を各胚に顕微注入し, 得られた導入胚 (G<sub>0</sub>) の一部の個体各々から, 24 hpf において, ゲノム DNA を抽出し, これを鋳型として標的配列をはさむ領域を PCR で増幅し, 産物を 15% PAGE で泳動したところ, 非導入胚では野生型で予想されるサイズ (152 bp) の PCR 断片のみが見られたが, 導入胚では加えて複数の異なるバンドシフトパターンが生じており (少なくとも 12 パターン) (Fig. 22C), 実際に *sox19a* の標的部位において塩基の挿入・欠失が起きたと考えられる. そこで, 残りの G<sub>0</sub> 胚を育てた上, 成魚の段階で改めて fin clip で DNA を抽出し, 個体ごとに HMA を行ったところ, G<sub>0</sub> 成魚においても遺伝子破壊が検出された (data not shown).

同定された変異導入成魚 (G<sub>0</sub>) の 1 個体と野生型魚の交配で得られた G<sub>1</sub> の胚の一部について, 改めて HMA による変異導入の確認を行ったところ, やはりシフトバンドが見られ



ており (12/16 ; Fig. 22D), 変異が次世代に引き継がれたことが確認された. 得られたシフトバンドの PCR 産物全体を鋳型として標的部周辺塩基配列を Direct sequencing により決定したところ, 13 bp のフレームシフト欠失がある二通りの変異 (異なる部位) が確認された ( $\Delta 13-1$ ,  $\Delta 13-2$ ; Fig. 22E). この G<sub>1</sub> 胚を成魚まで飼育したところ,  $sox19a^{A13-1}$  の雄と  $sox19a^{A13-2}$  の雌を得ることができたため, 各々について野生型魚とのアウトクロスにより系統化した. なお, この変異体系統 ( $sox19a^{A13-1}$ ) は NBRP (理研) に寄託されている.

### *soxB1* 変異体の表現型解析

まず, 本研究で作製された *sox3* と *sox19a* の変異体各々について, ヘテロ接合体を交配し, 得られた胚について形態観察を行ったが, これらの変異体の単独ホモ変異体胚では 48 hpf まで顕著な形態的異常が見られなかった (data not shown). しかしながら, *sox3* ヘテロ接合体の交配で得られた胚を成熟させた後に genotyping を行ったところ, 全て野生型 ( $sox3^{+/+}$ ) またはヘテロ接合体 ( $sox3^{+/-}$ ) であり, ホモ変異体は現在のところ成魚で確認されていない. *sox3* ホモ変異体は発生のある段階で死亡したと考えられるが, どの段階で死亡したのかを現在のところ特定できていない. 一方, *sox19a* ホモ変異体については成魚で生存することが確認され (data not shown), さらに *sox19a* ホモ変異体は生殖能力を持つことも確認された.

こうした状況から, *sox3* と *sox19a* の間で機能的な補償機構が存在すると考えられたため, 本研究で作製した *sox3* と *sox19a* の 2 重ホモ変異体の作製を行った. まず, 系統化された各 *soxB1* 変異体のヘテロ接合体 ( $sox3^{+/\Delta 7}$  と  $sox19a^{A13-1}$ ) の間で成魚の交配を行った. 得られた胚の形態を観察したところ, 特に形態異常は観察されなかった (data not shown). これらを成魚まで維持し, 成魚の段階で genotyping したところ, *sox3* と *sox19a* の 2 重ヘテロ接合体魚が雌雄で得られた ( $sox3^{+/\Delta 7}; sox19a^{A13-1}$ ). これら雌雄の 2 重ヘテロ接合体の交配で得られた胚を成魚まで維持し, genotyping したところ, *sox3* の変異についてはヘテロ接合体のみが見出され, やはりホモ接合体魚は得られなかった. 一方, *sox19a* の変異をホモで持つ個体については, 複数の遺伝子型の組み合わせで確認された ( $sox3^{+/+}; sox19a^{A13-1/\Delta 13-1}$ ,  $sox3^{+/\Delta 7}; sox19a^{A13-1/\Delta 13-1}$ ).

この際, *sox3* 変異をヘテロ, *sox19a* 変異をホモで持つ成魚個体 ( $sox3^{+/\Delta 7}; sox19a^{A13-1/\Delta 13-1}$ ) が雌雄で得られたため, これら雌雄変異体成魚同士の交配を行った. 得られた胚について形態観察を行ったところ, 浮き袋の欠損および体軸の屈曲が生じた胚が見られた (Fig. 23A). これら異常胚 16 個体について HMA により genotyping を行ったところ, その全てが *sox3/sox19a* の 2 重ホモ変異体 ( $sox3^{A7/\Delta 7}; sox19a^{A13-1/\Delta 13-1}$ ) であった (Fig. 23B). 一方, 正常胚についてはランダムに 8 個体を選別し, genotyping を行ったが, 2 重ホモ変異体は見られなかった ( $sox3^{+/+}; sox19a^{A13-1/\Delta 13-1}$ , または  $sox3^{+/\Delta 7}; sox19a^{A13-1/\Delta 13-1}$ ). これらの結果から, *soxB1* 遺伝子は実際に胚体後方 (尾部) の発生に重要であることが示唆され, *sox3*

と *sox19a* には機能的相補性があることも確認された.

## 考察

### soxB1 遺伝子の発生における重要性

胚発生において *soxB1* 遺伝子ファミリーは、神経前駆細胞の特異化と維持、その後の神経分化の抑制、そして神経幹細胞の増殖と分化を制御することが知られており (Archer et al., 2011), 神経誘導で生じた神経板で広く発現する (Dee et al., 2008). 特に *sox2* については尾芽発生への関与も示唆されており, *tbxta* とともに尾芽の多能性維持に必要であるとともに、尾芽からの神経分化にも関わる (Koch et al., 2017; Bouldin et al., 2015). 実際、本研究においてゼブラフィッシュ胚での *soxB1* 遺伝子の詳細な発現解析を行い、尾芽から神経管にかけて発現すること、*sox2* が一過的に尾芽本体で発現することが確認された (第 1 部). さらに、本研究での培養系を用いたレポーター解析により、本研究で注目する *pou5f3* と *soxB1* 遺伝子は *pou5f3* の転写調節において協調的に働くことが示された (第 4 部). その一方で、ゼブラフィッシュ胚において、異なる *soxB1* は各々神経板、神経管において特有のパターンで発現する. また、転写制御における *pou5f3* との相乗作用に関して *sox2* は *sox3*, *sox19a* とは異なる性質を示す. 従って、同じ *soxB1* であっても機能的分化が予想され、個別に機能を検討する必要がある. 本研究では *soxB1* 遺伝子の尾芽での役割に注目し、その機能を発生遺伝学的に解明するために *sox3* および *sox19a* 各々の変異体作製を行った.

### sox3 変異体および sox19a 変異体の作製

*sox3* については、そのコード領域内の機能ドメインである HMG ドメインの N 末端側に対して TALEN 遺伝子を設計し、mRNA を合成した上で胚に導入した. 導入 G<sub>0</sub> 胚、そして成熟 G<sub>0</sub> 魚について、実際に *sox3* の破壊が確認され、この変異導入 G<sub>0</sub> 成魚と野生型魚の交配で得られた G<sub>1</sub> 魚についても導入した変異が検出され、この変異は生殖系列に組み込まれたと言える. シーケンス解析では標的部位に 7 bp の欠失が確認されており、本研究の遺伝子破壊実験により、*sox3* にフレームシフトを起こす変異の導入に成功したと結論した. この変異遺伝子の産物では HMG ドメインの N 末から欠損するため、完全機能欠損であることが期待される.

*sox19a* については CRISPR/Cas9 法による遺伝子破壊を試みた. *sox3* の場合と同様、コード領域内の HMG ドメインの N 末端領域に標的部位を設計した上、合成した gRNA を Cas9 mRNA とともに胚に導入した. その結果、導入胚、そして成熟 G<sub>0</sub> 魚において実際に *sox19a* の破壊が検出され、この G<sub>0</sub> 成魚と野生型魚の交配で得られた G<sub>1</sub> 成魚に変異が引き継がれたことを確認しており、*sox19a* 変異体についても系統化に成功した. シーケンス解析を行ったところ、標的部位に 13 bp の欠失が確認されており、*sox19a* の HMG ドメインの N 末端側より下流がフレームシフトにより欠損すると考えられることから、この変異 (*sox19a*<sup>Δ13</sup>) はやはり Null 変異と考えられる.

### sox3 及び sox19a の変異体での表現型

本研究で作製された *sox3* と *sox19a* の各々の単独の変異体について形態観察を行ったが、これらの変異体のホモ変異体胚で顕著な形態的異常は観察されなかった。*sox3* ホモ変異体は成魚となっておらず、その後成長できず死滅すると考えられるが、異常が見られるのは孵化以降と考えられる。さらに、*sox19a* 変異についてはホモ接合体でも成長し、さらに生殖能力を持つことが分かっている。これら単独ホモ変異体胚で少なくとも孵化以前に異常が観察されなかった原因として、*soxB1* 遺伝子の冗長性、そして遺伝学的補償機構 (Sztal & Stainier, 2020) が考えられる。

まず、*soxB1* の冗長性については、本研究での発現検討実験の結果から、*soxB1* である *sox2*, *sox3*, *sox19a* はそれぞれ神経管で発現が広く見られ、それぞれの発現領域には重なりも多く確認された。また、これら *soxB1* 遺伝子が神経発生において機能することが広く知られている (Archer et al., 2011)。そのため、*soxB1* の内 1 つの遺伝子が破壊されたとしても、他の *soxB1* の機能により、変異による影響がでなかった可能性がある。

また、*soxB1* 遺伝子間の遺伝学的補償機構についても検討する必要がある。*sox3* もしくは *sox19a* を遺伝子破壊した変異体において、別の *soxB1* 遺伝子が、破壊した遺伝子の機能を補償するように発現を増大させる場合 (転写適応)、やはり単独での変異では表現型が隠れることになる。この可能性を検討するためには、今後、各 *soxB1* 変異体において他の *soxB1* の発現を検討する必要がある。また、塩基置換やフレームシフト変異とは別に遺伝子欠失の導入も有効と考えられる (Sztal & Stainier, 2020)。

### sox3 と sox19a の 2 重変異体解析

上述したように、本研究で作製された *sox3* と *sox19a* 各々の単独変異体について顕著な形態的異常は観察されず、さらに *sox19a* 単独ホモ変異体については、成魚まで育つ。想定される原因の一つが、複数ある *soxB1* の機能的冗長性であるため、*sox3* と *sox19a* について 2 重ヘテロ接合体をまず準備し、これらの交配により多重変異体の作製を行った。

本研究で作製された *sox3* と *sox19a* のヘテロ変異体を用いて、*sox3* の変異をヘテロで持ち、同時に *sox19a* の変異をホモで持つ成魚個体 (*sox3*<sup>+/Δ7</sup>;*sox19a*<sup>Δ13-1/Δ13-1</sup>) が雌雄で得られており、これらの交配を行うことで、*sox3* と *sox19a* の 2 重ホモ変異体の作製を行った。この交配では *sox3* と *sox19a* の単独ホモ変異体も得られたが、これら単独ホモ変異体では顕著なやはり異常は見られなかった。また、*sox3* 変異をヘテロで、*sox19a* 変異をホモで持つ個体についても異常は観察されなかった。

この交配の結果、多様なゲノタイプを持つ子孫胚の中で唯一 2 重ホモ変異体でのみ、浮き袋の形成異常および体軸伸張不全が観察された。これらの結果から、*sox3* と *sox19a* は正常な尾部発生に必要であるが、*sox3* と *sox19a* には機能的相補性があり、どちらかが存在する場合には正常な表現型になることが示された。なお、二重変異体では表現型が見られることから、各変異体において、転写適応は大きな影響を与えていないと考えられる。なお、

*sox3* と *sox19a* は神経外胚葉で発現する遺伝子であり、これらの 2 重変異体で内胚葉の浮き袋が欠損したことは意外であった。特に *soxB1* が浮き袋形成に関わるという知見はなく、原因は現在不明である。

今後、*soxB1* 変異体の表現型については形態のみならず、遺伝子レベルでの検討が必要である。また、*soxB1* 遺伝子間の相補性についてさらに検討するために、*sox2* 変異体を新たに作製した上で、これらの多重変異体を用いて解析することが課題であろう。

## 結論

脊椎動物の胚の伸長においては、尾芽に存在する多分化能細胞の分化制御機構を理解する必要がある。本研究では、体節形成期の初期には尾芽、中期では神経管後端で発現する Oct4 型 POU 転写因子遺伝子 *pou5f3*, そして脊髄伸長に注目して分子的機構について研究を行った。

第 1 部ではまず、尾芽幹細胞の維持や分化に関わると考えられる各種遺伝子の尾芽周辺での発現について、WISH および FISH を用いて詳細に検討した。その結果、本研究で注目する *pou5f3* は、初期体節形成期では尾芽の背側領域で発現しており、中期体節形成期になると、神経管後端において、*tbxta* の発現する尾芽と接するよう発現することが明らかになった。このことから、尾芽での未分化幹細胞から神経管に進入して神経系細胞に特異化される際には、まず *pou5f3* を発現し、この細胞はその後、さらに前方に移行するにつれて分化を進行させ、神経細胞として成熟すると推定される。そこで本研究では、尾芽幹細胞から神経細胞への分化過渡領域といえる神経管後端の *pou5f3* 発現領域を transition zone, その前方の *sox3* 発現領域を maturation zone と称した。さらに、尾芽形成への関与が知られるその他の各種転写因子、成長因子についても尾芽周辺での遺伝子発現を明らかにした。

第 2 部では、時期特異的 *pou5f3* 機能阻害および *pou5f3* 変異体を用いて、尾芽からの体軸伸長における *pou5f3* の機能解析を行った。時期特異的 *pou5f3* 機能阻害により異常となる部位は体軸伸長とともに後方に移動することから、*pou5f3* は尾芽から胴尾部が新たに生じる際に必要である一方、既存の体軸の維持には不要であることを示唆した。また、*pou5f3* は多能性維持遺伝子の発現には抑制的であること、尾芽において尾芽幹細胞からの神経細胞分化を推進する一方で、中胚葉前駆細胞への分化には抑制的に働くことを見出した。

第 3 部においては、尾芽発生におけるシグナル分泌因子の役割について検討するため、体節形成期のゼブラフィッシュ胚を各種シグナル伝達修飾剤で処理し、尾芽形成制御遺伝子の発現への影響を WISH により検討した。その結果、Wnt/FGF/BMP シグナルは各々異なる尾芽形成遺伝子の発現制御を通じて、尾芽発生に関与することが示唆された。さらに、尾芽幹細胞での多分化能の維持に重要と考えられる *tbxta* の機能解析のため、mRNA の注入による強制発現実験を行った結果、尾芽周辺領域において、*tbxta* は *sox2*, *myod*, *fgf8a* の発現を抑制する一方、*tbx16* の発現は活性化する可能性が示唆された。

第 4 部では *pou5f3* 上流 DNA による転写調節への各種脳形成遺伝子の役割を培養系でのレポーター解析で検討した。その結果、*pou5f3* の発現制御における *soxB1* 各々の役割の違いを示した。また、*nkx1.2la* と *gbx2* は *pou5f3* の発現に抑制的であること、*tbxta* は *pou5f3* の発現制御には関わらないことを見出した。

最後の第 5 部では、尾芽発生における *soxB1* 遺伝子の役割を検討するために、ゲノム編集技術を用いて *sox3* と *sox19a* の変異体を作製し、表現型を検討した結果、*sox3* と *sox19a* はいずれも胴尾部伸長に関わるが、両者には機能的冗長性があることが推測された。

以上の一連の研究により，脊椎動物胚の後方構造の伸長を制御する *pou5f3* を中心とした制御系の一部を明らかにし，さらに検討を進める上での実験系の構築に成功したといえる．

## 謝辞

本研究を進めるのにあたり，様々なご指導を頂きました指導教員の弥益恭教授，多くの知識や実験方法などについて様々な助言を下された川村哲規准教授，津田佐知子准教授にこの場を借りて深く感謝申し上げます．また，様々な実験技術を指導してくださった上，本研究を行うに当たり，その足かけとなる先行研究を行ってくださった池田真彬先輩，発生生物学研究室内で様々なサポートをしてくださった諸先輩方に深く感謝申し上げます．



## 参考文献

- Aires, R., Jurberg, A. D., Leal, F., Nóvoa, A., Cohn, M. J. and Mallo, M. (2016). Oct4 is a key regulator of vertebrate trunk length diversity. *Dev. Cell* **38**, 262–274.
- Aires, R., de Lemos, L., Nóvoa, A., Jurberg, A. D., Mascrez, B., Duboule, D. and Mallo, M. (2019). Tail bud progenitor activity relies on a network comprising Gdf11, Lin28, and Hox13 genes. *Dev. Cell* **48**, 383–395.e8.
- Albors, A. R., Halley, P. A. and Storey, K. G. (2018). Lineage tracing of axial progenitors using *nkx1-2creert2* mice defines their trunk and tail contributions. *Dev.* **145**,.
- Anderson, M. J., Schimmang, T. and Lewandoski, M. (2016). An FGF3-BMP signaling axis regulates caudal neural tube closure, neural crest specification and anterior-posterior axis extension. *PLoS Genet.* **12**, 1–30.
- Bae, Y. K., Shimizu, T., Muraoka, O., Yabe, T., Hirata, T., Nojima, H., Hirano, T. and Hibi, M. (2004). Expression of *sax1/nkx1.2* and *sax2/nk1.1* in zebrafish. *Gene Expr. Patterns* **4**, 481–486.
- Bally-Cuif, L., Dubois, L. and Vincent, A. (1998). Molecular cloning of Zco2, the zebrafish homolog of Xenopus Xco2 and mouse EBF-2, and its expression during primary neurogenesis. *Mech. Dev.* **77**, 85–90.
- Beck, F. and Stringer, E. J. (2010). The role of Cdx genes in the gut and in axial development. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 353–357.
- Belting, H. G., Hauptmann, G., Meyer, D., Abdelilah-Seyfried, S., Chitnis, A., Eschbach, C., Söll, I., Thisse, C., Thisse, B., Artinger, K. B., et al. (2001). Spiel ohne grenzen/*pou2* is required during establishment of the zebrafish midbrain-hindbrain boundary organizer. *Development* **128**, 4165–4176.
- Bouldin, C. M., Manning, A. J., Peng, Y. H., Farr, G. H., Hung, K. L., Dong, A. and Kimelman, D. (2015). Wnt signaling and *tbx16* form a bistable switch to commit bipotential progenitors to mesoderm. *Dev.* **142**, 2499–2507.
- Boyer, L. A., Tong, I. L., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947–956.
- Burgess, S., Reim, G., Chen, W., Hopkins, N. and Brand, M. (2002). The zebrafish spiel-ohne-grenzen (*spg*) gene encodes the POU domain protein Pou2 related to mammalian Oct4 and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis. *Development* **129**, 905–916.
- Cambray, N. and Wilson, V. (2002). Axial progenitors with extensive potency are localised to the mouse chordoneural hinge. *Development* **129**, 4855–4866.

- Cambray, N. and Wilson, V.** (2007). Two distinct sources for a population of maturing axial progenitors. *Development* **134**, 2829–2840.
- Cao, Y., Knöchel, S., Donow, C., Miethe, J., Kaufmann, E. and Knöchel, W.** (2004). The POU factor Oct-25 regulates the Xvent-2B gene and counteracts terminal differentiation in *Xenopus* embryos. *J. Biol. Chem.* **279**, 43735–43743.
- CB, K., WW, B., SR, K., B, U. and TF, S.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**, 253–310.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. and Smith, A.** (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643–655.
- Cornell, R. A. and Eisen, J. S.** (2002). Delta/Notch signaling promotes formation of zebrafish neural crest by repressing neurogenin 1 function. *Development* **129**, 2639–2648.
- Cunningham, T. J., Colas, A. and Duester, G.** (2016). Early molecular events during retinoic acid induced differentiation of neuromesodermal progenitors. *Biol. Open* **5**, 1821–1833.
- David, A., Ruth, D., David, K.** (2014). The early expansion and evolutionary dynamics of POU class genes. *Molecular Biology and Evolution* **31**, 3136–3147.
- Davidson, A. J., Ernst, P., Wang, Y., Dekens, M. P. S., Kingsley, P. D., Palis, J., Korsmeyer, S. J., Daley, G. Q. and Zon, L. I.** (2003). Cdx4 mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple Hox genes. *Nature* **425**, 300–306.
- Dong, X., Li, J., He, L., Gu, C., Jia, W., Yue, Y., Li, J., Zhang, Q., Chu, L. and Zhao, Q.** (2017). Zebrafish Znf11 proteins control the expression of hoxb1b gene in the posterior neuroectoderm by acting upstream of *pou5f3* and *sall4* genes. *J. Biol. Chem.* **292**, 13045–13055.
- Fior, R., Maxwell, A. A., Ma, T. P., Vezzaro, A., Moens, C. B., Amacher, S. L., Lewis, J. and Saúde, L.** (2012). The differentiation and movement of presomitic mesoderm progenitor cells are controlled by mesogenin 1. *Dev.* **139**, 4656–4665.
- Frankenberg, S. and Renfree, M. B.** (2013). On the origin of POU5F1. *BMC Biol.* **11**, 1–12.
- Gardiner, M. R., Baggett, D. F., Zon, L. I. and Perkins, A. C.** (2005). Zebrafish KLF4 is essential for anterior mesendoderm/pre-polster differentiation and hatching. *Dev. Dyn.* **234**, 992–996.
- Gold, D. A., Gates, R. D. and Jacobs, D. K.** (2014). The early expansion and evolutionary dynamics of POU class genes. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 3136–3147.
- Goto, H., Kimmey, S. C., Row, R. H., Matus, D. Q. and Martin, B. L.** (2017). FGF and canonical Wnt signaling cooperate to induce paraxial mesoderm from tailbud neuromesodermal progenitors through regulation of a two-step epithelial to mesenchymal transition. *Dev.* **144**, 1412–1421.
- Gouti, M., Tsakiridis, A., Wymeersch, F. J., Huang, Y., Kleinjung, J., Wilson, V. and Briscoe, J.** (2014). In vitro generation of neuromesodermal progenitors reveals distinct roles for wnt

- signalling in the specification of spinal cord and paraxial mesoderm identity. *PLoS Biol.* **12**,.
- Gardiner, MR., Daggett, DF., Zon, LL., Perkins, AC.** (2005). Zebrafish KLF4 is essential for anterior mesendoderm/pre-polyester differentiation and hatching. *Dev Dyn.* **234**, 992- 996.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. and Pevny, L.** (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* **39**, 749–765.
- Griffin, K. J. P., Amacher, S. L., Kimmel, C. B. and Kimelman, D.** (1998). Molecular identification of spadetail: Regulation of zebrafish trunk and tail mesoderm formation by T-box genes. *Development* **125**, 3379–3388.
- Haddon, C., Smithers, L., Schneider-Maunoury, S., Coche, T., Henrique, D. and Lewis, J.** (1998). Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Development* **125**, 359–370.
- Hauptmann, G. and Gerster, T.** (1995). Pou-2 - a zebrafish gene active during cleavage stages and in the early hindbrain. *Mech. Dev.* **51**, 127–138.
- Hauptmann, G., Belting, H. G., Wolke, U., Lunde, K., Söll, I., Abdelilah-Seyfried, S., Prince, V. and Driever, W.** (2002). Spiel ohne grenzen/*pou2* is required for zebrafish hindbrain segmentation. *Development* **129**, 1645–1655.
- Hsiao, C. Der, You, M. S., Guh, Y. J., Ma, M., Jiang, Y. J. and Hwang, P. P.** (2007). A positive regulatory loop between *foxi3a* and *foxi3b* is essential for specification and differentiation of zebrafish epidermal ionocytes. *PLoS One* **2**,.
- Inomata, C., Yuikawa, T., Nakayama-Sadakiyo, Y., Kobayashi, K., Ikeda, M., Chiba, M., Konishi, C., Ishioka, A., Tsuda, S. and Yamasu, K.** (2020). Involvement of an *Oct4*-related PouV gene, *pou5f3/pou2*, in neurogenesis in the early neural plate of zebrafish embryos. *Dev. Biol.* **457**, 30–42.
- Javali, A., Misra, A., Leonavicius, K., Acharyya, D., Vyas, B. and Sambasivan, R.** (2017). Co-expression of Tbx6 and Sox2 identifies a novel transient neuromesoderm progenitor cell state. *Dev.* **144**, 4522–4529.
- Jones, L., Wagers, A.** (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature* **9**, 11-21.
- Kanki, J. P. and Ho, R. K.** (1997). The development of the posterior body in zebrafish. *Development* **124**, 881–893.
- Khan, A., Nakamoto, A., Okamoto, S., Tai, M., Nakayama, Y., Kobayashi, K., Kawamura, A., Takeda, H. and Yamasu, K.** (2012a). Pou2, a class V POU-type transcription factor in zebrafish, regulates dorsoventral patterning and convergent extension movement at different blastula stages. *Mech. Dev.* **129**, 219–235.
- Khan, A., Nakamoto, A., Tai, M., Saito, S., Nakayama, Y., Kawamura, A., Takeda, H. and Yamasu, K.** (2012b). Mesendoderm specification depends on the function of Pou2, the class V

- POU-type transcription factor, during zebrafish embryogenesis. *Dev. Growth Differ.* **54**, 686–701.
- Kobayashi, K., Khan, A., Ikeda, M., Nakamoto, A., Maekawa, M. and Yamasu, K.** (2018). In vitro analysis of the transcriptional regulatory mechanism of zebrafish *pou5f3*. *Exp. Cell Res.* **364**, 28–41.
- Koch, F., Scholze, M., Wittler, L., Schifferl, D., Sudheer, S., Grote, P., Timmermann, B., Macura, K. and Herrmann, B. G.** (2017). Antagonistic Activities of Sox2 and Brachyury Control the Fate Choice of Neuro-Mesodermal Progenitors. *Dev. Cell* **42**, 514–526.e7.
- Kolf, C. M., Cho, E. and Tuan, R. S.** (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res. Ther.* **9**, 1–10.
- Kondoh, H., Takada, S. and Takemoto, T.** (2016). Axial level-dependent molecular and cellular mechanisms underlying the genesis of the embryonic neural plate. *Dev. Growth Differ.* **58**, 427–436.
- Korzh, V., Sleptsova, I., Liao, J., He, J. and Gong, Z.** (1998). Expression of zebrafish bHLH genes *ngn1* and *nrd* defines distinct stages of neural differentiation. *Dev. Dyn.* **213**, 92–104.
- Lavial, F., Acloque, H., Bertocchini, F., MacLeod, D. J., Boast, S., Bachelard, E., Montillet, G., Thenot, S., Sang, H. M., Stern, C. D., et al.** (2007). The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells. *Development* **134**, 3549–3563.
- Lippok, B., Song, S. and Driever, W.** (2014). Pou5f1 protein expression and posttranslational modification during early zebrafish development. *Dev. Dyn.* **243**, 468–477.
- Lunde, K., Belting, H. G. and Driever, W.** (2004). Zebrafish *pou5f1/pou2*, homolog of mammalian *Oct4*, functions in the endoderm specification cascade. *Curr. Biol.* **14**, 48–55.
- Marson, A., Levine, S. S., Cole, M. F., Frampton, G. M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M. G., Johnston, W. K., Wernig, M., Newman, J., et al.** (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* **134**, 521–533.
- Martin, B. L. and Kimelman, D.** (2012). Canonical Wnt signaling dynamically controls multiple stem cell fate decisions during vertebrate body formation. *Dev. Cell* **22**, 223–232.
- Mlodzik, M., Gibson, G. and Gehring, W. J.** (1990). Effects of ectopic expression of caudal during *Drosophila* development. *Development* **109**, 271–277.
- Morrison, G. M. and Brickman, J. M.** (2006). Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. *Development* **133**, 2011–2022.
- Murata, Y., Tamura, M., Aita, Y., Fujimura, K., Murakami, Y., Okabe, M., Okada, N. and Tanaka, M.** (2010). Allometric growth of the trunk leads to the rostral shift of the pelvic fin in teleost fishes. *Dev. Biol.* **347**, 236–245.

- Nakayama, Y., Kikuta, H., Kanai, M., Yoshikawa, K., Kawamura, A., Kobayashi, K., Wang, Z., Khan, A., Kawakami, K. and Yamasu, K.** (2013). Gbx2 functions as a transcriptional repressor to regulate the specification and morphogenesis of the mid-hindbrain junction in a dosage- and stage-dependent manner. *Mech. Dev.* **130**, 532–552.
- Nakayama, Y., Inomata, C., Yuikawa, T., Tsuda, S. and Yamasu, K.** (2017). Comprehensive analysis of target genes in zebrafish embryos reveals gbx2 involvement in neurogenesis. *Dev. Biol.* **430**, 237–248.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H. and Smith, A.** (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379–391.
- Nishikawa, S., Goldstein, R.A., Nierras, C.R.** (2008). The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**, 725–729.
- Nishitani, E., Li, C., Lee, J., Hotta, H., Katayama, Y., Yamaguchi, M. and Kinoshita, T.** (2015). Pou5f3.2-induced proliferative state of embryonic cells during gastrulation of *Xenopus laevis* embryo. *Dev. Growth Differ.* **57**, 591–600.
- Okuda, Y., Yoda, H., Uchikawa, M., Furutani-Seiki, M., Takeda, H., Kondoh, H. and Kamachi, Y.** (2006). Comparative genomic and expression analysis of group B1 sox genes in zebrafish indicates their diversification during vertebrate evolution. *Dev. Dyn.* **235**, 811–825.
- Okuda, Y., Ogura, E., Kondoh, H. and Kamachi, Y.** (2010). B1 SOX coordinate cell specification with patterning and morphogenesis in the early zebrafish embryo. *PLoS Genet.* **6**, 36.
- Ota, S., Hisano, Y., Muraki, M., Hoshijima, K., Dahlem, T. J., Grunwald, D. J., Okada, Y. and Kawahara, A.** (2013). Efficient identification of TALEN-mediated genome modifications using heteroduplex mobility assays. *Genes to Cells* **18**, 450–458.
- Pevny, L. H., Sockanathan, S., Placzek, M. and Lovell-Badge, R.** (1998). A role for SOX1 in neural determination. *Development* **125**, 1967–1978.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M.** (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: Inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* **86**, 589–598.
- Ralston, A. and Rossant, J.** (2008). Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* **313**, 614–629.
- Reim, G. and Brand, M.** (2006). Maternal control of vertebrate dorsoventral axis formation and epiboly by the POU domain protein Spg/Pou2/Oct4. *Development* **133**, 2757–2770.
- Reim, G., Mizoguchi, T., Stainier, D. Y., Kikuchi, Y. and Brand, M.** (2004). The POU domain protein Spg (Pou2/Oct4) is essential for endoderm formation in cooperation with the HMG domain protein casanova. *Dev. Cell* **6**, 91–101.
- Rodrigo, J. P., Grilli, G., Shah, J. P., Medina, J. E., Robbins, K. T., Takes, R. P., Hamoir, M.,**

- Kowalski, L. P., Suárez, C., López, F., et al.** (2018). Selective neck dissection in surgically treated head and neck squamous cell carcinoma patients with a clinically positive neck: Systematic review. *Eur. J. Surg. Oncol.* **44**, 395–403.
- Rogers, C. D., Archer, T. C., Cunningham, D. D., Grammer, T. C. and Silva Casey, E. M.** (2008). Sox3 expression is maintained by FGF signaling and restricted to the neural plate by Vent proteins in the *Xenopus* embryo. *Dev. Biol.* **313**, 307–319.
- Row, R. H., Tsotras, S. R., Goto, H. and Martin, B. L.** (2016). The zebrafish tailbud contains two independent populations of midline progenitor cells that maintain long-term germ layer plasticity and differentiate in response to local signaling cues. *Dev.* **143**, 244–254.
- Schier, A. F., Joyner, A. L., Lehmann, R. and Talbot, W. S.** (1996). From screens to genes: Prospects for insertional mutagenesis in zebrafish. *Genes Dev.* **10**, 3077–3080.
- Sharma, R., Shafer, M. E. R., Bareke, E., Tremblay, M., Majewski, J. and Bouchard, M.** (2017). Bmp signaling maintains a mesoderm progenitor cell state in the mouse tailbud. *J. Cell Sci.* **130**, 2982–2993.
- Shimizu, T., Bae, Y. K., Muraoka, O. and Hibi, M.** (2005). Interaction of Wnt and caudal-related genes in zebrafish posterior body formation. *Dev. Biol.* **279**, 125–141.
- Spiegel, A., Kalinkovich, A., Shvitiel, S., Kollet, O., Lapidot, T.** (2008). Stem cell regulation via dynamic interactions of the nervous and immune systems with the microenvironment. *Stem Cell* **3**, 484–92.
- Stewart, TA., Bellvé, AR., Leder, P.** (1984). Transcription and promoter usage of the myc gene in normal somatic and spermatogenic cells. *Science* **226**, 707–710.
- Stickney, H. L., Imai, Y., Draper, B., Moens, C. and Talbot, W. S.** (2007). Zebrafish bmp4 functions during late gastrulation to specify ventroposterior cell fates. *Dev. Biol.* **310**, 71–84.
- Strelchenko, N., Verlinsky, O., Kukhareno, V. and Verlinsky, Y.** (2004). Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod. Biomed. Online* **9**, 623–629.
- Suh, J., Eom, J. H., Kim, N. K., Woo, K. M., Baek, J. H., Ryoo, H. M., Lee, S. J. and Lee, Y. S.** (2019). Growth differentiation factor 11 locally controls anterior–posterior patterning of the axial skeleton. *J. Cell. Physiol.* **234**, 23360–23368.
- Tahara, N., Kawakami, H., Chen, K. Q., Anderson, A., Yamashita Peterson, M., Gong, W., Shah, P., Hayashi, S., Nishinakamura, R., Nakagawa, Y., et al.** (2019). Sall4 regulates neuromesodermal progenitors and their descendants during body elongation in mouse embryos. *Development* **146**, 1–10.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S.** (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676.
- Takeda, H., Matsuzaki, T., Oki, T., Miyagawa, T. and Amanuma, H.** (1994). A novel POU domain gene, zebrafish pou2: Expression and roles of two alternatively spliced twin products

- in early development. *Genes Dev.* **8**, 45–59..
- Taniguchi, Y., Kurth, T., Weiche, S., Reichelt, S., Tazaki, A., Perike, S., Kappert, V. and Epperlein, H. H.** (2017). The posterior neural plate in axolotl gives rise to neural tube or turns anteriorly to form somites of the tail and posterior trunk. *Dev. Biol.* **422**, 155–170.
- Thiel, G.** (2013). How Sox2 maintains neural stem cell identity. *Biochem. J.* **450**, 10–11.
- Tsakiridis, A. and Wilson, V.** (2015). Assessing the bipotency of in vitro-derived neuromesodermal progenitors. *F1000Research* **4**, 100.
- Tzouanacou, E., Wegener, A., Wymeersch, F. J., Wilson, V. and Nicolas, J. F.** (2009). Redefining the Progression of Lineage Segregations during Mammalian Embryogenesis by Clonal Analysis. *Dev. Cell* **17**, 365–376.
- van Nes, J., de Graaff, W., Lebrin, F., Gerhard, M., Beck, F. and Deschamps, J.** (2006). The Cdx4 mutation affects axial development and reveals an essential role of Cdx genes in the ontogenesis of the placental labyrinth in mice. *Development* **133**, 419–428.
- Warga, R. M., Mueller, R. L., Ho, R. K. and Kane, D. A.** (2013). Zebrafish Tbx16 regulates intermediate mesoderm cell fate by attenuating Fgf activity. *Dev. Biol.* **383**, 75–89.
- Wymeersch, F. J., Huang, Y., Blin, G., Cambray, N., Wilkie, R., Wong, F. C. K. and Wilson, V.** (2016). Position-dependent plasticity of distinct progenitor types in the primitive streak. *Elife* **5**, 1–28.
- Yamanaka, S.** (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Prolif.* **41**, 51–56.
- Yang, J., Gao, C., Chai, L. and Ma, Y.** (2010). A novel SALL4/OCT4 transcriptional feedback network for pluripotency of embryonic stem cells. *PLoS One* **5**, 1–10.
- Yoshikawa, Y., Fujimori, T., McMahon, A. P. and Takada, S.** (1997). Evidence that absence of Wnt-3a signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse. *Dev. Biol.* **183**, 234–242.
- Young, R. A.** (2011). Control of the embryonic stem cell state. *Cell* **144**, 940–954.
- Zhang, J., Tam, W.L., Tong, G.Q., Wu, Q., Chan, H.Y., Soh, B.S., Lou, Y., Yang, J., Ma, Y., Chai, L., Ng, H.H., Lufkin, T., Robson, P., Lim, B.** (2006). Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat Cell Biol.* **8**, 1114–23.
- 岡本俊 (2003). ゼブラフィッシュ後脳形成に関わる転写因子 Pou2 の作用機構の研究, 埼玉大学平成 14 年度卒業論文
- 田井美也子 (2004). ゼブラフィッシュ初期脳形成における転写因子 Pou2 の機能解析. 埼玉大学平成 15 年度卒業論文.
- 中本アンドルー (2007). ゼブラフィッシュで体軸および脳形成を制御する POU 転写因子の研究, 埼玉大学平成 18 年度修士論文.

坂内千夏 (2012). V 型 POU 転写因子 Pou2 の心臓形成と尾芽形成における役割の研究,  
埼玉大学平成 24 年度卒業論文.



## 図の説明

Figure 1. 脊椎動物胚における尾芽からの後方構造の発生制御機構.

脊椎動物胚の尾芽からの後方構造形成に関わる遺伝子相互作用についての知見を示す. 後端にある尾芽幹細胞は, *sox2*や *tbxt/tbxta* により多分化能が維持され, *soxB1* などにより神経系へ, *tbx6*, *tbx16*, *msgn* など中胚葉への分化が決定し, 各系列のその後の分化には各々プロニューラル遺伝子や myogenic 遺伝子を初めとする中胚葉形成遺伝子が関与すると考えられている. これらの分化制御には Wnt シグナル, FGF シグナル, BMP シグナル, retinoic acid シグナルなどが関わる.

Figure 2. 体節形成初期における尾芽関連遺伝子の発現の WISH による解析.

細胞の多能性の維持 (A), 神経分化 (B), 中胚葉分化 (C) に関わると考えられる制御遺伝子, そして主要成長因子遺伝子 (D) の 3-somite 期における発現を WISH により染色した. 遺伝子ごとに, 全身像 (左), そして破線で囲った尾芽周辺領域の拡大像 (右) を示した. スケールバー, 200  $\mu$ m. cnt, caudal neural tube; hb, hindbrain; nc, notochord; r1-3, rhombomere1-3; sc, spinal cord; tb, tail bud.

Figure 3. 体節形成中期における尾芽関連遺伝子の発現の WISH による解析.

(A-J) 多能性維持, 神経分化, 中胚葉分化などに関わると考えられる遺伝子の 18-somite 期における発現を WISH で染色した. 遺伝子ごとに, 染色胚の全体像 (左) と破線で囲った尾芽周辺領域の拡大像 (右) を示した. スケールバー, 200  $\mu$ m. hb; hindbrain, fb; forebrain, sc; spinal cord, nc; notochord, mb; midbrain, mhb, midbrain-hindbrain boundary, nt; neural tube.

Figure 4. 体節形成中期における遺伝子発現領域の two-color WISH による解析.

18-somite 期胚の尾芽周辺における 2 種の遺伝子の発現を two-color WISH により比較した (A, *pou5f3-tbxta*; B, *sox2-tbxta*; C, *sox3-tbxta*). 染色全体像を左, その内部で黒破線で囲った尾芽周辺領域の拡大像を右に示した. スケールバー, 200  $\mu$ m. nt; neural tube, nc; notochord.

Figure 5. 体節形成中期での遺伝子発現領域の two-color FISH による解析.

18-somite 期胚の尾芽周辺における 2 種の遺伝子の発現を two-color FISH により比較した. 左から順に, 明視野像 (BF, bright field), Alexa Fluor 488 での緑蛍光像, Alexa Fluor 647 でのマゼンタ蛍光像, 2 色の蛍光の merge 像, そして merge 像内の白破線で囲った領域の拡大像を示す. *soxB1* 遺伝子 (A), 神経発生制御遺伝子 (B), 分泌性因子遺伝子 (C) の発現について, 主として尾芽のマーカーとしての *tbxta* などを比較の対象として示している.

スケールバー, 100  $\mu$ m. cnt, caudal neural tube; nc, notochord; nt, neural tube; tb, tail bud; vm, ventral mesoderm.

Figure 6. 体節形成中期から後期における *pou5f3* 及び *soxB1* の発現の経時的追跡. 12-somite 期から 25-somite 期にかけての *pou5f3* (A), *sox2* (B), *sox3* (C), *sox19a* (D) の発現を WISH により経時的に観察した. 発生時期ごとに, 染色全身像 (左) と破線で囲った尾芽周辺領域の拡大図 (右) を示した. スケールバー, 200  $\mu$ m. hb; hindbrain, fb; forebrain, mb; midbrain, nt; neural tube.

Figure 7. 本研究で示された尾芽周辺での遺伝子発現領域の模式図.

本研究における尾芽周辺での遺伝子発現領域の解析結果により, *pou5f3* の発現は, 尾芽と脊索での *tbxta* の発現と接し, *sox3* が発現しない神経管後端で発現することが示された. この発現パターンから, 尾芽での未分化幹細胞は, 神経管に進入すると神経系細胞に特異化され, 前後して *pou5f3* を発現すると考えられる. *pou5f3* を発現した細胞はその後, *sox3* を発現する神経前駆細胞となり, さらに神経分化が進行することになる. このように, 尾芽幹細胞から神経細胞への分化過渡領域といえる神経管後端の *pou5f3* 発現領域を transition zone, その前方の *sox3* 発現領域を maturation zone とした.

Figure 8. 体節形成期での *pou5f3* 機能阻害により生じる胴尾部伸張異常.

(A) *pou5f3* の dominant-interfering 遺伝子である *en-pou5f3* の構造と Pou5f3 機能阻害の原理. *en-pou5f3* をヘミ接合体として持つ Tg 魚 [*Tg(hsp70l:en-pou5f3)*] を野生型魚 (*en-pou5f3*<sup>-/-</sup>) と交配し, 得られた胚を異なる時期で加温誘導処理した上 (37°C, 1 時間), 胚の形態と遺伝子発現の検討を行った. *en-pou5f3* 誘導胚では, Pou5f3 の転写調節機能が阻害される. なお, この交配によって得られる子孫胚では, *en-pou5f3*<sup>+/+</sup> と *en-pou5f3*<sup>-/-</sup> が各々 50% と予想される.

(B) 観察された典型的な胴尾部伸張異常. TTB-, 正常胚; TTB+, 体軸後方 (第 20 体節より後方) で尾部の屈曲が見られた胚; TTB++, 体軸の中程 (第 15~19 体節の間) とその後方で屈曲が見られた胚; TTB+++, 体軸の前方 (第 14 体節より前方) から屈曲が見られた胚.

(C) *en-pou5f3* の誘導時期と胴尾部伸張異常の関係. 体節形成期の異なる時期 (横軸) で *en-pou5f3* を誘導した結果, 24 hpf において見られた胴尾部での表現型の割合 (縦軸) を示す. 90% epiboly 期から 10-somite 期にかけて, 誘導時期が遅いほど屈曲の生じる位置が後方にシフトした. 10-somite 期以降については, 胴尾部異常の割合そのものが減少し, 正常な胴尾部を持つ胚が増加した. 各処理時期の上に観察した胚数を示す (n).

(D-F) 90% epiboly 期での *en-pou5f3* 誘導後, 形態観察によって正常 (TTB-), および TTB+++ に分類された胚において, 神経管マーカー *sox19a* (D), 体節マーカー *myod* (E),

脊索マーカー *tbxta* (F) の発現を WISH で染色した上, genotyping を行った. 観察されたマーカー発現異常胚はすべて *en-pou5f3* を保有するのに対し (*en-pou5f3*<sup>+/+</sup>), 正常胚はすべて *en-pou5f3*<sup>-/-</sup> であった. 検討したマーカー遺伝子の発現から, *en-pou5f3*<sup>+/+</sup> 誘導胚では神経管, 体節, 脊索が屈曲するなどの伸長異常を示し, さらに細胞分化やパターン形成が不規則となることが明らかになった. 右下には, 示された表現型を持つ胚の数と genotype を持つ胚の数を各々示す. スケールバー, 200  $\mu$ m.

(G) *en-pou5f3* の誘導胚での genotyping の例. *sox19a* の WISH 胚について, 正常胚と異常胚の各々4個体からゲノム DNA を抽出したうえ, ゲノム DNA 由来配列 (f, 180 bp) 及び *en-pou5f3* 遺伝子由来配列 (h, 200 bp) を PCR で増幅して泳動した結果を示す.

Figure 9. 体節形成期で *en-pou5f3* 誘導した胚における多能性関連遺伝子及び *soxB1* 遺伝子の発現.

3-somite 期または 18-somite 期で *en-pou5f3* を誘導した胚での多能性関連遺伝子 (A-J) および *soxB1* 遺伝子 (K-P) の発現を WISH により検討した. 右下には示された染色パターンを持つ胚数と該当する genotype を示す胚数を示す. スケールバー, 200  $\mu$ m. fb, forebrain; hb, hindbrain; mb, midbrain; sc, spinal cord; tb, tail bud.

Figure 10. 体節形成期で *en-pou5f3* 誘導した胚における神経発生遺伝子の発現.

3-somite 期または 18-somite 期で *en-pou5f3* を誘導した胚での神経発生遺伝子の発現を WISH により検討した. 右下には対応する染色パターンを示した胚数と該当する genotype を示す胚数を示す. スケールバー, 200  $\mu$ m. sc, spinal cord; tb, tail bud.

Figure 11. 体節形成期で *en-pou5f3* 誘導した胚における中胚葉形成遺伝子及び分泌因子遺伝子の発現.

3-somite 期または 18-somite 期で *en-pou5f3* を誘導した胚での中胚葉形成遺伝子および分泌因子遺伝子の発現を WISH により検討した. 右下には対応する染色パターンを示した胚数と該当する genotype を示す胚数を示す. スケールバー, 200  $\mu$ m. mhb, midbrain-hindbrain boundary; nc, notochord; pm, presomitic mesoderm; tb, tail bud.

Figure 12. *en-pou5f3* 誘導胚での *tbxta* と *sox3* に関する two-color FISH での発現解析.

(A) 18-somite 期での *en-pou5f3* 誘導胚における *sox3* と *tbxta* の発現を two-color FISH で検討した. *en-pou5f3* 誘導を行うことによって, *sox3* と *tbxta* の発現がいずれも抑制される胚がみられた. 左端から, 明視野画像 (BF; bright field), Alexa Fluor 488 での緑の蛍光画像, Alexa Fluor 647 でのマゼンタの蛍光画像, それぞれの蛍光を merge させた画像. スケールバー, 100  $\mu$ m. nt; neural tube, nc; notochord.

(B) FISH で染色された *en-pou5f3* 誘導胚 (A) の Genotyping. 染色胚の中で, 野生型と

比較して発現が低下した胚のみが全て *en-pou5f3* 保有胚であった。f はゲノム DNA 由来 PCR 産物 (180 bp), h は *en-pou5f3* 由来 PCR 産物 (200 bp) を示す。

Figure 13. CRISPR/Cas9 法による *pou5f3* 遺伝子の破壊と観察された形態的表現型。

(A) *pou5f3* に対する gRNA の設計。CRISPR/Cas9 法により *pou5f3* の遺伝子破壊を行うため、遺伝子産物の N 末端領域に gRNA の標的部位を設計した。この際、CRISPRdirect によって示された候補の中で、オフターゲット配列が少ないと予想された標的部位を選択した。標的配列と確認された変異配列 (7 塩基欠失,  $\Delta 7$ ) を赤字で示す。

(B) *pou5f3* 変異体で観察された発生異常。*pou5f3* ヘテロ接合体魚同士の交配で得られた子孫魚を 3 dpf で観察したところ、*pou5f3* ホモ接合体では尾部の伸長異常が見られた (左)。右には全身像内の枠で示した領域を拡大して示した。スケールバー, 200  $\mu$ m。

(C) 観察された表現型と genotype の対応関係。ヘテロ接合体魚の交配で得られた子孫胚の中で見られた正常胚と尾部伸長異常胚を各々ランダムに 8 胚ずつとり、各々 genotyping を行ったところ、異常胚はすべてホモ接合体 ( $\Delta 7/\Delta 7$ ) だったのに対し、正常胚のほとんど (7/8) は野生型 (+/+), またはヘテロ接合体 (+/ $\Delta 7$ ) だった。

Figure 14. *pou5f3* 変異体胚における尾芽形成遺伝子の発現。

18-somite 期の *pou5f3* 変異体胚において、多能性関連遺伝子 (A-D), *soxB1* 遺伝子 (E-F), 神経発生遺伝子 (G-I), 中胚葉・尾芽形成遺伝子 (J-L), 分泌因子遺伝子 (M-P) の発現を WISH により検討したうえ、genotyping を行った。各遺伝子、各 genotype について、染色全身像 (左) とその内部の破線で囲った尾芽周辺領域の拡大図 (右) を示した。右下には示された染色パターンを持つ胚の数と該当する genotype を示す胚数を示す。スケールバー, 200  $\mu$ m. cnt, caudal neural tube; mhb, midbrain-hindbrain boundary; nc, notochord; psm, presomitic mesoderm; sc, spinal cord; tb; tail bud.

Figure 15. 体節形成期での Pou5f3 転写因子の活性化が尾芽形成遺伝子の発現に及ぼす効果の検討。

(A) ERT2-tamoxifen 系を利用した Pou5f3 転写因子の活性化。本研究では Pou5f3 の C 末に人工エストロゲン受容体 (ERT2) を融合させた Pou5f3-ERT2 の遺伝子 (*pou5f3-ERT2*) を作製し、選択的 estrogen 受容体モジュレーターである tamoxifen (4-OHT) による処理と組み合わせることで、Pou5f3 転写因子の時期特異的な活性化を行った。*pou5f3-ERT2* の mRNA を導入した胚を 18-somite 期から 2 時間 4-OHT で処理し、これにより Pou5f3 を活性化させた胚について、20 hpf での尾芽形成遺伝子の発現を two-color FISH により検討する一方、24 hpf で形態観察を行った。

(B) Pou5f3-ERT2 活性化胚での *sox3* と *tbxta* の発現。18-somite 期から 2 時間 4-OHT で処理して Pou5f3 活性化を行うことによって、20 hpf において *sox3* (マゼンタ) と *tbxta*

(緑)の発現が活性化された。左端から明視野像 (BF; bright field), Alexa Fluor 488 で緑の蛍光画像, Alexa Fluor 647 でマゼンタの蛍光画像, それぞれの蛍光を merge させた画像。スケールバー, 100  $\mu$ m. nt; neural tube, nc; notochord.

(C) Pou5f3 活性化胚の形態観察。18-somite 期から 2 時間 4-OHT で処理した胚の形態を 24 hpf において観察した。活性化を行わなかった胚は全てが正常であり (100%, n=26), Pou5f3 活性化胚もほとんどが正常胚であった (92%, n=37)。スケールバー, 200  $\mu$ m.

Figure 16. 各種細胞間シグナルによる尾芽形成遺伝子の発現制御の検討。

(A-G) 14 hpf から 18 hpf までの 4 時間, 胚を各種分泌性シグナル因子の伝達に影響する薬剤 (Wnt シグナル阻害剤 IWR-1, Wnt シグナル活性化剤 BIO, FGF シグナル阻害剤 SU5402, BMP シグナル阻害剤 Dorsomorphin) で処理し, 直ちに固定した胚について WISH による尾芽形成遺伝子の発現解析を行った。対照 (control) として, 0.5% DMSO で処理した胚を同様に発現解析した。解析した胚数は各々について図中に示した。図中の赤矢印は発現の上昇, 青矢印は発現の減少を示す。スケールバー, 100  $\mu$ m. nt, neural tube; nc, notochord; sm, somite.

Figure 17. *tbxta* 強制発現胚での尾芽発生遺伝子の発現。

(A-H) *tbxta* mRNA を 100 pg 顕微注入した胚を 14-somite 期で固定し, WISH により尾芽形成遺伝子の発現を検討した。対照として sibling 胚についても同様に WISH を行った。図中の赤矢印は発現の上昇, 青矢印は発現の減少を示す。各遺伝子, 条件ごとに, 全身像 (左), そしてその内部で黒破線により示した尾芽領域 (右) を示す。

Figure 18. Luciferase レポーター解析による *pou5f3* 転写制御機構の検討。

*pou5f3* 上流 2.4 kb の制御下にある Luc-2.2 コンストラクトの P19 細胞での発現を検討した。この際, *pou5f3/soxB1* 発現プラスミドが存在しない条件, *pou5f3* のみ存在, *pou5f3/soxB1* がいずれも存在する条件各々について, *nkx1.2la* (A-C), *tbxta* (A, B), *gbx2* (C) の発現プラスミドの共導入の効果を比較した。*soxB1* としては *sox3* (A, C) と *sox19a* (B) を用いた。縦軸は対照 (*egfp* 発現プラスミドのみ) での Luc-2.2 の発現に対する相対値を表す。横軸の下には effector としての *pou5f3*, *sox3* もしくは *sox19a* の有無を+, -で示した。\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ 。Luciferase 解析の結果, まず, *pou5f3* と *soxB1* の相乗作用が確認された。また, *nkx1.2la* と *gbx2* は *pou5f3* の転写を抑制すること, *tbxta* は *pou5f3* の転写制御に関与しないことが示された。

Figure 19. *pou5f3* 発現制御における *soxB1* 遺伝子間の相乗作用の検討。

P19 細胞における Luc-2.2 発現系を用い, *pou5f3* の転写制御における *soxB1* 遺伝子間の相乗作用の検討を行った。Luc-2.2 を *pou5f3* 及び 2 種の *soxB1* の発現プラスミドとともに細

胞に共導入し、Luciferase の発現を測定した (A, *sox2-sox3*; B, *sox3-sox19a*). 縦軸は、対照 (*egfp* 発現プラスミドのみ) での Luc-2.2 の発現に対する相対値を表す. 横軸の下には effector として加えた発現プラスミド (*pou5f3*, *sox3*, *sox2*, *sox19a*, *egfp*) の量を 70, 35, ー (0) で示した (単位は ng/3 well). \*,  $p<0.05$ , \*\*,  $p<0.01$ . その結果, Fig. 18 で見られたように *sox3* と *sox19a* は *pou5f3* と相乗的に働くが, *sox2* は *pou5f3* と相乗作用がないこと, *soxB1* 遺伝子間での相乗作用もないことが確認された.

Figure 20. *sox3* をターゲットとした TALEN 遺伝子の設計.

(A) *sox3* 配列上に 3 か所設定した TALEN の標的部位. Old TALEN Targeter を用いて, *sox3* 遺伝子の機能ドメインである HMG ドメイン (High mobility group box domain) 上に TALEN の標的配列を 3 か所設定した (N 末端側から, *sox3*-TALEN-1, *sox3*-TALEN-2, *sox3*-TALEN-3). 下線は左右の TALEN 標的配列には含まれた部分であり, 主としてこの部分に変異導入が予想される. 本研究では *sox3*-TALEN-1 部位に対する TALEN を作製した.

(B) TALEN の作製の手順. TALEN-STEP1 では各モジュール (HD1, HD2, NN3, HD4, NI5, NN6) からクラスター (Left-C1) を作製し, TALEN-STEP2 では STEP1 で作製した各クラスターの連結を行った (Left TALEN). この模式図では, TALEN-STEP1 として Left-C1 の作製を例として示し, TALEN-STEP2 については Left TALEN の作製を例とした.

Figure 21. *sox3* に対する TALEN 遺伝子コンストラクトの作製過程と魚個体への変異導入.

(A) STEP1 で得られた各クラスタープラスミドクローンについてのコロニーPCR 産物の 2% agarose ゲルでの泳動結果. 上に示す番号は得られた各コロニーを示す. コロニーPCR では, STEP1 が完了しているならば 100 bp 間隔のバンドラダーが見られるはずであり, 各クラスターについて, 一部のコロニーで実際にそのようなラダーパターンが検出された (赤丸).

(B) STEP2 で得られた各 TALEN プラスミドクローンについてのコロニーPCR 産物の 1% agarose ゲルでの泳動. 上に示す番号は得られた各コロニーを示す. STEP2 が完了しているならば 2000 bp 付近にバンドが見られ, さらに低分子量側に 100 bp 間隔のバンドラダーが見られるはずである. 実際, 一部のコロニーについて, Left TALEN と Right TALEN の両方で実際にそのようなバンドパターンが検出された (赤丸).

(C) 制限酵素処理による TALEN 遺伝子アセンブリーの 1% agarose ゲル電気泳動での確認. 作製した Left TALEN と Right TALEN が正しく作製された場合, *HindII* で消化すると, 14300 bp と 2900 bp 付近にバンドが見られるはずであるが, 実際にそのようなバンドパターンが検出された.

(D) TALEN mRNA を導入した胚での Indel 導入の確認 (HMA). *sox3*-TALEN-1 の左右

の TALEN について mRNA を顕微注入した胚 (G<sub>0</sub>) から 24 hpf においてゲノム DNA を抽出し, HMA を行った. 上に示す番号は各 TALEN 導入胚を示す. *egfp* mRNA を注入した対照胚 (cont) では見られない複数のバンドシフトが TALEN 導入胚の一部で見られた (12/15, 赤矢印). 電気泳動については, まず 2% Agarose ゲルで行い, さらに詳しく調べるために同じ PCR 産物について 15% PAGE でも行った.

(E) 生殖系列への変異導入の確認. TALEN によって *sox3* への欠失導入が確認された G<sub>0</sub> 成魚 (1 個体) を野生型魚と交配し, 得られた次世代胚 (G<sub>1</sub> 胚) の一部について, HMA による変異導入の確認を行った結果, G<sub>1</sub> 胚についてもシフトバンドが確認された (2/6 赤矢印). 電気泳動については, 15% PAGE で行った.

(F) G<sub>1</sub> 胚における HMA でシフトバンドが確認された PCR 産物について, 塩基配列を決定したところ, Sox3 の機能ドメイン (HMG box) の N 末端側に設定した標的部位に 7 bp のフレームシフト欠失 ( $\Delta 7$ ) が確認された.

Figure 22. *sox19a* を標的とした gRNA の作製と魚個体への変異導入.

(A) *sox19a* の機能ドメイン (HMG box) の N 末端側に対する CRISPR/Cas9 の標的部位を, CRISPRdirect を用いて設計した. 標的部位の設計においては, 候補とされた標的の中でオフターゲット予想配列が少ないものを選択した.

(B) 合成した gRNA と *Cas9* mRNA の Agarose 電気泳動による確認. 1, 環状 *Cas9* 鋳型 plasmid. 2, *NotI* により直鎖化した *Cas9* plasmid, 3, 直鎖化 *Cas9* plasmid から合成した *Cas9* mRNA. 4, 環状 pT7-gRNA plasmid. 5, *BamHI* により直鎖化した pT7-gRNA plasmid. 6, 直鎖化 pT7-gRNA plasmid から合成した gRNA.

(C) *Cas9* mRNA と gRNA の共導入胚における Indel 導入. *Cas9* mRNA と gRNA を顕微注入した胚各々から 24 hpf においてゲノム DNA を抽出し, HMA を行った (15% PAGE). 上に示す番号は各 CRISPR/Cas9 導入胚 (G<sub>0</sub>) を示す. 対照胚 (C) では見られない複数のシフトバンドが導入胚のすべてで見られた (8/8).

(D) 生殖系列への変異導入の確認. *sox19a* への欠失導入が確認された G<sub>0</sub> 成魚を野生型魚と交配し, 得られた次世代胚 (G<sub>1</sub> 胚) の一部について, HMA による Indel の確認を行った結果 (15% PAGE), G<sub>1</sub> 胚についてもシフトバンドが確認された (12/16).

(E) HMA でシフトバンドが確認された G<sub>1</sub> 胚由来 PCR 産物の塩基配列を決定したところ, *sox19a* の標的部位に異なる二通りの 13 bp 配列が欠失した変異が確認された ( $\Delta 13-1$ ,  $\Delta 13-2$ ).

Figure 23. *sox3* と *sox19a* の二重変異体解析.

A. *sox3/sox19a* の二重変異体で観察された発生異常. 本研究で作製された *sox3:sox19a* 二重変異体 (*sox3*<sup>+/ $\Delta 7$</sup> ; *sox19a* <sup>$\Delta 13-1/\Delta 13-1$</sup> ) 同士で交配を行い, 得られた胚について形態観察を行うとともに genotyping を行った. 得られる子孫胚は全て *sox19a* 変異についてホモ接合体

であり, *sox3*について3通りの **genotype** が予想される. 形態観察の結果, 一部の胚で浮き袋の欠損と胴尾部伸長の異常が見られた. B. 得られた正常胚と異常胚について **genotyping** したところ, 異常胚の全てが *sox3* と *sox19a* の2重ホモ変異体であり (n=16), 他の **genotype** の胚は全て正常であった (n=8). スケールバー, 200  $\mu$ m.

**Figure 24.** 本研究で推定された尾芽幹細胞の発生における *pou5f3* の役割.

尾芽幹細胞の維持, そして尾芽幹細胞から神経性組織・中胚葉性組織への分化に関わる遺伝子の発現制御における内在 *pou5f3* の役割について, 本研究で得られた結果を元に模式的に表した. 内在 *pou5f3* は多能性維持遺伝子の発現には抑制的であり, 尾芽幹細胞からの神経細胞分化は推進する一方, 中胚葉前駆細胞への分化には抑制的に働くと推定される.

**Figure 25.** 本研究で推定された尾芽周辺での分泌因子の役割.

尾芽幹細胞の維持, そして尾芽幹細胞から神経性組織または中胚葉性組織への分化に関わる遺伝子の発現制御における分泌因子の役割について, 本研究で得られた結果を元に模式的に表した. Wnt/FGF/BMP シグナルは尾芽形成遺伝子の発現制御を通じて, 尾芽発生に関与すると推定される.



Table 1. 本研究で用いた合成オリゴヌクレオチド

A. cDNA クローニングに用いた PCR プライマー

Primer name	Sequence (5' → 3')	Base
klf4-RI-s	GCGAATTCTTCCTTCCACTCATGAGGCAG	29
klf4-Xb-as	GCTCTAGAGATGTTTTGGCTATAGATGGCGC	31
klf17-Bam-s	GCGGATCCAACATTTGCAACATGGCTCTT	29
klf17-Bam-as	GCGGATCCCTCTTTATGTTTACATGTGCC	29
nanog-RI-s	GCGAATTCCTAACGGCGAAATGGCGGACT	29
nanog-Xb-as	GCTCTAGAGCAGCTGGACTCACAGCAAAG	29
myca-RI-s	GCGAATTCACAAGTGTCAAAATGCCGGTG	29
myca-Xb-as	GCTCTAGATCATTAATGTGAACTCCGCAGC	30
nkx1.2la-RI-s	GCGAATTCGCAAGCGAAAGATGCTCGAA	28
nkx1.2la-Xb-as	GCTCTAGACCACCATGCAGAGTTCATAAG	29
sall4(prtl)-s	GCAGTCCAAACCACAGCATA	20
sall4(prtl)-as	ATGCACCATCACTGCCTGAT	20
sox19a-RI-s	GCGAATTCTCTGTTGGCAGCCATGTACA	28
sox19a-Xb-as	GCTCTAGAATCAGATGTGTGTGAGAGGC	28
gdf11-RI-s	GCGAATTCGAGAAAACCATTTGTTTCCTG	28
gdf11-Xb-as	GCTCTAGAGCAAACTCTATGAACAGCC	28
tbxta-RI-s	GCGAATTCGATCGGAAATATGTCTGCCTC	29
tbxta-Xb-as	GCTCTAGAATCTCAGTAGCTCTGAGCCA	28

B. *en-pou5f3* 誘導胚の genotyping に用いた PCR プライマー

Primer name	Sequence (5' → 3')	Base
Eng-s <sup>1</sup>	GGATACACGAGGAAATCGTG	20
Pou2-as <sup>1</sup>	TGAGCTCTTTCGCAAACTGC	20
fe37b04-F <sup>2</sup>	GCAGCTTTTGTGTCTGCTTG	20
fe37b04-R <sup>2</sup>	GGTTTGTCTGCATCAGATACG	22

1. *en-pou5f3* 保有胚を PCR で検出 (産物のサイズ, 200 bp)
2. 第 3 染色体のゲノムから得られる対照用 PCR プライマー (産物のサイズ, 180 bp).  
(Khan et al., 2012a/b)

### C. TALEN 作製の STEP1 で確認のために用いた PCR プライマー<sup>1</sup>

Primer name	Sequence (5' → 3')	Base
pCR8 F1	TTGATGCCTGGCAGTTCCCT	20
pCR8 R1	CGAACCGAACAGGCTTATGT	20

1. STEP1 が完了しているならば 100 bp 間隔のバンドラダーが見られるプライマー.

### D. TALEN 作製の STEP2 で確認のために用いた PCR プライマー<sup>1</sup>

Primer name	Sequence (5' → 3')	Base
TAL F1	TTGGCGTCGGCAAACAGTGG	20
TAL R2	GGCGACGAGGTGGTCGTTGG	20

1. STEP2 が完了しているならば 2000 bp 付近にバンドが見られるプライマー.

### E. 遺伝子破壊で HMA に用いた PCR プライマー

Primer name	Sequence (5' → 3')	Base
<i>sox3</i> -TAL-HMA-s	GGAAACCGAGATTAAAAGCCCC	22
<i>sox3</i> -TAL-HMA-as	CCATGAAAGCATTTCATAGGCCG	22
<i>sox19a</i> -CRI2-HMA-s	AATGACCCAGCTGAAC	16
<i>sox19a</i> -CRI2-HMA-as	GTGCCATTTTGCGCCT	16

### F. CRISPR/Cas9 法で gRNA 合成用プラスミド作製に用いたオリゴ DNA

Primer name	Sequence (5' → 3')	Base
sgRNA- <i>sox19a</i> -gRNA-2S	TAGGAGCAGAGTAGCGATCCTA	22
sgRNA- <i>sox19a</i> -gRNA-2AS	AAACTAGGATCGCTACTCTGCT	22

### G. プラスミドコンストラクトの *pou5f3* 上流へのノックインに用いたオリゴ DNA

Primer name	Sequence (5' → 3')	Base
<i>pou5f3</i> -up-1AS(CUGA)	CTAATACGACTCACTATAGAGGACATGTTTGGGAACGCGG TTTTAGAGCTAGAAATAGCA	60

Table 2. 本研究で WISH 用プローブ合成に用いたプラスミドと酵素<sup>1</sup>

Gene name	Vector	Restriction enzyme <sup>2</sup>	RNA polymerase <sup>3</sup>
<i>klf4</i>	pCS2+	<i>EcoRI</i>	T7
<i>klf17</i>	pTAC2	<i>XhoI</i>	SP6
<i>nanog</i>	pCS2+	<i>EcoRI</i>	T7
<i>myca</i>	pCS2+	<i>EcoRI</i>	T7
<i>pou5f3</i>	pBlueskript	<i>ApaI</i>	T3
<i>chordin</i>	-	<i>NotI</i>	T7
<i>tbx6</i>	pBlueskript	<i>EcoRV</i>	T3
<i>lhx5</i>	pCS2+	<i>EcoRI</i>	T7
<i>wnt3a</i>	pBlueskript	<i>EcoRI</i>	T3
<i>cdx1a</i>	pBlueskript	<i>EcoRI</i>	T7
<i>cdx4</i>	-	<i>HindIII</i>	T3
<i>nkx1.2la</i>	pCS2+	<i>EcoRI</i>	T7
<i>sall4</i>	pTAC2	<i>XbaI</i>	T7
<i>sox19a</i>	pCS2+	<i>EcoRI</i>	T7
<i>gdf11</i>	pCS2+	<i>EcoRI</i>	T7
<i>tbxta</i>	pCS2+	<i>EcoRI</i>	T7
<i>neurog1</i>	pCS2+	<i>EcoRI</i>	T7
<i>bmp2b</i>	pBlueskript	<i>EcoRI</i>	T3

1. 上記の表にないが、本研究で WISH に用いたプローブについては、所属研究室で既に作製されたものを用いた。
2. 直鎖化に用いた制限酵素。
3. 転写に用いた RNA polymerase。

Table 3. 本研究で用いたシグナル活性化剤・阻害剤

Chemicals	Effect	Stock	solvent
DMSO	control		
IWR-1	Wnt inhibition	20 mM	DMSO
BIO	Wnt activation	10 mM	DMSO
SU5402	FGF inhibition	25 mM	DMSO
Dorsomorphin	BMP inhibition	5 mM	DMSO

Table 4. 本研究の遺伝子破壊実験で用いた plasmid

TALEN STEP1	pFUS-A2A
	pFUS-A2B
	pFUS-A3A
	pFUS-A3B
	pFUS-BX (1-6)
TALEN STEP2	pCS-TAL3-DD
	pCS-TAL3-RR
CRISPR/Cas9	pT7-gRNA-plasmid
	Cas9 plasmid

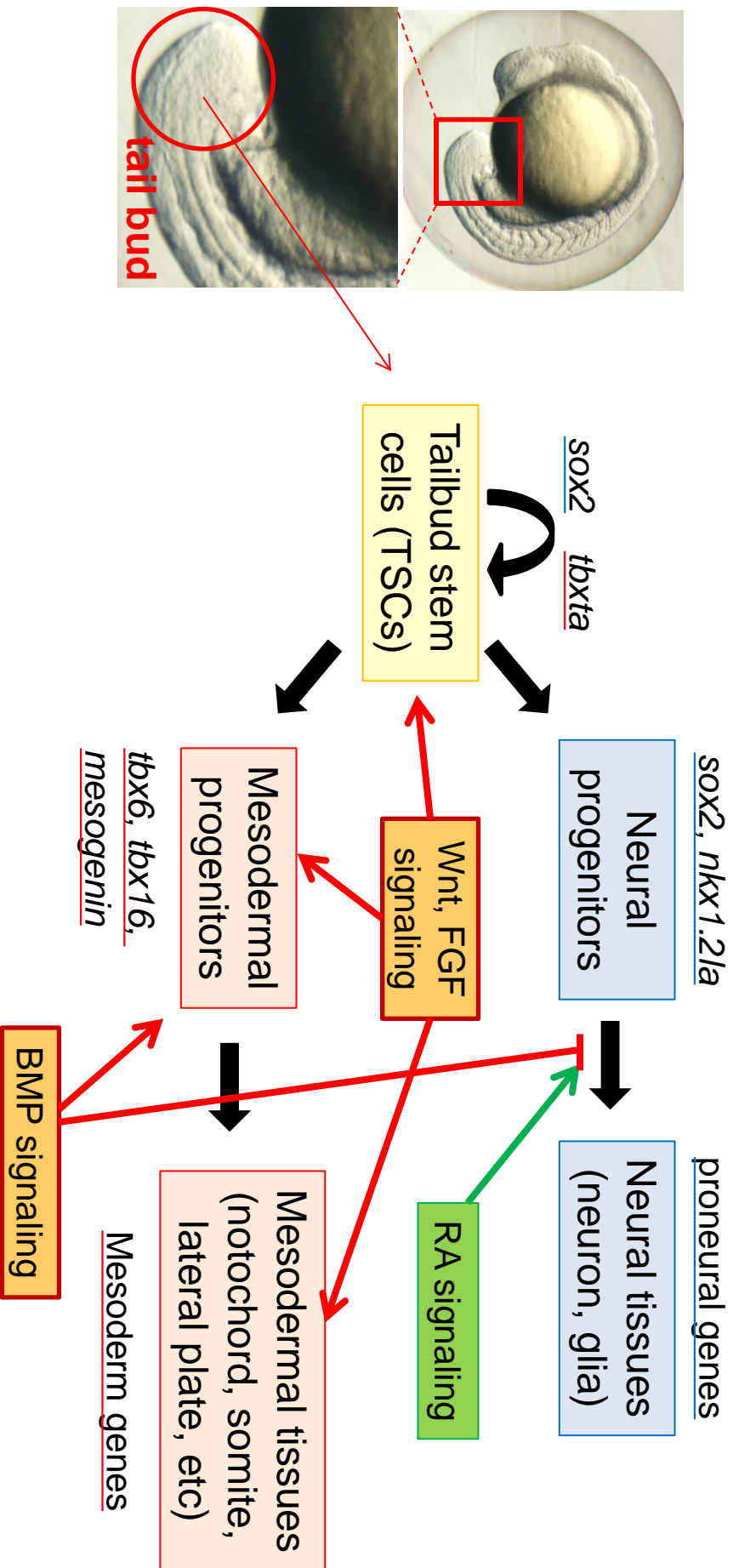
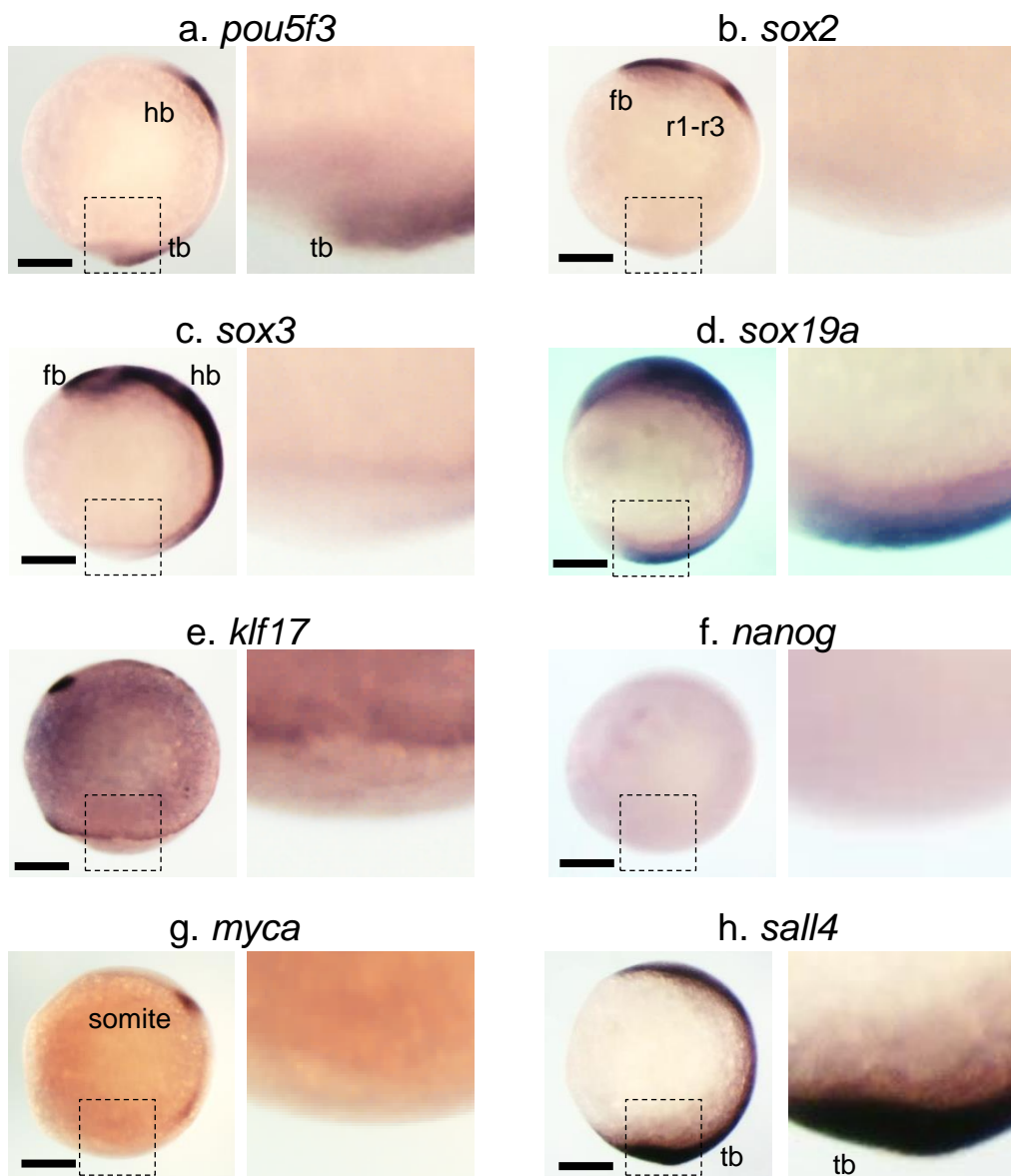


Figure 1

A



B

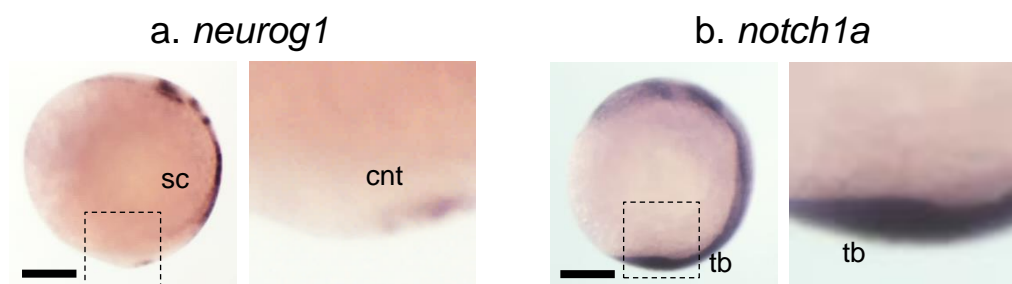
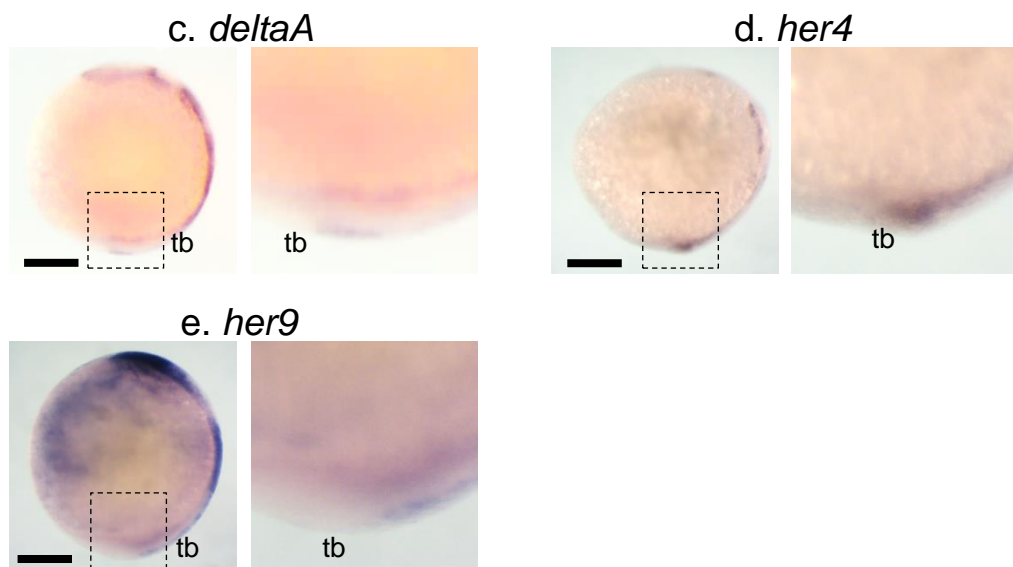


Figure 2

B



C

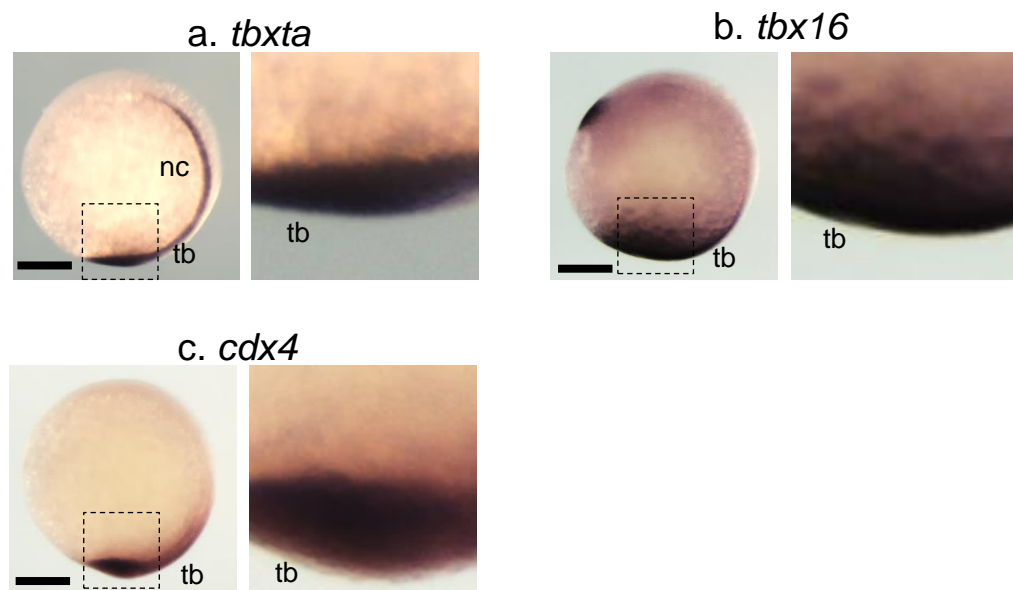


Figure 2

D

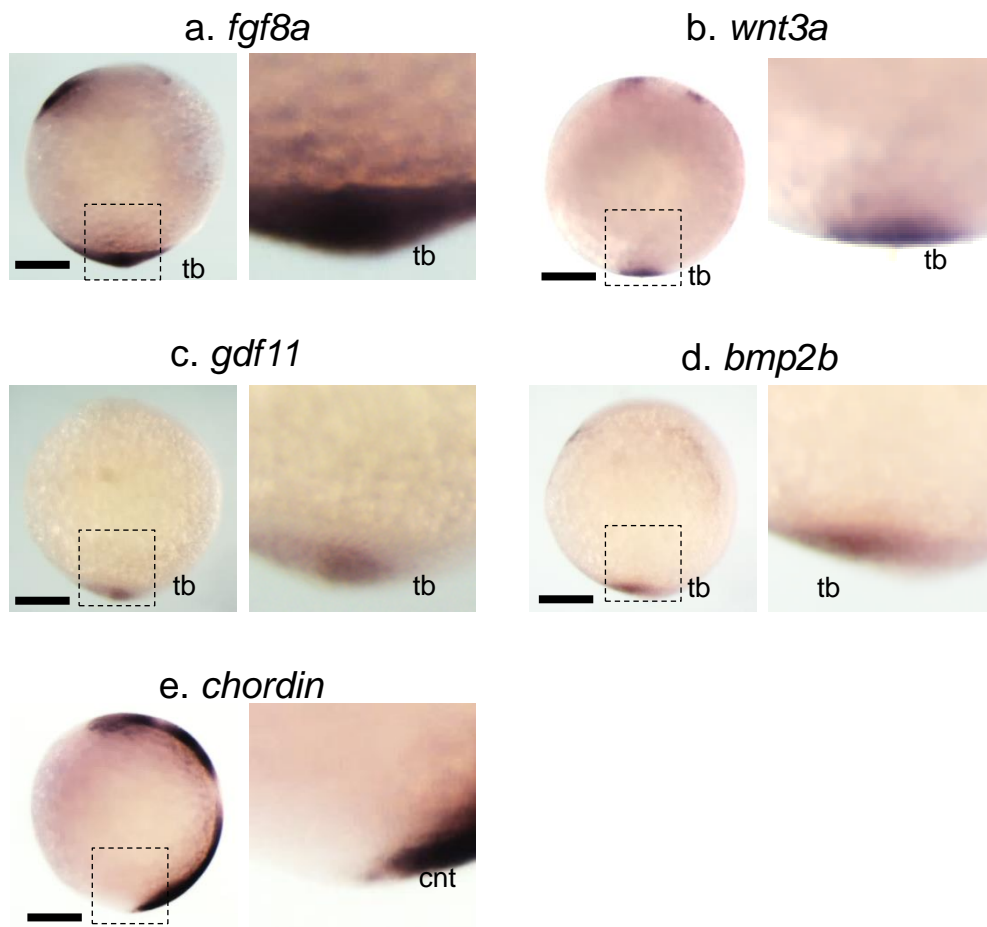


Figure 2



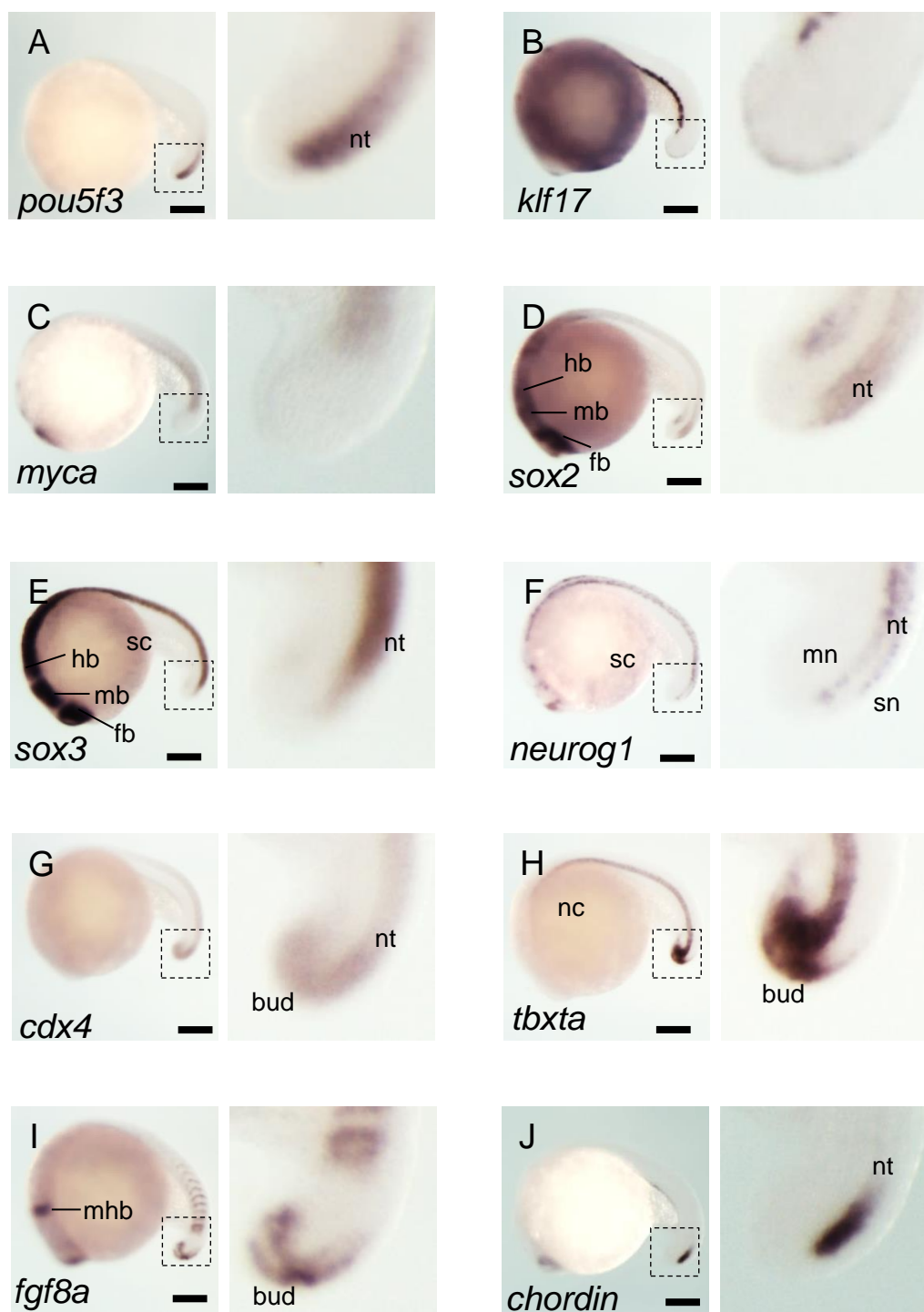
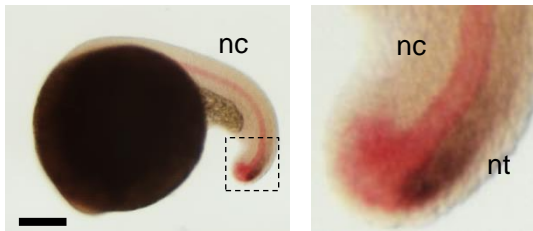


Figure 3

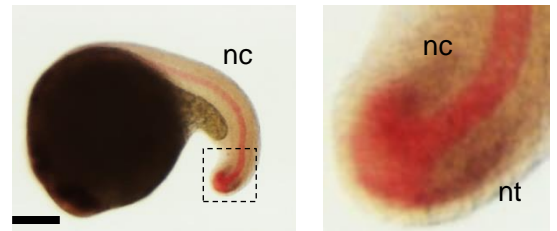
A

*pou5f3* + *tbxta*



B

*sox2* + *tbxta*



C

*sox3* + *tbxta*

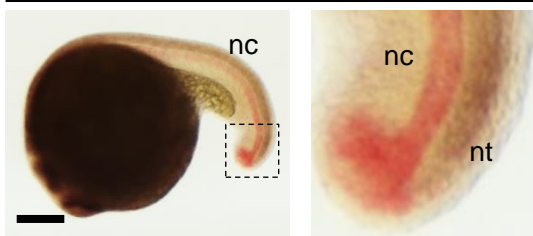


Figure 4

A

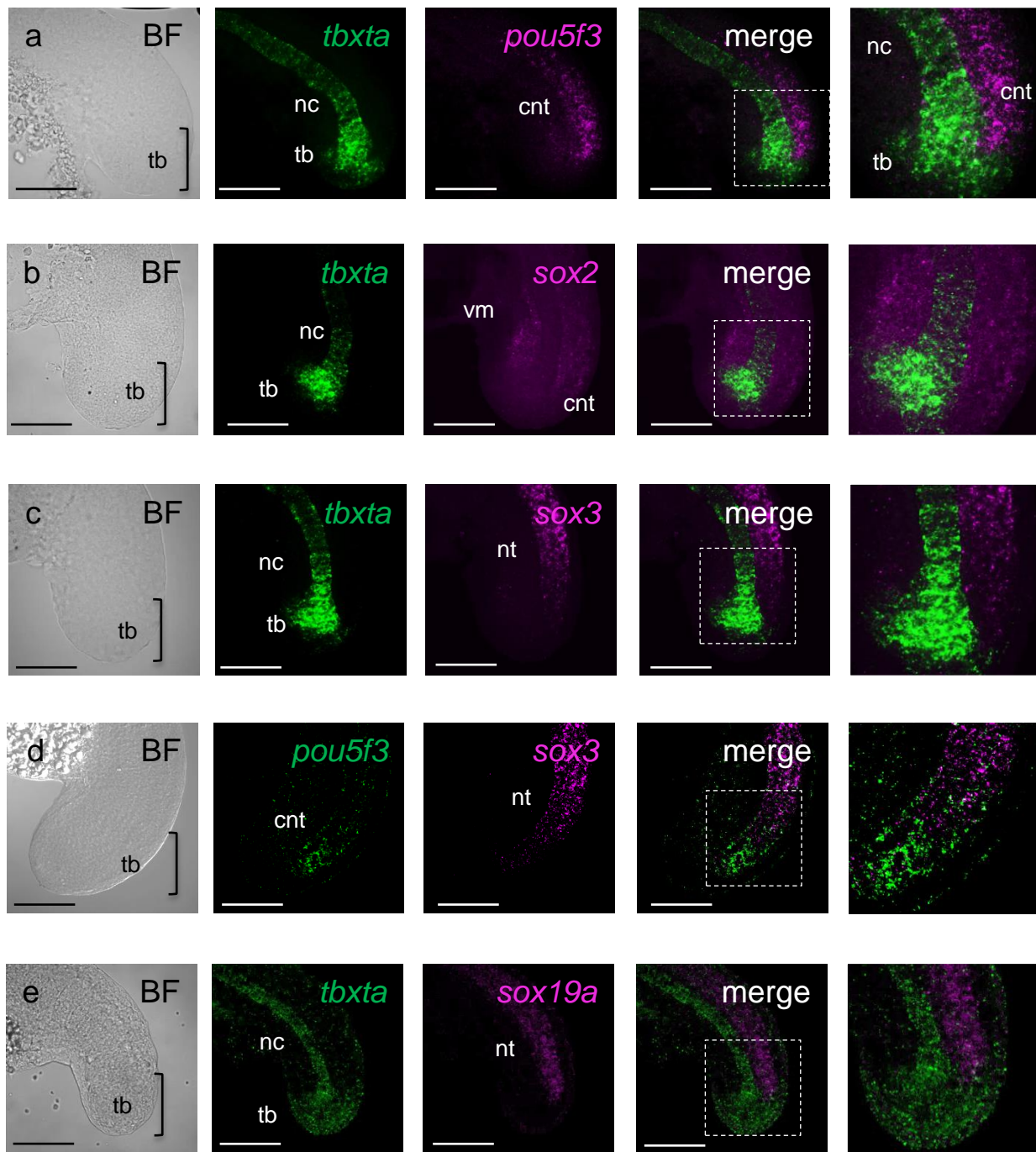


Figure 5

B

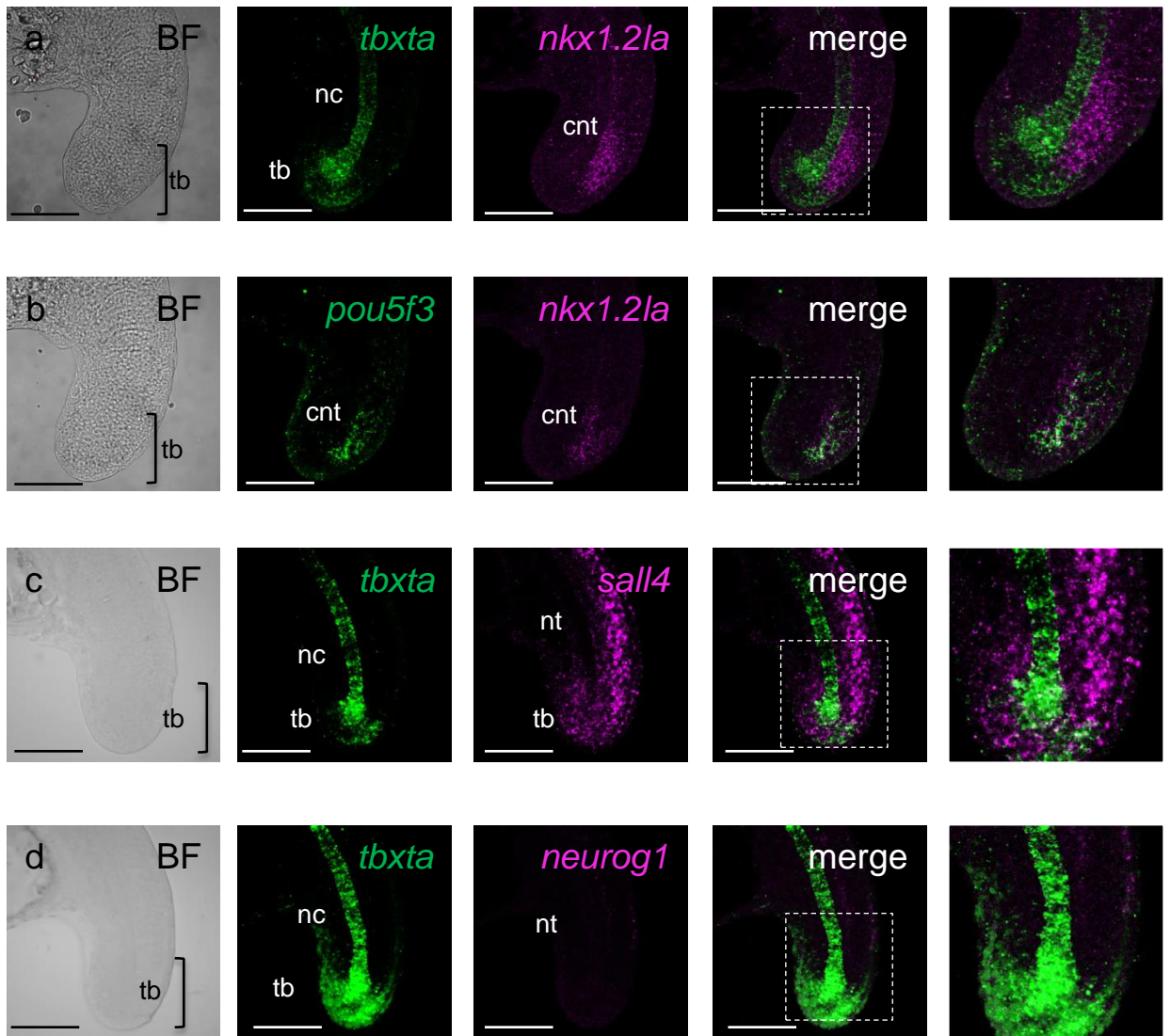


Figure 5



C

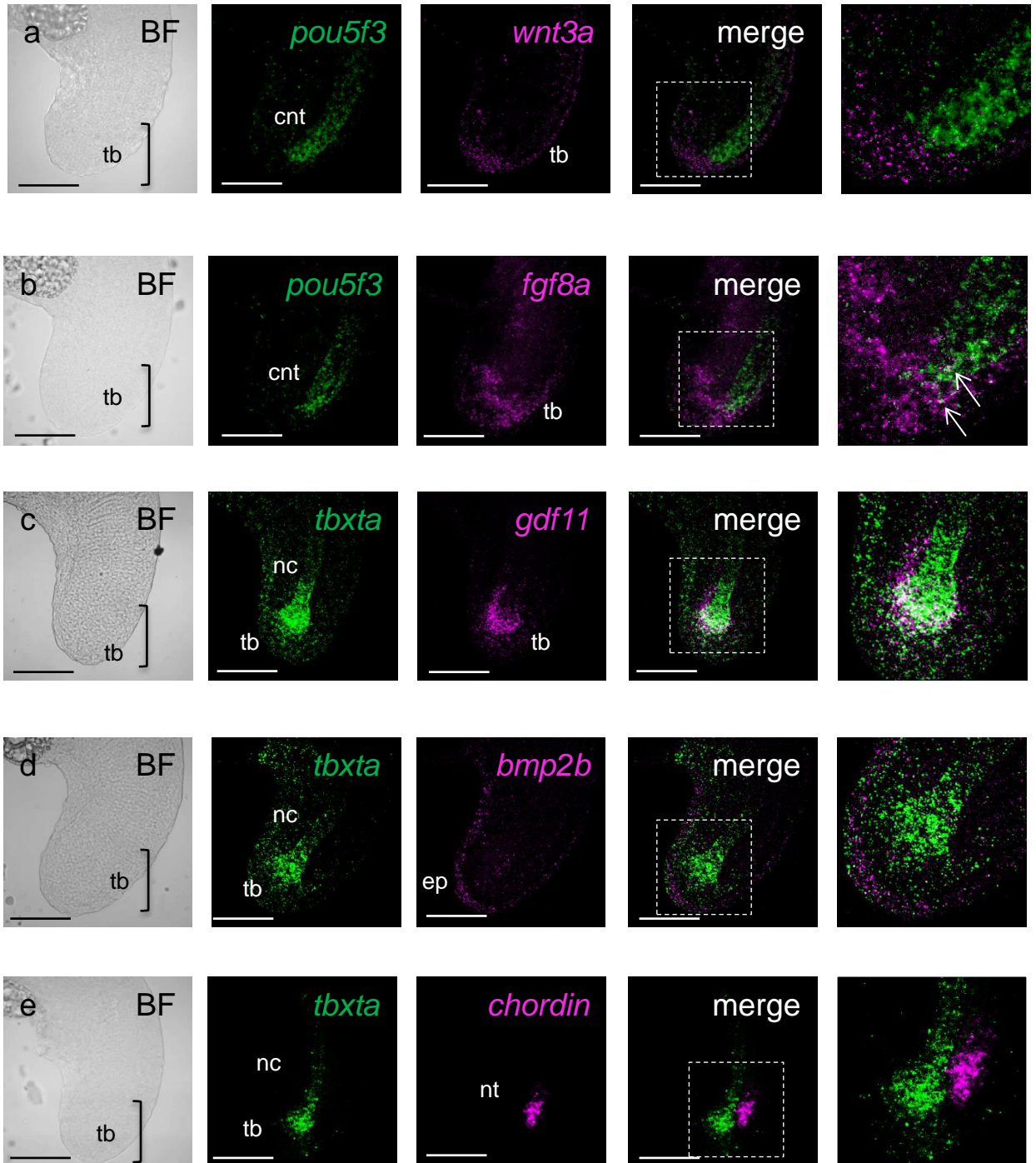
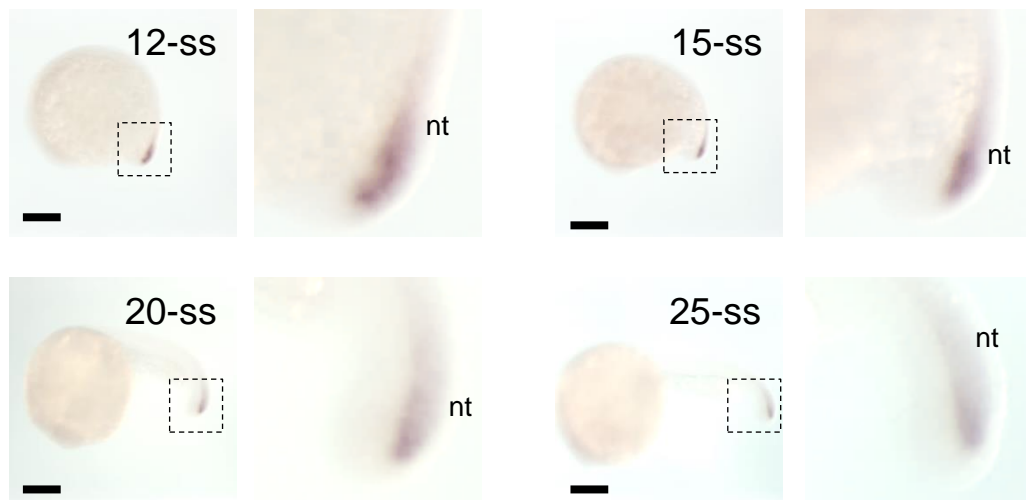


Figure 5

A  
*pou5f3*



B  
*sox2*

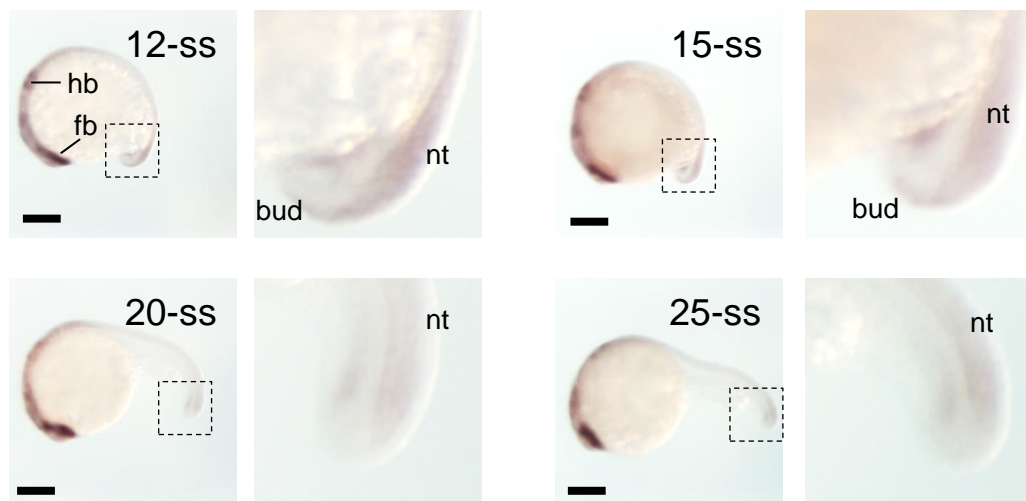
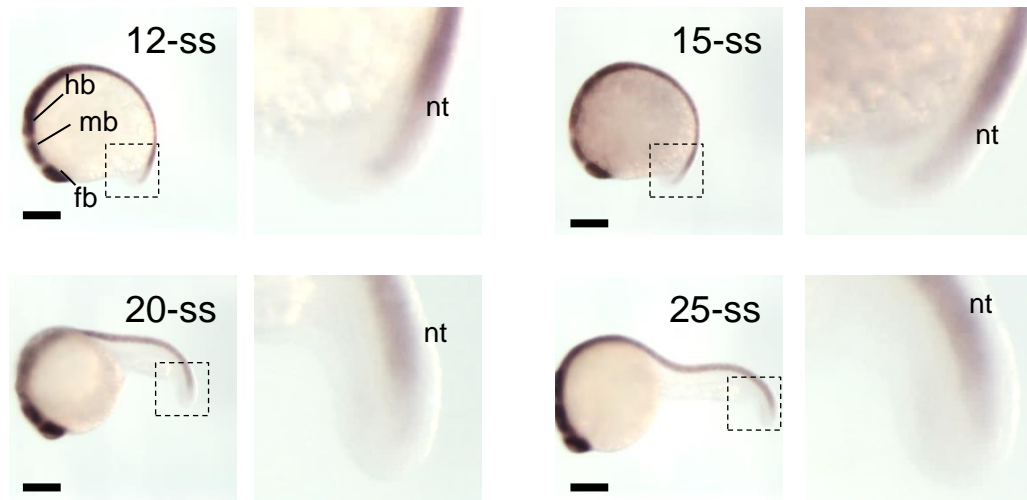


Figure 6

C  
*sox3*



D  
*sox19a*

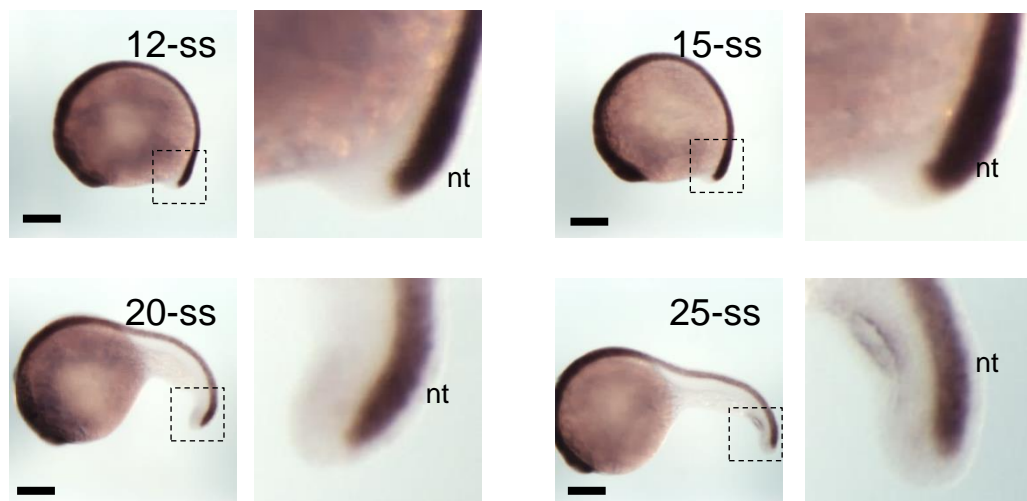


Figure 6

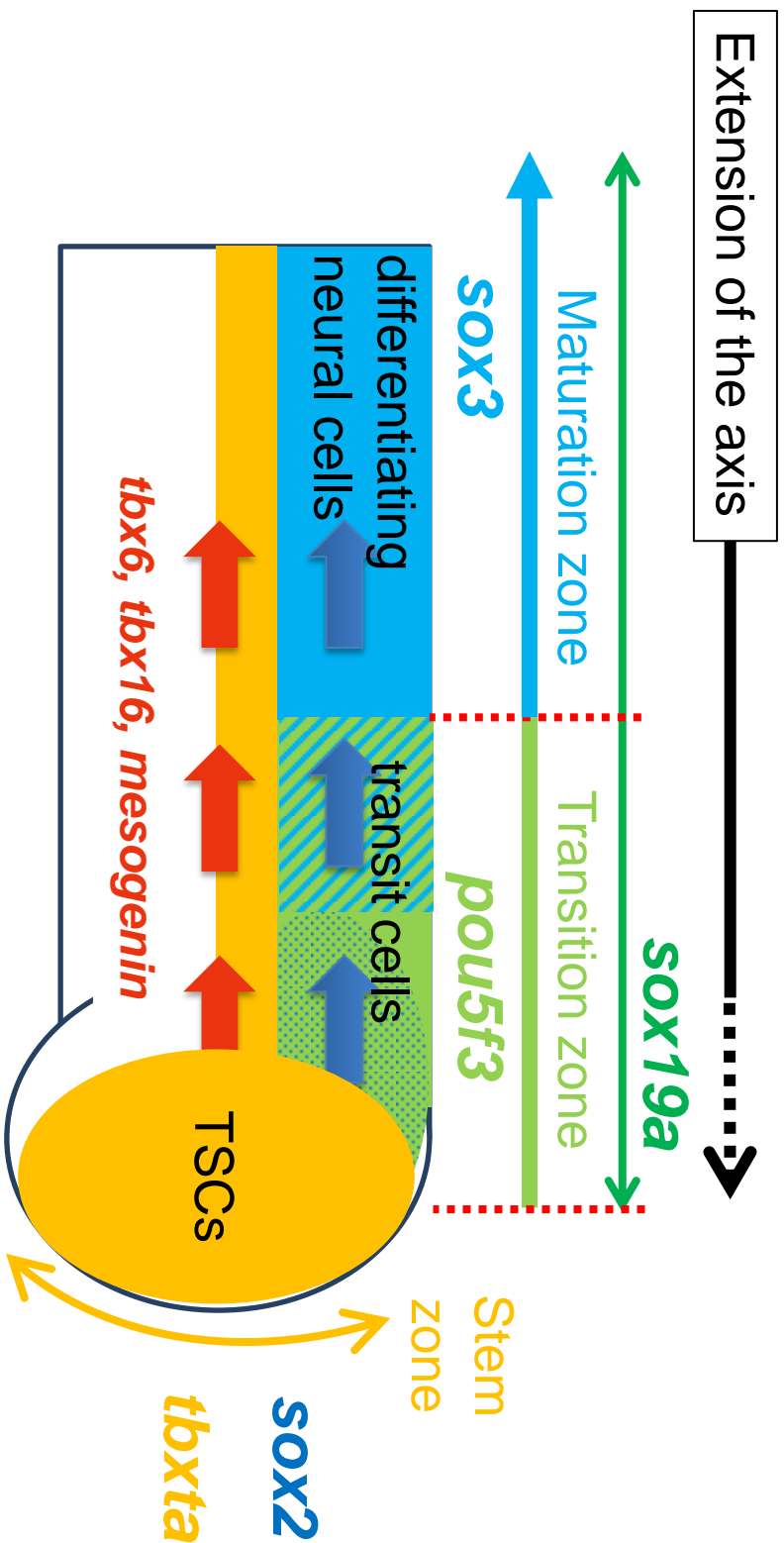


Figure 7



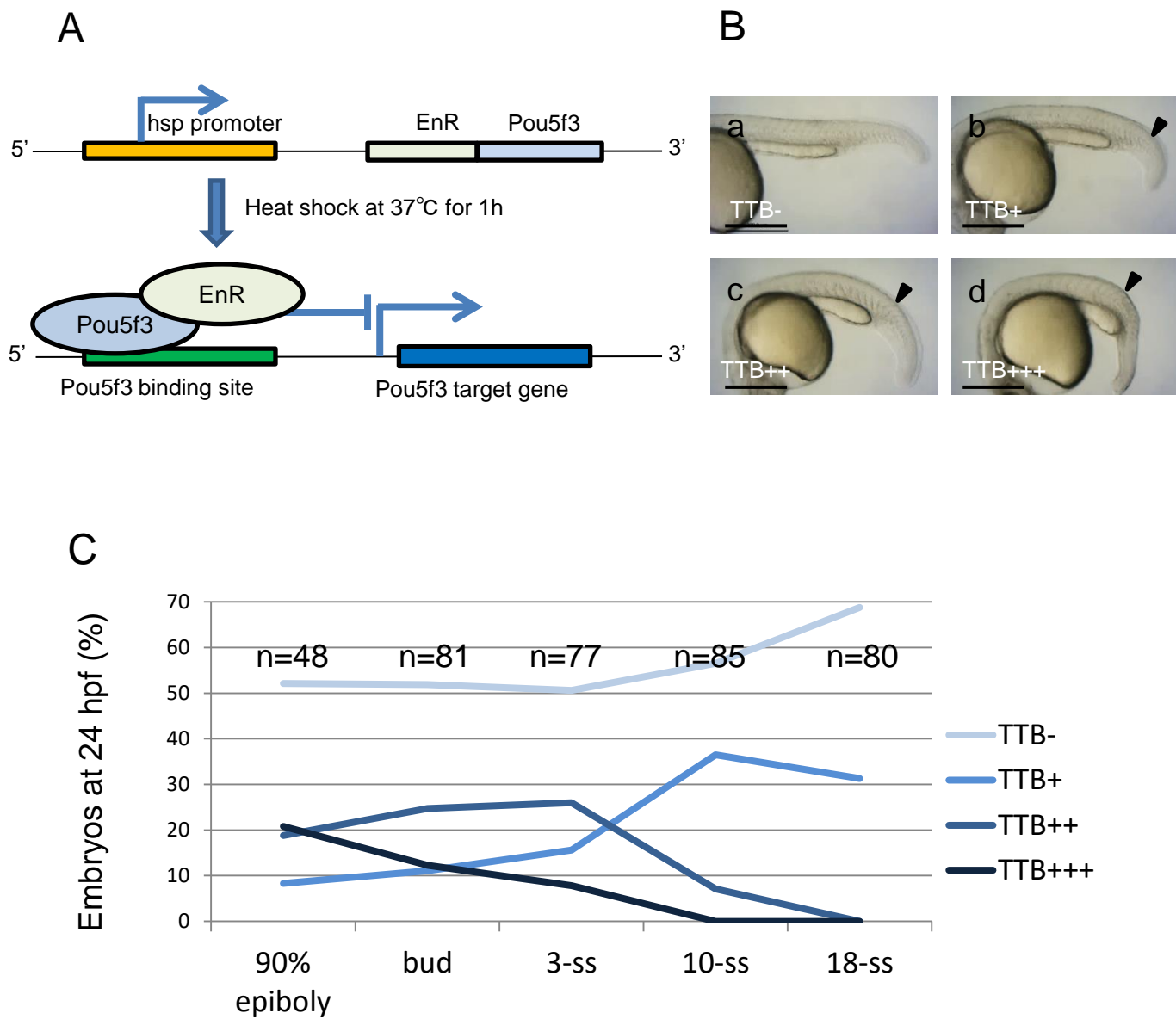
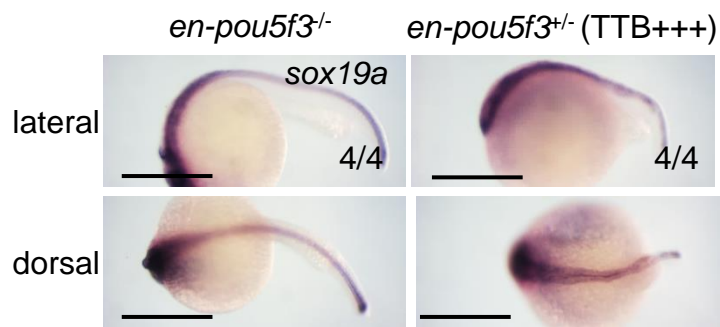
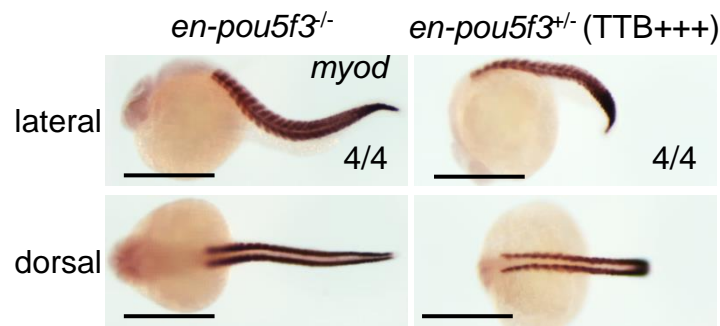


Figure 8

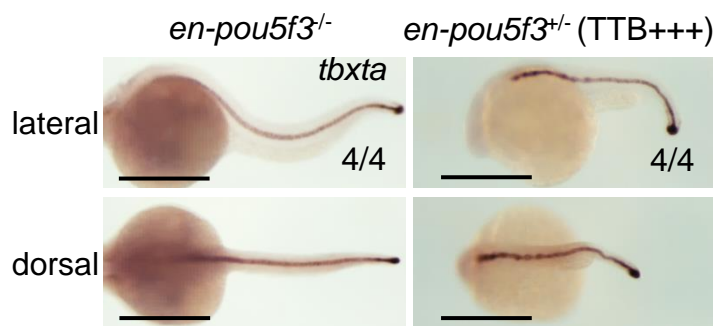
D



E



F



G

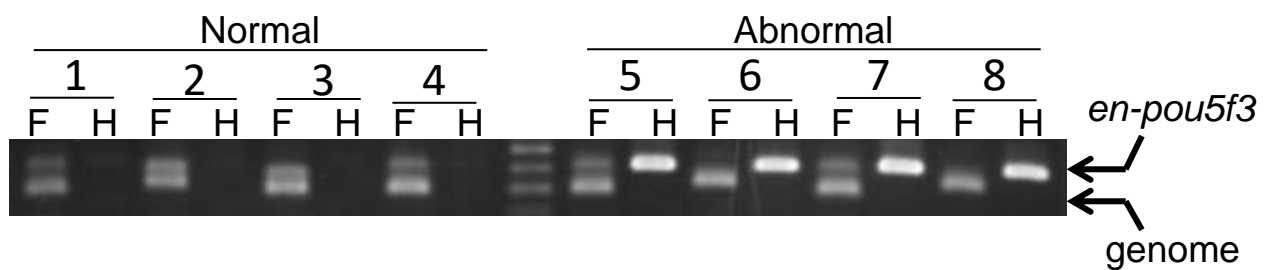


Figure 8

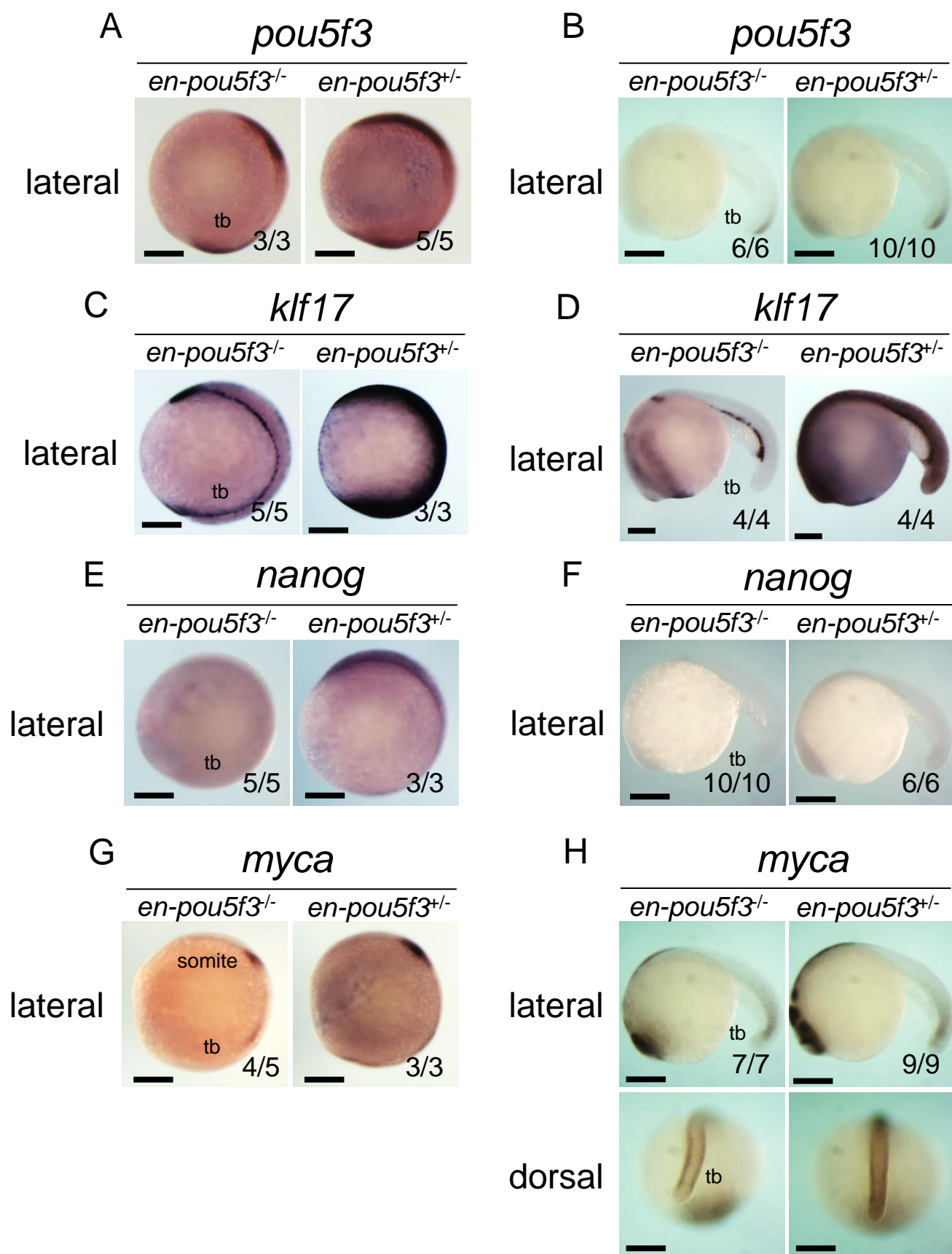


Figure 9

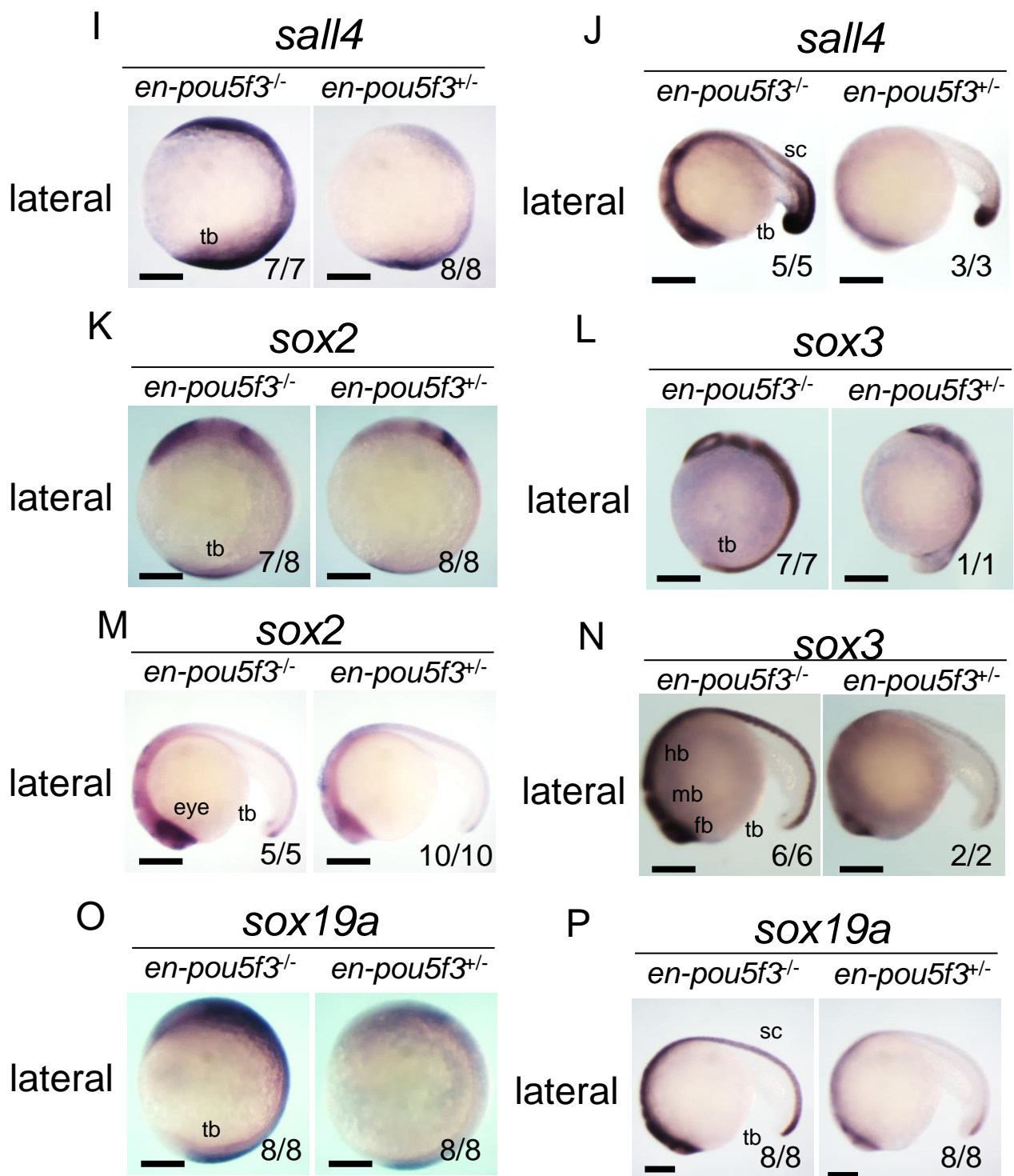


Figure 9

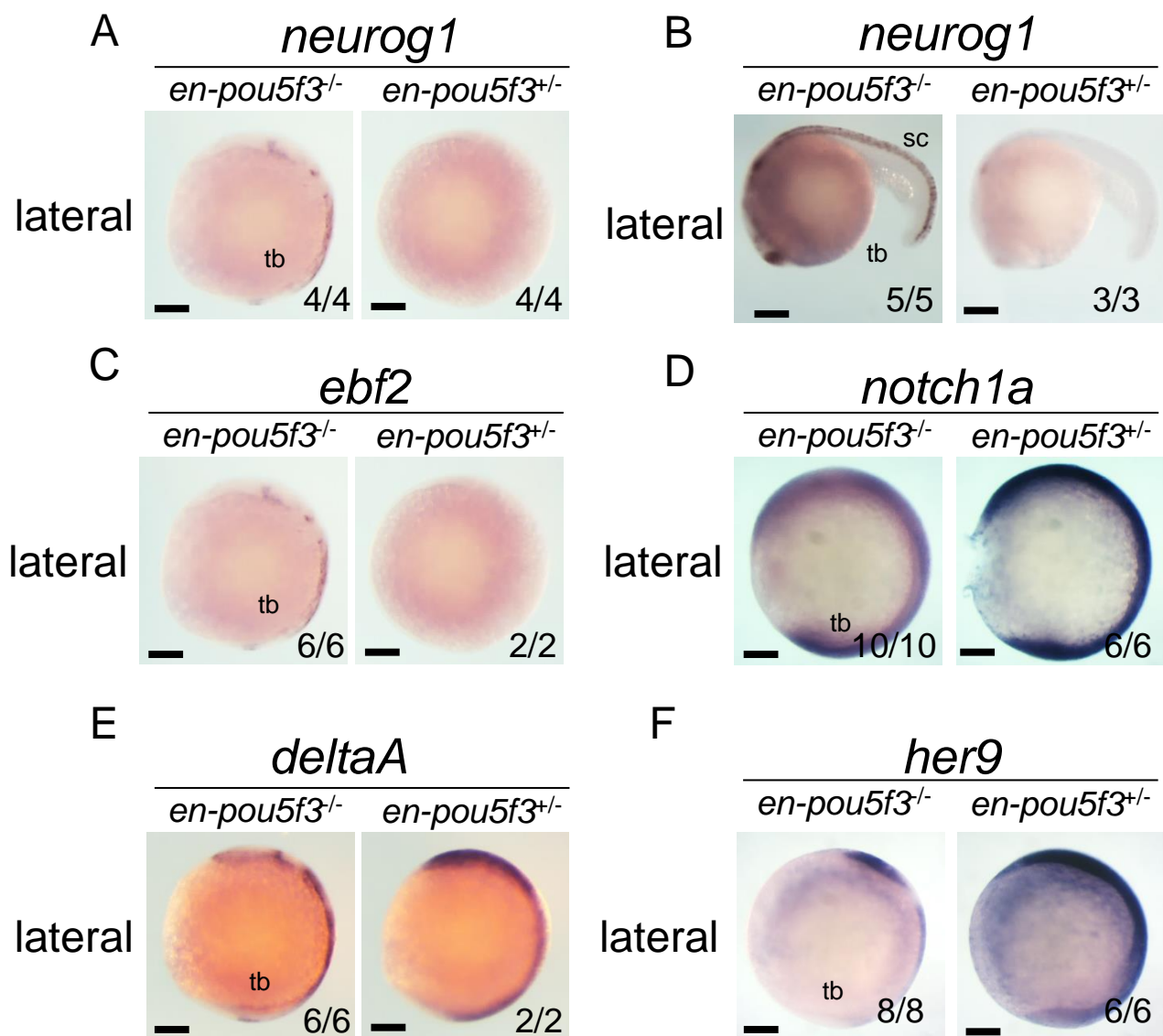


Figure 10

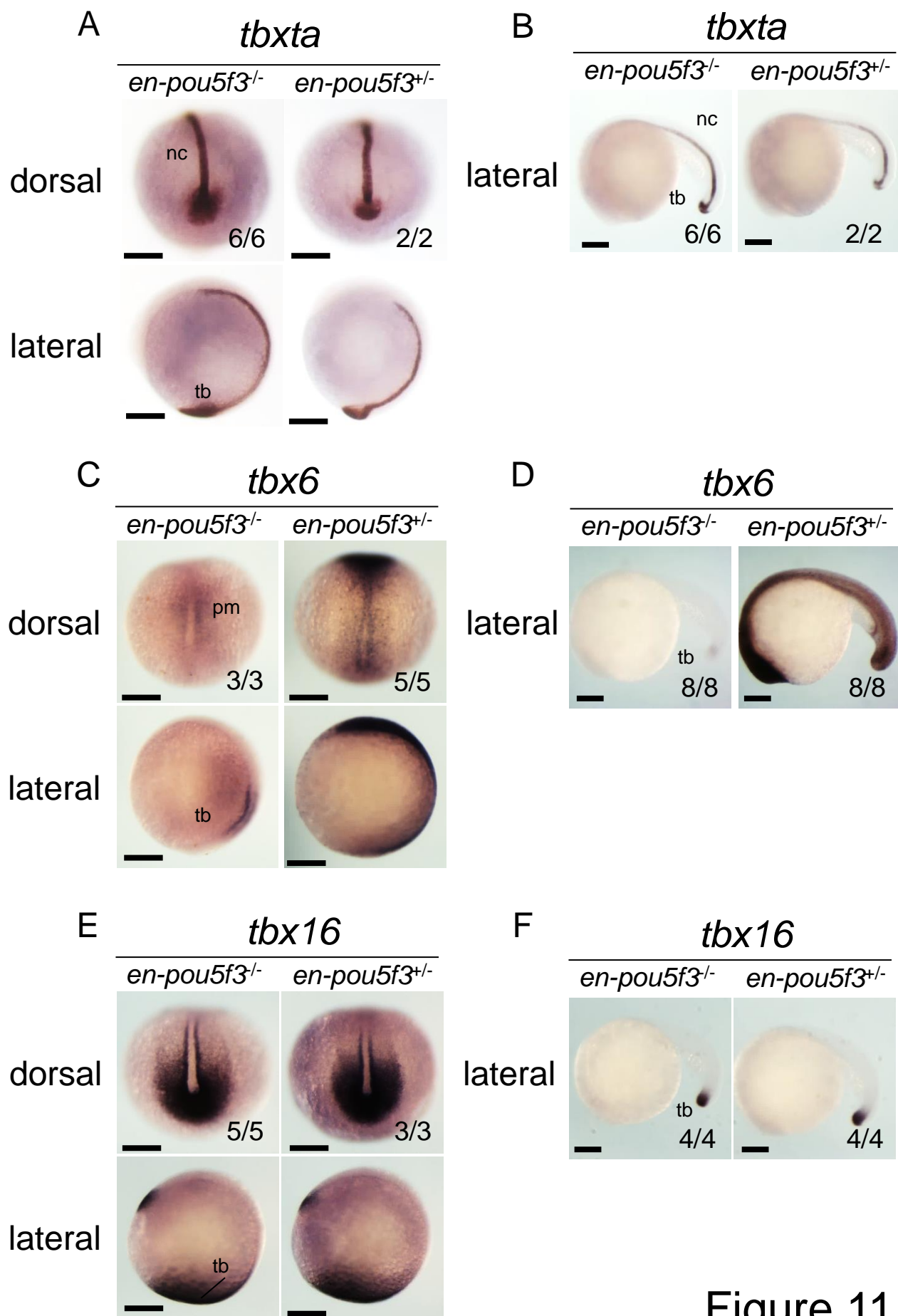


Figure 11



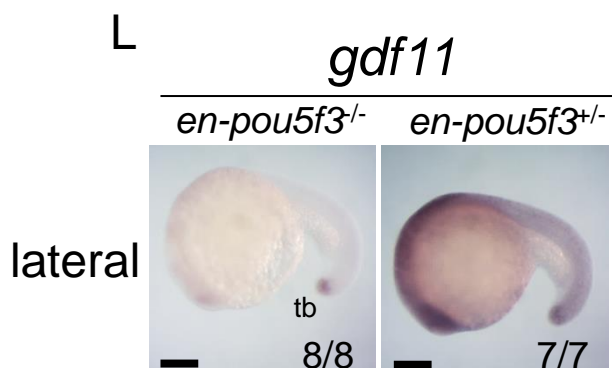
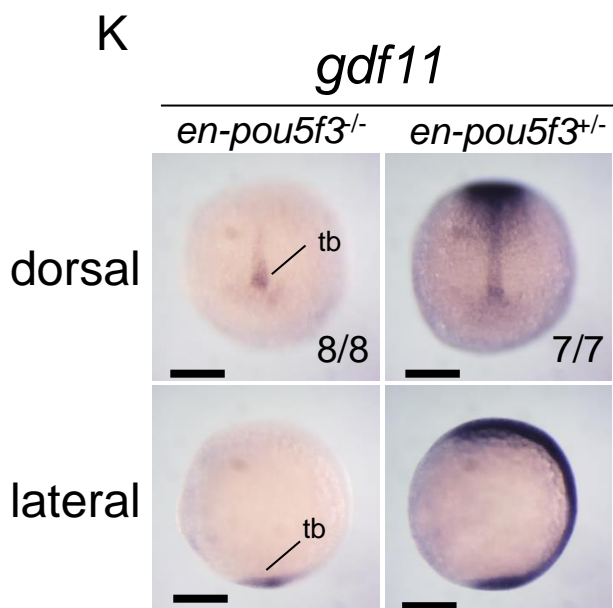
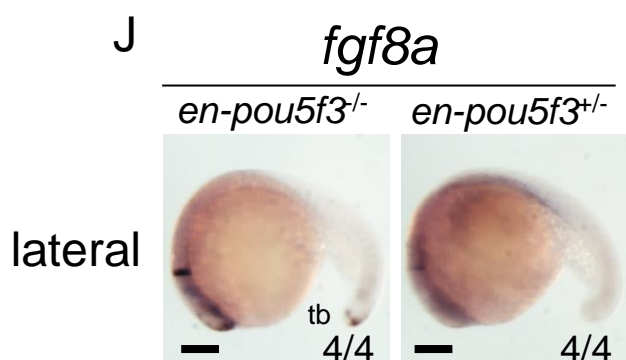
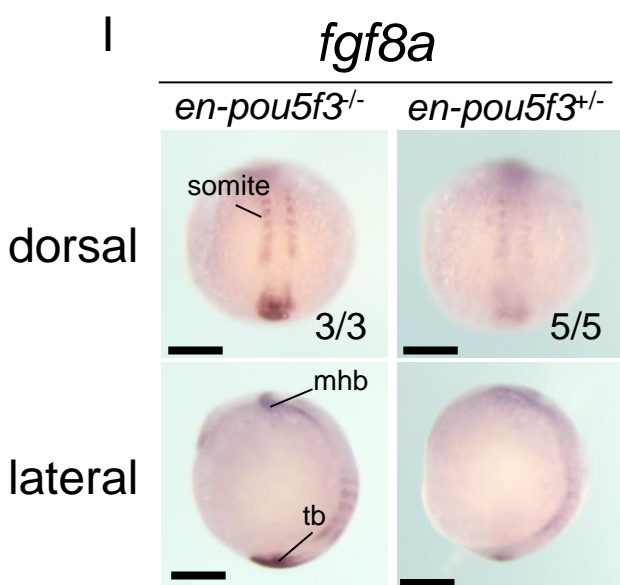
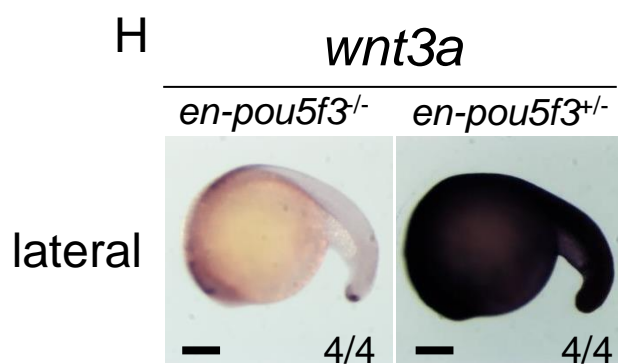
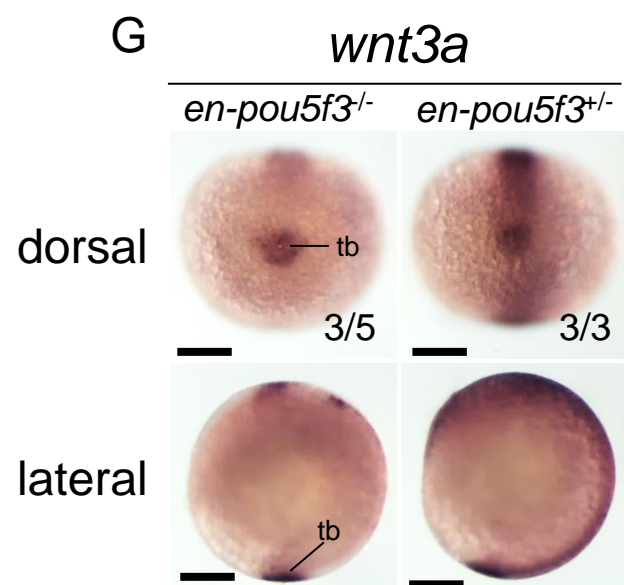


Figure 11

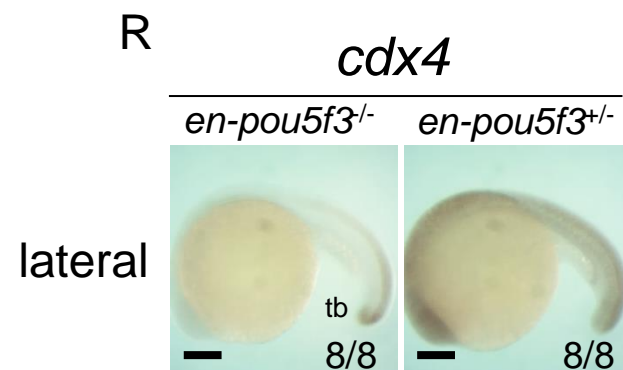
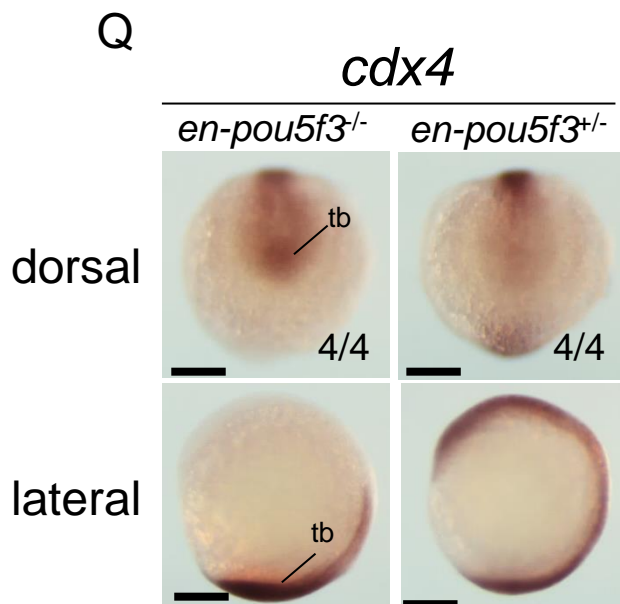
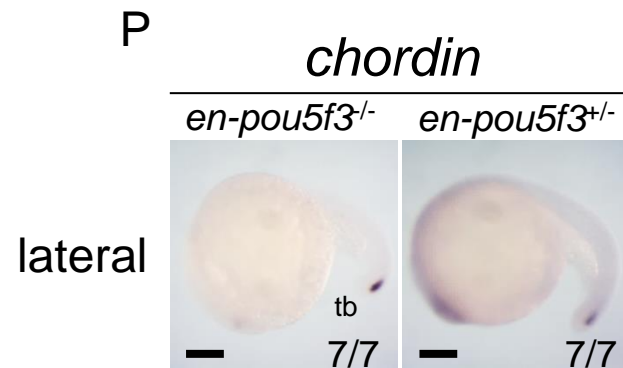
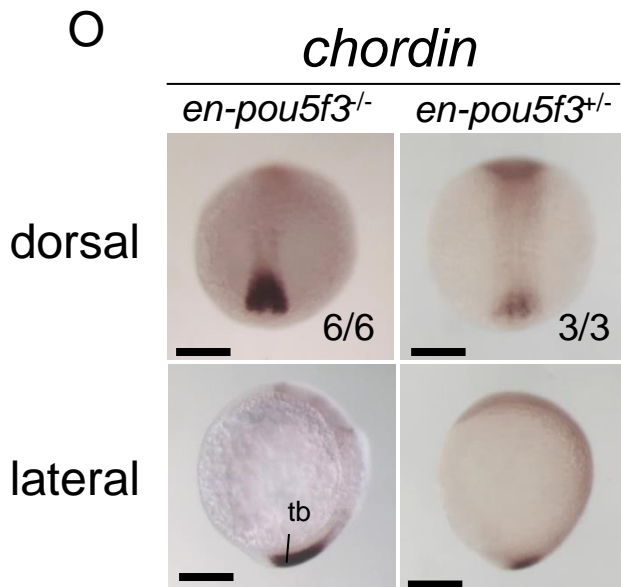
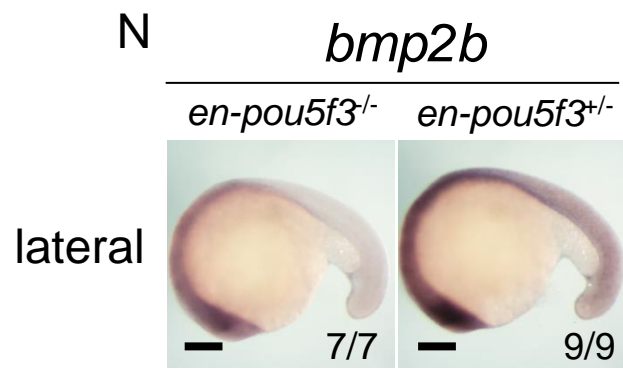
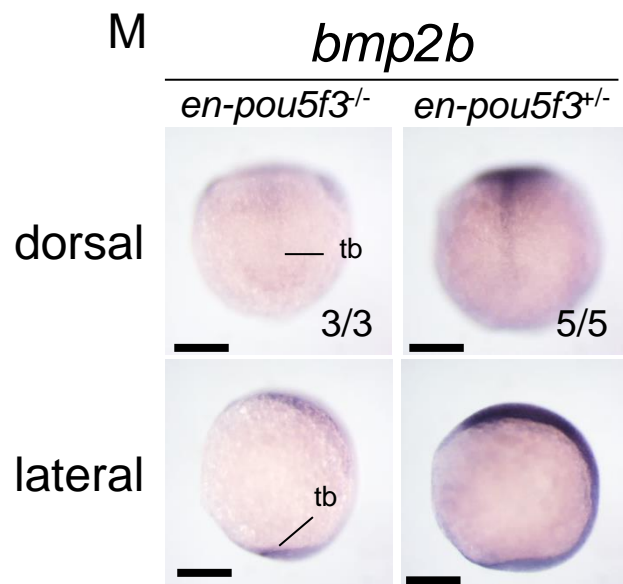
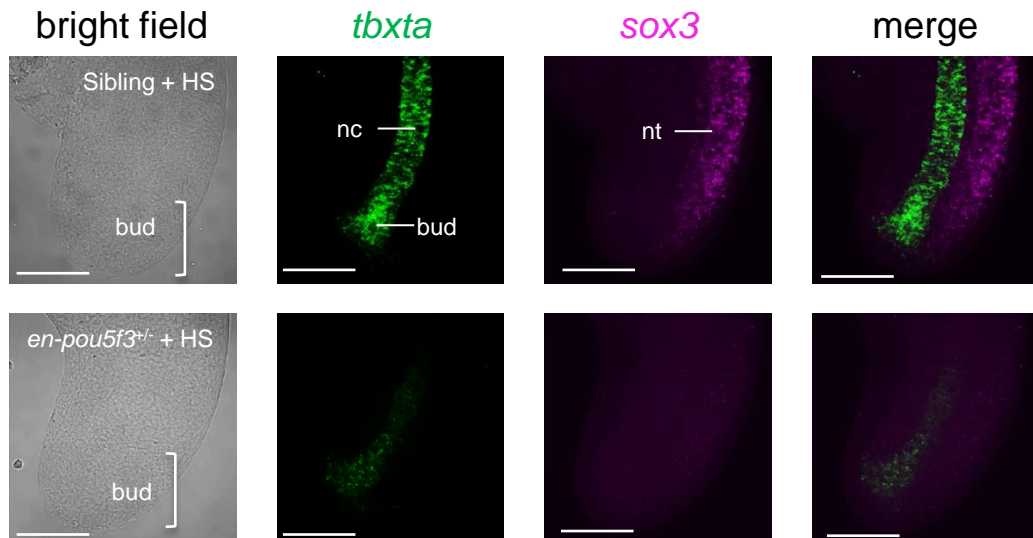


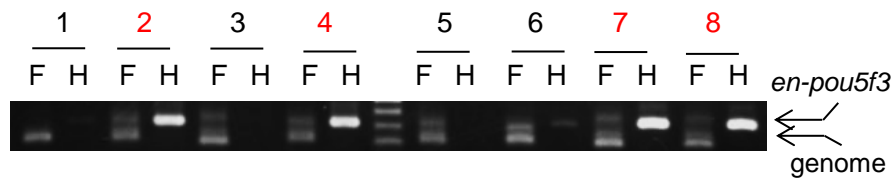
Figure 11



A



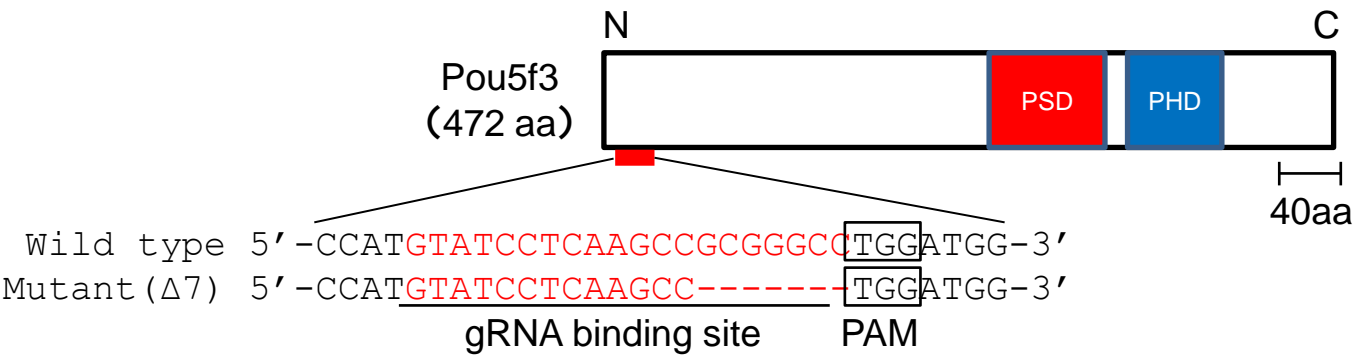
B



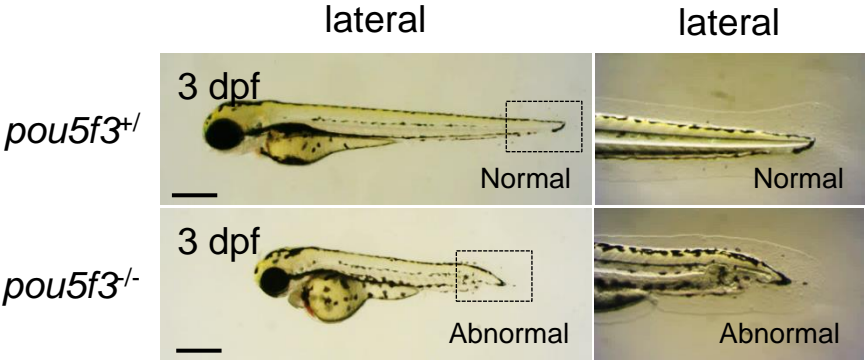
1, 3, 5, 6: normal expression embryo  
 2, 4, 7, 8: expression decreased embryo

Figure 12

A



B



C

normal embryos

total	<i>pou5f3</i> <sup>+/+</sup>	<i>pou5f3</i> <sup>+/-</sup>	<i>pou5f3</i> <sup>-/-</sup>
8	2	5	1

abnormal embryos

total	<i>pou5f3</i> <sup>+/+</sup>	<i>pou5f3</i> <sup>+/-</sup>	<i>pou5f3</i> <sup>-/-</sup>
8	0	0	8

Figure 13

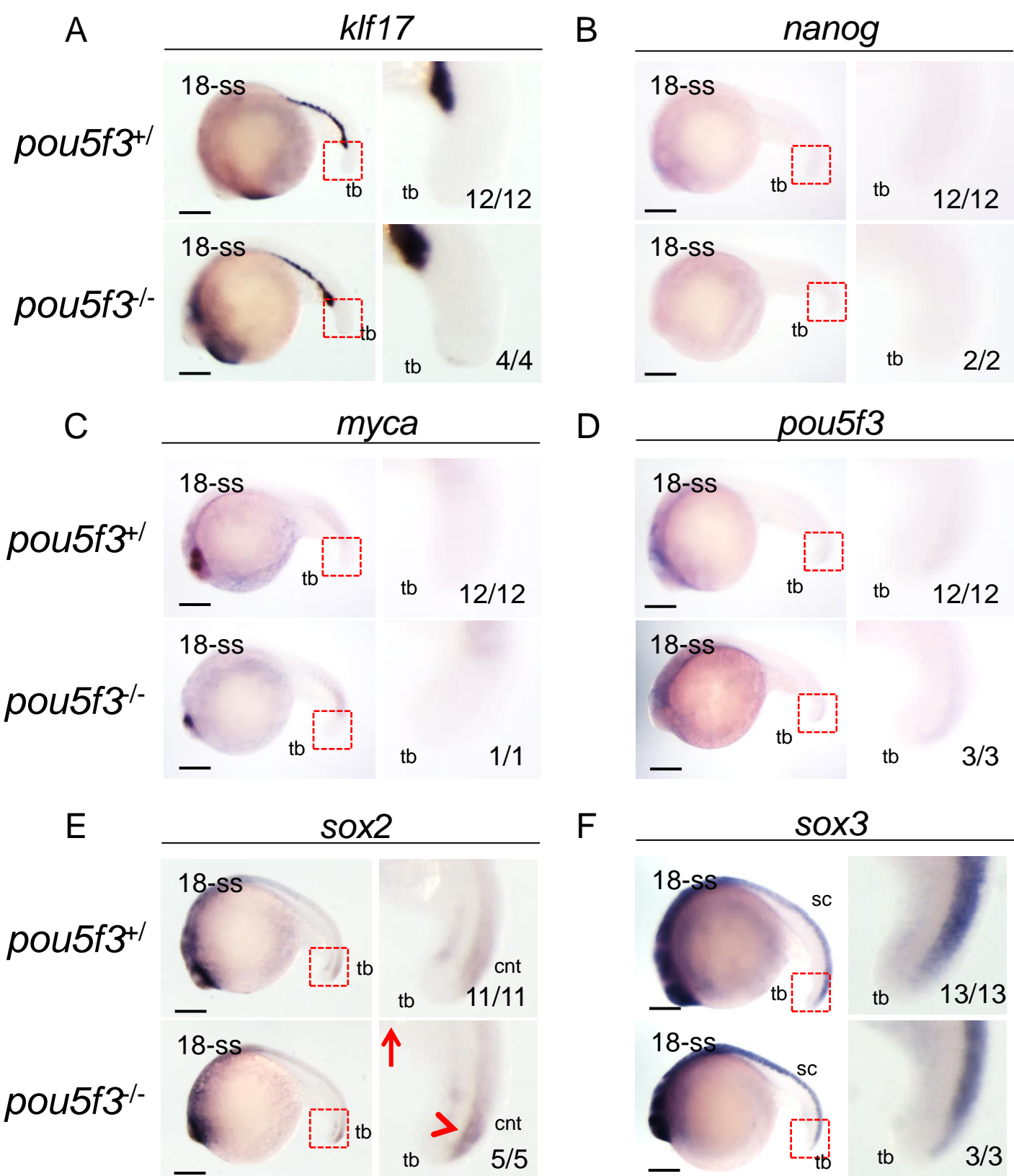


Figure 14

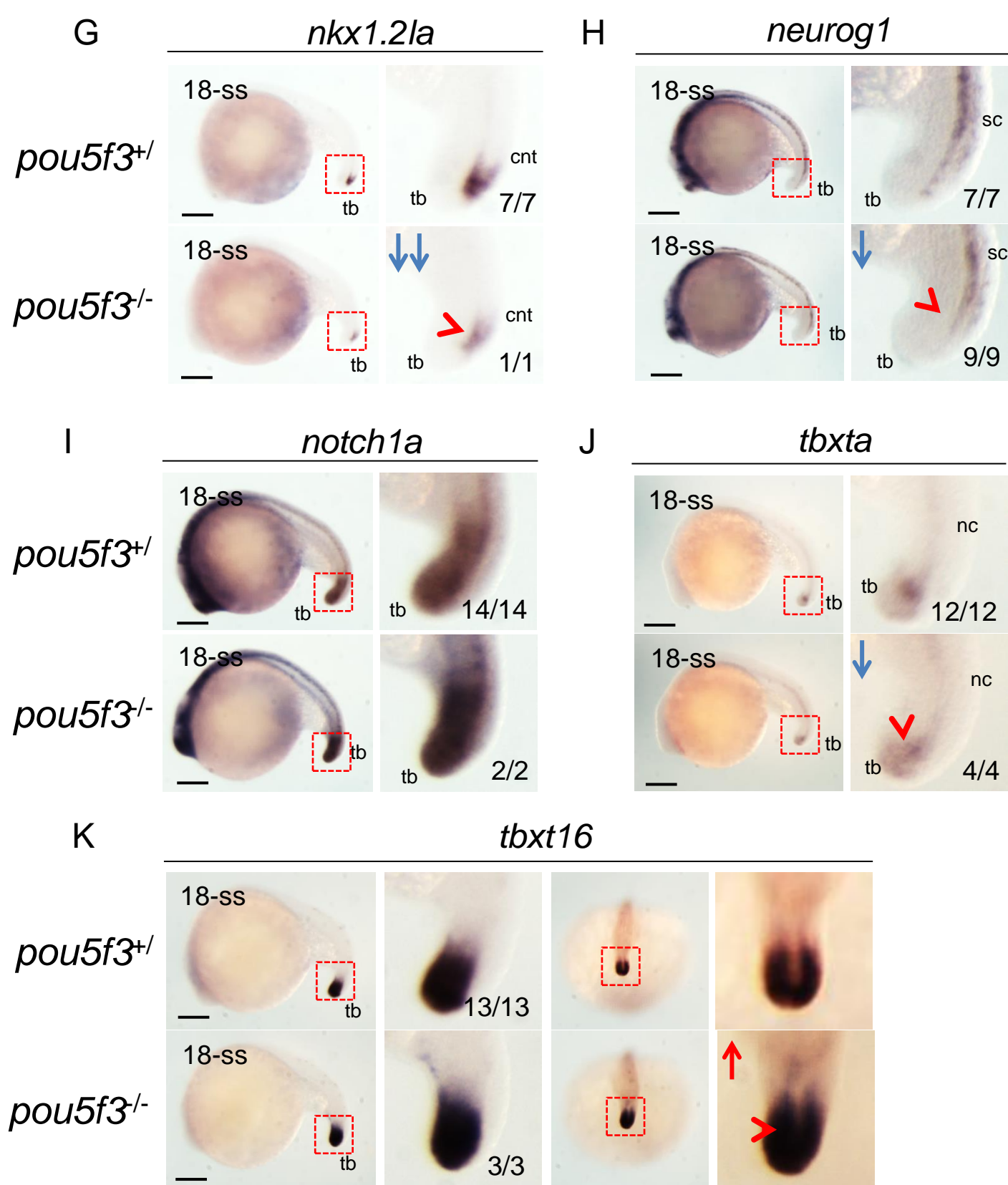


Figure 14

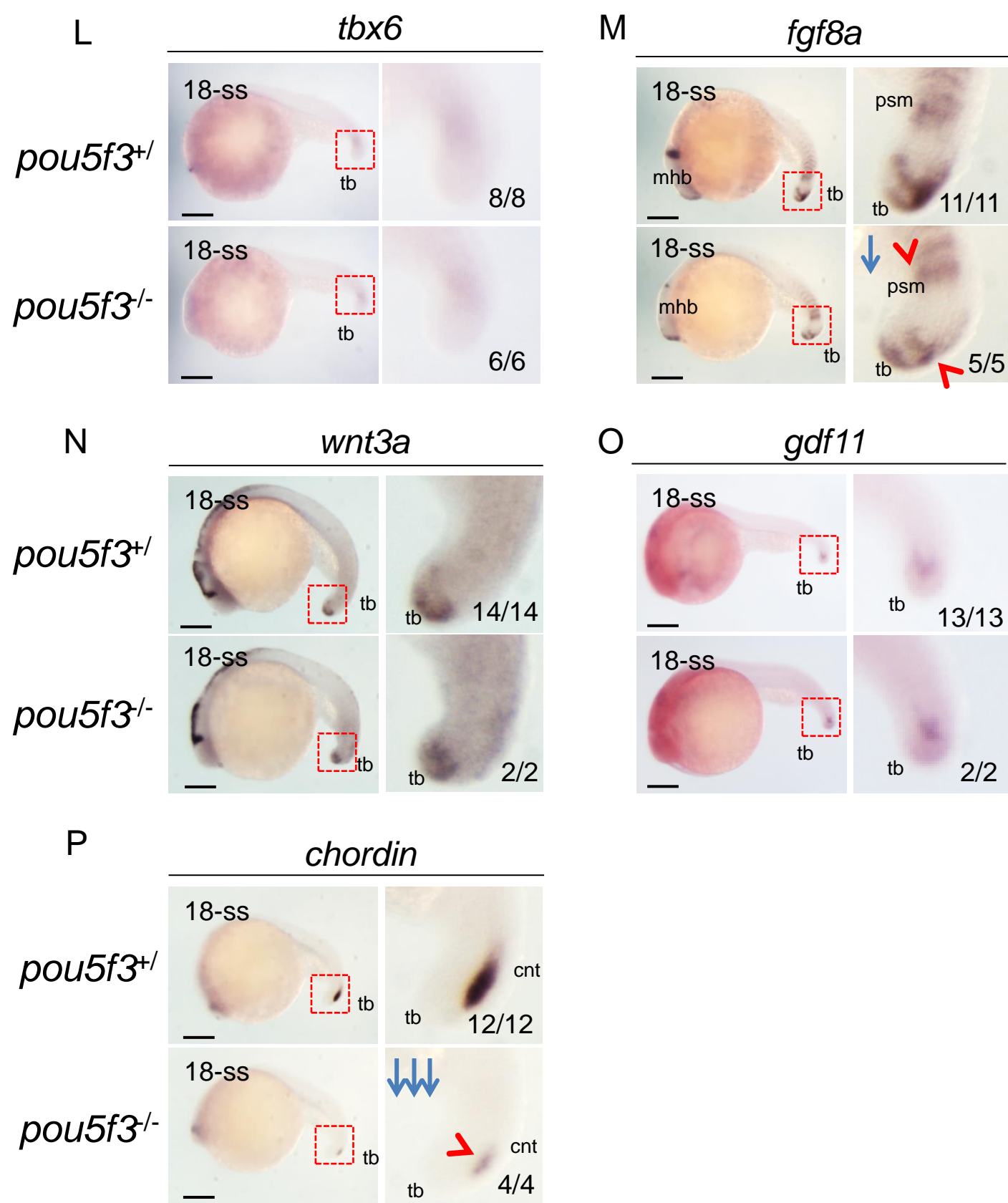


Figure 14

A

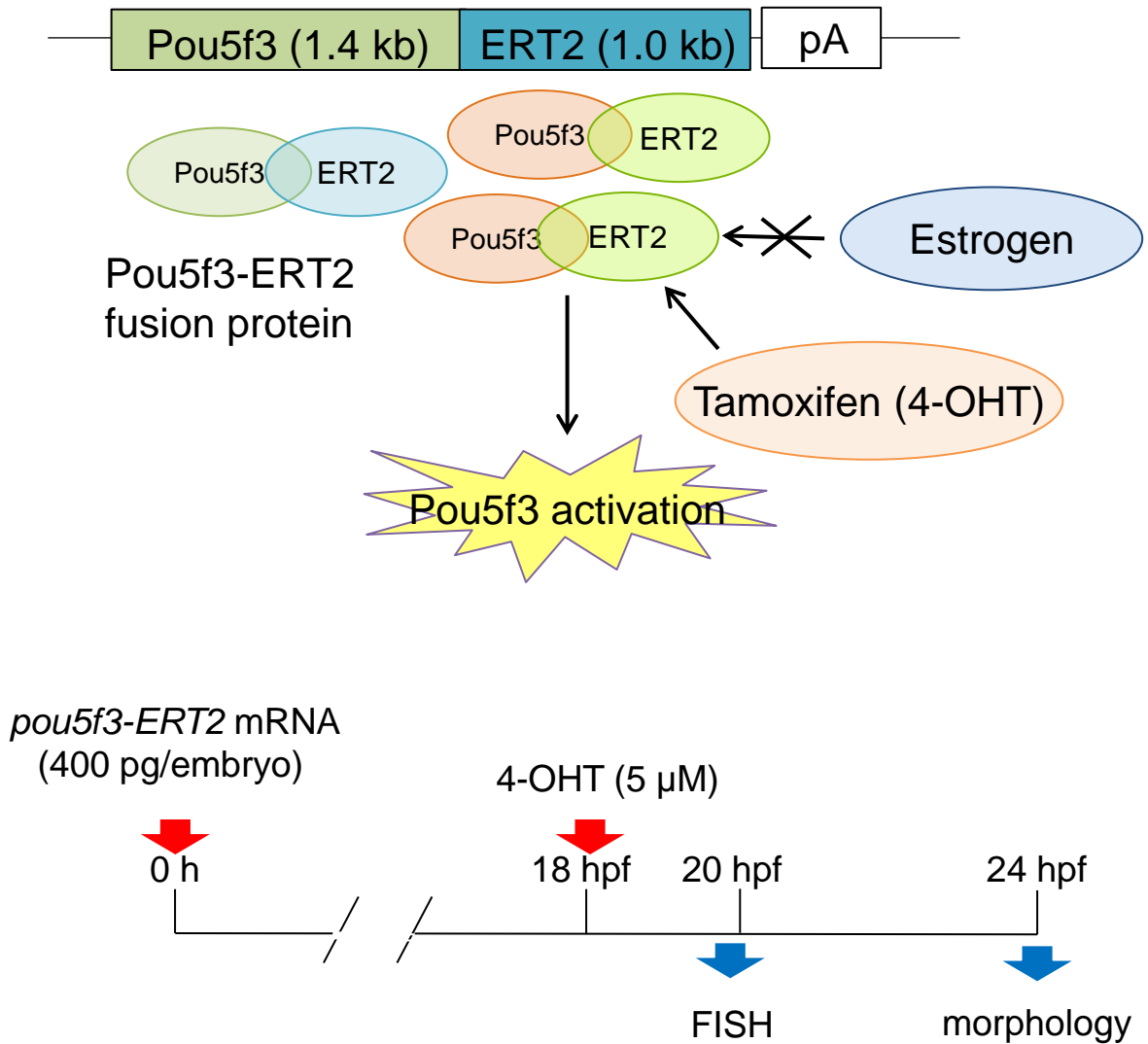
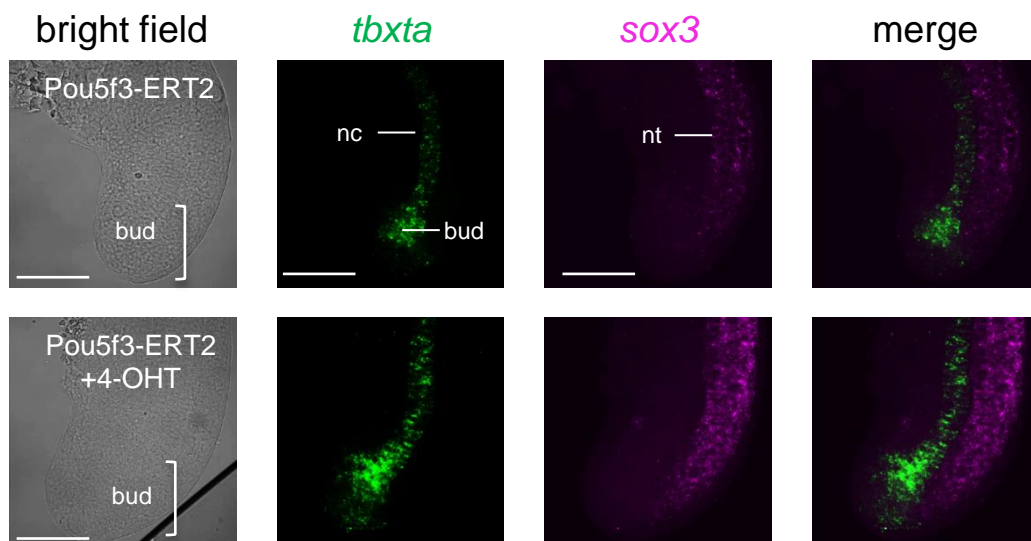


Figure 15

B



C

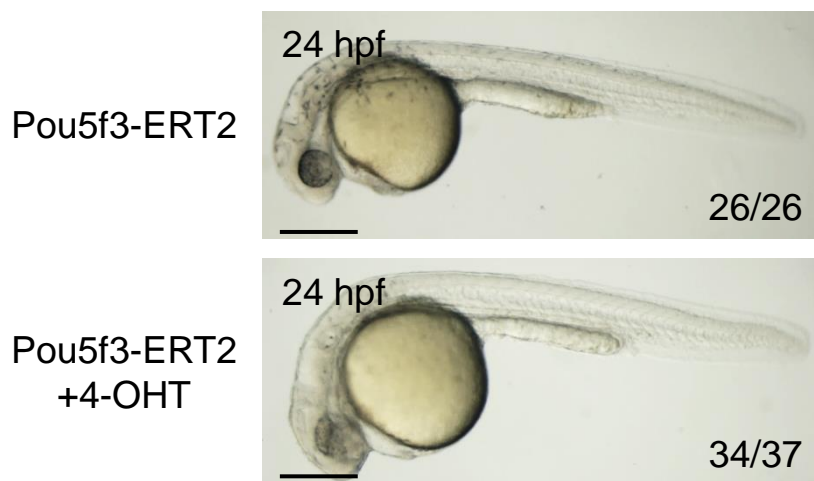


Figure 15



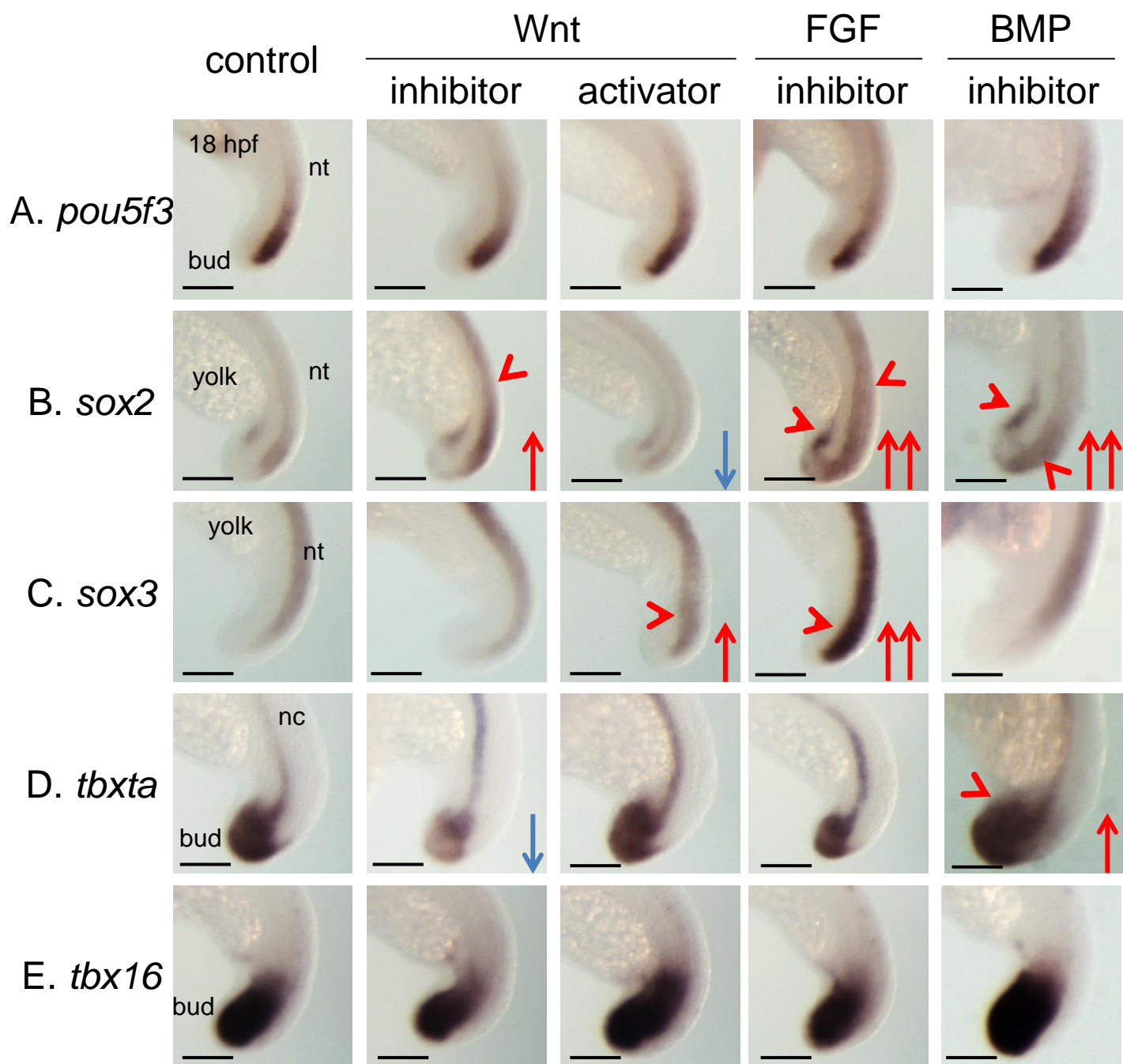


Figure 16



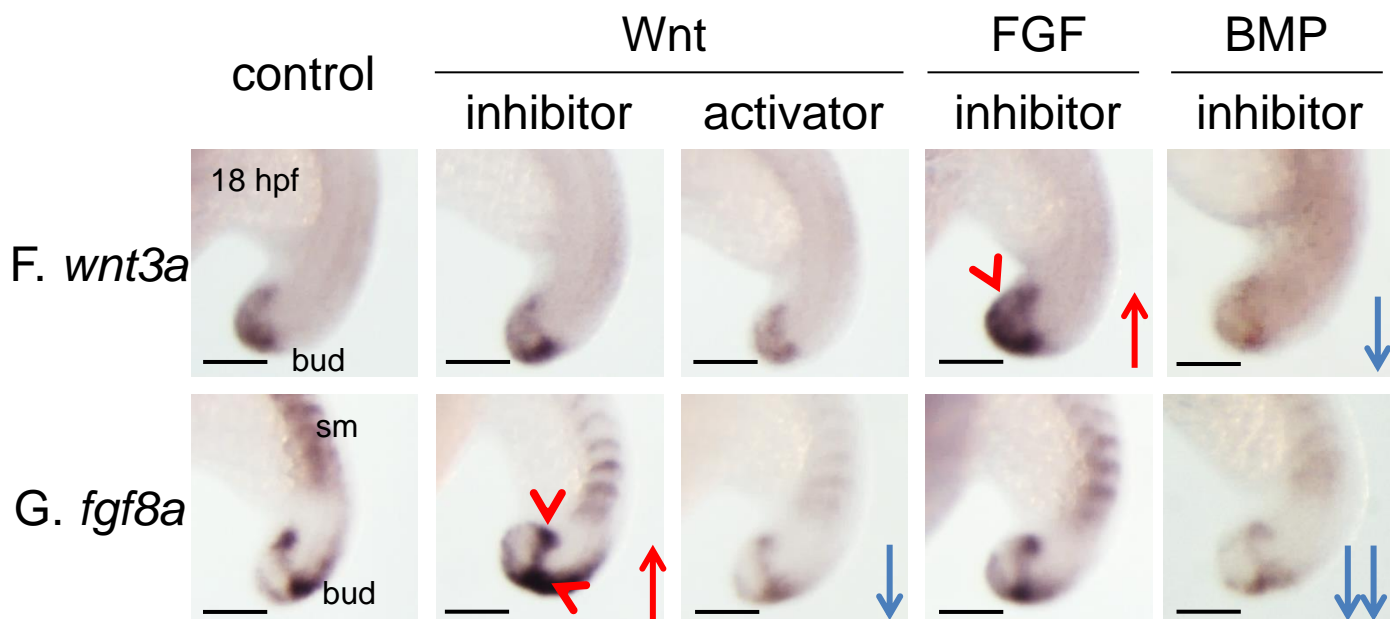


Figure 16

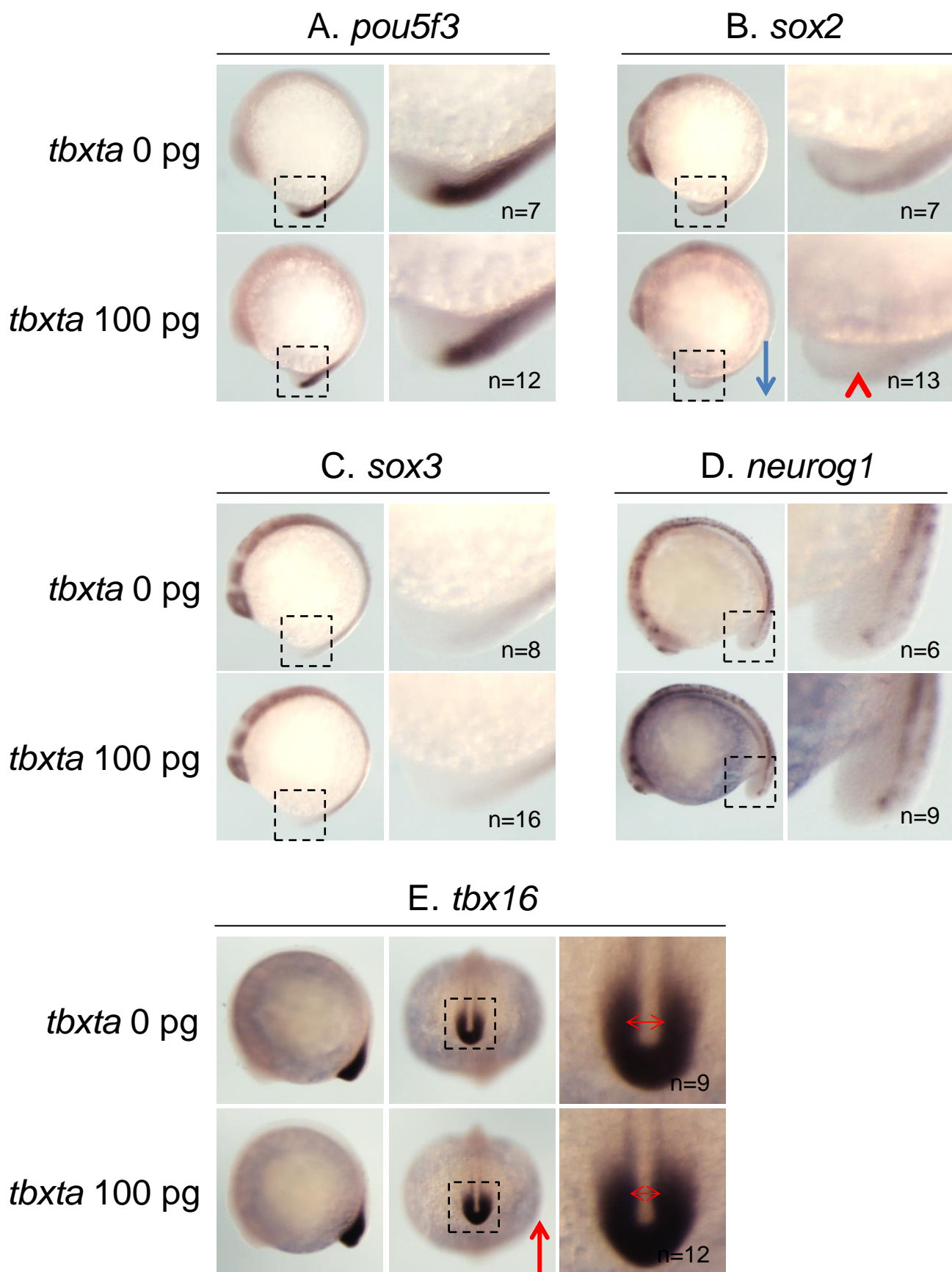
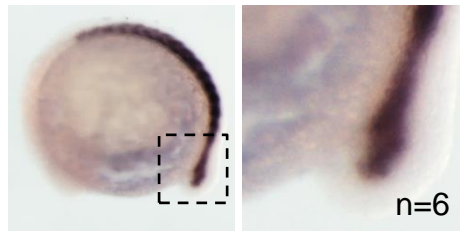


Figure 17

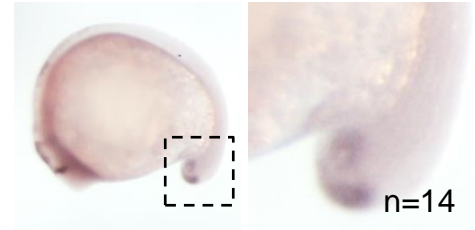
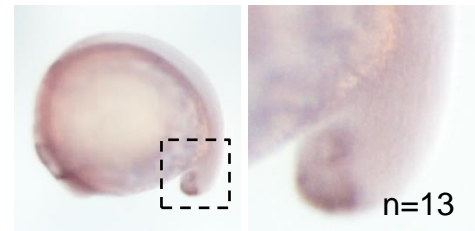
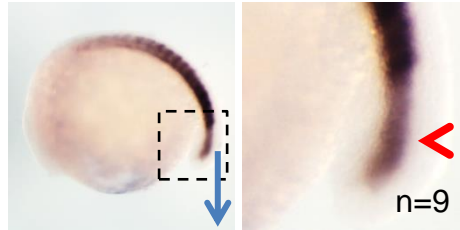
*F. myod*

*G. wnt3a*

*tbxta* 0 pg

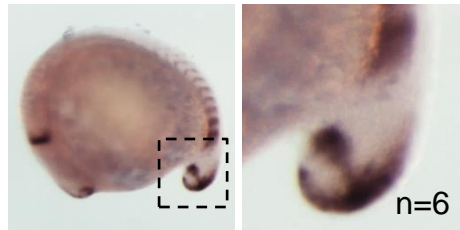


*tbxta* 100 pg



*H. fgf8a*

*tbxta* 0 pg



*tbxta* 100 pg

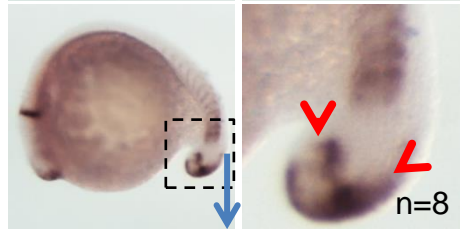
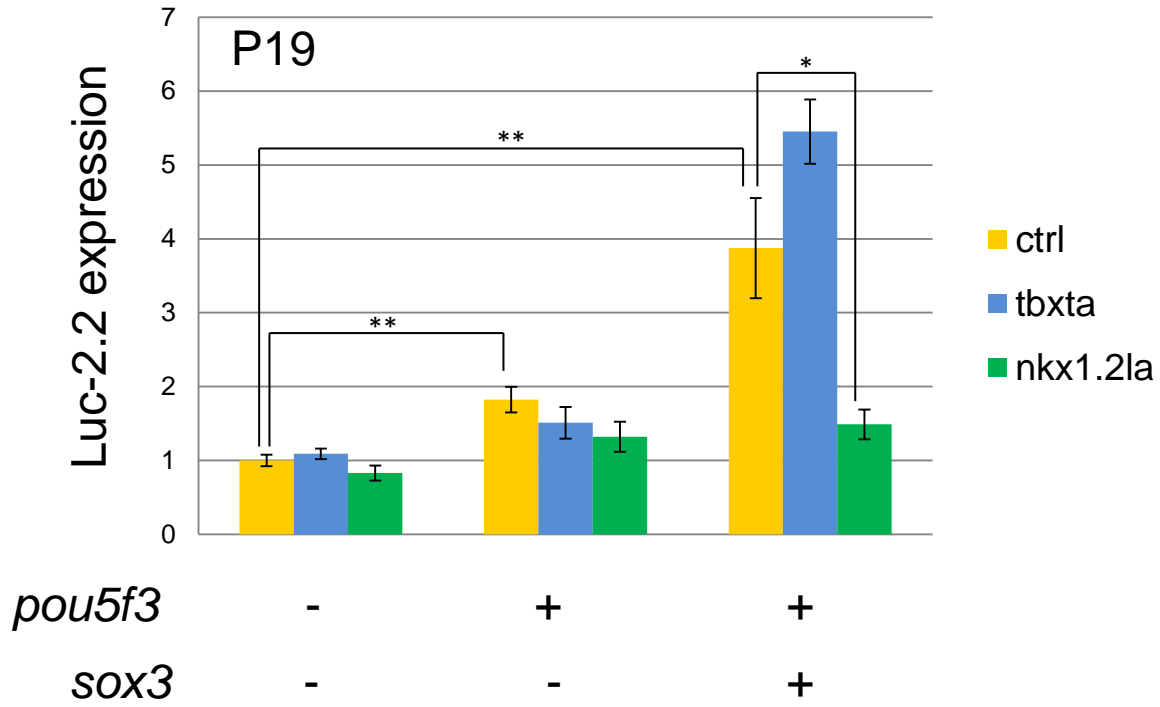


Figure 17

A



B

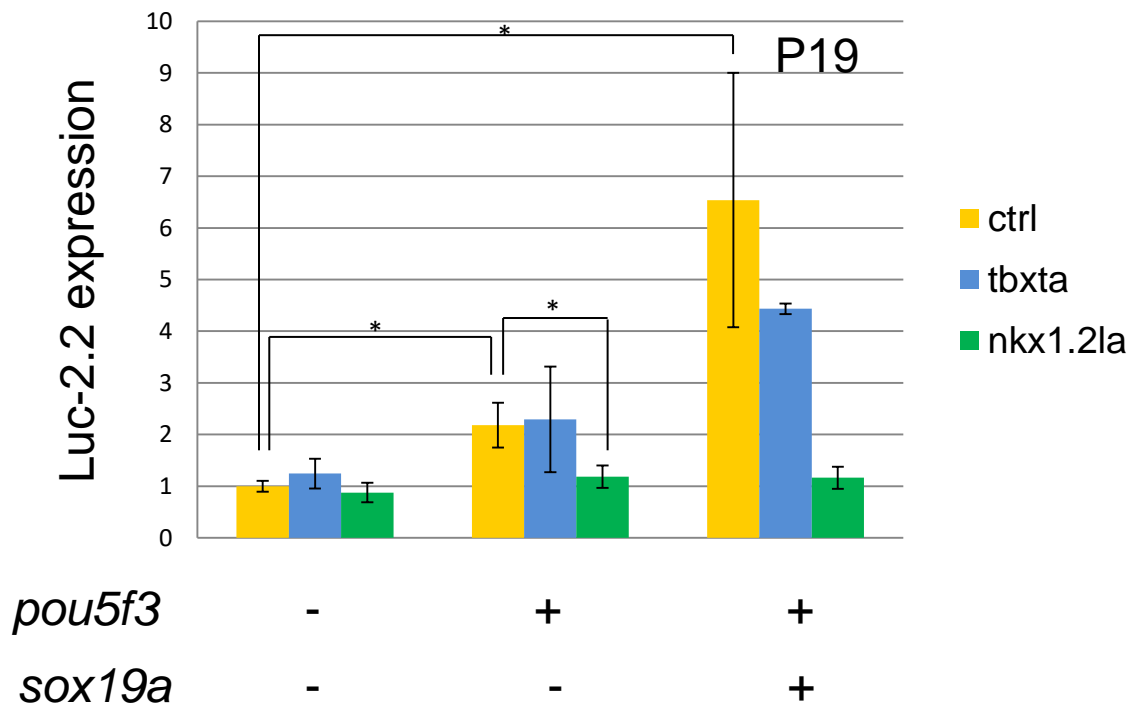


Figure 18

C

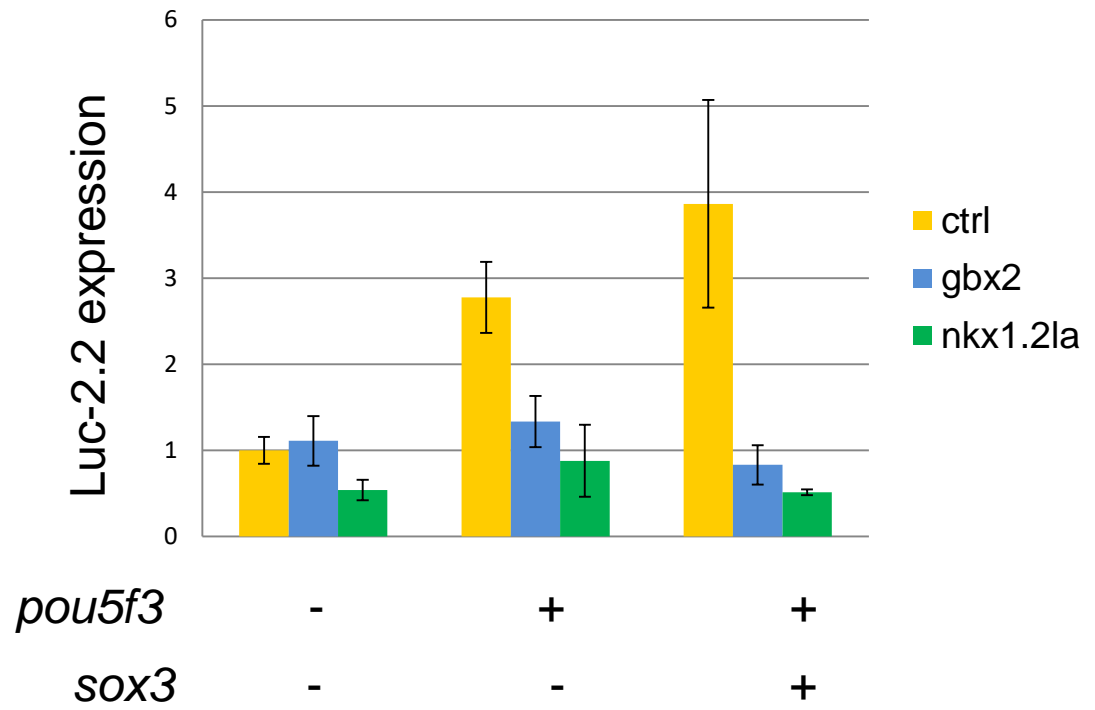
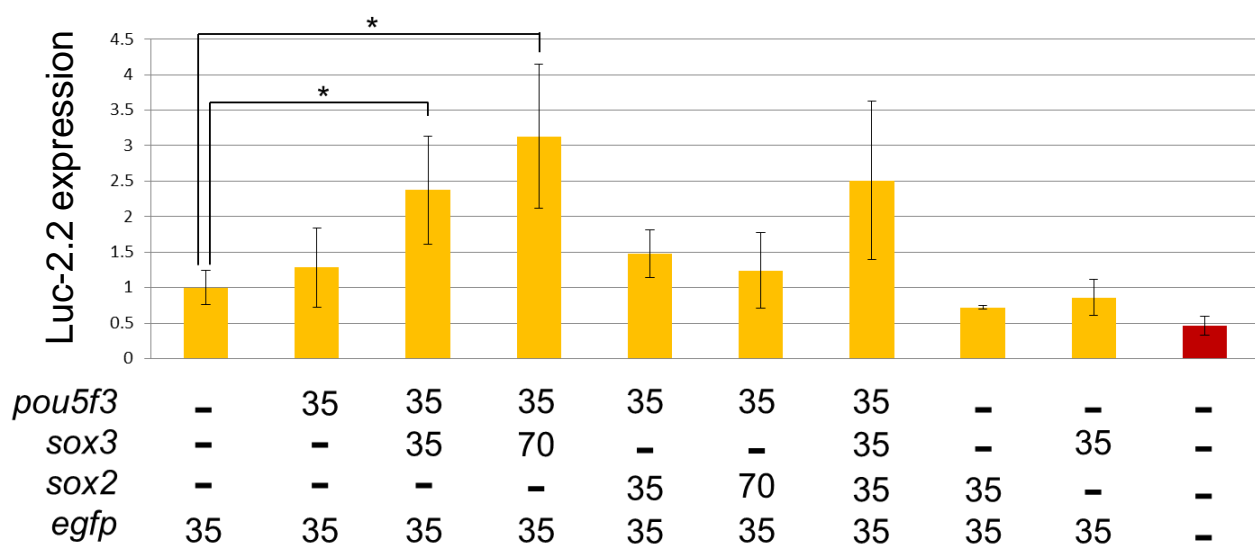


Figure 18

A



B

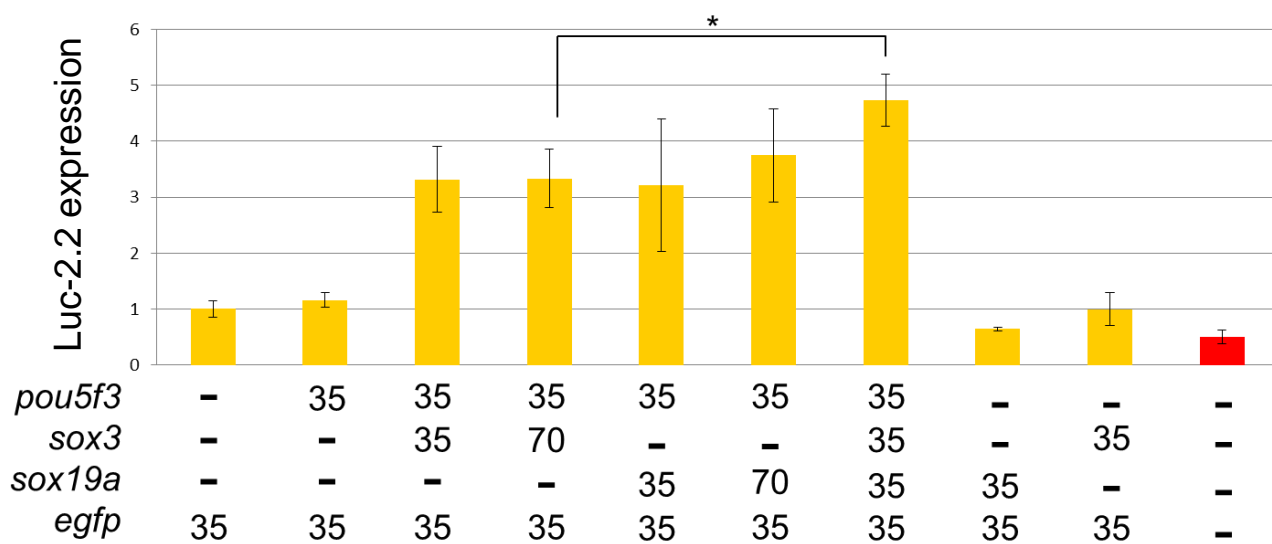
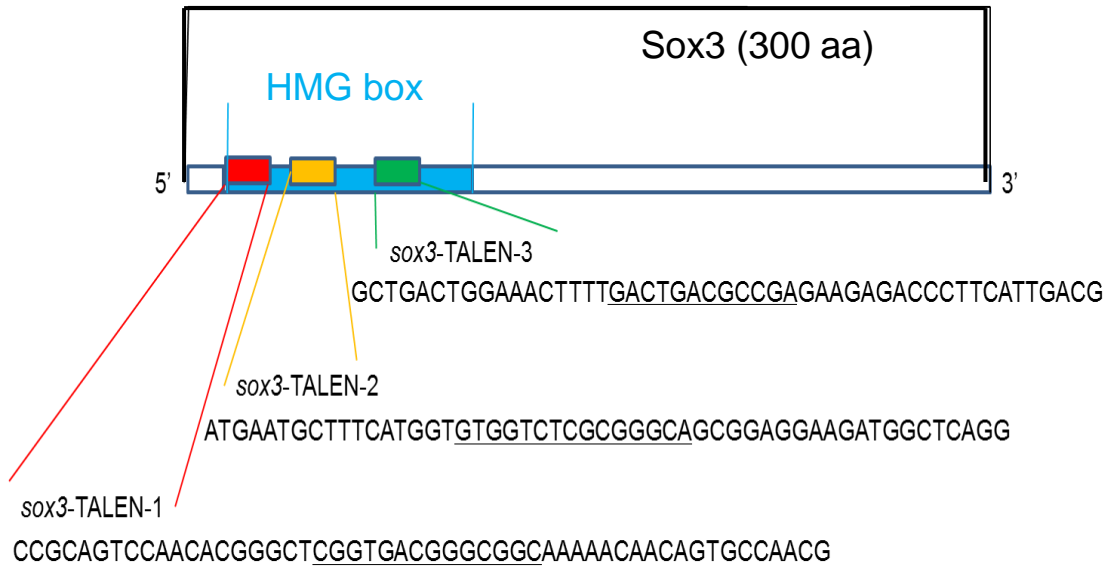


Figure 19

A



B

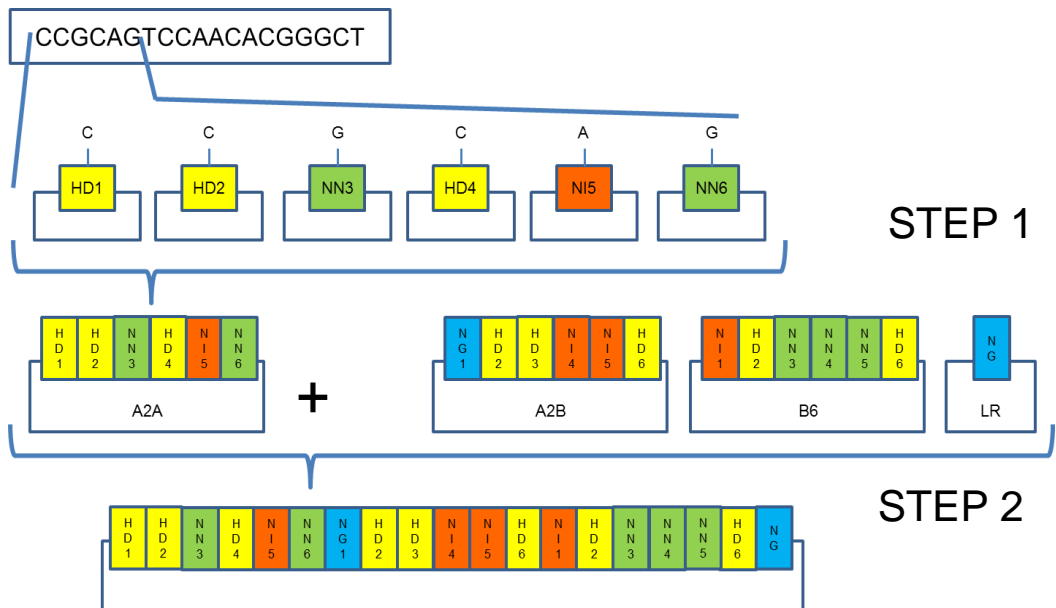
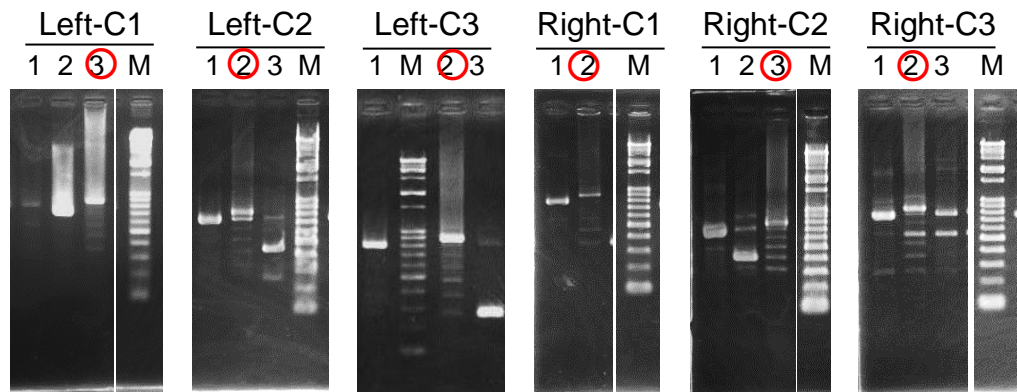
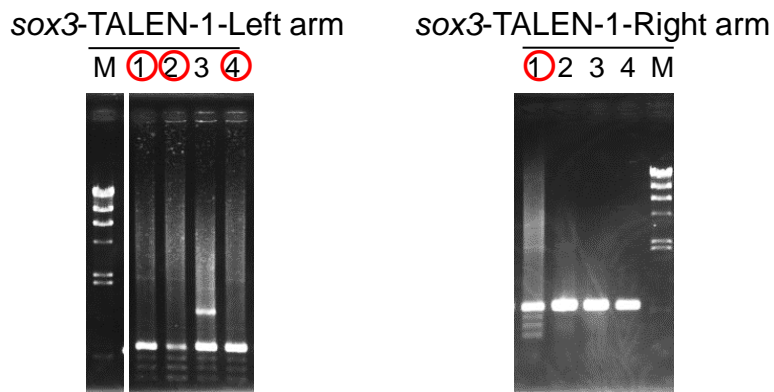


Figure 20

A



B



C

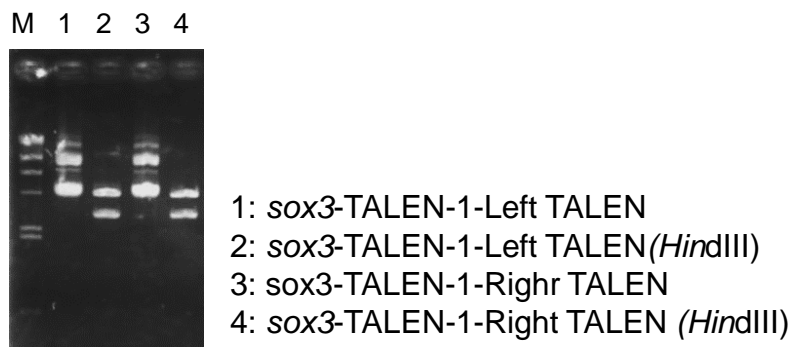


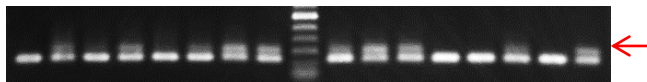
Figure 21



D

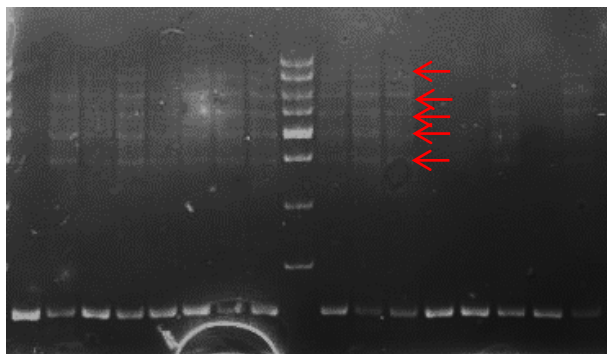
2% Agarose/TBEゲル

cont 1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12 13 14 15



15% polyacrylamideゲル

cont 1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12 13 14 15



E

M C 1 2 ③ 4 5 ⑥



1-6: G<sub>1</sub> embryo  
c: control embryo

F

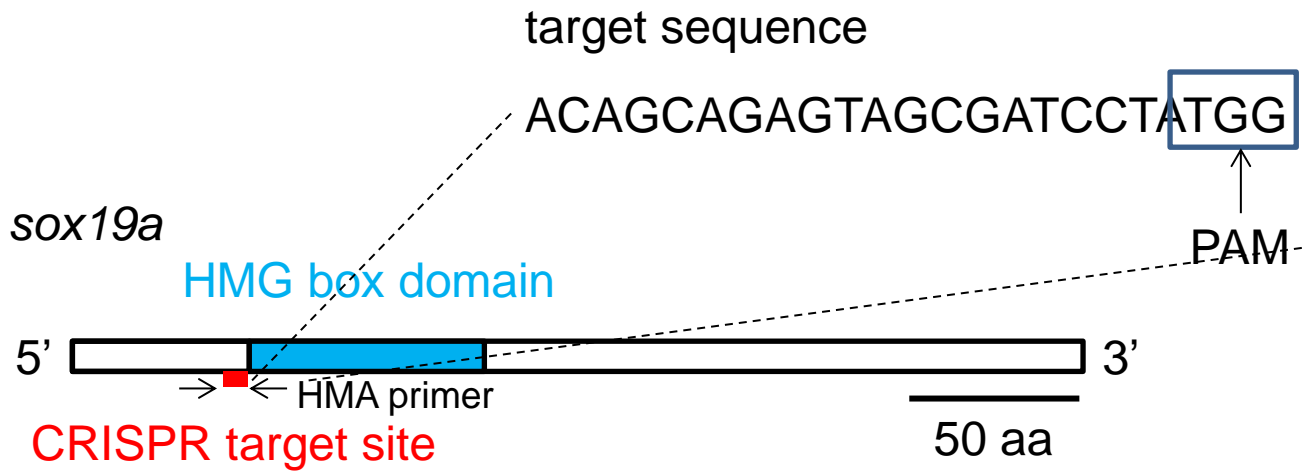
TALEN binding site

TALEN binding site

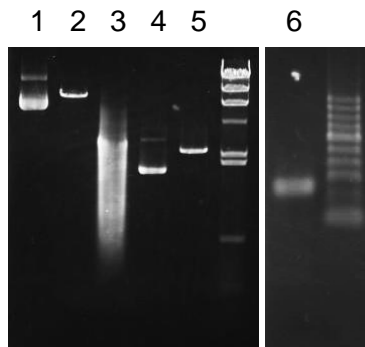
WT 5' CCGCAGTCCAACACGGGGCTCGGTGACGGGCGGC AAAAACAACAGTGCCAACG 3'  
mutant: 5' CCGCAGTCCAACACGGGGCTCGG-----CGGC AAAAACAACAGTGCCAACG 3'  
7 bp deletion

Figure 21

A



B



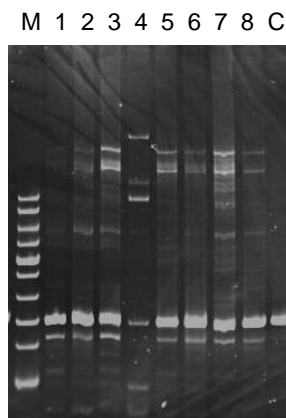
1% Agarose/TAE gel

- 1: Cas9 plasmid
- 2: Cas9 plasmid (*NotI*)
- 3: Cas9 mRNA (SP6)
- 4: CRISPR-*sox19a-2*-pT7-gRNA plasmid
- 5: CRISPR-*sox19a-2*-pT7-gRNA plasmid (*Bam*HI)

2% Agarose/TBE gel

- 6: CRISPR-*sox19a-2*-pT7-gRNA (T7)

C



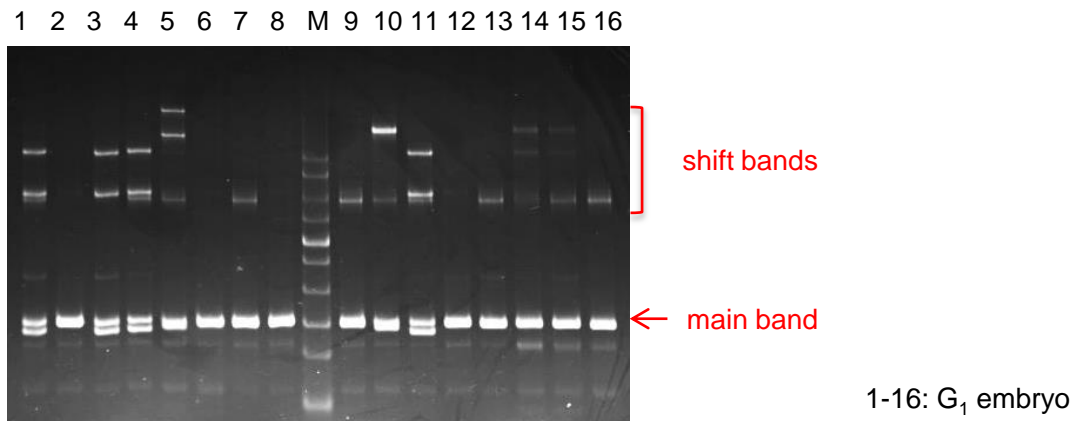
shift bands

main band

- 1-7: G<sub>0</sub> embryo
- c: control embryo

Figure 22

D



E

### CRISPR target site

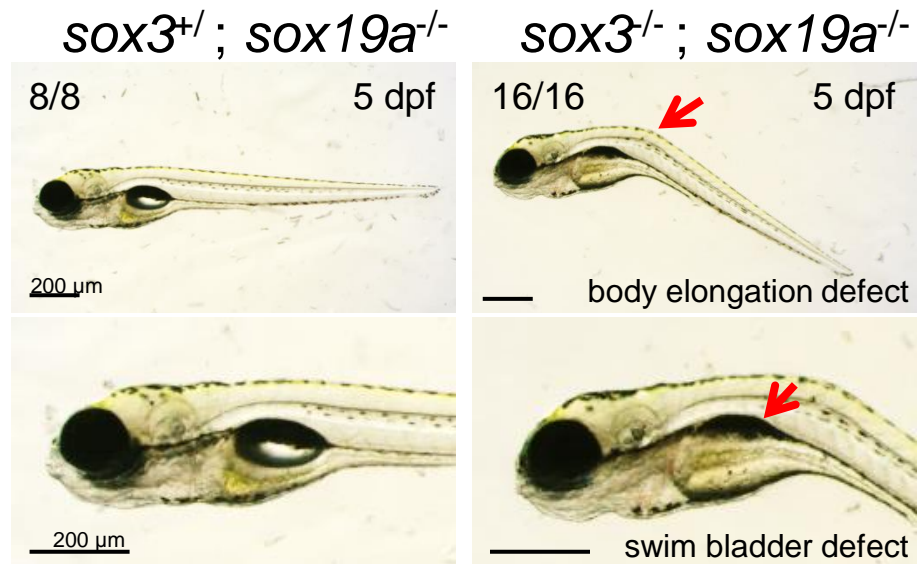
WT: 5'-CAACAACAGCAGAGTAGCGATCCTATGGACAAAGTTAAGAG-3'

5'-CAACAACAGCAGAG-----GACAAAGTTAAGAG-3'

5'-CAACAACAGC-----TATGGACAAAGTTAAGAG-3'

Figure 22

A



B

Normal

Genotype	sox3			Total
	+/+	+/-	-/-	
sox19a <sup>-/-</sup>	12.5%	87.5%	0%	8

Abnormal

Genotype	sox3			Total
	+/+	+/-	-/-	
sox19a <sup>-/-</sup>	0%	0%	100%	16

Figure 23



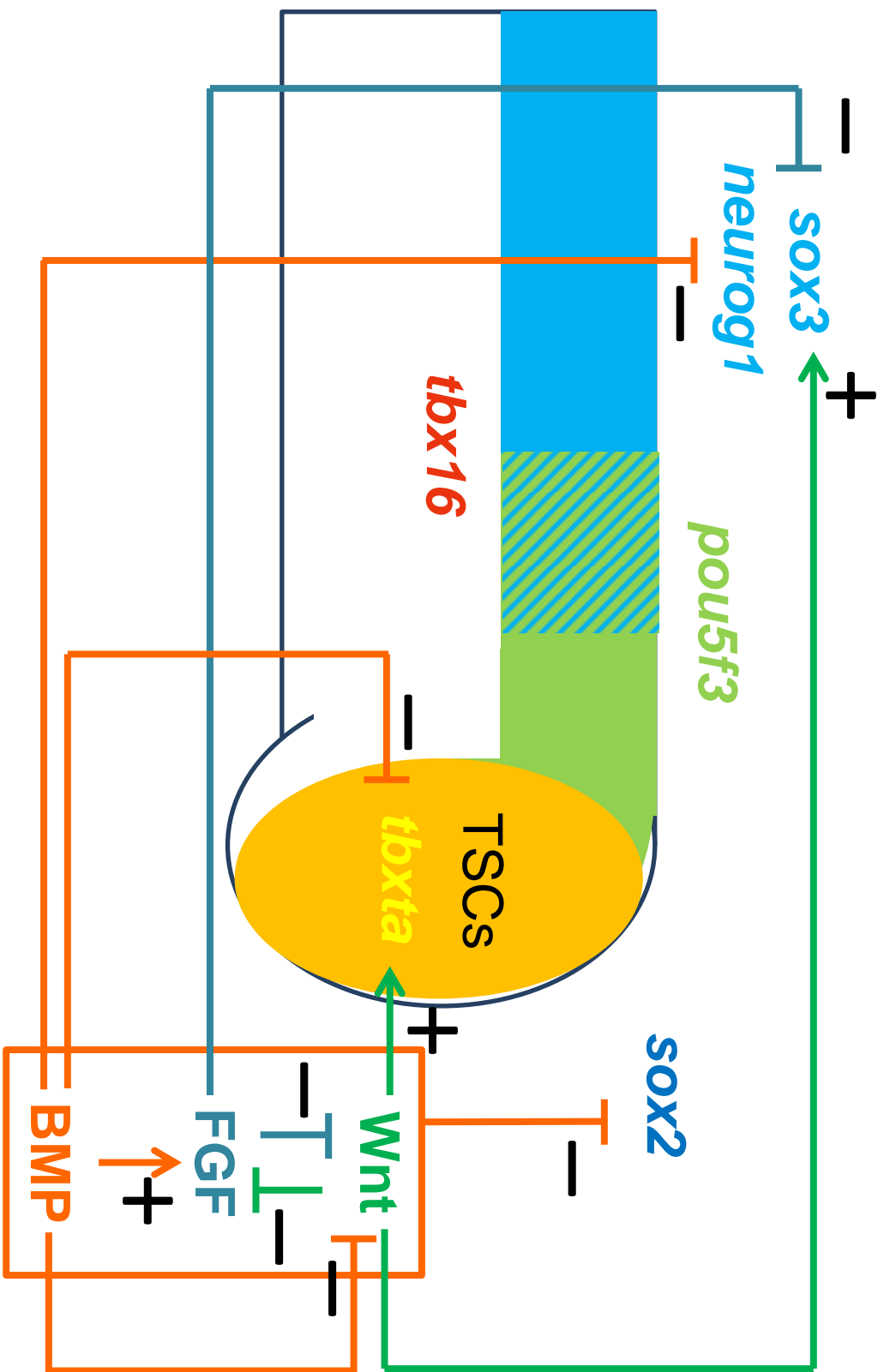


Figure 25