

## 細胞系譜マッピングによる哺乳類の胚軸形成機構の解析

藤森 俊彦

京都大学大学院医学研究科

### 研究のねらい

我々動物の体は3次元の構築物で、その中に前後、左右、背腹といった「軸」を想定することができる。動物は、球状の受精卵から細胞分裂を繰り返しながら発生をすすめ、やがて形態的に明瞭な軸を作り上げる。私は、ほ乳類の初期胚において、どのように体軸が形成されるかに興味を持っている。マウスでは、受精後6.5日目には将来の体の前後が形態的に明らかになる。受精から約1週の間どんなメカニズムで体の軸が決められるかについては、多くが未解明である。本研究では、細胞の振る舞いを解析することによって、どのようにして胚の中に偏りができ、将来の体軸が決まるかを明らかにすることを目標としている。また、ほ乳類胚は非常に高い調節能を有しているが、正常発生でどれくらい決まったパターンで発生が進むか、調節能を利用しているかについても知りたい。

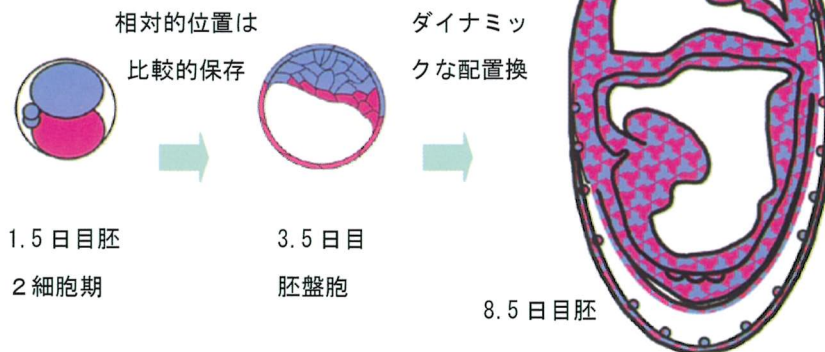
### 研究の成果と考察

2つの手法により、受精後から順にマウス胚における細胞の挙動を解析した。

#### 1) Cre-loxP システムを応用した細胞の標識と追跡

トランスジェニックマウス CAG-CAT-Z は、強力なプロモーターの下流に両側を loxP 配列で囲まれた CAT 遺伝子と  $\beta$  gal 遺伝子を持つ。Cre 発現ベクターを核内に注入して特定の細胞で Cre レコンビナーゼによる組み換えをおこすと、ゲノム DNA 上の2つの loxP 配列に囲まれた CAT 遺伝子を不可逆的に取り除き、その細胞に由来する細胞群で  $\beta$  gal の発現を誘導できる。この系を利用して、2細胞期、4細胞期の一つの割球（細胞）をランダムに選んで標識した後、体軸が明瞭な8.5日目まで発生させ、X-gal 染色し解析した。2細胞期の一つの割球に由来する細胞は、解析した全ての細胞層においてもう一つの割球の子孫と混在していた。4細胞期に標識した結果、3つの存在様式がみられた。第1に、2細胞期に標識した場合と同様にすべての胚葉においてランダムに標識細胞が存在、第2に胚体外外胚葉のみに標識細胞が存在、第3に胚体外外胚葉以外の細胞層にのみ標識細胞が存在するものであった。これらの結果から、2細胞期の2つの割球間には将来の発生運命に関して明確な差は存在しないこと、4細胞期以降に胚体外外胚葉と、それ以外の組織への将来の運命の方向付けが始まることが示唆された。また、標識細胞が非標識細胞と混在していることから、胚の中でダイナミックな細胞の配置換えがおこることが明らかになった。着床前の胚盤胞では、標識細胞は胚の中でまとまって存在しているこ

## マウス初期胚における細胞の 相対的位置関係の変化



とから、細胞の配置換えは着床後におこることがわかった(右の図参照)。

2) 3次元タイムラプス顕微鏡を用いた細胞の挙動の解析  
特定の細胞を標識し、その子孫の挙動を解析する方法では、発生が進んで胚の中の細胞数が増えると標識

が困難、途中の細胞の動きが解析できない等の欠点がある。そこで、細胞の分裂、移動などを連続的に観察するため方法を開発した。細胞を可視化する為胚のすべての核をGFPで標識するトランスジェニックマウスを作製し、その胚を培養して発生させ、3次元タイムラプス顕微鏡を用いて細胞の挙動を観察するシステムを用いている。着床後の体軸が明らかになるまでの段階に関しては現在条件を改良中であり、今後解析する予定である。着床時期以前の胚について、第一卵割面と、胚盤胞での胚自身に寄与するICMのある側と無い側の軸(Em-Ab軸)との関係、第二卵割の順とICMに寄与する割球との関係を調べた。その結果、第一卵割面とEm-Ab軸に関しては相関が見られた。ICM側に寄与する割球に関しては、第二卵割の際に先に分裂する割球と、あとから分裂する割球のどちらもがほぼ同数であった。

以上の結果から明らかにできたことは、よく知られているカエルの例などとは異なり、マウスにおいては2細胞期の2つの割球間には将来の発生運命や体軸に関して性質の差がないということである。

これまでに開発してきた技術は、マウス個体の中での細胞の挙動を詳細に検討するのに大変有用なシステムであり、他のステージにも応用することができる。今後は更に研究を進展させ、着床後体軸が決まる時期に至るまで、胚の中での細胞の動きを追跡し、マウスの初期胚における細胞の挙動を全て把握したい。これにより、軸を方向づける最初のイベントを解明できると考えている。

### 主な論文

Toshihiko Fujimori, Yoko Kurotaki, Jun-ichi Miyazaki and Yo-ichi Nabeshima.  
Analysis of cell lineage in two- and four-cell mouse embryos.  
*Development* 130, 5113-5122 (2003).

藤森俊彦 動物発生工学 発生プログラム、p50-69、朝倉書店 (2002)