

ゼブラフィッシュ内胚葉由来器官の形成過程における
RNA 結合タンパク Celf1 の役割

田原 直幸
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 遺伝子発現制御研究室
(別所 康全 教授)
平成 27 年 3 月 12 日 提出

目次	2
序論	3
材料と方法	12
結果	18
考察	36
結論	43
謝辞	44
参考文献	45

序論

脊椎動物の発生過程では細胞は分化や増殖、細胞移動、細胞死など様々なふるまいを見せる。このような細胞のふるまいは、正確な体を作るため決められたタイミングと位置で起きる。時空間的に制御される細胞のふるまいは細胞レベルでの厳密な遺伝子の発現制御により、タンパクが適切な量へ調節(fine-tuning)されることで成り立つ。

遺伝子発現制御には転写調節と転写後調節がある。転写調節は時空間的に遺伝子発現の ON/OFF を切り替えることで細胞のふるまいを制御する(Naiche et al., 2005; Schier and Talbot, 2005; Shivdasani, 2002)。しかし、細胞分裂などの偶然性(ノイズ)により転写調節による mRNA の転写量は安定しにくいことから、タンパク発現レベルの調節は転写調節だけでは難しい(Blake et al., 2003; Elowitz et al., 2002)。そのため、細胞は転写後調節によりタンパク量を適切な量まで調節する仕組みを持つと考えられる(Gebauer and Hentze, 2004)。タンパク量を fine-tuning し、発生の過程を制御する機構の一つとして RNA 結合タンパクを介した転写後調節が知られている。

RNA 結合タンパクは、RRM(RNA recognition motif)、KH(hnRNP K homology)ドメイン、DSRM(double-stranded RNA-binding motif)、RGG(Arg-Gly-Gly)box など様々な RNA 結合モチーフを持ち、標的となる RNA と結合する。(Burd and Dreyfuss, 1994; Mattaj, 1993; Siomi and Dreyfuss, 1997)。

RRM は、約 80 アミノ酸残基からなる $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$ 構造から成り立つ。また、コアとなる $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 構造に対応する 8 アミノ酸残基からなる RNP1、6 アミノ酸残基からなる RNP2 と呼ばれる特に保存性の高い領域が存在する。この領域は、RRM の RNA 結合活性にとって重要であることが報告されている(Siomi and Dreyfuss, 1997)。RRM 型 RNA 結合タンパクには、分子内に RRM を 1~4 つ有するものがこれまでに見つかっている(Birney et al., 1993)。

RRM 型 RNA 結合タンパクの一つに Cugbp Elav-like family (CELF)がある。CELF ファミリーは脊椎動物において 6 種類が確認されており、アミノ酸配列の相同性から CELF1,2 と CELF3-6 の 2 つのサブファミリーに分けられる(Fig.1)。CELF ファミリーは共通の構造として RRM を N 端側に 2 つ、C 端側に一つ、合計で 3 つの RRM を持ち、RRM2 と RRM3 の間には divergent domain と呼ばれるリンカー領域を持つ。CELF ファミリーは核内、細胞質どちらにも局在し、核内においては pre-mRNA と結合しオルタナティブスプライシングや RNA エディティングに関与する。(Dasgupta and Ladd, 2012; Vlasova-St Louis et al., 2013)。CELF1 と CELF2 は同じ部位で発現していることが多く、特に心臓や体節、骨格筋、脳、水晶体に強く発現していることが報告されている(Blech-Hermoni et al., 2013, Brimacombe and Ladd, 2007)。CELF3-5 は神経系で、CELF6 は神経系と腎臓、精巣でそれぞれ発現するこ

とが知られている(Vlasova-St Louis and Bohjanen, 2011)。また、細胞質に存在する CELF ファミリーは mRNA の安定性の調節、翻訳調節に機能を持つことが報告されている。例えば CELF1 は脱アデニル化酵素 PARN と複合体を形成し、ポリ A をすみやかに除去することで、標的となる mRNA の分解を促進する(Fig.2)ことや CELF2 は翻訳アクチベーターHuR と競合することで標的 mRNA の翻訳を阻害することが報告されている(Vlasova-St Louis and Bohjanen, 2011)。

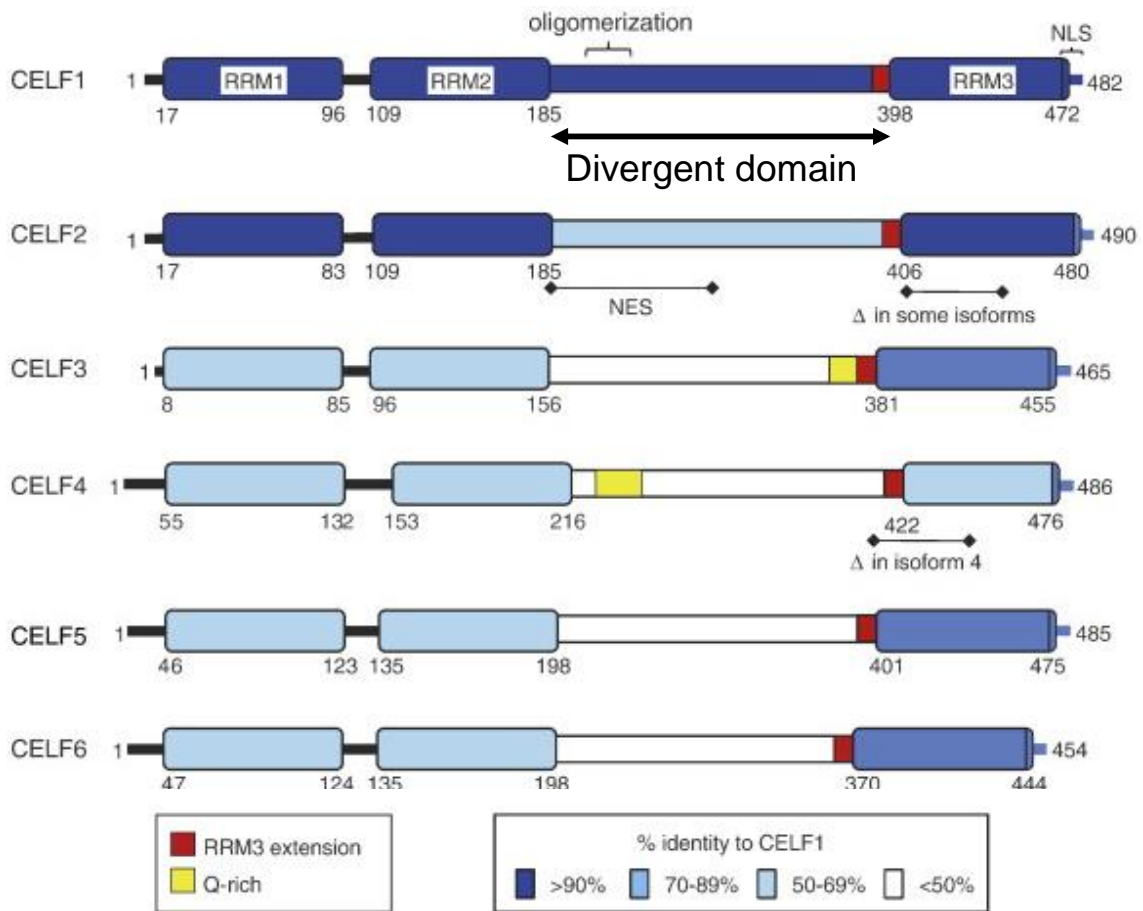


Fig.1 CELF タンパクのドメイン構造

CELF タンパクは3つのRRMを持ち、2つめと3つめのRRMの間にlinker領域(Divergent domain)が存在する。RRM1~3、linker領域(Divergent domain)のそれぞれのドメインに対してCEL F1におけるアミノ酸配列の相同性が高いほど濃い青色になるよう色分けしている。

I Vlasova-St Louis *et al.* 2013, BBA, 1829, 6-7, 695-707. より引用・改変した。

Vertebrate CELF1-mediated deadenylation

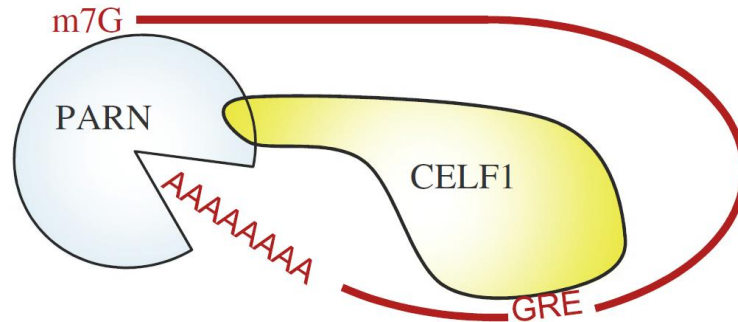


Fig.2 CELF1 は脱アデニル化酵素と複合体を形成し、mRNA の分解を促進する脊椎動物において CELF1 は脱アデニル化酵素 PARN と複合体を形成し、標的 mRNA の分解を促す。GRE : GU-rich elements。I Vlasova-St Louis *et al.* 2013, BBA, . 1829, 6-7, 695-707. より引用した。

CELF1 の標的配列

CELF1 は筋ジストロフィー症(myotonic dystrophy, DM)の原因遺伝子として同定され、DM 患者において *DM protein kinase* 遺伝子の 3'UTR に存在する CUG 反復配列の反復回数が増加していたことから、(CUG)₈ RNA オリゴヌクレオチドに結合能を持つタンパクとして単離された(Timchenko *et al.*, 1996)。しかし、CELF1 の標的配列は yeast three hybrid system 法、SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法、RNP immunoprecipitation (RIP) 法や、cross-linking immunoprecipitation (CLIP)法により詳しく解析が行われ、CELF1 は CUG リピートではなく UGUGUGUGU や UGUGUGUUGU といった UG-rich または UGUrepeat 配列に強い親和性を持つことが示された(Lee *et al.*, 2010; Marquis *et al.*, 2006; Masuda *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 2008; Rattenbacher *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000) 。これらの配列はヒトやマウス、カエルにおいても CELF1 の標的となることが確かめられており、mRNA 3'UTR の多くに UG-rich、UGU repeat が存在していることが知られている。(Lee *et al.*, 2010; Marquis *et al.*, 2006; Mori *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2000) 。

CELF1 は脊椎動物の発生において役割を持つ

CELF1 は脊椎動物の初期胚において一様に発現しているが、発生が進むにつれ体節や水晶体などに特異的に発現することが知られており、マウスの発生過程においても筋形成、精子形成などに関与することが知られている(Gautier-Courteille *et al.*, 2004; Hashimoto *et al.*, 2006; Kress *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010)。しかし、Hela 細

胞において細胞増殖、細胞移動や細胞死に関わる 600 以上の mRNA に結合することが報告されており、CELF1 は多数の mRNA から翻訳されるタンパクの発現を協調的に制御することを示唆している(Rattenbacher et al., 2010)。最近、標的候補の mRNA に存在する CELF1 結合配列と相補的に結合する target-protector morpholino(TPMO)をマイクロインジェクションすることで目的の遺伝子特異的に CELF1 との結合を阻害するなどの方法を用いることで RNA 結合タンパクと 1 つの標的 mRNA の役割が明らかになってきている(Cibois et al., 2010; Cibois et al., 2013; Gautier-Courteille et al., 2004; Matsui et al., 2012)。

たとえば、アフリカツメガエル *celf1* ノックダウン(KD)胚において体節の形成異常が起こることが報告されており、その標的候補の遺伝子に Notch intracellular domain の核内移行を促進する *rbpj* が見つかった。さらに、*rbpj* に対する TPMO をマイクロインジェクションした胚において *rbpj* の mRNA 量が増加していたこと、*rbpj* の過剰発現胚において *celf1* KD 胚と同様の表現型が確認されたことなどから、Celf1 が *rbpj* mRNA と結合し、転写後調節を通して体節形成に役割を持つことが報告されている(Cibois et al., 2013)。

私が所属する研究室では、これまでにゼブラフィッシュ胚発生における Celf1 の機能解析を行い、TPMO を用いた実験などから *celf1* が転写因子 *dmrt2* の転写後調節を介して体節の左右対称の維持と心臓の左右非対称性の決定に関与することを報告した(Matsui et al., 2012)。この研究の過程で、心臓と同じく左右非対称に配置される肝臓や膵臓の形成位置を調べたところ、*celf1* ノックダウン (KD) 胚では、左右差の異常に加えて肝臓や膵臓の形成不全が観察された。この結果は、*celf1* が左右非対称性の決定だけではなく、内胚葉由来の器官形成に関与することを示唆している。

ゼブラフィッシュ胚における内胚葉由来器官の形態形成

ゼブラフィッシュでは肝臓、腸管、膵臓などの内臓器官の形成は、内胚葉細胞の分化(原腸陥入初期・受精後 6 時間)、内胚葉細胞の正中線への集合(受精後 6 時間~9 時間)、内胚葉の形成(受精後 10~14 時間)、各器官への分化、器官形成(受精後 14 時間~)という過程を通して行われる(Chung et al., 2008; Field et al., 2003a; Field et al., 2003b; Mizoguchi et al., 2006; Mizoguchi et al., 2008)。

内胚葉細胞は原腸陥入初期(受精後 6~7 時間)に、内胚葉と中胚葉細胞の共通の前駆細胞である中内胚葉細胞において *nodal* シグナル経路が活性化し内胚葉に分化することで生じる(Mizoguchi et al., 2006)。最初、内胚葉細胞は *solt and pepper* 状に出現し、エピボリーの進行に合わせて正中線の周囲に増殖を伴いながら移動する(Mizoguchi et al., 2008)。分化した直後(受精後 6~7 時間)の内胚葉細胞は方向性を持った移動は行わないが、受精後 7~8 時間のステージに達すると Rho ファミリー G タンパクが活性化され細胞移動に必要な糸状仮足、葉状仮足の形成が促進されること、

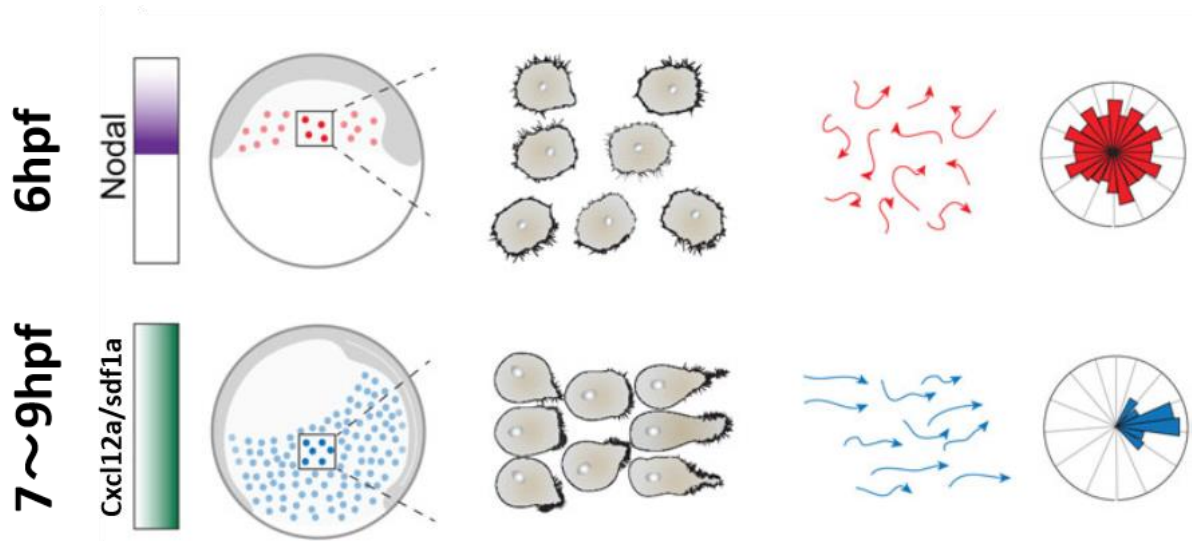


Fig.3 ゼブラフィッシュ内胚葉細胞の分化と原腸陥入期における細胞移動

ゼブラフィッシュ内胚葉細胞は原腸陥入初期(受精後 6 時間)に Nodal シグナル経路が活性化することで分化する(上図)。内胚葉細胞は salt and pepper 状に出現する。分化した直後はランダムに移動を行う(上図)が、受精後 7~9 時間の間で方向性を持った動きに切り替わる(下図)。内胚葉細胞は Cxcl12a/Sdf1a の正中線方向の濃度勾配を感知することで方向性を獲得する。G Reig *et al.* 2014, *Development*, 141, 1999-2013.より引用・改変した。

また原腸陥入期に内胚葉細胞で発現する G タンパク共役受容体 Cxcr4a が、中胚葉系から分泌される Cxcr4a のリガンドである化学誘引物質 Cxcl12a/Sdf1a が作る正中線方向への濃度勾配を感知することで、方向性を持った移動を行う(Mizoguchi *et al.*, 2008; Woo *et al.*, 2012) (Fig.3)。その後、体節形成中期(受精後 14 時間)頃までにシート状の内胚葉組織を形成する。

体節形成中期(受精後 14 時間)では 1~3 つめの体節に隣接する側板中胚葉で Bmp2b が分泌される。その Bmp2b のシグナルを受け取った内胚葉細胞は肝臓に運命決定される(Chung *et al.*, 2008; Deutsch *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2001)(Fig.4B)。Bmp2b シグナルを受け取らなかった細胞は早期膵臓マーカー *pdx1*(*pancreatic duodenal homeobox 1*)が強く発現し、膵臓原基または腸管へ分化する。内胚葉細胞群は受精後 24 時間のステージまでにシート状の構造がさらに収斂し、正中線にそって棒状の腸管が形成される(Fig.5A)。

肝臓形成は、受精後 24~28 時間のステージにおいて 1 つめの体節と卵黄の間の位置に配置された腸管組織において肝芽組織の出芽に機能を持つ Prox1 が発現することから始まる。(Fig.5A,B)。その後、受精後 30 時間頃から Prox1 陽性細胞において

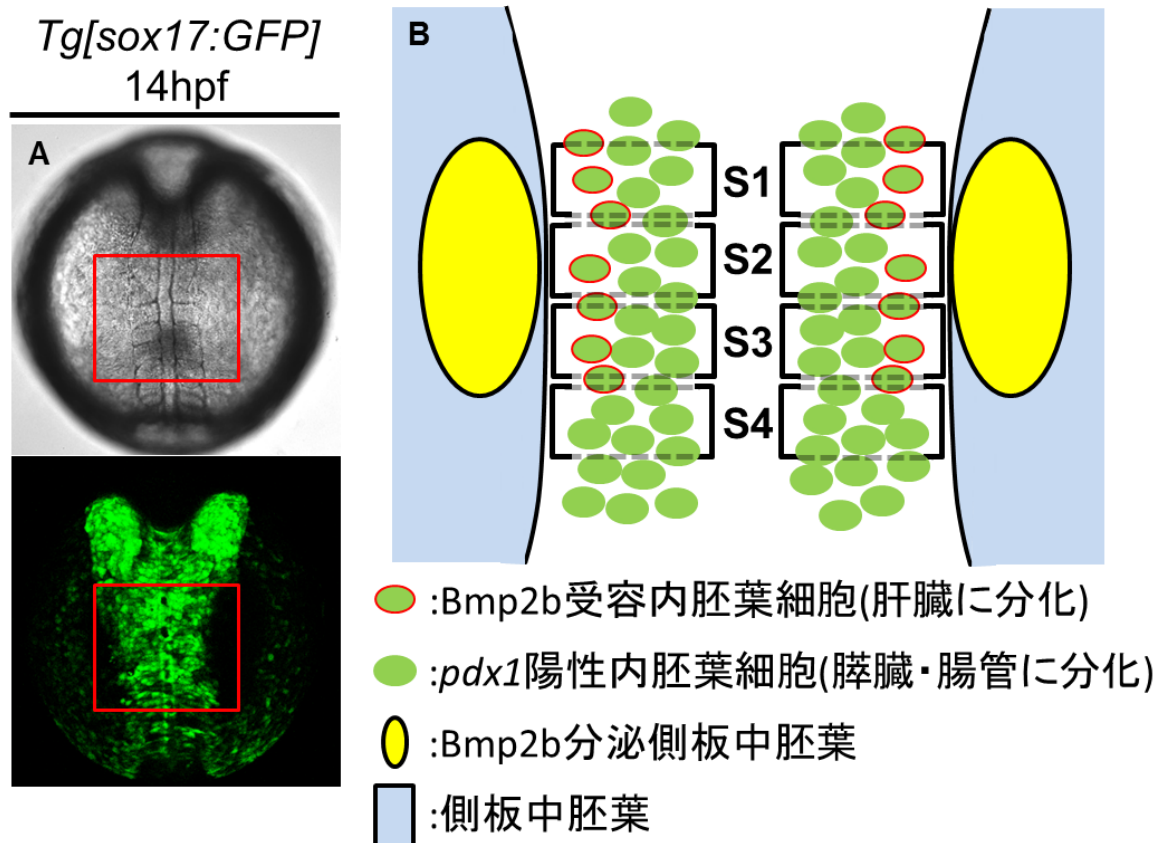


Fig.4 体節形成期において **Bmp2b** シグナルは肝臓の分化に役割を持つ

(A)体節形成期中期(受精後 14 時間)における内胚葉組織。(B)肝臓原基または膵臓原基細胞に分化する内胚葉組織の模式図。(A)の赤四角の位置に当たる。1 から3つめの体節に隣接する側板中胚葉が分泌する **Bmp2b** を受け取った内胚葉細胞は将来肝臓に分化する。その他の内胚葉細胞は **Pdx1** を発現し、膵臓または腸管へ分化する。

肝臓特異化に機能を持つ **Hnf4** が強く発現する(Fig.5C)。受精後 34 時間のステージまでに、**Prox1**、**Hnf4** 陽性肝芽細胞は腸管の左側から出芽する(Fig.5D)。受精後 48 時間までに肝芽は組織の体積をさらに増大させることで、肝臓を形成していく(Field et al., 2003b)(Fig.5E,F)。

Pdx1 陽性細胞の一部は受精後 34 時間のステージまでにおいて 4 つめの体節と卵黄の間に収束することで膵臓芽組織(dorsal posterior bud)を形成し、腸管の右側に出芽する(Fig.6A)。さらに、受精後 40 時間胚において肝臓付近の *pdx1* 陽性細胞(ventral anterior bud)が腸管の右側に出芽し(Fig.6B)、受精後 44~52 時間のステージにおいて dorsal posterior bud と融合することで膵臓が形成する (Fig.6C,D)。Ventral anterior bud は受精後 52 時間までに肝臓・腸管・膵臓をつなぐ膵臓管となりそれぞれの器官をつなぐネットワークを構築する(Field et al., 2003a; Field et al., 2003b)。

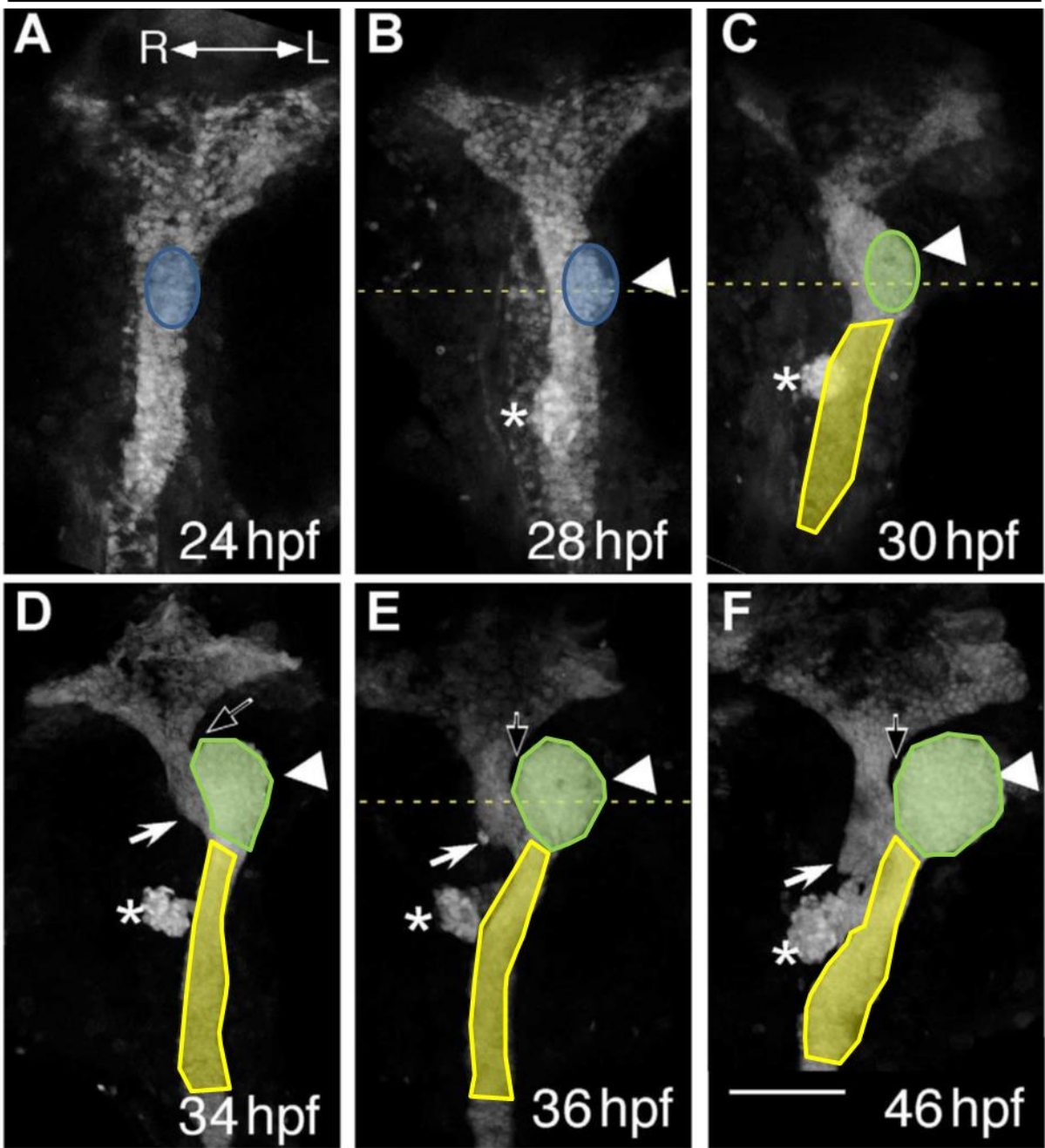
以上のように、内胚葉由来器官の形成は、多段階で動的なプロセスによって構成されており、数多くのシグナルや分子の関与が示唆されるためどのようなメカニズムで *celf1* が器官形成に役割を持つのかは理解できていなかった。

そこで本研究では、

- ① 内胚葉由来器官の形成プロセスのどこを Celf1 が制御するのか？
- ② そのときの標的 RNA は何か？

を解明することで、Celf1 に依存した転写後調節機構が内胚葉由来器官の形成にどのような役割を持つのかを解明することを目的とする。

gutGFP



- : Prox1陽性細胞群 ○ : Hnf4陽性細胞群
- : Prox1、Hnf4陽性細胞群

Fig.5 肝臓形成の模式図

(A-F)受精後 24 時間以降の肝臓の形成過程。肝臓形成(白矢頭)は、受精後 24~28 時間のステージにおいて 1 つめの体節と卵黄の間の位置に配置された腸管組織で Prox1 が発現することから始まる(A,B)。受精後 30 時間から肝芽細胞で Hnf4 が発現し、受精後 34 時間のステージまでに Prox1,Hnf4 陽性肝臓芽細胞が出芽する(C,D)。受精後 48 時間のステージまでに肝臓芽は組織の体積をさらに増大させることで、肝臓を形成していく(F)。*は腸管の形成を示す。H

A. Field et al. 2003, Dev. Biology, 253, 279-290.より引用・改変した。

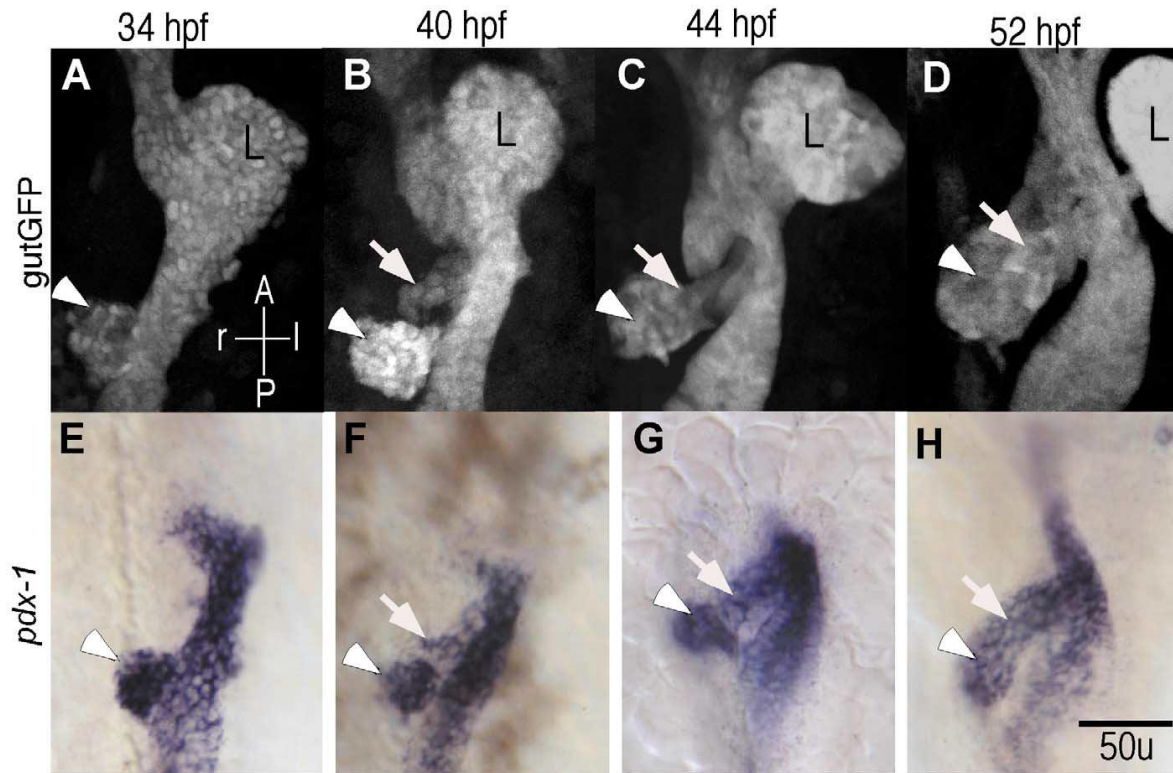


Fig6 膵臓の形成

(A-H)受精後 34 時間以降の膵臓の形成過程。受精後 34 時間胚までに 4 つめの体節と卵黄の間に形成される膵臓芽組織(dorsal posterior bud) (白矢頭)が出芽する(A,E)。受精後 40 時間胚において肝臓付近の腸管右側から ventral anterior bud(白矢印)が出芽する(B,F)。ventral anterior bud は受精後 44~52 時間胚までに ventral anterior bud と融合し、膵臓が形成される。(C,D,G,H)。L は肝臓を意味する。H A. Field et al. 2003, Dev. Biology, 261, 197-208.より引用・改変した。

材料と方法

ゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)は、塩濃度 0.03%となるように調整した人工海水中で、常時雄と雌を隔離し、水温 28.5°C、明期 14 時間・暗期 10 時間の条件下で飼育した。受精卵は、暗期に入る前、網で隔離された同一の水槽に、雌雄を分けて数匹ずつ入れ、次の明期に網を取り外し、雄と雌を混ぜ合わせるにより得た。回収した受精卵は 28.5°Cにて培養した。24 時間以降胚のステージで観察をする場合は、胚の色素形成を阻害するために $3 \times 10^{-3}\%$ となるように PTU(1-phenyl2-thiourea、東京化成)を、それぞれ飼育水に添加した。発生段階は Kimmel らのステージ表に従った (Kimmel, C.B. *et al.*, 1995)。

また、ライブイメージングには、内胚葉細胞のマーカーである転写因子 *sox17* のプロモーター下に GFP を発現するようにしたトランスジェニックゼブラフィッシュ *Tg[sox17:GFP]* (Mizoguchi, T. *et al.*, 2008) を遺伝研より提供を受けた。また、F-actin を標識する Lifeact-RFP を内胚葉で発現する *Tg[sox17:Lifeact-RFP]* は Tol2 トランスポゾンを用いて作成した。Tol2 transposase は国立遺伝学研究所 川上研より提供を受けた。

試薬

試薬類は主にナカライテスク、和光純薬、Roche diagnostics から、制限酵素は主に宝酒造、東洋紡から購入した。オリゴヌクレオチドの合成は、greiner bio-one に依頼し、簡易カラム精製されたものを用いた。

antisense morpholino oligo

本研究で用いた antisense morpholino origo は、Gene Tool から購入した。配列は以下の通りである。

control-MO 5' -CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'

celf1

long-MO 5' -GCTTCAGCTTCGATACTATCCATCC-3'

short-MO 5' -GTGGTCCAGAGACCCATTCATCTTC-3'

cdc42-MO 5' -GCTATGCAGACGATCAAGTGCGTCG-3'

ゼブラフィッシュ受精卵への micro injection

injection 用のニードルは、NARISHIGE ガラス管(G-1)1×90nm をプラー(PC-30、NARISHIGE)で加熱、牽引し、先端をカッターナイフで切断したものを用いた。Injection は、FemtoJet (Eppendorf) を用い、実体顕微鏡 (Olympus SZ61) 下で行った。受精卵を、1%アガロースゲルにプラスチックスロットメーカーを埋め込んで作成した溝に並べて、各受精卵に約 5nl ずつ目的のサンプルを injection した。injection 後は、塩濃度 0.03%となるように調整した 3×10^{-5} %メチレンブルー(ナカライテスク)を含む水中で 28.5°Cに保ち、発生させた。

Whole mount *in situ* hybridization

1.ゼブラフィッシュ胚の固定

目的の発生段階の胚を、4%paraformaldehyde(PFA、SIGMA)/PBST 中において、4°Cで一晩固定した。その後、卵膜を除去し、PBST にて 2 回洗浄した後、100%メタノール(ナカライテスク)に置換し、-30°Cで保存した。ただし、受精後 2 4 時間胚以降の胚は卵膜を除去した後、固定、メタノール置換をした。

2.probe 作成

in situ hybridization 用の probe 作成を目的とした cDNA 断片の単利は TAKARA LA taqTM(タカラバイオ)を用いて行った。反応系は、cDNA テンプレート 1.5 μ l、2×GC buffer 12.5 μ l、2.5mM dNTPs 4 μ l、20 μ M Forward primer 1 μ l、20 μ M Reverse primer 1 μ l、H₂O 4.5 μ l、LA taq 0.5 μ l であった。PCR 条件は、94°C 5 分の後、94°C 30 秒、primer の T_m 値より 5°C低い温度 30 秒、68°C 2 分のサイクルを 32 回行い、最後に 72°C 7 分であった。primer の配列は以下の通りである。

cp

Forward 5' - GGCTAGGAGACCGTACTCCATACACGC -3'

Reverse 5' - TCCAGCACAGTGTATGTGGTCTCCATTCCG -3'

ins

Forward 5' - CACCATTCCTCGCCTCTGCTTCGAG-3'

Reverse 5' - CCTGTGTGCAAACAGGTGTTTCTGGCATTG-3'

foxa3

Forward 5' - ATGGGTGGAGGCCCAACCACATGA -3'

Reverse 5' - GGTGCTGCTGCCATCCTGAGACTTTGA -3'

sox32

Forward 5' - GCAACATCAGAACGACGAACAGCGCAGGA -3'

Reverse 5' - CTGTGGTCCAAAGTCTGTGCTGGATTGAGG -3'

得られた PCR 産物を Gel / PCR DNA Isolation System (VIOGENE)を用いて精製した。精製した PCR 産物を Dual Promoter TA CloningKIT(Invitrogen)を用いて pCR II ベクター(Invitrogen)にクローニングし、cDNA の塩基配列を決定した。

環状プラスミド DNA 10 μ g、適切な制限酵素 2 μ l、10 \times buffer 40 μ l、H₂O 348 μ l の反応系により、プラスミドを直線化した。サンプルの一部を電気泳動し、プラスミド DNA が完全に消化されていることを確認した。20%SDS 2 μ l、10mg/ml Protease K(Roche) 10 μ l を加えて、55 $^{\circ}$ Cで 30 分間 1000rpm の周期で震とうさせた。PCI 処理により制限酵素を除去し、エタノール沈殿により DNA を精製した。この直線化プラスミドを鋳型として、直線化プラスミド 1 μ g、10 \times DIG RNA labeling mixture(Roche) 2 μ l、10 \times transcription buffer(Roche) 2 μ l、適切な RNA polymerase(Roche) 2 μ l、sterile water 12 μ l を、37 $^{\circ}$ Cで 2 時間反応させ、*in vitro* transcription 反応を行った。サンプルの一部を電気泳動し、probe の合成が行われていることを確認した。残りのサンプルをエタノール沈殿により精製し、得られた沈殿を hybridization buffer[60% ホルムアルデヒド(分子生物学用特急試薬)、5 \times SSC、20% Tween-20(ナカライテスク)、50mg/ml ヘパリン、10mg/ml total RNA]に溶かし、-30 $^{\circ}$ Cで保存した。

3.whole mount *in situ* hybridization

メタノール中に保存している胚を 50%メタノール/PBST、30%メタノール/PBST に順に 5 分ずつ処理し、PBST で 5 分ずつ 2 回洗浄、再水和した。再水和したサンプルに、4%PFA/PBST を加え、氷上で 20 分おき、再固定した。PBST で 5 分ずつ 2 回洗浄した。洗浄した胚は 10 μ g/ml Proteinase K(Roche)/PBST 処理を行った。反応時間は原腸陥入期の胚は 30 秒、受精後 4 8 時間の胚は 20 分であった。Proteinase K 処理後、2 μ g/ml グリシン/PBST を加え、氷上に静置し、酵素を失活させた。サンプルを PBST にて quick wash し、4%PFA/PBST を加え、氷上で 20 分静置し、再固定した。PBST で 5 分間ずつ 2 回洗浄した後、hybridization buffer[60% ホルムアルデヒド(分子生物学用特急試薬)、5 \times SSC、20% Tween-20(ナカライテスク)、50mg/ml ヘパリン、10mg/ml total RNA]を加え、70 $^{\circ}$ Cで 1 時間以上保温しプレハイブリダイゼーションを行った。その後、300ng/ml DIG-RNA probe を溶かした hybridization buffer に置換し、70 $^{\circ}$ Cで一晩保温した。

保温した胚を solution1[50%ホルムアルデヒド、5 \times SSC(pH4.5)、1%SDS]で、70 $^{\circ}$ C、1 時間置きに 3 回洗浄、solution3[50%ホルムアルデヒド、2 \times SSC(pH4.5)]で 65 $^{\circ}$ C、1 時間置きに 2 回洗浄し、TBST で室温、15 分おきに 3 回洗浄した。Blocking solution(5%ヒツジ血清 in TBST)を加え、室温に 1 時間以上おいた。その後、1/2000 Anti-digoxgenin-AP (Roche) in Blocking solution に置換し、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。

翌日、抗体液を除き、TBST で 5 分おきに 3 回、15 分おきに 10 回洗浄し、NTMT 溶液[0.1M NaCl、0.1M Tris-HCl(pH9.5)、5mM MgCl₂、20% Tween-20]で 5 分ず

つ、2回洗浄した。その後、color solution[NTMT 溶液 1ml、NBT(Roche)22.5 μ l、BCIP(Roche) 3.5 μ l]に置換し、遮光しながらシグナルが得られるまで静置した。発色が完了したところで、PBST で3回洗浄して反応を止め、4%PFA/PBST で胚を固定した。

in vivo での内胚葉細胞のライブイメージング

28.5 $^{\circ}$ Cで培養した受精卵を目的の発生段階において卵膜を除去し、ガラスボトムディッシュ(14mm ϕ 、マツナミまたは IWAKI)にマウントした。マウントは65 $^{\circ}$ Cにて融解させた1%low melting agarose gel(ナカライテスク)に埋没させ、目的の部位が撮影できるようにオリエンテーションを調節した。Time lapse 動画の撮影には倒立蛍光実体顕微鏡(ZIESS、LSM710 duo)を用いた。励起光のレーザー波長は488nm、GFP シグナルを検出するフィルターを用いた。Time interval は、低倍率($\times 10$)では3 min/frame、高倍率($\times 40$ 、水深)では2 min/frame とした。

内胚葉細胞の数値解析

1.細胞数

内胚葉細胞のマーカーである転写因子 *sox32* に対して *in situ* hybridization を行った胚を80%グリセロール(ナカライテスク)に1時間ほど浸し、卵黄を除去した。胚に切れ目を入れ、スライドガラスにフラットマウントした。実体顕微鏡にて胚の写真を撮影し、*sox32* がポジティブな細胞を数えた。

2.分裂回数

倒立蛍光実体顕微鏡(ZIESS、LSM710 duo)にて *Tg[sox17:GFP]* を対象にタイムラプス動画を取得した。そして、GFP がポジティブな細胞が分裂する回数を調べた。

3.細胞移動の数値解析

倒立蛍光実体顕微鏡(ZIESS、LSM710 duo)にて *Tg[sox17:GFP]* を対象にタイムラプス動画を取得した。そして、画像解析ソフト MetaMorf(Molecular Device)の Track Points オブジェクト機能を用い、内胚葉細胞の細胞移動の軌跡を得た。トラックするポイントは GFP シグナルがポジティブな細胞の中心とした。

4.カラースタック画像の作成

画像解析ソフト ImageJ に KBI ImageJ plugin(<http://hasezawa.ib.k.u-tokyo.ac.jp/zp/Kbi/ImageJKbiPlugins> より入手した)を導入し、kbi stkFilter 機能を用いて作成した。

Cdc42-GFP のフュージョンタンパクをコードするレポーターの作成

以下のプライマーを使用し、*cdc42* のコーディングリージョンの一部をクローニングし、pCS2-EGFP の上流に組み込んだ。

F 5' -GGATTTATAAAgaattcGCTATGCAGACGATCAAGTGCG-3'

R 5' -CTGCATAGTTATCctcgagCGTTGGTACATATTCGGAGG-3'

RIP アッセイ

Celf1 の結合の確認は、松井らの研究により得られた cDNA テンプレートを鋳型とし、PCR を行うことで比較した。反応条件は、cDNA 1 μ l、2 \times GC buffer 12.5 μ l、2.5mM dNTPs 4 μ l、Filterd water 5.25 μ l、LA taq 0.25 μ l、20pmol/ μ l Forward primer 1 μ l、20pmol/ μ l Reverse primer 1 μ l である。PCR 条件は、94 $^{\circ}$ C 5 分の後、94 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒のサイクルを 32 回行い、最後に 72 $^{\circ}$ C 2 分であった。

プライマーの設計は以下のように行った。

cdc42

Forward 5' -GACAGTAGCCCTGTAAATGGTTG-3'

Reverse 5' -GTTAGAAAGTTCCTGCTTGAGAG-3'

gata5

Forward 5' -CAATATCTGCCATCCAAGACC-3'

Reverse 5' -AATCACAGCCAGAGAGTAACCAG-3'

cyclinA1

Forward 5' -CAATATCTGCCATCCAAGACC-3'

Reverse 5' -AATCACAGCCAGAGAGTAACCAG-3'

RNA 精製と定量的 PCR

全 RNA は SuperScriptII Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて逆転写する。定量的 PCR マスターミックス KAPA SYBR FAST Universal (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) を用い、PCR 反応は Light Cycler 480 (Roche) を用いて、95 $^{\circ}$ C 3 分熱変成後、(95 $^{\circ}$ C 10 秒、60 $^{\circ}$ C 20 秒、72 $^{\circ}$ C 1 秒) の 3 ステップ条件で 40 サイクルの PCR を行う。PCR に用いるプライマーセットは以下のとおりである。

BrdU 染色

25 mM の BrdU(Sigma, St. Louis, MO, USA)を 1nL、受精後 6 時間の Tg[sox17:GFP] 胚に microinjection し、受精後 9 時間までインキュベートしたのち 4%PFA/PBS にて固定した。GFP 抗体を用いた免疫染色の後、5 μ g/mL の Protenase K にて 5 分間処理した後、PBSDT(1% DMSO, 0.1% TritonX100 in PBS)で洗浄後、4% PFA にて再固定した。その後 2N HCl で 20 分、0.1%ホウ酸で 10 分処理した。PBSDT にて洗浄後、2%FBS/PBSDT にて 30 分ブロッキングした。BrdU 抗体(AbD Serotec, Oxford, UK)を 4 $^{\circ}$ C で 16 時間以上反応させる。PBSTD で十分に洗浄した後、CF647 donkey anti-rat IgG(Biotium, Hayward, CA, USA)を 4 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させた。PBSDT で十分に洗浄した後 4%PFA で固定した。

TUNEL 染色

Tg[sox17:GFP]の胚を受精後 9 時間で 4%PFA で固定した。In Situ Cell Death Detection Kit, POD(Roche, Mannheim, Germany)を用い死細胞を標識した後、Alexa Fluor 647-Tyramide Signal Amplification Kit)を使用し、シグナルの増長をした。その後、GFP 抗体を用いた免疫染色を行った。

統計解析

有意差検定はスチューデントの t テストを用いて行う。結果には標本標準誤差のエラーバーをつけた。3 群間の検定が必要な細胞移動の速度については Anova 法により検定した。

結果

Celf1 は内胚葉由来の器官形成に關与する

celf1 KD 胚において、心臓の左右非対称性が変化していたことから(Matsui et al., 2012)、同様に左右非対称性を示す内胚葉に由来する器官である肝臓や膵臓、腸管でも左右非対称性が変化することが予想された。これを検証するため、内胚葉細胞を GFP で標識する *Tg[sox17:GFP]* (Mizoguchi et al., 2008) に *celf1* に対するモルフォリノオリゴ(MO)をインジェクションし内胚葉由来器官の形成について調べた。受精後 48 時間の胚において、control 胚では肝臓は腸管の左側に、膵臓は右側に形成され、腸管は左側に湾曲した構造をとる(Field et al., 2003a; Field et al., 2003b; Matsui and Bessho, 2012) (Fig.7G)。しかし、予想外なことに *celf1* KD 胚では肝臓の位置に見られる GFP シグナルが欠損し、膵臓の位置に見られる GFP シグナルは減少していた。さらに、腸管は湾曲構造が見られず、直線的に形成されていた(Fig.7H,I)。腸管が直線的になる表現型は左右非対称性が崩れたためと考えられるが、肝臓、膵臓の形成不全は左右非対称性が崩れた表現型として報告されている例とは一致しない(Leung et al., 2008; Matsui and Bessho, 2012)。これらの結果は、ゼブラフィッシュの *celf1* は左右差規定だけでなく内胚葉由来の器官形成においても役割を持つことを示唆している。

Celf1 の内胚葉に由来する器官形成への役割を調べるため、内胚葉由来の器官全体マーカーである(*forkhead box A3*, *foxa3*)と肝臓原基マーカー(*ceruloplasmin*, *cp*)、膵臓β細胞マーカー(*preproinsulin*, *ins*)の発現を Whole mount *In situ* hybridization (WISH)法を用いて調べた(Fig.8)。 *celf1* KD 胚における *Tg[sox17:GFP]*を用いた実験で得られた結果と同様に、前側腸管と肝臓が約 80%の胚において消失しており、残りの 20%の胚においても形成不全が認められた(Fig.8A-F)。また、control 胚においてβ細胞を示すシグナルは1つのクラスターを形成するが、 *celf1* KD 胚では約 55%の胚において2つ、または3つの集団を形成していた(Fig.8G-I)。これらの結果は *celf1* が内胚葉由来器官の正確な形成に重要であることを示している。

Celf1 は原腸陥入期に内胚葉細胞で発現する

celf1 が発生過程のどの時期に内胚葉由来器官の形成に關与するかを調べるため、発生過程における *celf1* の発現パターンを WISH 法により調べた(Fig.9)。Celf1 は母性因子であることが知られており(Hashimoto et al., 2006; Matsui et al., 2012; ZFIN, 2001)、Celf1 は受精卵から内胚葉の形成が始まる原腸陥入期(受精後 6~9 時間)までは胚全体で発現している(Fig.9A,B)。その後、体節形成期(受精後 10 時間~)以降の胚において *celf1* は体節や水晶体、胸びれなどの組織や器官に特異的に発現しているが内胚葉由来の器官には存在しなかった。(Fig.9C-F)。このため、

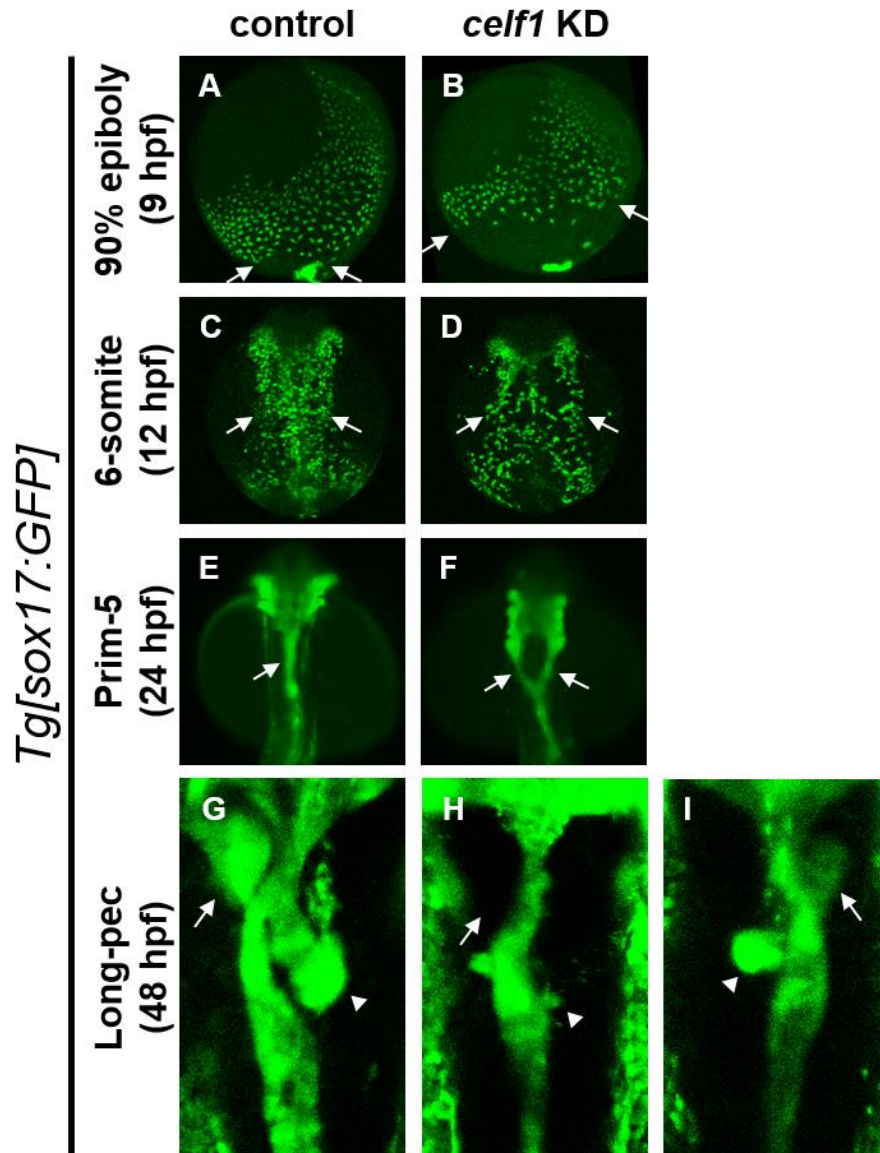


Fig.7 *celf1* のノックダウン(KD)は内胚葉由来の器官形成に欠損を引き起こす
 (A-D) *Tg[sox17:GFP]*における受精後9時間胚の側面像(lateral view)(A,B)。受精後12時間胚の中洞領域における内胚葉細胞の集合(C,D)。 *celf1* KD 胚では GFP 陽性な内胚葉細胞の正中線方向への移動が遅れていた。A,B と C,D における矢印は内胚葉細胞の尾部または側面端をそれぞれ示している。(E,F) *Tg[sox17:GFP]*の受精後24時間胚における咽頭と前腸部の内胚葉細胞の形成。背面像(Dorsal view)。 *celf1* KD 胚において前腸部(矢印)が分断し、Y字型の腸管が形成されていた。(G-I)受精後48時間における *Tg[sox17:GFP]*胚の中洞領域。 *celf1* KD 胚では肝臓(矢印)のシグナルが消失し、膵臓(矢頭)のシグナルは縮小していた。また、 *celf1* KD 胚においては内胚葉由来の器官形成に対する欠損だけでなく左右非対称性も乱れていた。

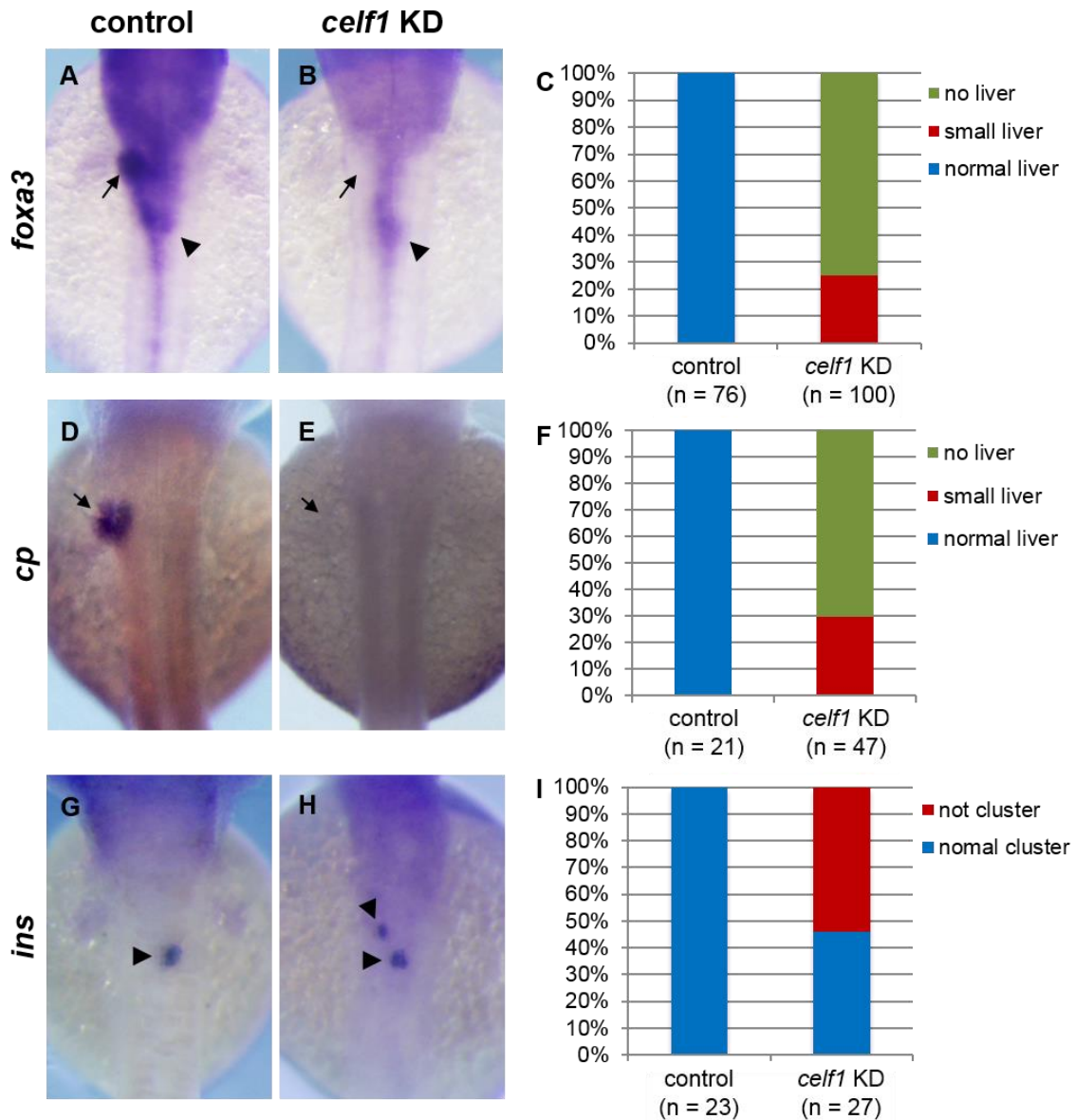


Fig.8 *celf1* KD 胚における内胚葉由来器官の形成不全

foxa3(内胚葉に由来する器官)、*cp*(肝臓)、*ins*(膵臓内のβ細胞)の発現を受精後48時間の*celf1* KD 胚にて調べた。*celf1* KD 胚において*foxa3*の発現は前腸部において特に減少していた(A-C)。さらに、*celf1* KD 胚において肝芽の形成は見られず(D-F、矢印)、膵臓内のβ細胞はひとつのクラスターを形成していなかった(G-H、矢頭)。

celf1 は内胚葉の形成を原腸陥入期に制御しており、内胚葉由来の器官形成に影響を与えると考えた。

Celf1 は原腸陥入期において内胚葉細胞の増殖を制御する

この仮説を検証するため、*Tg[sox17:GFP]*を用いて*celf1* KD 胚の原腸陥入期にお

ける内胚葉細胞のふるまいを観察した。原腸陥入初期(受精後 6 時間)の control 胚において内胚葉細胞は胚盤周縁部の周りにごま塩状(salt-and-pepper pattern)に出現する(Fig.7A)。その後原腸陥入後期(受精後 9 時間)までに、分裂を伴いながら正中線方向へ移動し、シート状の内胚葉組織を形成する(Fig.7C)。しかし、*celf1* KD 胚において内胚葉細胞の数が control 胚と比べて減少していること、また正中線方向への移動が遅れているように見えた(Fig.7B,D)。

そこで、*celf1* KD 胚において内胚葉細胞の数が減少しているのかを検証するため、内胚葉マーカーである *sox32* に対する WISH を行い、内胚葉細胞の数を計測した(Fig.10A-D)。原腸陥入初期において内胚葉細胞の数は control 胚で 227 (±24) 個、*celf1* KD 胚では 236(±26)個とほとんど違いはなかった。一方で原腸陥入後期においては control 胚で 423(±18)個であったのに対して *celf1* KD 胚では 340(±59)個と *celf1* KD 胚において有意に減少していた(Fig.10E)。この結果から、*celf1* KD 胚では内胚葉細胞への特異化/出現は正常に起こるが、その後の細胞数の増加が起こらないことが示唆された。

細胞数の増加は細胞増殖または細胞死の抑制によるので、*celf1* KD 胚では内胚葉細

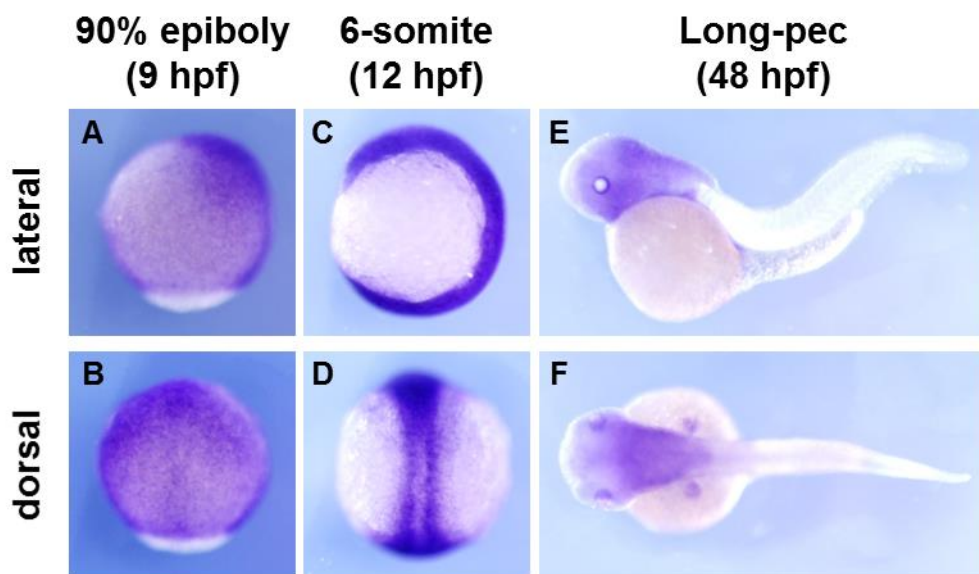


Fig.9 ゼブラフィッシュ胚における *celf1* 発現パターン

(A-F)WISH 法による *celf1* の発生ステージごとにおける発現パターン。側面像(lateral view) (A,C,E)と背面像(Dorsal view) (B,D,F)。(A,B)受精後 9 時間胚においてドット状のシグナルが見られた。このパターンは原腸陥入期での内胚葉細胞の配置と一致する。(C,D)受精後 12 時間胚では体節にシグナルが見られ、内胚葉細胞の位置に *celf1* のシグナルは見られなかった。(E,F)受精後 48 時間において、*celf1* の発現は胸びれ、水晶体に見られたが、内胚葉由来器官ではシグナルが見られなかった。

胞の細胞増殖低下または細胞死の増大が起こっていると考えられる。これを検証するために、*Tg[sox17:GFP]*を用いたタイムラプス動画において細胞死、または細胞増殖の特徴を示す細胞の数を計測した。GFP 陽性の細胞が断片化することが細胞死のサインとして考えられる(Matsui et al., 2011)が、control 胚と *celf1* KD 胚において細胞の断片化はほとんど見られなかった(Table1)。また、本当に細胞死を引き起こした細胞がないのかを確かめるため、*Tg[sox17:GFP]*の原腸陥入後期(受精後 9 時間)胚を用いた TUNEL 法を行い、内胚葉細胞における細胞死のシグナルが現れる割合を調べたところ、GFP のシグナルと TUNEL のシグナルが共局在する細胞はほとんど見られなかった(Fig.10F)。以上の結果から、*celf1* は細胞死には関与しないことがわかった。一方で、細胞分裂の回数は control 胚において 27.77(±3.72)回/h であったのに対

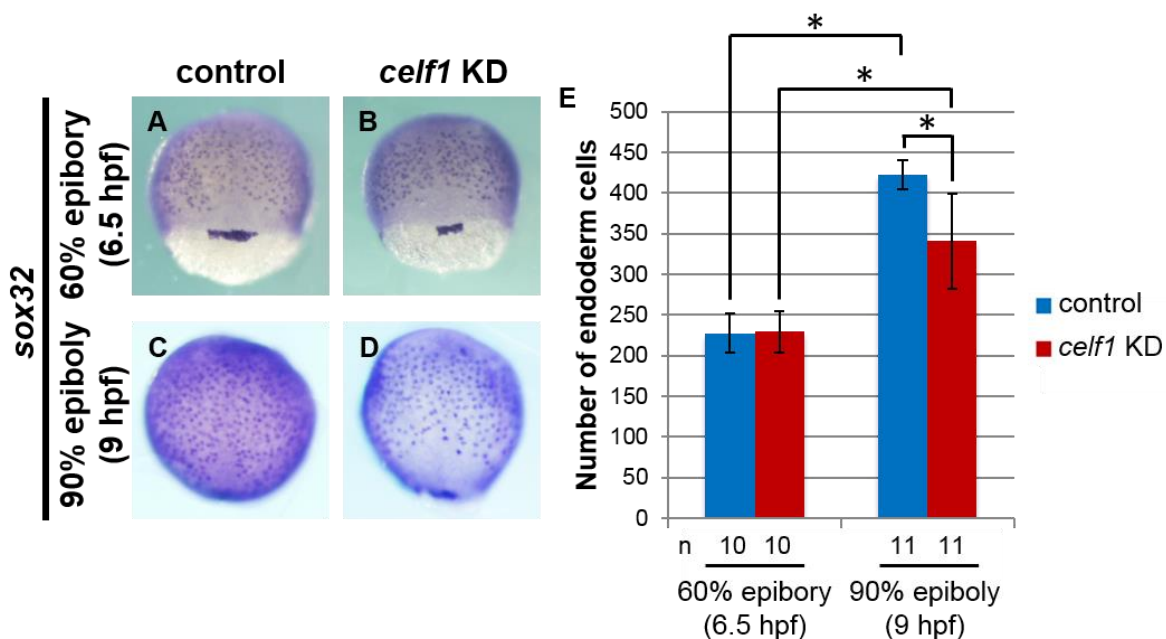
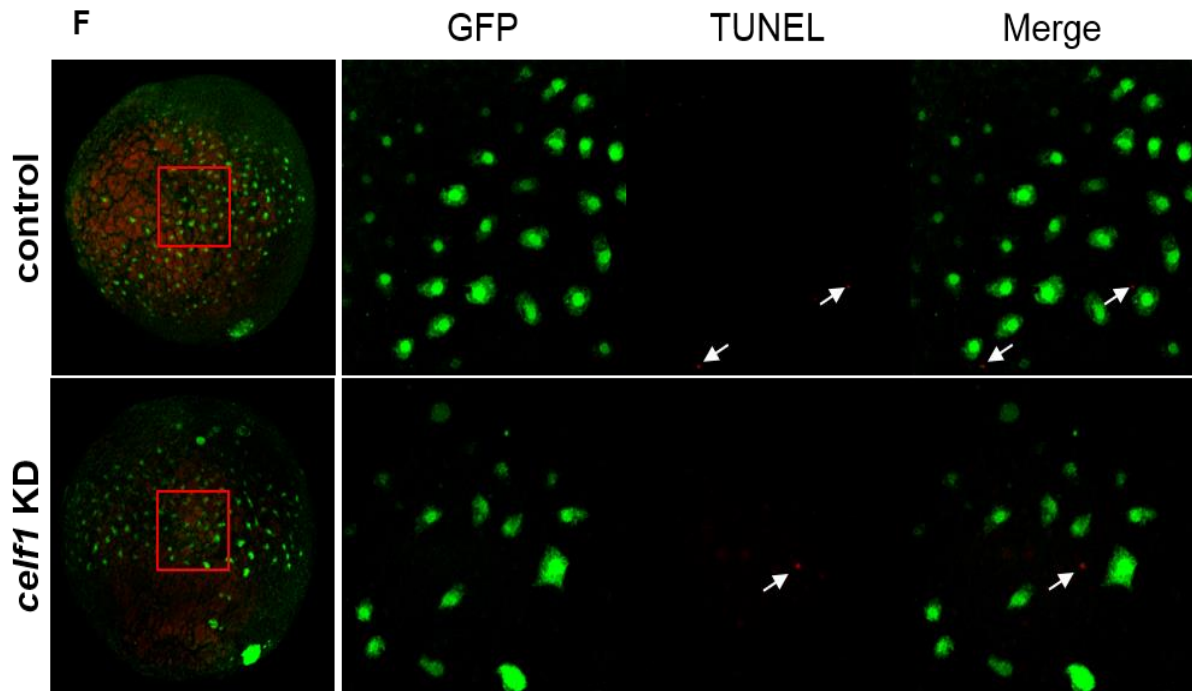


Fig.10 *celf1* は原腸陥入期において内胚葉細胞の増殖を制御する。

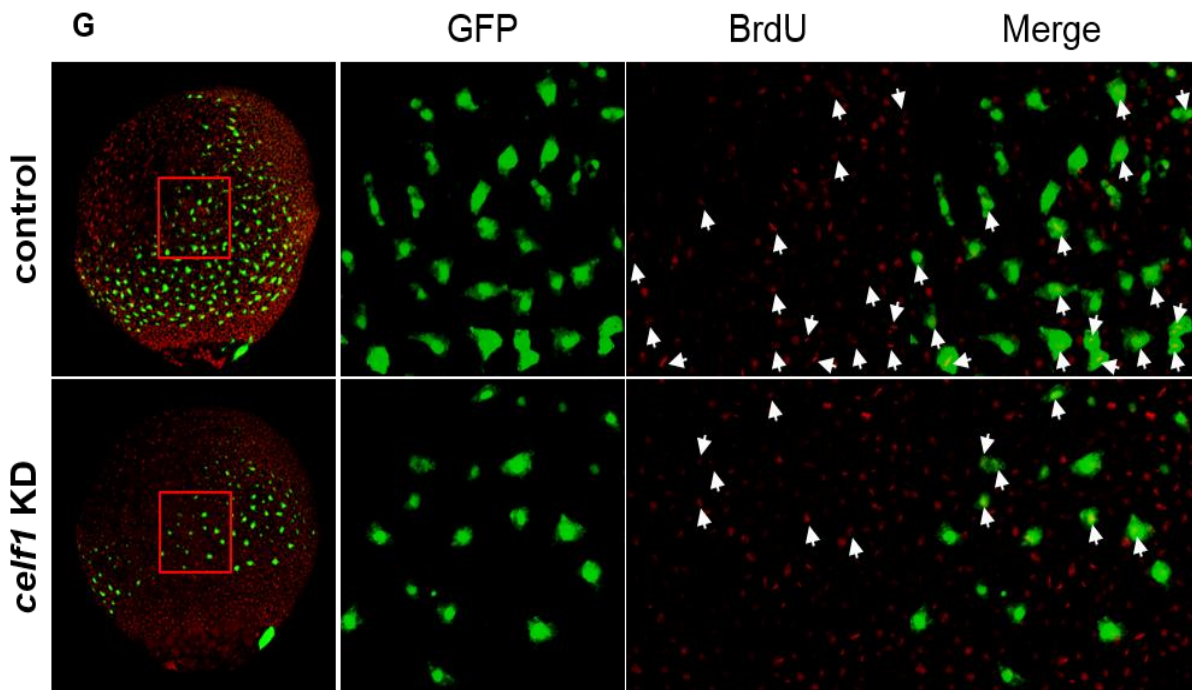
(A-D)control 胚と *celf1* KD 胚における受精後 6.5 時間と受精後 9 時間の内胚葉細胞マーカーである *sox32* の発現パターン。(E)内胚葉細胞の数は受精後 6.5 時間では違いはなかったが、受精後 9 時間においては *celf1* KD 胚において細胞数の減少が見られた。(* p<0.05)

(F)原腸陥入後期胚における細胞死。受精後 9 時間の *Tg[sox17:GFP]*胚を用いて TUNEL assay を行った。緑のシグナルは GFP 陽性の内胚葉細胞、赤のシグナルは TUNEL 陽性細胞を示している。右側のパネルは左側パネル内の赤四角で示す範囲を高倍率に撮影したものである。矢印は TUNEL シグナルを示す。TUNEL シグナルは control 胚、*celf1* KD 胚のどちらでも観察されたが、内胚葉細胞とシグナルが共局在するものはほとんどなかった。

(G)原腸陥入期胚における細胞増殖。受精後 9 時間の *Tg[sox17:GFP]*胚を用いて BrdU 染色を行った。緑のシグナルは GFP 陽性の内胚葉細胞、赤のシグナルは BrdU 陽性細胞を示している。右側のパネルは左側パネル内の赤四角で示す範囲を高倍率に撮影したものである。矢印は BrdU シグナルと GFP シグナルが共局在している細胞を示す。BrdU 陽性内胚葉細胞の数は *celf1* KD 胚において有意に減少していた。



Embryo	n	TUNEL positive cells	GFP positive cells	TUNEL / GFP
control	7	0	142	0%
<i>celf1</i> KD	10	0	187	0%



Embryo	n	BrdU positive cells	GFP positive cells	BrdU / GFP
control	9	154	339	45.4%
<i>celf1</i> KD	9	74	211	35.1%

Table 1. Frequency of cell death and division

Embryo	Cell death (times/h)	Cell division (times/h)
Control (n = 3)	0.11 ± 0.16	27.77 ± 3.72
<i>celf1</i> KD (n = 4)	0 ± 0	17.00 ± 3.32 *

* : Control胚と*celf1* KD胚の間において有意差(p<0.05)が見られた

し *celf1* KD 胚においては 17.00(±3.32)回/h と *celf1* KD 胚において減少していた (Table1)。また、実際に細胞分裂を経験した細胞を調べるため、原腸陥入初期に BrdU を胚にインジェクションし、原腸陥入後期において BrdU の取り込まれている細胞の割合を調べた。原腸陥入期において BrdU の取り込みが行われた細胞の割合は、control 胚では 45.4%の GFP 陽性細胞で BrdU のシグナルが見られたのに対して *celf1* KD 胚では 35.1%と有意に減少していた。これらの結果から、*celf1* は原腸陥入期の細胞増殖を制御することで内胚葉細胞の数を調節することがわかった (Fig.10G)。

Celf1 は原腸陥入期における内胚葉細胞の移動を制御する

原腸陥入期のタイムラプスから、*celf1* KD 胚において内胚葉細胞の移動が遅れているように見られたことから、原腸陥入期における GFP 陽性内胚葉細胞の移動を追跡した。タイムラプスから内胚葉細胞が移動した軌跡を描いた。control 胚ではジグザグ型に進行方向を変えながら正中線方向へ向かう軌跡が見られたが、*celf1* KD 胚では正中線方向へ向かうものの、control 胚と比べ短く、直線的な軌跡が見られた。また、80 分間あたりの移動距離からその全長から平均速度を測定すると、内胚葉細胞の速度は control 胚において 2.04(±0.18)µm/min であったのに対し、*celf1* KD 胚では 1.28(±0.16)µm/min と移動速度の減少が見られた。このことから、*celf1* は原腸陥入期の内胚葉細胞の移動速度を制御することが示唆された (Fig.11A,B,D)。

細胞移動は、糸状仮足や葉状仮足といった細胞仮足が伸長・収縮を繰り返すことで起こる。*celf1* KD 胚では内胚葉細胞の移動に異常が見られたことから、Celf1 は細胞仮足形成に関与する可能性が考えられる。これを検証するため、細胞仮足の主な構成タンパクである F-actin を標識する Lifeact-RFP を内胚葉細胞において発現するトランスジェニックライン *Tg[sox17:Lifeact-RFP]* を作成し、*celf1* KD 胚において仮足形成に影響があるのかを調べた。まず、受精後 8 時間のステージにおいて *celf1* KD 胚における糸状仮足・葉状仮足の本数を数えたところ、control 胚においては 1 細胞あたり 3.19(±1.17)本形成されていたのに対し、*celf1* KD 胚においては 1 細胞あたり 5.99(±1.81)本と *celf1* KD 胚において細胞仮足の形成が増加していた (Table2)。また、control 胚では進行方向と一致した方向に糸状仮足と葉状仮足が多く形成される

(Fig.12A,B)のに対し、*celf1* KD 胚においては仮足形成の方向性が乱れているように見えた(Fig.12C,D)。これらの結果から、*celf1* KD 胚では内胚葉細胞の仮足形

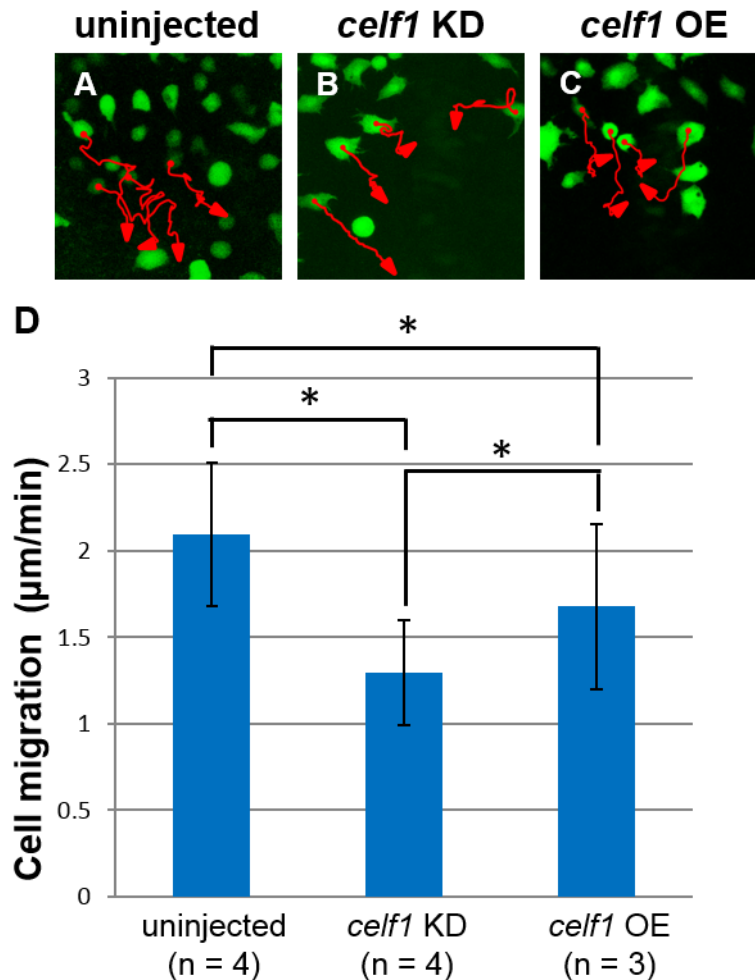


Fig.11 *celf1* は原腸陥入期において内胚葉細胞の移動を制御する。

(A-C)80分間のタイムラプスにおける uninj(A)、*celf1* KD(B)、*celf1* overexpression(OE)(C)胚の内胚葉細胞の軌跡。細胞の位置は2分毎に計測された。(D)uninj(n = 4)、*celf1* KD(n = 4)、*celf1* OE(n = 3)胚における内胚葉細胞(n = 58, 59, 50)の移動。*celf1* KD 胚における内胚葉細胞の移動速度は uninj 胚より減少していた。

成が促進されたことにより内胚葉細胞の速度が遅くなったと考えている。

また、発生が進んだ受精後12時間の胚において *celf1* KD 胚の内胚葉組織は control 胚よりも広い範囲で形成されていた(Fig.7D)。更に発生が進んだ受精後24時間の胚において、control 胚では直線状の腸管が形成されるのに対し、*celf1* KD 胚においては前側腸管の融合が阻害されY字型の腸管が形成されていた(Fig.7E,F)。これは *celf1* KD 胚において内胚葉細胞の *celf1* KD 胚で見られた内胚葉細胞の集合に遅れが出たものと考えられる。これらの結果は、*celf1* が内胚葉細胞の移動を制御することで後

の器官形成に役割を持つ可能性を示している。以上の結果から、*celf1* は原腸陥入期の内胚葉細胞において、細胞増殖と移動を制御することで正確な器官形成を促す因子

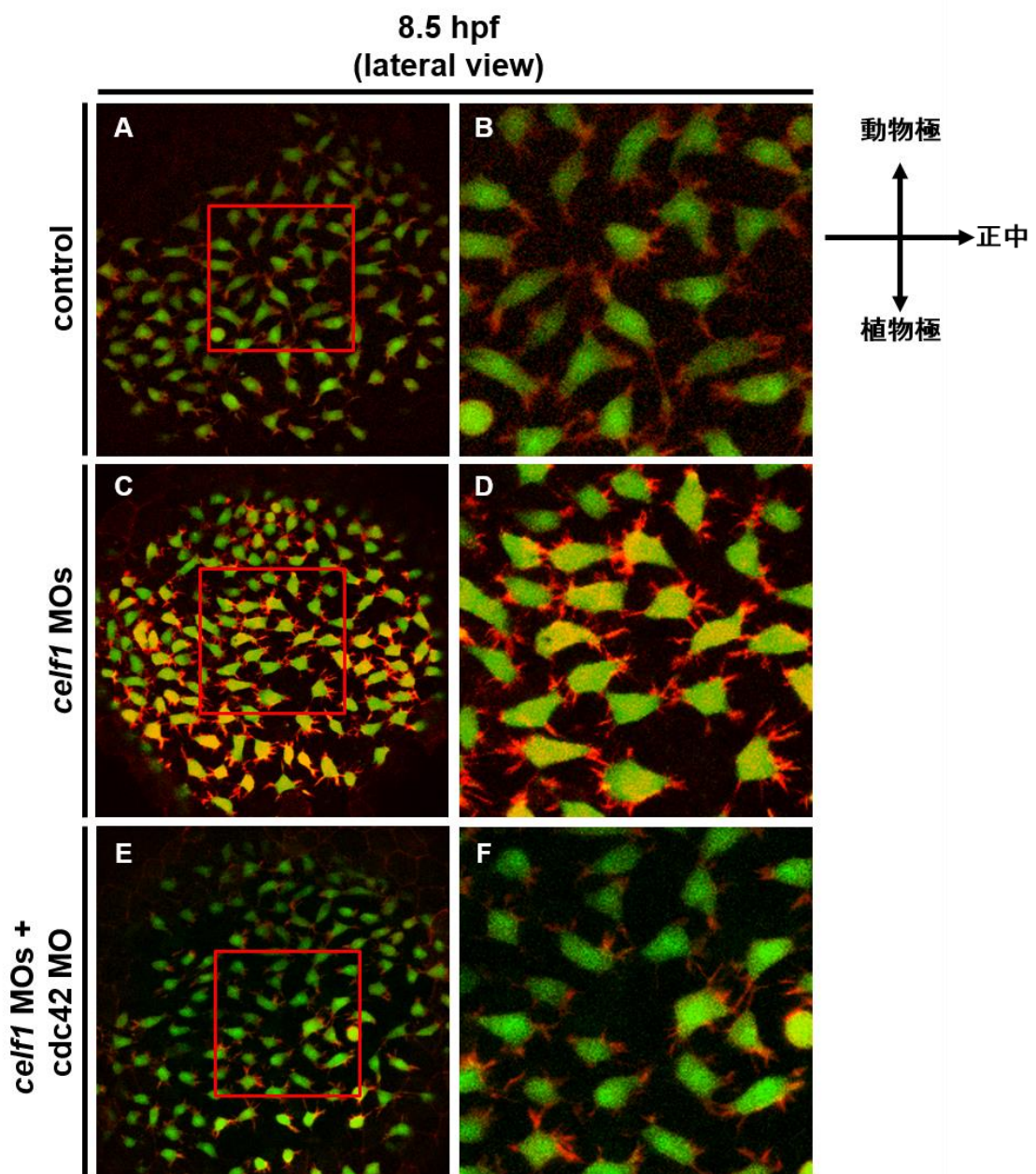


Fig.12 *celf1* は細胞仮足の数と方向性を制御する。

(A-F) control(n = 3)(A,B)、*celf1* MOs(n = 3)(C,D)、*celf1* MOs + *cdc42* MO(n = 3)(E,F)胚における内胚葉細胞(n = 63, 76, 66)における細胞仮足の形成(赤いシグナル)。(B,D,F)は(A,C,E)における赤四角を拡大した。

Table 2. 細胞の仮足形成

Embryo	n	Total cell	細胞仮足(本/cell)
control	3	63	3.19±1.17
<i>celf1</i> MOs	3	76	5.99±1.81 *
<i>celf1</i> MOs + <i>cdc42</i> MO	3	66	3.77±1.30

* : control胚と*celf1* KD胚の間において有意差(p<0.05)が見られた

であることが示唆された。

Celf1 は *gata5* と *cdc42* の転写後調節を行う

これまでの結果から、*celf1* は原腸陥入期において内胚葉細胞の増殖または移動に関わる因子を転写後調節することで後の器官形成に関わると考えられる。そこで *celf1* がどのようなメカニズムで内胚葉由来の器官形成に役割を持つのかを明らかにするため、Celf1 の転写後調節のターゲットとなり得る遺伝子を調べた。Celf1 は 3'UTR に存在する UG-rich な配列または UGU repeat に強い親和性を持つことが過去に報告されており、SELEX 法を用いた解析から 35bp の間に UGU repeat を少なくとも 4 つ以上もつ配列と結合することが報告されている。(Barreau et al., 2006; Vlasova-St Louis and Bohjanen, 2011; Vlasova-St Louis et al., 2013; Matsui et al., 2012)。そこで、このような標的候補配列を持ち、かつ内胚葉の細胞増殖または細胞移動に関与する遺伝子をデータベース上から検索した。その結果、転写因子 *gata5*(*gata-binding protein 5*)、と Rho ファミリーG タンパク *cdc42* を見つけた(Fig.13A)。

gata5 はゼブラフィッシュ内胚葉の増殖を制御する因子(Li et al., 2011; Reiter et al., 1999)で、3'UTR に U-rich な配列と 5 つの UGU repeat をもつ。また細胞移動に関わる因子として Rho ファミリーG タンパク (Rho, Rac, Cdc42) は中内胚葉の収斂伸長を制御することが知られており(Roszko et al., 2009)、特に Rac と *cdc42* はハエの発生において中腸細胞の移動に関わることが報告されている(Martin-Bermudo et al., 1999)。Rho ファミリーG タンパクの中で、*cdc42* のみが Celf1 の標的配列の候補である UGU repeat を 10 個持っていた(Fig.13A)。

次に、上記標的候補遺伝子の mRNA が生体内で Celf1 と結合するかを調べるため、Celf1 抗体を用いた RIP assay を行った。Celf1 抗体と反応させたサンプルにおいて RT-PCR を行った結果、*gata5* と *cdc42*、のレーンでは control の抗体を用いたサンプルに比べ有意に強いバンドが得られた。その一方で Celf1 の標的となる配列を持たない *ccna1* については、control 抗体作用条件、Celf1 抗体作用条件のどちらでも特異

的なバンドを得られなかった(Fig.13B)。これらの結果から *gata5* と *cdc42* の mRNA は Celf1 と結合することがわかった。

さらに、これらの標的候補遺伝子が Celf1 から *in vivo* で転写後調節を受けているかを調べるため、*celf1* KD 胚においてそれぞれの遺伝子の発現レベルを qPCR により定量した。その結果、*celf1* KD 胚では control 胚と比較して、*gata5* は 23%、*cdc42* は 39% の mRNA 量がそれぞれ増加していた(Fig.13C)。これらの結果は Celf1 が *gata5* と *cdc42* の mRNA の減衰に機能を持つことで内胚葉由来の器官形成を制御することを示唆している。

これまでの結果から、Celf1 は *gata5*、または *cdc42* を転写後調節することで原腸陥入期における細胞増殖と細胞移動を通して内胚葉形成に役割を持つと考えられる。また、qPCR の結果から *celf1* KD 胚において *gata5*、*cdc42* の mRNA 量が増加していたことから、両タンパクの発現量が増加したことが細胞増殖の減少、または細胞移動の遅延を引き起こし、のちの器官形成に影響を与えたことが示唆される。

celf1 KD 胚において内胚葉細胞の糸状突起形成が促進されていた(Fig.12C, Table2)ことから、糸状仮足の形成に重要な役割を持つ *cdc42* (Hall, 1998; Stanley et al., 2014) は原腸陥入期の内胚葉細胞移動における Celf1 の有力な標的候補であると考えられる。そこでここからは *celf1* を介した *cdc42* の転写後調節が内胚葉由来器官の形成へどのように影響するのかに注目した。

***celf1-cdc42* ダブル KD の条件検討**

celf1 KD 胚では *cdc42* の mRNA 量は上昇していた(Fig.13C)ことから *cdc42* タンパク量も上昇していることが示唆される。そこで *cdc42* に対する MO を作成し、*celf1* MOs と同時にインジェクション(*celf1-cdc42* ダブル KD)することで *celf1* KD 胚における Cdc42 タンパク量を特異的に引き下げることによって器官形成の欠損が改善されるのかを調べることにした。

今回作成した *cdc42* MO は、*cdc42* mRNA の翻訳開始点の周囲 25mer に特異的に結合する用に合成されており、Cdc42 タンパクの翻訳阻害を行う。まず、この *cdc42* MO が実際に機能するのかを確かめるため、Cdc42-GFP のフュージョンタンパクをコードするレポーターを作成し、*cdc42* MO がこのレポーター mRNA からの翻訳を阻害できるのかを検証した。その結果、control MO とレポーター mRNA をそれぞれ 2.5ng ずつ co-injection した胚においては強い GFP の発現が確認されたことに対して、*cdc42* MO とレポーター mRNA をそれぞれ 2.5ng ずつ co-injection した胚において GFP の蛍光量が殆ど見られなかった(Fig.14A)。また、*cdc42* MO を

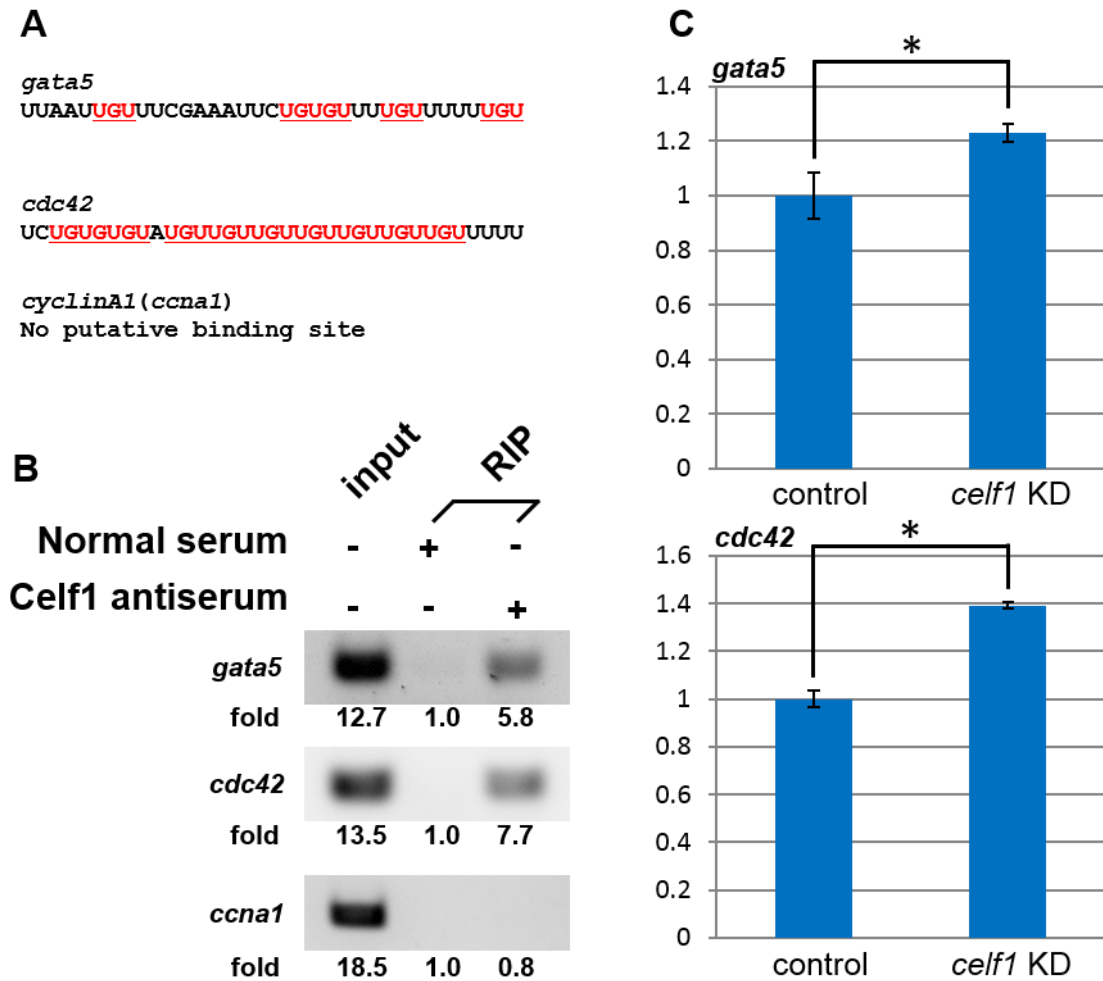


Fig.13 ゼブラフィッシュ胚において Celf1 は内胚葉の細胞増殖と細胞移動に関わる制御因子の mRNA に結合する。

(A)標的候補となる mRNA の 3'UTR における Celf1 結合可能配列。下線部は UGU repeat を示す。(B)RIP assay における Celf1 と標的 mRNA との特異的な結合。Celf1 は *gata5*、*cdc42* と結合するが、親和性のある配列を持たない *ccna1* とは結合しない。シグナル輝度は ImageJ により定量化し、normal serum と作用させた RIP サンプルにおけるシグナル輝度を 1.0 とした。(C)ゼブラフィッシュ胚における Celf1 の *gata5*、*cdc42* 発現量に与える影響。Total RNA は受精後 10 時間の control-MO または *celf1*-MOs をインジェクションした胚から採取し、*gata5*、*cdc42*、または *ccna1* に対して qPCR を行った。サンプルは *ccna1* をリファレンスとして基準化した。アスタリスクは優位に差があることを示している。(* $p<0.05$)

0.5ng、レポーターmRNAを2.5ng、それぞれ co-injection した胚においては GFP の蛍光が弱く確認されたことから、この MO は濃度依存的に Cdc42 の発現量を抑制できることを示している(Fig.14A)。

次に、*cdc42* KD が内胚葉由来器官に与える影響を調べるため、受精後 48 時間の *Tg[sox17:GFP]* を用いて器官形成の変化を調べた。*cdc42* MO を 0.5ng インジェクションした胚では control 胚と比べ内胚葉由来の器官形成にほとんど違いは見られなかった。一方で 2.5ng の *cdc42* MO をインジェクションした胚においては、左右差が乱れる表現型や、肝臓や前腸の形成不全などの表現型が見られた(Fig.14B)。

以上の結果から、2.5ng の *cdc42* MO インジェクション量がゼブラフィッシュ胚における *cdc42* KD に十分な量であることが考えられる。qPCR の結果から *celf1* KD 胚における *cdc42* の mRNA 量は 1.4 倍ほどに上昇していたことから、*celf1* KD 胚における Cdc42 の発現量をコントロール条件と同等にまで抑制させるためには *cdc42* の部分的な KD を行う必要がある。以上のことから *celf1-cdc42* ダブル KD の条件として 0.5ng の *cdc42* MO を *celf1* MOs と co-injection することにした。

Celf1 を介した *cdc42* の転写後調節は内胚葉の形成パターンを制御する

まず、原腸陥入期の *celf1-cdc42* ダブル KD 胚において *celf1* KD 胚で見られた内胚葉細胞の移動が改善されるのかを調べた。受精後 6 時間から 9 時間胚までのタイムラプスを撮影した結果、*celf1* KD 胚で遅れていた内胚葉細胞の集合がダブル KD 胚では改善されていた(Fig.15A-F)。また、*celf1-cdc42* ダブル KD 胚における原腸陥入期の内胚葉細胞における細胞仮足形成について *Tg[sox17:Lifeact-RFP]* 胚を用いて調べた。その結果、1 細胞あたりの細胞仮足は $3.77(\pm 1.30)$ 本と control 胚と同等の状態までに改善されていた(Fig.12E,F,Table2)。この結果は Celf1 を介した *cdc42* の転写後調節が原腸陥入期の内胚葉細胞の細胞仮足形成を通して内胚葉細胞移動に役割を持つことを示唆している。

Celf1 を介した *cdc42* の転写後調節は膵臓の形成に役割を持つ

肝臓原基細胞と膵臓原基細胞が出現する受精後 16 時間の胚において内胚葉組織の形成パターンについて調べた。control 胚では内胚葉細胞の集合は完了し、一枚のシート上に内胚葉組織期が形成されていた(Fig.16A)。しかし、*celf1* KD 胚では細胞の集合が完了しておらず、シート状の内胚葉が分断されて形成されていた(Fig.16B)。その一方で *celf1-cdc42* ダブル KD 胚では、後に肝臓が形成される 1 つめの体節の位置では内胚葉細胞の集合が完了していない一方で、膵臓が将来形成される 4 つめ体節の位置では内胚葉細胞の集合が完了している様子が見られた(Fig.16C)。また、受精後 48

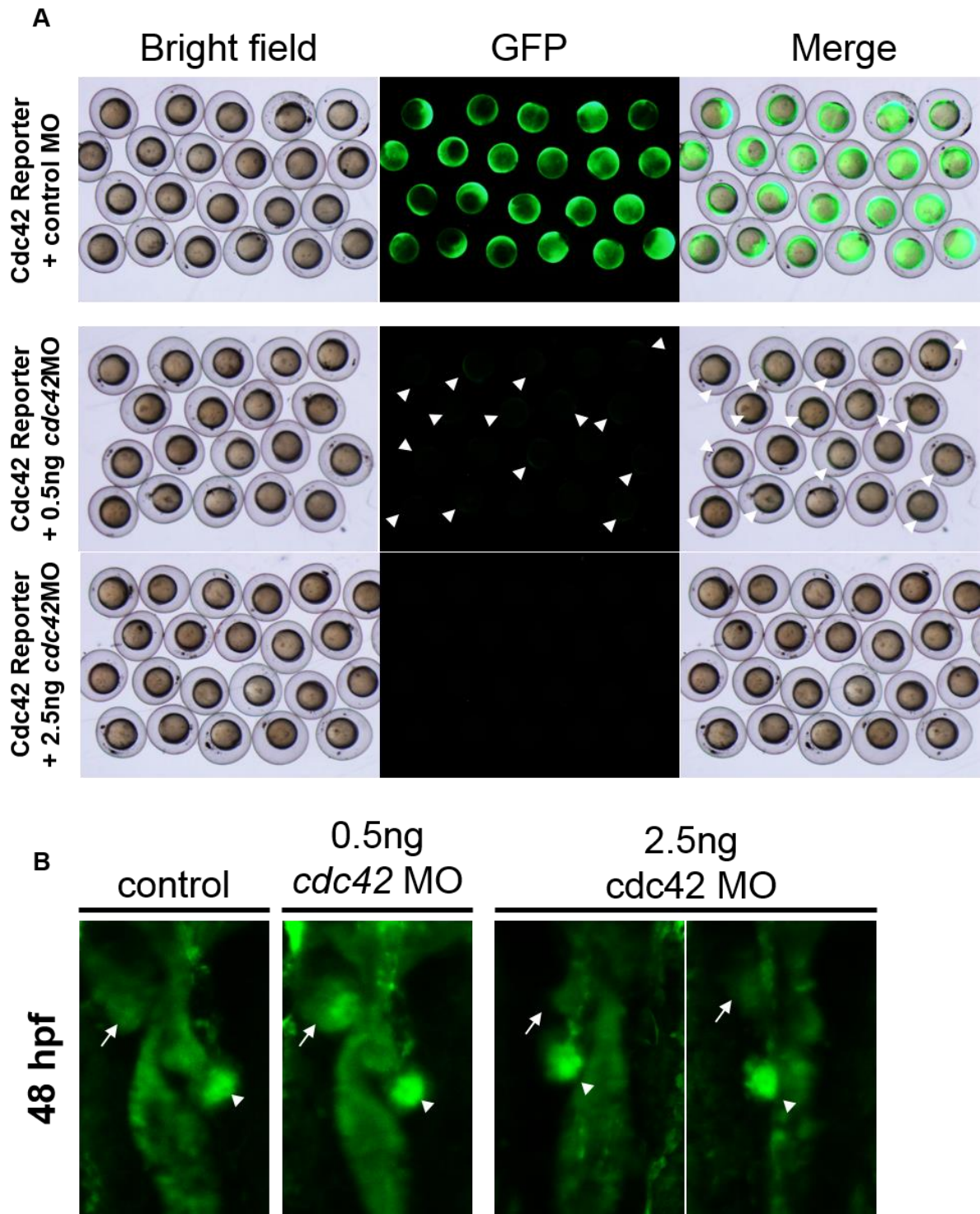


Fig.14 *cdc42* MO の機能解析

(A) Cdc42-GFP レポーターを作成し、濃度条件を振り分けた *cdc42* MO と co-injection した。0.5ng *cdc42* MO をインジェクションした胚では弱く GFP の蛍光が確認された(矢頭)が、2.5ng *cdc42* MO をインジェクションした胚では GFP の蛍光は全く見られなかった

(B) *cdc42* KD による内胚葉由来器官の表現型。0.5ng *cdc42* MO をインジェクションした胚では目立った表現型は見られなかったが、2.5ng の *cdc42* MO をインジェクションした胚では肝臓(矢印)や前腸の形成不全や膵臓(矢頭)の縮小、左右差が乱れるといった表現型を示した。

時間胚において肝臓(*cp*)または膵臓マーカー(*ins*)の発現パターンを WISH 法により調べたところ、肝臓に関しては *celf1* KD 胚において見られたマーカーシグナルの欠損が *celf1-cdc42* ダブル KD 胚においても同様の割合で見られた(Fig.15A-D)。それに対し、膵臓マーカーの発現パターンは *celf1* KD 胚において 55%の胚で2つまたは3つの集団で見られたことに対し、*celf1-cdc42* ダブル KD 胚では 98%の胚でひとつの集団を形成していた(Fig.17E-H)ことから、*celf1* KD 胚において見られた表現型が改善されていた。この結果は、Celf1 を介した *cdc42* の転写後調節は少なくとも膵臓の形成について重要な役割を持つことが示唆している。

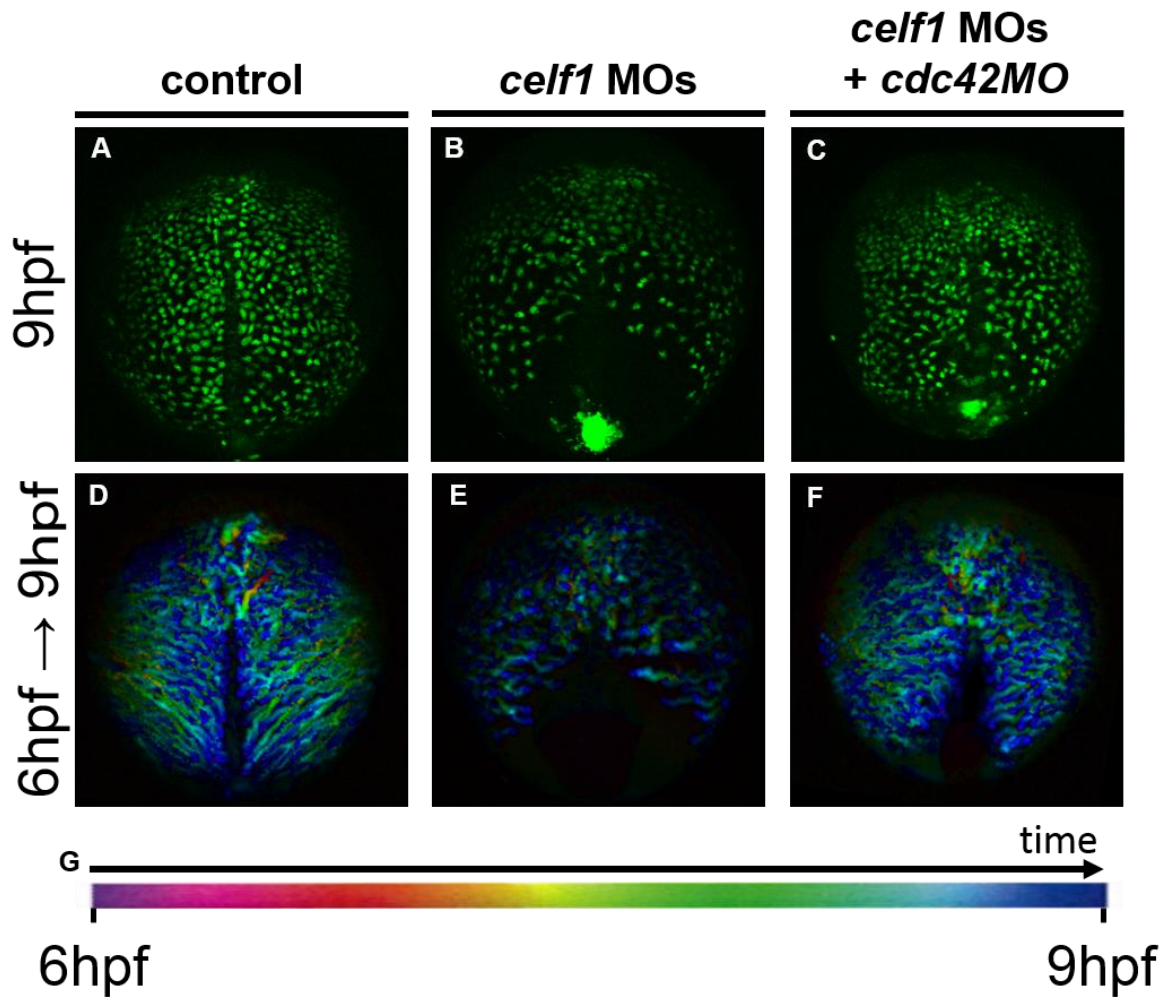
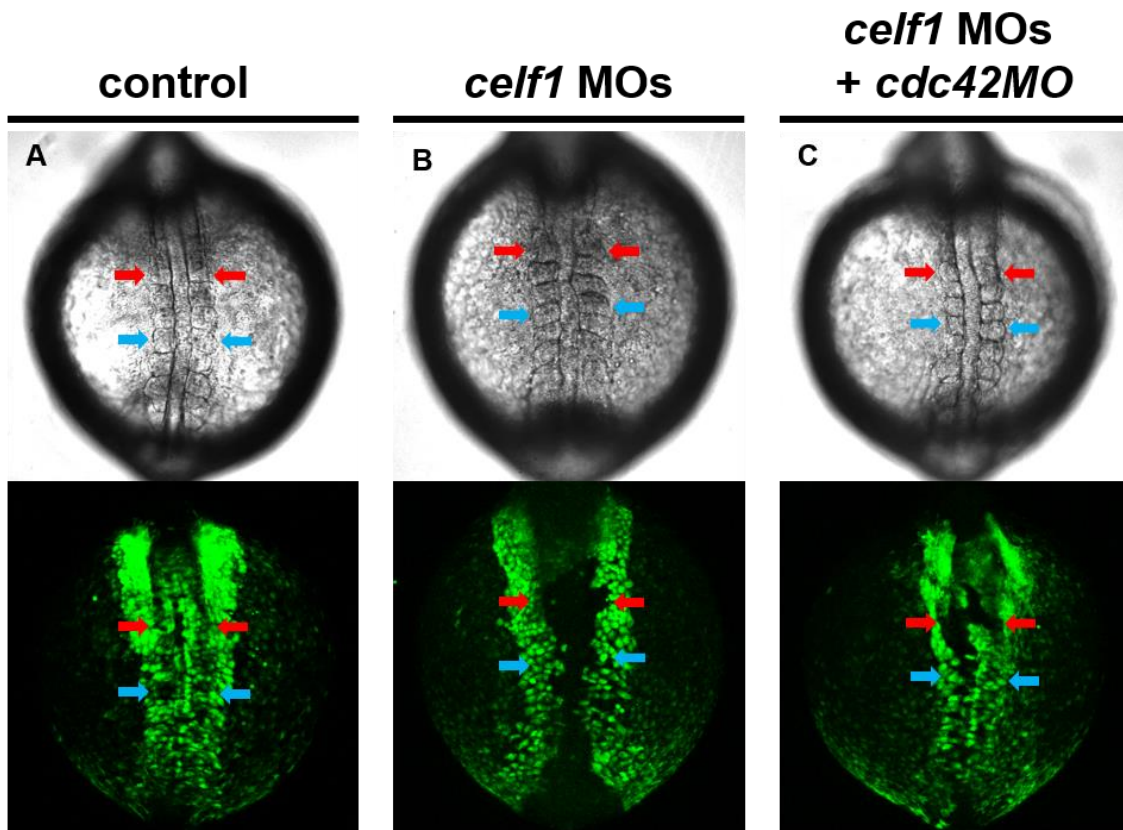


Fig.15 *celf1-cdc42* ダブル KD 胚では内胚葉細胞の集合が改善する

(A-C)受精後9時間胚における control(A)、*celf1* KD(B)、*celf1-cdc42* ダブル KD(C)胚における内胚葉細胞の集合。(D-F)受精後6時間から9時間胚における内胚葉細胞の移動を一枚にまとめた。一本の線がひとつの細胞の移動軌跡を示す。軌跡の色の変化は(G)のカラーバーが示す時間変化と対応している。



→ ←:

1st somite (liver position in the future)

→ ←:

4th somite (pancreas position in the future)

Fig.16 *celf1-cdc42* ダブル KD 胚では内胚葉形成の一部に改善が見られる。

(A-C)受精後 16 時間胚における内胚葉組織の形成。control(A)、*celf1*KD(B)、*celf1-cdc42* ダブル KD(C)。*celf1-cdc42* ダブル KD 胚では、将来肝臓が形成される位置(赤矢印)では内胚葉細胞の集合が改善されないものの、膵臓が形成される位置(青矢印)では細胞集合が完了している。

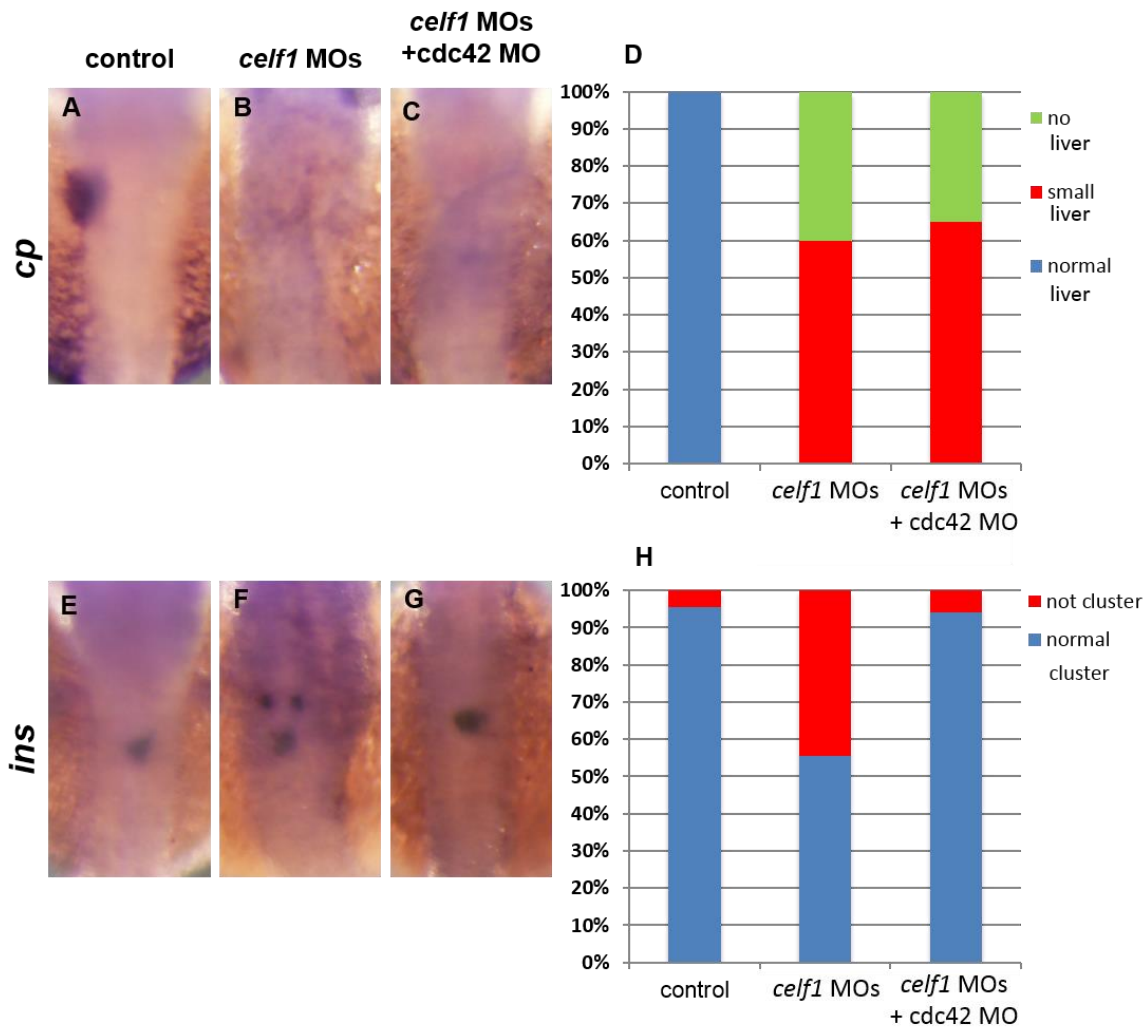


Fig.17 Celf1 を介した *cdc42* の転写後調節は膵臓の形成に重要である。

(A-H) *celf1-cdc42* ダブル KD 胚での肝臓(A-D)と膵臓(E-H)の形成。 *celf1-cdc42* ダブル KD 胚では肝臓が欠損する表現型に改善は見られなかった(D)が、膵臓についてはほとんどの胚が control 胚と同様に 1 つの集団を形成した(H)

考察

Celf1 は原腸陥入期における内胚葉の細胞移動・細胞移動を制御する

発生過程を追って、発現パターンを調べてみると、Celf1 は母性因子として発現するため(Hashimoto et al., 2006; Matsui et al., 2012; ZFIN, 2001)、原腸陥入期までは胚全体で *celf1* の発現し、その後、体節形成期以降の胚において *celf1* は体節や水晶体、胸びれなどの組織や器官に特異的な発現することが分かった(Fig.9)。 *celf1* KD 胚の表現型と発現パターンの解析結果から、Celf1 は胚全体で発現する原腸陥入期に機能していると考えられる。この考えは、*celf1* KD 胚で、原腸陥入期に内胚葉細胞の移動や細胞の形態変化が起こること(Fig.7,12)、内胚葉細胞で発現する *gata5* が標的として同定されたこと(Fig.13)によってサポートされている。よって、原腸陥入期のゼブラフィッシュにおいて Celf1 は、内胚葉細胞の移動/増殖に関与することが示唆された。しかし、*celf1* KD 胚の解析では、MO はすべての細胞に供給されているため、Celf1 が内胚葉細胞自律的に機能するかは明らかにできていない。内胚葉細胞特異的なプロモーター(例えば、*sox17*)を用いて、RNAi やドミナントネガティブ型 Celf1 を発現させるなどの実験を行い、自律的な役割があるかを調べる必要があると考えている。

celf1 KD 胚では内胚葉細胞の移動に異常が見られたこと、また細胞突起の形成が増加し、さらに方向性にも乱れが見られたことから、Celf1 を介した転写後調節が細胞突起形成を制御することで内胚葉細胞移動が正常に行われることが示唆された。これを確かめるために、細胞突起の形成と細胞移動との関係性について調べた。実際に細胞が移動する方向は細胞突起が引き起こす引張力の総和として表せるのではないかと考えた。そこでまず、細胞体の中心から細胞突起の先端までの距離と方向をベクトルとして計測し (Fig.18A)、その総和が示す方向が実際の細胞移動と相関するのかを調べた。実際に細胞が移動した方向とベクトルの総和が示す方向の差 θ (Fig.18A)を計算しその頻度をまとめたところ、control 胚では相関があると考えられる $0^\circ < \theta < 20^\circ$ の範囲にピークが見られたが、 $20^\circ < \theta < 80^\circ$ の範囲にも多く分布が見られた(Fig.18B)。また、*celf1* KD 胚では $0^\circ < \theta < 20^\circ$ の範囲にピークは見られず、均等にばらつくような分布が得られた(Fig.18B)。これらの結果は、本研究で行った解析では突起形成と細胞移動についての関係性が低いことを示している。しかしながら、*celf1-cdc42* ダブル KD 胚では細胞突起形成の改善と内胚葉組織のパターン形成に改善が見られたことから *celf1* KD 胚で見られた内胚葉細胞の移動の遅延が突起形成の増加による可能性は完全に否定出来ず別の視野からの解析が必要なのではないかと考えている。例えば、*celf1* KD 胚で見られた増加した細胞突起の中には細胞移動に関与しないものが含まれている可能性がある。細胞移動には突起形成

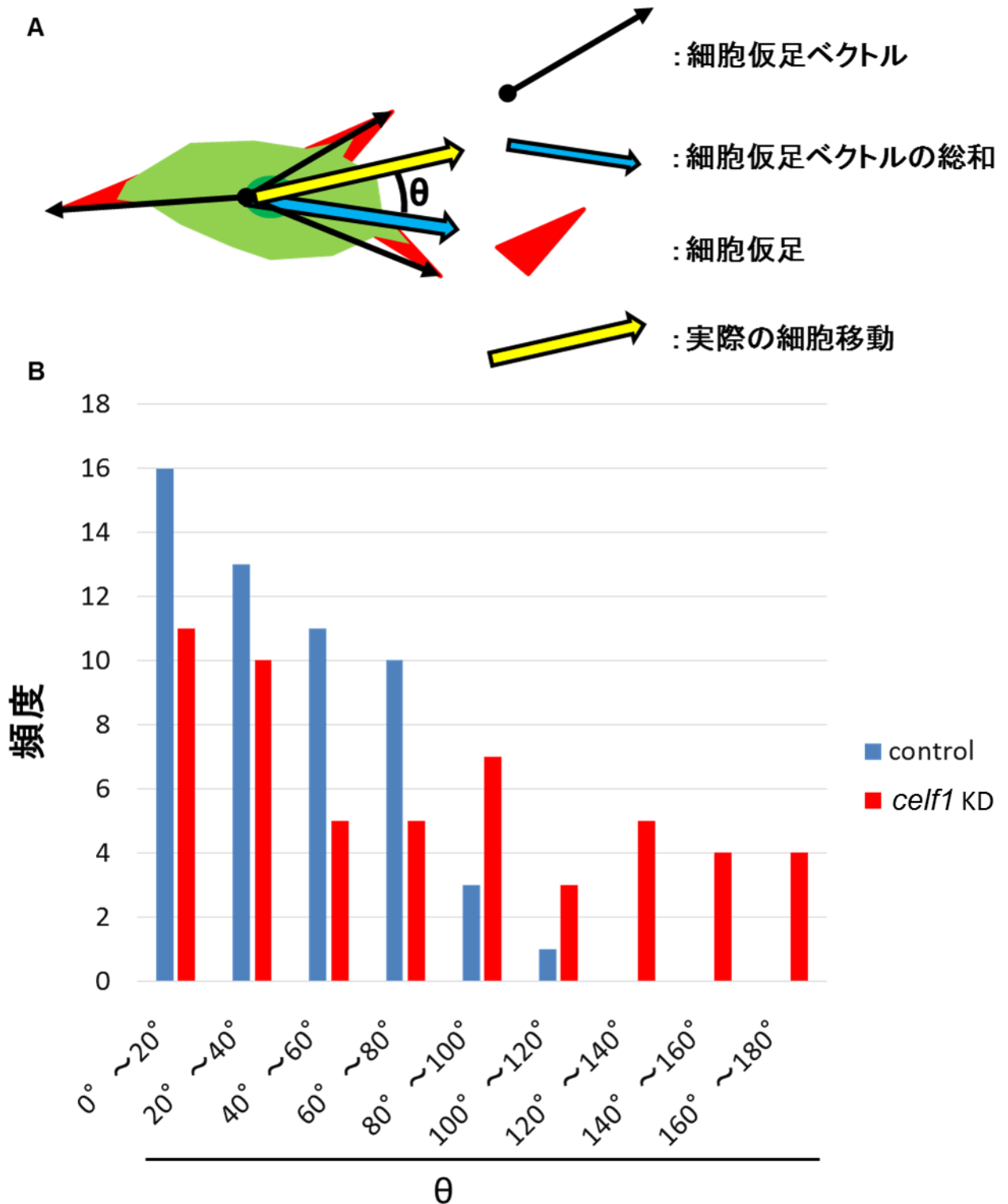


Fig.18 細胞突起と実際の移動との相関性は低い

(A)細胞仮足から推測される細胞が移動するであろう方向（青色矢印）と実際に細胞が移動した軌跡（黄色矢印）。2つの矢印の差(θ)が0に近いほど突起の形成と細胞移動の相関性が高いと考えた。(B) θ のヒストグラム。コントロール胚では相関性が高いと考えられる $0^\circ < \theta < 20^\circ$ にピークが見られたが、それ以外の値を示すものが多く全体としての相関性は低いと考えられた。*celf1* KD胚では特にピークが見られず、均等にばらつく分布が見られた。

だけではなく、移動の土台となる細胞外基質と細胞がフォーカルアドヒージョンを介して接着することが移動の駆動力となる。*celf1* KD 胚では細胞突起の数が増えていたが、一つ一つの大きさは control 胚と比べ小さくみえたことから、実際に細胞外基質と強く結合し移動に関与する突起が減少しているのではないかと考えた。これを確かめるため、細胞突起の足場となるフォーカルアドヒージョンの形成を突起形成と同時に観察できる系を作成するなど、他の細胞移動に関わる因子と合わせて更に詳しく調べる必要がある。

Celf1 の標的遺伝子

Hela 細胞では、Celf1 の標的遺伝子は 600 を超えることが報告されている (Rattenbacher et al., 2010)。ゼブラフィッシュでもかなりの数の標的があると予想されるが、今回は、*celf1* KD 胚の表現型から、一部の候補遺伝子についてのみスクリーニングを行った。つまり、*celf1* KD 胚では内胚葉の増殖や移動が異常になるため、標的遺伝子は、これらのプロセスを制御すると考え、30 個の標的候補遺伝子の 3'UTR に Celf1 の結合配列の有無を調べ、2 次スクリーニングとして、結合配列を持つ遺伝子の発現パターンを調べ、12 個の遺伝子を標的候補遺伝子として得た。RIP と qPCR の解析を行ったことで、*gata5* と *cdc42* が Celf1 の標的であることが分かった (Fig.13) ので、更に詳しく調べた。

-*gata5* に関して-

celf1 KD 胚で、内胚葉細胞の数が減少することから、内胚葉細胞の数を制御する因子が標的であると考えた。これまでに、*gata5* は細胞数を正に制御する因子であり、*gata5* KD 胚では内胚葉細胞の数が減少することが報告されていた (Li et al., 2011; Reiter et al., 1999) ため、*gata5* が Celf1 の標的であり、Celf1 は *gata5* の安定化する役割があると考えていた。しかし、本研究で得られた qPCR の結果では、Celf1 が *gata5* mRNA の不安定にするため、この考えと矛盾することが分かった (Fig.13C)。また、*celf1* の過剰発現胚において内胚葉細胞数を WISH 法により計測した結果、原腸陥入初期、後期どちらにおいても内胚葉細胞数は control 胚と違いが見られなかったことから (Fig.19)、Celf1 を介した内胚葉細胞の数の制御はシンプルな仕組みでは無い可能性が考えられる。

最近、我々は、*gata5* の翻訳阻害を行う *miR-92* に Celf1 の結合配列が存在していることを見つけた (Li et al., 2011) (Fig.20)。つまり、Celf1 は *gata5* の転写後調節を通してタンパク量を調節することに加え、*miR-92* と結合(またはその RNA レベルの調整)することでその機能を阻害する役割がある可能性が考えられた (Fig.21)。この仮説を *celf1* KD 胚に当てはめると、Celf1 による *gata5* の mRNA 量は上昇するが、同時に Celf1 に抑えられていた *miR-92* が開放されることにより、強い *gata5* の翻訳阻害が起こり、結果として内胚葉細胞数が減少する表現型が現れると考えられる。こ

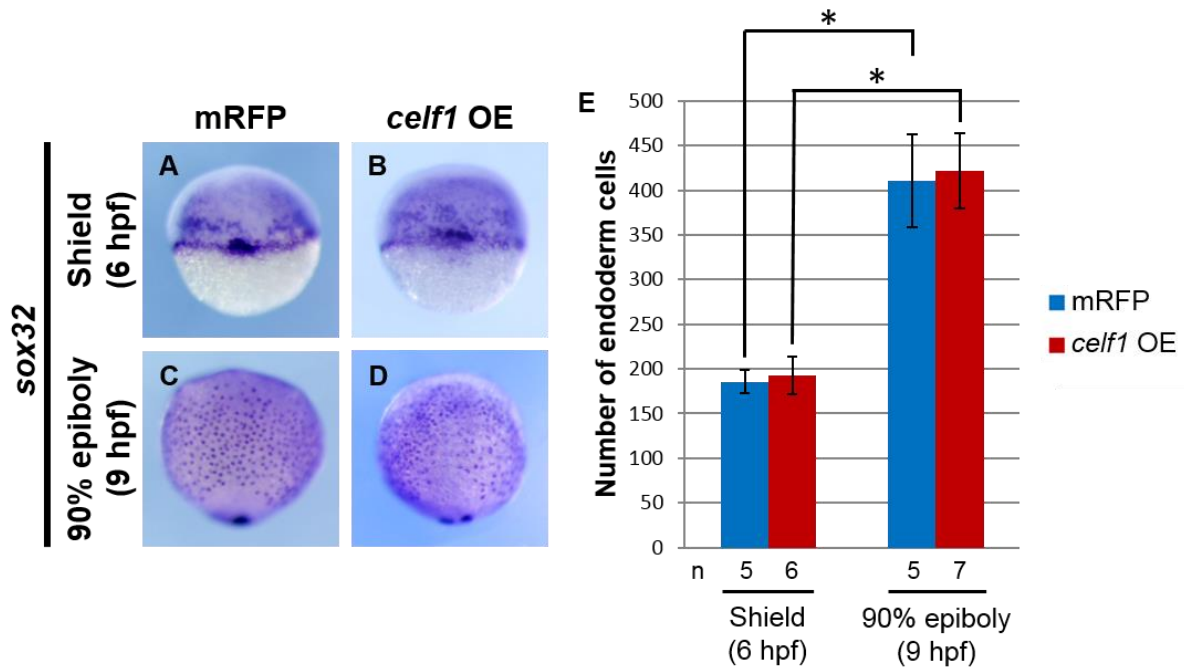


Fig.19 *celf1* 過剰発現が与える細胞増殖に対する影響

(A-D)受精後6時間(A,B)と9時間(C,D)における内胚葉細胞における *sox32* の発現パターン。

(E)*celf1* の過剰発現は内胚葉細胞の増殖に影響を与えなかった。(* $p < 0.05$)

これは本研究で得られた *celf1* KD 胚における表現型と一致する。また、*celf1* 過剰発現においては *gata5* mRNA 量は減少し、内胚葉細胞も減少する一方で *miR-92* に結合し、その機能を強く阻害する可能性がある。この仮説は本研究で得られた *celf1* 過剰発現胚における内胚葉細胞数が control 胚と変化が見られなかったことと一致する (Fig.21)。この仮説を立証するために、*gata5* mRNA の Celf1 結合サイトまたは *miR-92* 特異的な TPMO を作成し、マイクロインジェクションした胚において *gata5* mRNA を定量すること、また内胚葉細胞数についての解析を進める必要があると考えている。

-cdc42に関して-

Rho ファミリーに属する Cdc42 は、GDP から GTP に変換されることで、活性が調節される分子スイッチであることが知られている。そのため、恒常活性化型や優性阻害型 Cdc42 を過剰発現させることで、多くの知見が集められてきている。しかし、野生型の Cdc42 を導入した場合にも、恒常活性化型を発現させた場合と類似した表現型が誘導されることが知られており、活性調節以外にも、mRNA または、タンパク量の制御も重要である可能性が示唆されている。本研究では、Celf1 によって Cdc42 を転写後調節することで、タンパク量を fine-tuning することを示しており、発生

mir-92a-1

UGGUCCCUUUCUGCGCAGGUUGGGAUUGGUAGCAAUGCUGUGU
GUUUUGAAGGUAUUGCACUUGUCCCGGCCUGUAAAGGAUUGU

mir-92a-2

ACAGCAUCCCUUUCUUUGCAGGUUGGGAUCGGCCGCAAUGCUC
UGUGCUGGAAGUAUUGCACUUGUCCCGGCCUGUGAAGAGCAUG
GGAAAUUGU

mir-92b

UCCUACGGGCAGGGAGGUGUGGGAUGUUGUGCAGUGUUGUUCA
AUCUCCCGCCAAUAUUGCACUCGUCCCGGCCUCCCUGAC

— :Celf1結合配列

Fig.20 *mir-92* は Celf1 結合配列を持つ。

ゼブラフィッシュ *miR-92a* は 2 つの pre-miRNA、*miR-92b* はひとつの pre-miRNA が報告されており、それぞれに Celf1 の結合配列が確認された。

過程で、Cdc42 の量の制御の重要性を示した例として位置づけられる。

また、原腸陥入期において、Cdc42 の活性は、non-canonical Wnt シグナルを介した起こることが知られており (Roszko et al., 2009, Matsui et al., 2005)、Cdc42 の量の調節が non-canonical Wnt シグナルに影響することも考えられるので、Celf1 と non-canonical Wnt シグナルの関連性を調べるのは今後の面白いテーマの一つと考えている。

-その他の標的遺伝子に関して-

Celf1-cdc42 ダブル KD 胚において臍臓に見られた欠損は改善されていたが肝臓の欠損は改善しなかったことから、*celf1* は別の標的遺伝子の転写後調節を行うことで肝臓の形成に役割を持つことが考えられる。Hela 細胞では Celf1 の標的遺伝子は 600 を超えることが報告されており (Rattenbacher et al., 2010)、*celf1* の内胚葉由来器官の形成に対する役割の全容を明らかにするためには候補遺伝子のスクリーニングだけではなく RIP Chip 法を用いた解析や *celf1* KD 胚を用いた網羅的な解析が有効であると考えている。また、*Tg[sox17:GFP]* や gutGFP、臍臓 β 細胞を EGFP で標識する *Tg[ins:EGFP]* や稚魚の肝臓、臍臓をそれぞれ DsRed、EGFP で標識できる Lipan など、内胚葉と内胚葉由来器官を蛍光タンパクで標識できるトランスジェニックラインが確立されている (Field et al., 2003a; Field et al., 2003b; Korzh et al., 2008;

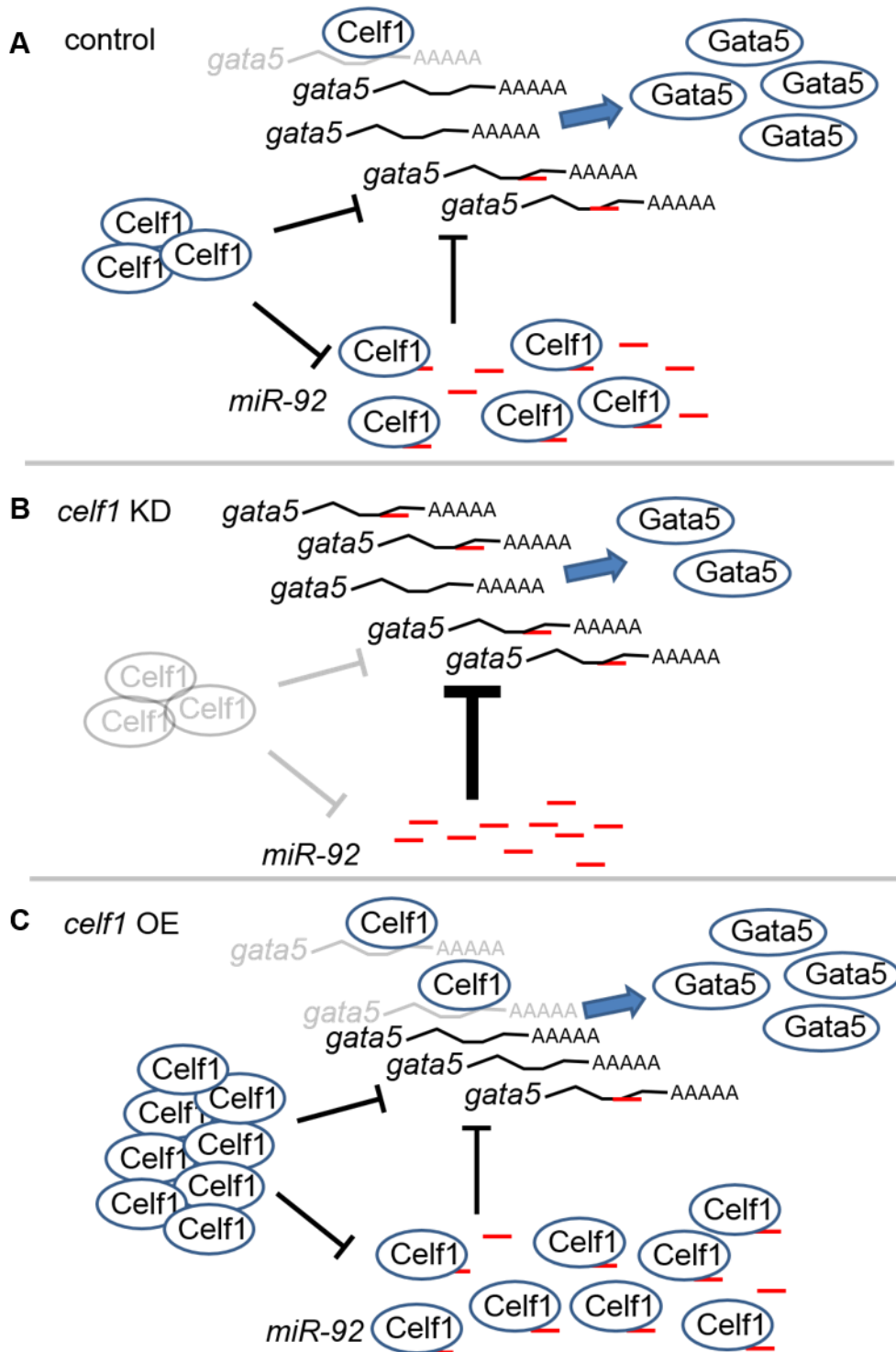


Fig21 Celf1 の内胚葉細胞増殖への役割についての仮説

(A-C)control(A)、*celf1* KD(B)、*celf1* OE(C)胚における Celf1 が持つ内胚葉細胞の増殖への役割の仮説。(A)Celf1 は *gata5* mRNA と結合し RNA の減衰に関わり、*miR-92* と結合しその機能阻害を行う。(B)*celf1* KD 胚では Celf1 の減少により *gata5* mRNA が増えるが、開放された *miR-92* による翻訳阻害により Gata5 タンパク量は減少する。(C)*celf1* OE 胚では *gata5* mRNA が減少するが、*miR-92* が機能阻害されることで Gata5 タンパクは control 胚と同等程度まで発現する。

Mizoguchi et al., 2008; Pisharath et al., 2007)ことから、セルソーターを用いて蛍光タンパク陽性細胞を分離することで内胚葉由来器官形成に役割を持つ *Celf1* の標的遺伝子を見つけ出すことができると考えている。

celf1 MOs がオフセットに機能する可能性

ゼブラフィッシュやアフリカツメガエルの胚に MO を injection し機能欠損実験を行う手法は発生学において遺伝子の役割を調べるために有効な手段であり、多くの研究で用いられている。しかし最近、ゼブラフィッシュ胚において ZFN 法や TALEN 法など人口ヌクレアーゼを用いたゲノム編集が容易になった(Cade et al., 2012; Hwang et al., 2013; Meng et al., 2008)ことで変異体を作成された結果、多くの遺伝子において MO を用いた KD における表現型と変異体が示す表現型が一致しないことが報告された(Kok et al., 2015)。これは、MO が標的配列以外の配列に結合するオフターゲット効果によるものと考えられる(Amoyel et al., 2005; Gerety and Wilkinson, 2011)。本研究では *celf1* mRNA の翻訳阻害により KD を行う 2 種類の translation MO と正常なスプライシングを阻害することで KD を行う splicing MO を作成しており、translation MOs と splicing MO をそれぞれ injection した胚において同等の表現型を確認していること、下流の因子によるレスキュー効果が認められることから、本研究で見られた *celf1* KD 胚に見られた表現型はオフターゲット効果によるものではないと考えている。これを証明するために、TALEN などの方法を用いて、*celf1* の変異体を作成し、その表現型を解析することとともに、*celf1* の変異体に MO をインジェクションすることで、表現型が変化しないことを確かめる必要があると考えている。

結論

本研究ではゼブラフィッシュ **Celf1** が原腸陥入期の内胚葉細胞における、細胞増殖または移動に関わる因子を転写後調節することで後の器官形成に重要な役割を持つこと明らかにした。特に原腸陥入期の内胚葉細胞の増殖を制御する *gata5*、細胞移動を制御する *cdc42* が標的遺伝子であることを明らかにした。特に **Celf1** を介した **Cdc42** の転写後調節は膀胱の形成に重要な役割を持つことを示した。

謝辞

本研究に携わるにあたり、多くの方々に多大なご協力を頂きました。

直接指導をして頂いた松井貴輝助教には、先行研究のデータをご提供頂いたことや基本的な実験操作や研究を進める際の考え方など多くのことを学ばせて頂きました。また、研究生活だけでなく、私生活の面でも面倒を見て頂きました。何度もご迷惑をおかけしましたが、最後まで辛抱強くご指導を頂き、本当にありがとうございました。

別所康全教授には大変恵まれた研究環境を与えてくださったことに感謝を申し上げます。また、数々のディスカッションを通し刺激的なアドバイスを頂いたことで本研究を進めるアイデアを得ることができました。中畑泰和助教には朝ミーティングを通して的確な御意見を頂き、新しい解析を行う方法のヒントを頂きました。

研究室の先輩方には研究に対して鋭い意見を頂きました。また、学生生活に対して多くの意見を頂き、私生活でも大変お世話になりました。後輩の皆様にも研究活動のサポートだけでなく、本研究などについて質問を頂いたことで、どう行動していくべきなのかを考えるきっかけを与えられ、先輩として成長させてもらいました。ありがとうございました。

技術補佐官の重里宏子さん、横内舞子さんにはゼブラフィッシュの世話、共通試薬の管理など、様々な点でお世話になりました。また、村山千恵さんにも共通試薬の管理や実験の補助などをして頂き、効率よく実験する上で大変お世話になりました。秘書の田野美佐さんには日々の学生生活、事務的な手続きなどをサポートして頂きました。

神経システム生物学研究室の稲垣直之教授、神経機能科学研究室の塩坂貞夫教授には本研究のアドバイザーとして興味深いご意見を頂くことができました。

最後になりますが、大学院生活を遠くから見守り、支えとなってくれた両親をはじめとする家族に感謝します。

2014年1月20日

田原直幸

参考文献

Amoyel, M., Cheng, Y.C., Jiang, Y.J., and Wilkinson, D.G. (2005). Wnt1 regulates neurogenesis and mediates lateral inhibition of boundary cell specification in the zebrafish hindbrain. *Development* *132*, 775-785.

Barreau, C., Paillard, L., Mereau, A., and Osborne, H.B. (2006). Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions. *Biochimie* *88*, 515-525.

Birney, E., Kumar, S., and Krainer, A.R. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res.* *21*, 5803-5816.

Blake, W.J., KAern, M., Cantor, C.R., and Collins, J.J. (2003). Noise in eukaryotic gene expression. *Nature* *422*, 633-637

Blech-Hermoni, Y., Stillwagon, S.J., and Ladd, A.N. (2013). Diversity and conservation of CELF1 and CELF2 RNA and protein expression patterns during embryonic development. *Dev. Dyn.* *242*, 767-777.

Brimacombe, K.R., and Ladd, A.N. (2007). Cloning and embryonic expression patterns of the chicken CELF family. *Dev. Dyn.* *236*, 2216-2224.

Burd, C.G., and Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* *265*, 615-621.

Cade, L., Reyon, D., Hwang, W.Y., Tsai, S.Q., Patel, S., Khayter, C., Joung, J.K., Sander, J.D., Peterson, R.T., and Yeh, J.R. (2012). Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. *Nucleic Acids Res.* *40*, 8001-8010.

Chung, W.S., Shin, C.H., and Stainier, D.Y. (2008). Bmp2 signaling regulates the hepatic versus pancreatic fate decision. *Dev. Cell.* *15*, 738-748.

Cibois, M., Gautier-Courteille, C., Kodjabachian, L., and Paillard, L. (2013). A gene regulation network controlled by Celf1 protein-rbpj mRNA interaction in

Xenopus somite segmentation. *Biol. Open* *2*, 1078-1083.

Cibois, M., Gautier-Courteille, C., Vallee, A., and Paillard, L. (2010). A strategy to analyze the phenotypic consequences of inhibiting the association of an RNA-binding protein with a specific RNA. *Rna* *16*, 10-15.

Dasgupta, T., and Ladd, A.N. (2012). The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA-binding proteins. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *3*, 104-121.

Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lora, J., and Zaret, K.S. (2001). A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* *128*, 871-881.

Elowitz, M.B., Levine, A.J., Siggia, E.D., and Swain, P.S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science* *297*, 1183-1186.

Field, H.A., Dong, P.D., Beis, D., and Stainier, D.Y. (2003a). Formation of the digestive system in zebrafish. II. Pancreas morphogenesis. *Dev. Biol.* *261*, 197-208.

Field, H.A., Ober, E.A., Roeser, T., and Stainier, D.Y. (2003b). Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis. *Dev. Biol.* *253*, 279-290.

Gautier-Courteille, C., Le Clainche, C., Barreau, C., Audic, Y., Graindorge, A., Maney, D., Osborne, H.B., and Paillard, L. (2004). EDEN-BP-dependent post-transcriptional regulation of gene expression in *Xenopus* somitic segmentation. *Development* *131*, 6107-6117.

Gebauer, F., and Hentze, M.W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 827-835.

Gerety, S.S., and Wilkinson, D.G. (2011). Morpholino artifacts provide pitfalls and reveal a novel role for pro-apoptotic genes in hindbrain boundary development. *Dev. Biol.* *350*, 279-289.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* *279*, 509-514.

- Hashimoto, Y., Suzuki, H., Kageyama, Y., Yasuda, K., and Inoue, K. (2006). Bruno-like protein is localized to zebrafish germ plasm during the early cleavage stages. *Gene Expr. Patterns* *6*, 201-205.
- Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.R., and Joung, J.K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* *31*, 227-229.
- Kok, F.O., Shin, M., Ni, C.W., Gupta, A., Grosse, A.S., van Impel, A., Kirchmaier, B.C., Peterson-Maduro, J., Kourkoulis, G., Male, I., *et al.* (2015). Reverse Genetic Screening Reveals Poor Correlation between Morpholino-Induced and Mutant Phenotypes in Zebrafish. *Dev. Cell.* *32*, 97-108.
- Korz, S., Pan, X., Garcia-Lecea, M., Winata, C.L., Pan, X., Wohland, T., Korzh, V., and Gong, Z. (2008). Requirement of vasculogenesis and blood circulation in late stages of liver growth in zebrafish. *BMC Dev. Biol.* *8*, 84-213X-8-84.
- Kress, C., Gautier-Courteille, C., Osborne, H.B., Babinet, C., and Paillard, L. (2007). Inactivation of CUG-BP1/CELF1 causes growth, viability, and spermatogenesis defects in mice. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 1146-1157.
- Ladd, A.N., Charlet, N., and Cooper, T.A. (2001). The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 1285-1296.
- Ladd, A.N., Nguyen, N.H., Malhotra, K., and Cooper, T.A. (2004). CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing. *J. Biol. Chem.* *279*, 17756-17764.
- Ladd, A.N., Stenberg, M.G., Swanson, M.S., and Cooper, T.A. (2005). Dynamic balance between activation and repression regulates pre-mRNA alternative splicing during heart development. *Dev. Dyn.* *233*, 783-793.
- Lee, J.E., Lee, J.Y., Wilusz, J., Tian, B., and Wilusz, C.J. (2010). Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells. *PLoS One* *5*, e11201.

Leung, T., Humbert, J.E., Stauffer, A.M., Giger, K.E., Chen, H., Tsai, H.J., Wang, C., Mirshahi, T., and Robishaw, J.D. (2008). The orphan G protein-coupled receptor 161 is required for left-right patterning. *Dev. Biol.* *323*, 31-40.

Li, N., Wei, C., Olena, A.F., and Patton, J.G. (2011). Regulation of endoderm formation and left-right asymmetry by miR-92 during early zebrafish development. *Development* *138*, 1817-1826.

Marquis, J., Paillard, L., Audic, Y., Cosson, B., Danos, O., Le Bec, C., and Osborne, H.B. (2006). CUG-BP1/CELF1 requires UGU-rich sequences for high-affinity binding. *Biochem. J.* *400*, 291-301.

Martin-Bermudo, M.D., Alvarez-Garcia, I., and Brown, N.H. (1999). Migration of the *Drosophila* primordial midgut cells requires coordination of diverse PS integrin functions. *Development* *126*, 5161-5169.

Masuda, A., Andersen, H.S., Doktor, T.K., Okamoto, T., Ito, M., Andresen, B.S., and Ohno, K. (2012). CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci. Rep.* *2*, 209.

Matsui, T., and Bessho, Y. (2012). Left-right asymmetry in zebrafish. *Cell Mol. Life Sci.* *69*, 3069-3077.

Matsui, T., Raya, A., Kawakami, Y., Callol-Massot, C., Capdevila, J., Rodriguez-Esteban, C., and Izpisua Belmonte, J.C. (2005). Noncanonical Wnt signaling regulates midline convergence of organ primordia during zebrafish development. *Genes Dev.* *19*, 164-175.

Matsui, T., Sasaki, A., Akazawa, N., Otani, H., and Bessho, Y. (2012). Celf1 regulation of *dmrt2a* is required for somite symmetry and left-right patterning during zebrafish development. *Development* *139*, 3553-3560.

Matsui, T., Thitamadee, S., Murata, T., Kakinuma, H., Nabetani, T., Hirabayashi, Y., Hirate, Y., Okamoto, H., and Bessho, Y. (2011). Canopy1, a positive feedback regulator of FGF signaling, controls progenitor cell clustering during Kupffer's vesicle organogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9881-9886.

Mattaj, I.W. (1993). RNA recognition: a family matter? *Cell* *73*, 837-840.

Meng, X., Noyes, M.B., Zhu, L.J., Lawson, N.D., and Wolfe, S.A. (2008). Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* *26*, 695-701.

Mizoguchi, T., Izawa, T., Kuroiwa, A., and Kikuchi, Y. (2006). Fgf signaling negatively regulates Nodal-dependent endoderm induction in zebrafish. *Dev. Biol.* *300*, 612-622.

Mizoguchi, T., Verkade, H., Heath, J.K., Kuroiwa, A., and Kikuchi, Y. (2008). Sdf1/Cxcr4 signaling controls the dorsal migration of endodermal cells during zebrafish gastrulation. *Development* *135*, 2521-2529.

Mori, D., Sasagawa, N., Kino, Y., and Ishiura, S. (2008). Quantitative analysis of CUG-BP1 binding to RNA repeats. *J. Biochem.* *143*, 377-383.

Naiche, L.A., Harrelson, Z., Kelly, R.G., and Papaioannou, V.E. (2005). T-box genes in vertebrate development. *Annu. Rev. Genet.* *39*, 219-239.

Pisharath, H., Rhee, J.M., Swanson, M.A., Leach, S.D., and Parsons, M.J. (2007). Targeted ablation of beta cells in the embryonic zebrafish pancreas using *E. coli* nitroreductase. *Mech. Dev.* *124*, 218-229.

Rattenbacher, B., Beisang, D., Wiesner, D.L., Jeschke, J.C., von Hohenberg, M., St Louis-Vlasova, I.A., and Bohjanen, P.R. (2010). Analysis of CUGBP1 targets identifies GU-repeat sequences that mediate rapid mRNA decay. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 3970-3980.

Reig, G., Pulgar, E., and Concha, M.L. (2014). Cell migration: from tissue culture to embryos. *Development* *141*, 1999-2013.

Reiter, J.F., Alexander, J., Rodaway, A., Yelon, D., Patient, R., Holder, N., and Stainier, D.Y. (1999). Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev.* *13*, 2983-2995.

Rossi, J.M., Dunn, N.R., Hogan, B.L., and Zaret, K.S. (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev.* *15*,

1998-2009.

Roszko, I., Sawada, A., and Solnica-Krezel, L. (2009). Regulation of convergence and extension movements during vertebrate gastrulation by the Wnt/PCP pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* *20*, 986-997.

Schier, A.F., and Talbot, W.S. (2005). Molecular genetics of axis formation in zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* *39*, 561-613.

Shivdasani, R.A. (2002). Molecular regulation of vertebrate early endoderm development. *Dev. Biol.* *249*, 191-203.

Siomi, H., and Dreyfuss, G. (1997). RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *7*, 345-353.

Stanley, A.C., Wong, C.X., Micaroni, M., Venturato, J., Khromykh, T., Stow, J.L., and Lacy, P. (2014). The Rho GTPase Rac1 is required for recycling endosome-mediated secretion of TNF in macrophages. *Immunol. Cell Biol.* *92*, 275-286.

Suzuki, H., Maegawa, S., Nishibu, T., Sugiyama, T., Yasuda, K., and Inoue, K. (2000). Vegetal localization of the maternal mRNA encoding an EDEN-BP/Bruno-like protein in zebrafish. *Mech. Dev.* *93*, 205-209

Takahashi, N., Sasagawa, N., Suzuki, K., and Ishiura, S. (2000). The CUG-binding protein binds specifically to UG dinucleotide repeats in a yeast three-hybrid system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *277*, 518-523.

Timchenko, L.T., Miller, J.W., Timchenko, N.A., DeVore, D.R., Datar, K.V., Lin, L., Roberts, R., Caskey, C.T., and Swanson, M.S. (1996). Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res.* *24*, 4407-4414.

Vlasova-St Louis, I., and Bohjanen, P.R. (2011). Coordinate regulation of mRNA decay networks by GU-rich elements and CELF1. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 444-451.

Vlasova-St Louis, I., Dickson, A.M., Bohjanen, P.R., and Wilusz, C.J. (2013). CELFish ways to modulate mRNA decay. *Biochim. Biophys. Acta* *1829*, 695-707.

Woo, S., Housley, M.P., Weiner, O.D., and Stainier, D.Y. (2012). Nodal signaling regulates endodermal cell motility and actin dynamics via Rac1 and Prex1. *J. Cell Biol.* *198*, 941-952.

ZFIN. (2001). Zebrafish *celf1* data for this paper were retrieved from the Zebrafish Information Network (ZFIN), University of Oregon, Eugene, OR 97403-5274; World Wide Web URL: <http://zfin.org/>; [accessed 24 june 2013].

修士論文

佐々木 章裕

ゼブラフィッシュの胚発生における *cugbp1* の機能解析(2007)

修士論文

赤澤 尚子

ゼブラフィッシュ胚発生における CUG triplet repeat RNA-binding protein (*cugbp1*) の機能解析 (2009)