

2008年9月5日

独立行政法人 理化学研究所

脳を一定の大きさに発生させる自動調節機構を解明

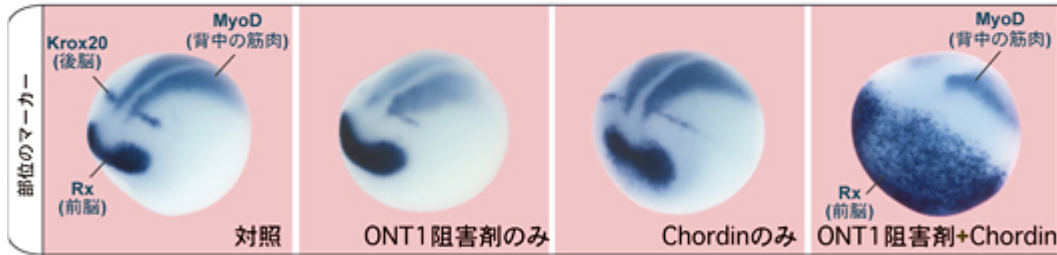
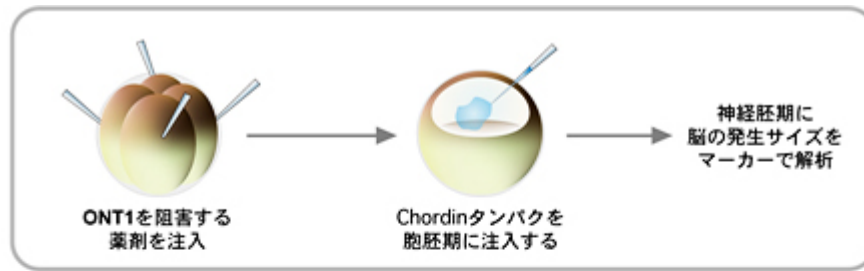
- 臓器のサイズを制御するメカニズムの発見 -

生物は1つの受精卵が繰り返し分裂し、細胞を増やしながら多様で多彩な細胞・組織を形成していきます。さらに組織は、脳をはじめとする高度な機能を持ったさまざまな器官へと発生、生命を獲得していきます。

その発生過程で、脳や心臓などの主要な臓器の大きさは、環境の影響を受けず、ほぼ一定に発生し、個体差はわずかです。例えば哺乳類の場合、胎児の環境の条件は母親の栄養状態や発熱などで変わりますが、胚や胎児であれば、多くの場合、個々の器官や前駆組織のサイズはほぼ一定になることが知られています。これは、発生学の歴史の中でも大きな謎の1つとなっています。

発生・再生科学総合研究センター細胞分化・器官発生研究グループは、脊椎動物の初期胚が、常に一定の大きさに脳組織を発生させる機構を明らかにし、この謎に1つの答えを示しました。その機構とは、脳の発生を促進する神経誘導因子「コーディン」の量を、新規の分泌タンパク質「ONT1」が自動的に調整し、神経誘導の活性が一定に保たれるというものです。アフリカツメガエルを使った研究で「ONT1」の機能を消失させると、胚の中の脳組織の量が不安定になり、コーディンが少しでも多く働くと、巨大化した脳が発生することがわかりました。

発生学の謎を解いた今回の発見は、次世代の再生医学に必須である、ES細胞などから正しいサイズ・形の組織・臓器を誘導する技術開発に大きく貢献すると期待されます。



ONT1が働かないと、神経誘導因子Chordinの少しの量の変化で脳の発生量が大きく変化してしまう(量的頑強性の破綻)

この実験では、Chordinの微量注入で、前脳(大脳や間脳)が巨大化(匹の半分)までしている

図 ONT1 が、脳発生の量的頑強性（発生量の一定化）に必須な実験結果

2008年9月5日
独立行政法人 理化学研究所

脳を一定の大きさに発生させる自動調節機構を解明

- 臓器のサイズを制御するメカニズムの発見 -

◇ポイント◇

- ・発生司令塔による脳組織の分化誘導を量的に制御する分子機構が存在
- ・脳発生の神経誘導因子を分解調整するフィードバック因子「ONT1」を発見
- ・脳の発生サイズがなぜ常に一定になるのかという長年の謎を解く

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、脊椎動物の初期胚が常に一定の大きさで脳組織を発生させる機構を明らかにしました。脳の発生を促進する神経誘導因子として知られる「Chordin（コーディン）」^{*1}の量を新規のタンパク質因子が自動的に調整し、その因子の作用で神経誘導活性が一定に保たれるというものです。発生・再生科学総合研究センター（竹市雅俊センター長）細胞分化・器官発生研究グループの笹井芳樹グループディレクター、猪股秀彦研究員を中心とした研究グループの成果です。

脊椎動物の発生過程で脳組織は、形成体^{*2}由来の神経誘導因子と呼ばれる分泌性タンパク質の作用により、未分化な胚組織（外胚葉^{*3}組織）から発生します。研究グループは、これまでに神経誘導因子コーディンを発見し、その制御機構を研究してきました。興味深いことに、胚発生過程では、脳発生を制御する条件（例えば、脳の形成体の量など）が大きく変動しても、最終的に発生する脳組織の量は、なぜか常に一定になること（脳発生の量的頑強性：ロバストネス^{*4}）が知られていました。しかし、この脳発生の量的頑強性が、どのように起こるかはこれまで不明でした。

今回、研究グループは、アフリカツメガエルの系を用いた研究で、胚の発生時に、細胞外でコーディンと結合し、その分解を促進する分泌タンパク質「ONT1^{*5}」を同定し、ONT1がコーディンの活性を常に一定に保つためのフィードバック制御^{*6}の因子として機能することを発見しました。ONT1の機能が消失すると、胚の中で脳組織の量の発生制御が不安定になり、コーディンが少し多く働くだけでも巨大化した脳組織が発生することを明らかにしました。

この研究成果は、受精卵が分裂を繰り返すだけで発生が進行する脊椎動物の胚発生の過程で、どのようにして多様な臓器のサイズが自動的に決定されるのか、という根本的な生命科学の疑問に対して、1つの明確な分子制御メカニズムを提案した点で大きな意義があります。将来、ES細胞などから分化させた組織・臓器を、正しいサイズや形に発生させ、移植する技術につながることで期待されます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『Cell』（9月5日付け：日本時間9月6日）に掲載されます。

1. 背景

脊椎動物の胚発生過程では、1つの受精卵が繰り返し分裂することで、細胞数が

増し、それらが多様な細胞・組織（細胞の機能的な集合構造）を形成します。組織はさらに複雑化し、脳などの高度な機能を持つ器官へと発生していきます。脊椎動物の胚・胎児では、同じ発生時期であれば、各器官やその前駆組織のサイズは、個体間でほぼ一定であることが知られています（多少の個体差はあるにしても、その差は一般にわずかです）。

動物の発生過程では、発生中の胚が受ける生育条件は大きく変動することもあり、特に非哺乳類動物の場合、胚が母親の体外で成長するため、温度など発生の制御に大きくかわる条件が変動します（哺乳類胚の場合でも、母親の発熱や栄養状態などにより胎児環境の条件が変動します）。それにもかかわらず多くの場合、脳や心臓などの主要な臓器の大きさは、ほとんど環境の影響を受けずに、個体差が少なく一定に発生します。このことは、発生学の歴史の中でも大きな謎でした。

例えば、ヒトの着床前遺伝子診断の場合、体外で受精させ発生させた8細胞期^{*}7の胚の1つの細胞を微小ガラス針で取り出し、それを培養して遺伝子異常の有無を解析しています。残りの胚（7細胞）を母胎に戻して発生させると、不思議なことに、決して胚は8分の7の大きさに発生することはなく、すべての臓器は正しいサイズに発生し、正常な出産につながります（発生生物学の教科書では、こうした自動的な修復現象を、胚の「調節性」と呼びます）。

こうした胚の器官形成量の自動制御に関するもう1つの典型的な例が、アフリカツメガエルの脳の発生です。両性類を含む脊椎動物の中樞神経組織は、胚発生の初期に外胚葉と呼ばれる未分化な組織に、シュペーマン形成体^{**2}から分泌されるコーディンなどの神経誘導因子が働いて発生します（神経誘導あるいは1次誘導と呼ばれ、高校の生物の教科書にも記載されています）（図1）。

外胚葉自体は神経組織に分化しやすい性質を持っていますが、初期胚にはBMP4という神経分化を抑制するタンパク質性因子が存在するため、このBMP4の活性が弱まらない限り神経分化は起こりません。コーディンなどの神経誘導因子は、BMP4に結合し、BMP4による神経分化抑制を解除することで、神経分化を促進します（図2）。ところが、面白いことに、神経誘導が起こる際に、シュペーマン形成体を微小手術で除去して、その大きさをごく小さくしたり、逆に追加移植して2倍の大きさにしたりしても、最終的に発生する胚の中樞神経組織の大きさはほぼ一定であることが、以前より知られていました（図3）。これが、脳発生研究での大きな謎となっていました。

一般に「大きな条件の量的変動が加えられても、そのことが最終的な結果にほとんど影響を与えず、常に一定の結果を生み出す」ことを量的な頑強性（ロバストネス）があるといいます。上記の例はその典型です。

研究グループは、この長らく謎であった神経誘導における量的頑強性（形成体からの誘導因子の活性が、常に一定に保たれること）の分子機構を明らかにしました。臓器が一定のサイズで発生するという、生命の根幹となっている分子機構を明らかにした初めての成果となりました。

2. 研究成果

(1) 神経誘導因子コーディンの活性を細胞外で調整する分泌因子 ONT1 を同定

研究グループは以前に、初期胚の神経系に発現する分泌性タンパク質Tiarin（ティ

アリン) を単離しています。今回、ティアリンに構造が類似する関連タンパク質として、アフリカツメガエル初期胚に発現する分泌性タンパク質ONT1 を単離しました。解析の結果、ONT1 は神経発生が始まる時期の初期胚でシュペーマン形成体およびその周辺に発現していました。

アンチセンスRNA法^{*8}でONT1 の機能を阻害すると、胚の脳組織が軽度に拡大することを観察しました。詳細な解析の結果、その拡大は、コーディンの活性が強められたためであることが判明しました。このことから、発生中の胚のなかで、ONT1 はコーディンの機能に拮抗する因子であることが判明しました。

(2) ONT1 は神経誘導因子コーディンに結合し、その分解を促進する

詳細な生化学的な解析から、ONT1 は細胞外でコーディンに結合することが判明しました。さらに面白いことに、ONT1 はコーディンに結合するだけでなく、コーディン分解酵素^{*9}とも結合し、両者の反応を促進する足場タンパク質 (スキヤフォールド) ^{*10}として働くことがわかりました。すなわち、ONT1 が存在すると、コーディンはより効率よくコーディン分解酵素によって分解されるわけです (図 4)。

(3) ONT1 の発現は、コーディンによって正に制御され、全体として負のフィードバック制御を形成する

ONT1 は、このようにコーディンの量 (活性) を負に制御しますが、逆に胚の中の ONT1 の量は、コーディンによって正に制御されていることがわかりました。その結果、ONT1 はコーディンの活性を一定にする負のフィードバック制御系を形成することになります (図 5)。例えば、コーディンの量が増加すると、ONT1 の量が増加し、余計なコーディンを分解することで、コーディンの量をもとに戻そうとします。逆にコーディンの量が減少した場合、ONT1 の量も減り、その結果コーディンの分解も減り、コーディンの量も元に戻ろうとします。

発生中の生体の中では、さまざまなシグナルの量は常に多少の変化 (揺らぎ) を受けますが知られていますが、コーディンの場合、ONT1 によるフィードバックにより、常にその活性が一定になり、発生する脳組織の量も一定になることが解明できました。

(4) ONT1 は形成体による神経誘導の量的な頑強性に必須である

ONT1 によるフィードバック制御は、非常に強力なものであることが次のような実験からわかりました。ONT1 が正常に働いている通常胚の中に、神経誘導因子コーディンを微小ガラス針で注入しても、胚の神経組織の量はごく軽度に増加する程度でした。しかし、アンチセンス RNA 法で ONT1 の機能を阻害した胚の場合、同じ量のコーディンを注入すると、胚の大半が神経組織 (特に脳) に変わってしまいました (図 6)。

このように、ONT1 は、形成体による神経誘導の量的頑強性に必須のフィードバック制御因子であることを実証しました。すなわち、ONT1 が、脳を正常なサイズに常に発生させるための制御因子 (いわば安全装置) であることを解明したことになりました。

3. 成果の生物学的意義

「形成体による脳組織誘導の量が、形成体自身の量の変化にかかわらず常に一定になる」という長年の謎に対して、明確な分子機構を明らかにした学術的に意義のある成果となりました。動物の脳が、どうして個体差が少なく一定に発生するかということへの1つの重要な答えとなります。(今回の研究は脳の初期発生の話であり、脳は後期発生でも成長が続くため、後期には別のメカニズムが補足的に働いている可能性もあります)。

生体内の組織や器官の発生における、サイズや形の決定の原理はほとんどわかっておらず、今回の成果は、その理解に大きく貢献するものと考えられます。また、組織サイズを一定に保つこうした制御原理は、違う形で「組織再生」の制御にも生体内で用いられている可能性があり、その解明は今後の重要な課題です。

研究グループは、両生類胚という古典発生生物学的な知見がスーパーマンの時代から最も蓄積されている生物を主に用いて研究を行いました。ONT1の関連遺伝子は、ニワトリ胚やマウス胚にも発現していることが、研究グループのこれまでの研究からわかっています。これらが、脳や他の臓器の発生量の制御にかかわっているかは、今後の非常に興味深いテーマです。コーディンおよびその関連タンパク質は、骨・腎臓などさまざまな臓器形成に関係していることがわかっているため、それらの形やサイズの制御との関連に興味を持たれます。

4. 再生医学的な意義と今後の展開

過去10年間ほどで、細胞の分化制御に関しては急速に分子メカニズムの理解が進み、細胞分化の人為的制御もそれに比例して可能となっています。ES細胞からさまざまな有用細胞への分化誘導や、体細胞からiPS細胞を作成することなどがそのよい例です。しかし、私たち動物の身体は、単なる細胞の集合体ではなく、形、大きさ、機能が整然と制御された組織・器官のシステムとして成り立っています。こうした組織・器官の形や大きさを動物種ごとに一定に発生させるメカニズムは、いまだにほとんどわかっていないのが現状です。

こうした状況のもとでは、試験管中でES細胞などから「細胞」は作れても、正しい形やサイズを持った「組織・器官」の作成を制御することはできません。また、動物実験ではES細胞から分化した組織を移植した後に、生体内で不要なサイズへと過剰な巨大化を起こした報告もあります。組織・臓器の大きさを制御するメカニズムの理解は、臨床応用に向けて非常に大きな課題になりうると考えられます。今回のコーディンやONT1のフィードバック制御の発見は、自動的に組織を一定にする制御機構の例であり、次世代のより高度な再生医学(特に組織・器官形成と組み合わせた幹細胞医学)の発展のうえで先導的な意義を持つと考えられます。

今後、正確な臓器の形成を試験管内で制御するためには、さらに多くのフィードバックなど動的制御の理解が必要です。そのため、それら的人為制御をもとに正しいサイズと機能性をもった臓器をES細胞やiPS細胞から作成することを、理研発生・再生科学総合研究センターは、1つの大きなミッションとしてとらえています。複数の動的な制御を同時に理解するための数理科学的な研究アプローチにも力を入れる計画で、次世代スーパーコンピュータの神戸市設置とも連携して、より

複雑な生命現象の理解と新規の制御技術の開発に尽力します。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

発生・再生科学総合研究センター

細胞分化・器官発生研究グループ

グループディレクター 笹井 芳樹

Tel : 078-306-1841 / Fax : 078-306-1854

神戸研究推進部企画課

Tel : 078-306-3008 / Fax : 078-306-3039

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 Chordin(コーディン)

シュペーマン形成体から分泌される神経誘導因子。分泌性タンパク質で、外胚葉に働いて神経前駆細胞を分化誘導する。1994年に笹井らによって、アフリカツメガエルで発見された。

※2 形成体/シュペーマン形成体

両生類(カエルやイモリ)の初期胚に存在する、将来、脊索(背骨の中心部)に発生する部分。ドイツのハンス・シュペーマンらによる移植実験により、その部分が中枢神経系などの身体の背側の発生の司令塔であることが証明されて、「形成体(オーガナイザー)」と名付けられている。シュペーマンはこの功績により、1935年ノーベル医学・生理学賞を受賞した。哺乳類にも原始結節という同様の機能をもった形成体が存在する。

※3 外胚葉

受精卵が分裂を繰り返すなか、胚の細胞は外胚葉・中胚葉・内胚葉という3種類の未分化な組織に分化する。未分化の外胚葉に神経誘導因子という分泌因子(タンパク質)が作用すると、神経前駆細胞に分化する。この神経誘導因子を分泌するのが、形成体である。

※4 頑強性:ロバストネス

ある生命現象に関する1つ(あるいは複数)の制御因子の条件が大きく変動しても、

その生命現象がほとんど影響を受けない場合、その生命現象はその変動（摂動）に対して、「頑強性（ロバストネス）がある」と言う。例えば、今回の論文では、生命現象は胚の発生する中枢神経系組織量（神経誘導因子の活性）の制御、変動は胚のなかの神経誘導因子（あるいはそれを分泌するシュペーマン形成体）の量にあたる。

こうした概念は、生命現象の制御工学的な解釈として、非常に注目を集め出しており、北野宏明（ソニー研究所）らの著書『したたかな生命--進化・生存のカギを握るロバストネスとはなにか』（ダイヤモンド社）などにも詳しく述べられている。

※5 ONT1

初期胚に存在する分泌性のタンパク質で、これまではっきりした機能が不明であった。構造的にはオルファクトメディン・ファミリーという一群の分泌性タンパク質に分類される。このタンパク質群の機能や作用メカニズムは、ONT1 以外はほとんど判っていない。

※6 フィードバック制御

制御システムのなかで、下流の因子（あるいは経路）が上流の因子（あるいは経路）の活性を制御するものをフィードバック制御という。正（ポジティブ）と負（ネガティブ）のフィードバック制御がある。

※7 8 細胞期

ヒトなどの哺乳類の受精胚は、1つの受精卵から細胞分裂を繰り返した後に、着床する。受精後、3回分裂した胚を8細胞期胚と呼ぶ。この時期の胚の細胞は、非常に未分化な状態であり、胎児のすべての細胞に分化する能力に加えて、胎盤系の細胞にも分化する能力を併せ持つ（こうした幅広い分化能は全能性と呼ばれる）。

※8 アンチセンス RNA 法

特定の遺伝子の機能を阻害する方法。その遺伝子の相補的な配列をもつ短い RNA（アンチセンス RNA）を、胚の細胞に微量注入して行う。モリフォリノという化学修飾をして安定性を増した RNA を用いることが多い。

※9 コーディン分解酵素

神経誘導因子コーディンタンパク質を特異的に分解し不活性化する、一群のタンパク質分解酵素が存在する。それらは、BMP1/Tolloid ファミリーと呼ばれ、初期胚では、BMP1 および Xlr が主に働いている。

※10 足場タンパク質(スキャフォールド)

複数のタンパクが協同的に働くための足場となるタンパク質をスキャフォールド（足場タンパク）と呼ぶ。一般に、スキャフォールドはそれらのタンパク質に結合し、それらの間の相互作用を調整する。ONT1 は、コーディンとコーディン分解酵素（BMP1 または Xlr）のスキャフォールドであり、コーディンの分解を促進する。



図1 アフリカツメガエルの形成体実験

高校生物の教科書でも記載されているシュペーマン形成体は、原腸胚の原口上唇部に存在する。背側に存在する脳・神経系などを分化誘導する因子を分泌して、背側の体軸を形成する活性を持つ。

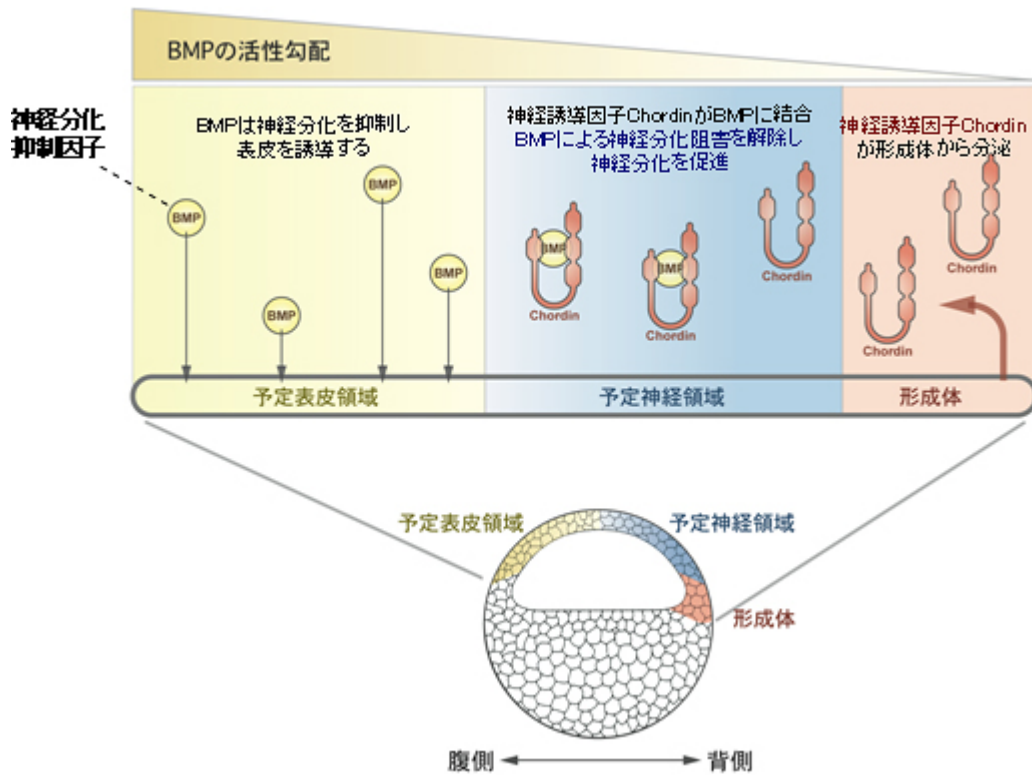


図2 アフリカツメガエルの神経誘導の分子機構

形成体から分泌される神経誘導因子 Chordin (コーディン) が、内在性の神経分化抑制因子 BMP を阻害することで、神経分化を促進する。

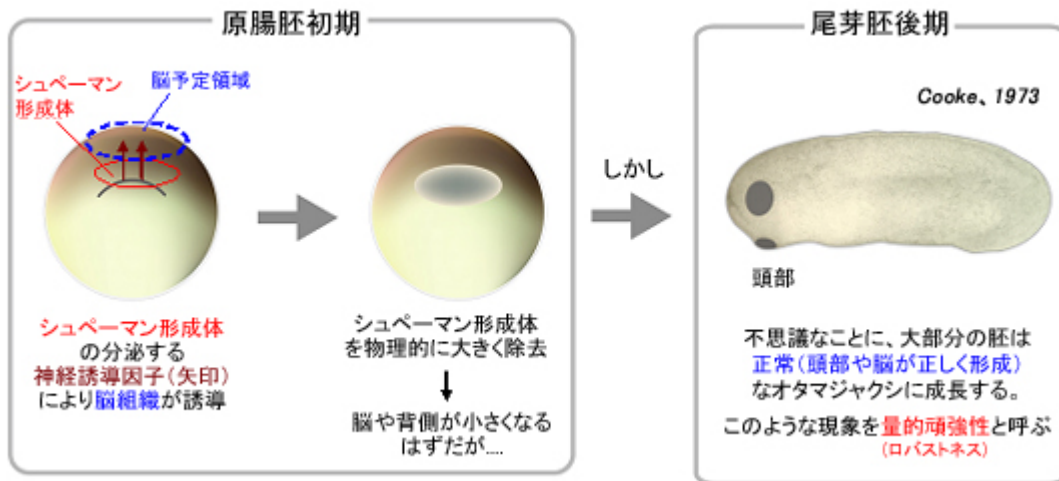


図3 形成体による神経誘導の量的頑強性 (脳発生量の一定化)

シュペーマン形成体の量に変化しても、脳・神経系の発生する量はほとんど影響を受けず、一定のサイズになろうとする。

① 分泌タンパク質 ONT1の構造



- SP (シグナルペプチド): ONT1を細胞外に分泌させるための配列
- CC (コイルドコイルドメイン): Chordin分解酵素に結合する領域
- OLF (オルファクトメディンドメイン): Chordin分解酵素に結合する領域

② ONT1による神経誘導因子Chordinの活性調節

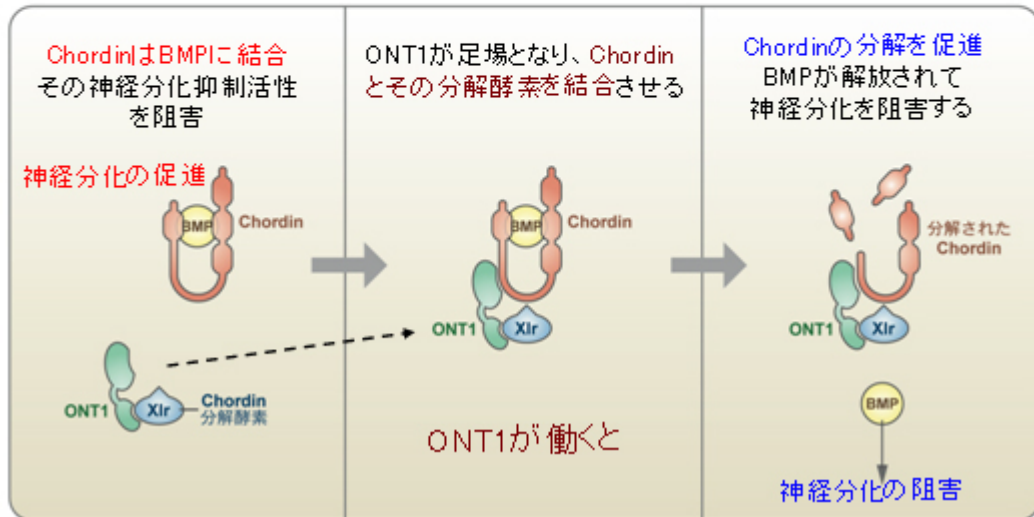


図4 ONT1の構造とONT1によるChordinの活性調節

ONT1は神経誘導因子Chordin（コーディン）に結合し、その分解を促進する。

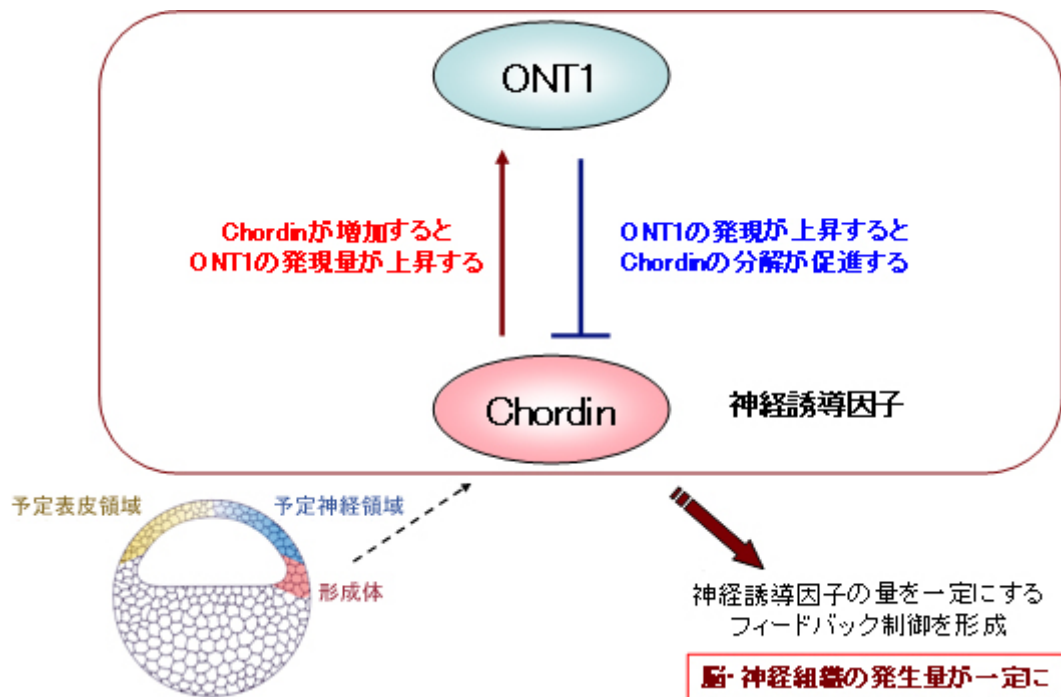


図5 ONT1による負のフィードバック制御

ONT1は神経誘導因子 Chordin (コーディン) の負のフィードバック因子として働き神経誘導活性を一定に保つ

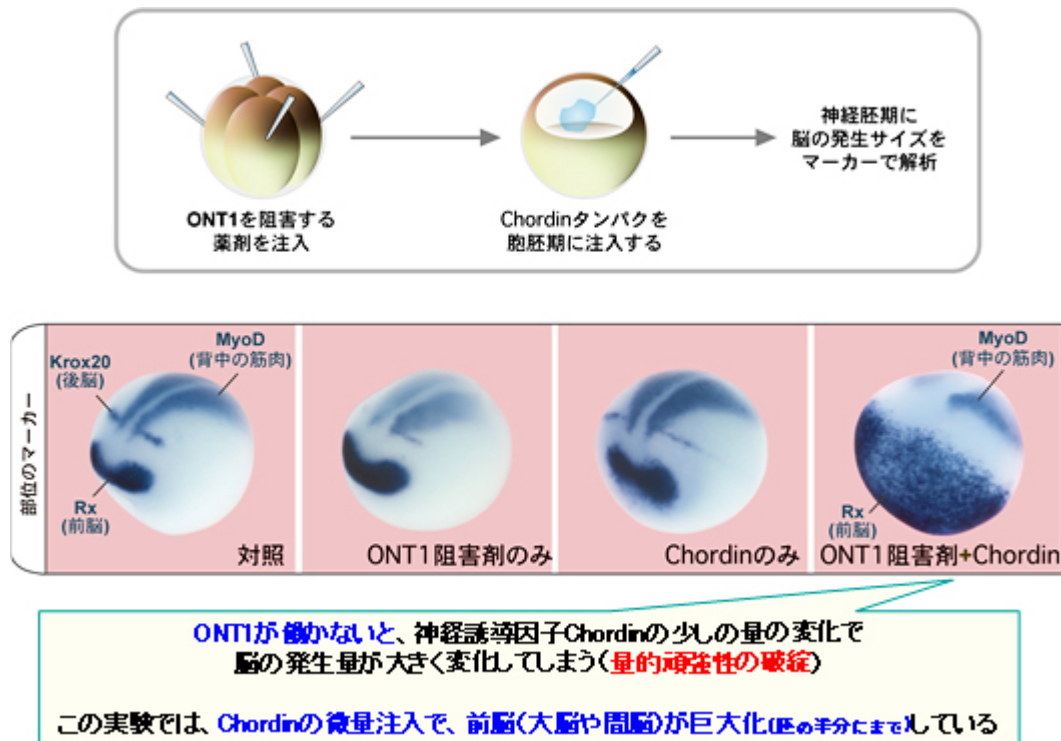


図6 脳発生の量的頑強性 (発生量の一定化) における ONT1 の役割

ONT1を阻害する薬剤 (アンチセンス RNA) の注入により脳の発生量を一定にする機構が破綻する。