

2. 膵臓特異的な新規遺伝子の単離

(a) ディファレンシャルスクリーニング
 前述の系を用いて誘導した膵臓組織から mRNA を抽出する。cDNA は SMART PCR cDNA 合成キット (invitrogen) により行い、cDNA ライブラリーを構築する。プローブはサブトラクション法により、膵臓誘導条件から膵臓非誘導条件のものを差し引いたものを準備し、ハイブリダイゼーションにより上記 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることによって目的クローンを単離した。

(b) マイクロアレイ

マイクロアレイはアジレント・テクノロジー社のマイクロアレイシステムを使用した。マイクロアレイは、当研究室で作成したツメガエル 8K スポットのものを

使用した。

アクチビン処理したアニマルキャップ、非処理のアニマルキャップからそれぞれ RNA を抽出し、Cy3, Cy5 でラベリングした cRNA を合成し、ターゲット RNA を作成した。これを用い、ハイブリダイズ・洗浄を行い、陽性スポットを解析した。

3. 単離した新規遺伝子の発現領域解析

単離した新規遺伝子は、genbank 等の配列情報を元に PCR クローニング等の方法によって DNA 断片を得る。さらに、遺伝子の空間的な発現パターンを調べるため、プラスミドに連結後、ディゴキシジェニンラベルされたアンチセンス RNA を SP6, T3, T7RNA ポリメラーゼを用いて in vitro 合成し、これをプローブに用いて in situ

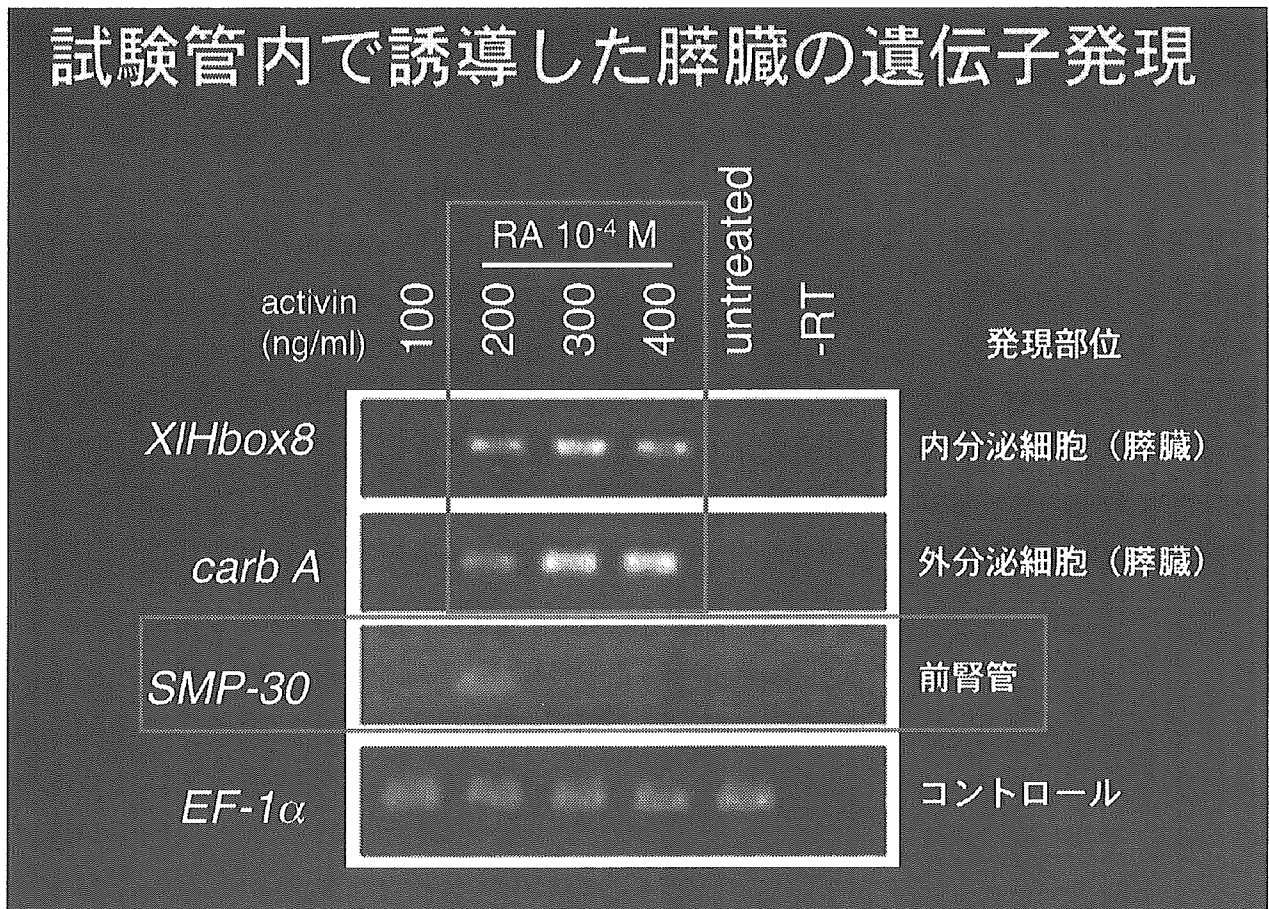


図 3

ハイブリダイゼーションを行った。

なお、倫理面への配慮は特に、指針にのっとりながら行った。

C. 研究結果

1. ツメガエルアニマルキャップからの膵臓誘導系の確立

我々はまず、高効率にアニマルキャップから膵臓を誘導するための条件検討を行った。その結果、以下の方法でアニマルキャップを処理することによって膵臓が高効率に誘導することができた(図1)。まず、後期胞胚期(ステージ9)でアニマルキャップを切除し、400ng/ml アクチビンを含む生理食塩水中でアニマルキャップを5時間培養した後、 10^{-4} mol/l のレチノイン酸溶液で1時間処理する。以上の方法により、約70%の効率でアニマルキャップから膵臓を誘導することが出来た(図2)。実際、処理したアニマルキャップの組織像を、薄切切片のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色により観察すると、膵臓組織に特徴的な組織像が見られた(図2)。さらに、膵臓特異

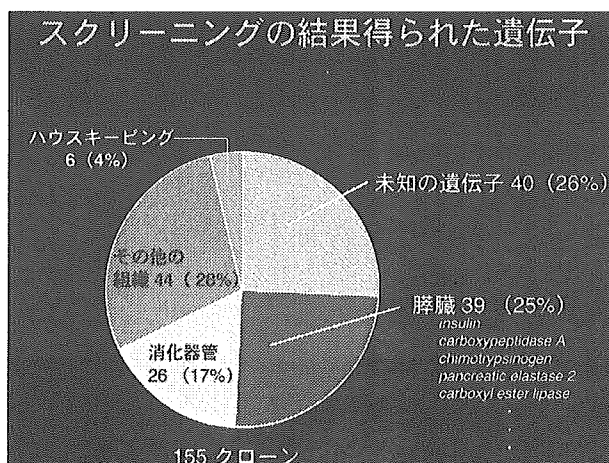


図4

的に発現するマーカー遺伝子の発現をRT-PCRで確認したところ、内分泌細胞特異的マーカーX1Hbox8, 外分泌細胞特異的マーカーcarbA共に、400ng/ml アクチビン処理したアニマルキャップで最も強い発現を示した(図3)。以上の結果から、膵臓特異的な新規遺伝子を単離するために必要不可欠な高効率の膵臓誘導系が確立できた。

2. 膵臓特異的な新規遺伝子の単離

まず、我々はディファレンシャルスクリーニングにより、膵臓特異的に発現する新規遺伝子の単離を試みた。

まず、上記で述べた膵臓誘導条件(400ng/ml アクチビン1時間処理、生理食塩水5時間処理、 10^{-4} mol/l レチノイン酸1時間処理)で処理したアニマルキャップ由来のmRNAからDNA合成し、cDNAライブラリーを構築した。一方、プローブは400ng/ml アクチビン・ 10^{-4} mol/l レチノイン酸処理したアニマルキャップ由来mRNAから400ng/ml アクチビン処理したアニマルキャップ由来mRNAをサブトラクション法により差し引いたものを用いて作成した。これを用いて上記cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、155の陽性クローンを得ることが出来た。そのうち、未知の遺伝子は40個存在した。得られた155の遺伝子が膵臓特異的に発現しているかどうかを解析するため、既知の遺伝子も含めin situハイブリダイゼーションによって検討した

ところ、膵臓特異的に発現する遺伝子が 39 遺伝子見出された (図 4)。その中で代表的な 3 遺伝子について図 5 に示す。carboxyl ester lipase, pancreatic elastase 2, placental protein 11 はいずれも、ステージ 40 以降で予定膵臓領域で発現が確認できた。また、未知の遺伝子のうちのひとつ (54H) の発現パターンを図 6 に示す。この遺伝子は、ステージ 33 で弱く予定膵臓領域に発現する。ステージ 40 では、予定膵臓領域だけでなく、内胚葉全体で強い発現が観察される。さらに我々は、マイクロアレイを用いて膵臓特異的に発現する遺伝子の単離を試みた。この場合も、上記の膵臓誘導条件

で処理したアニマルキヤップ由来の mRNA、非処理のアニマルキヤップ由来の mRNA からそれぞれ Cy3, Cy5 ラベルしたターゲット RNA を合成し、これを用いてマイクロアレイのスクリーニングを行った。その結果、いくつかの未同定の遺伝子を得た。いくつかの新規遺伝子を単離した。その中には、実際に予定膵臓領域で発現する遺伝子も存在していた。

以上の結果から、我々が独自に確立したこの系は初期発生の膵臓形成においても非常に類似していることが明らかとなり、膵臓形成のしくみを調べる上で極めて有効なことが明らかとなった。

既知の消化酵素の発現パターン

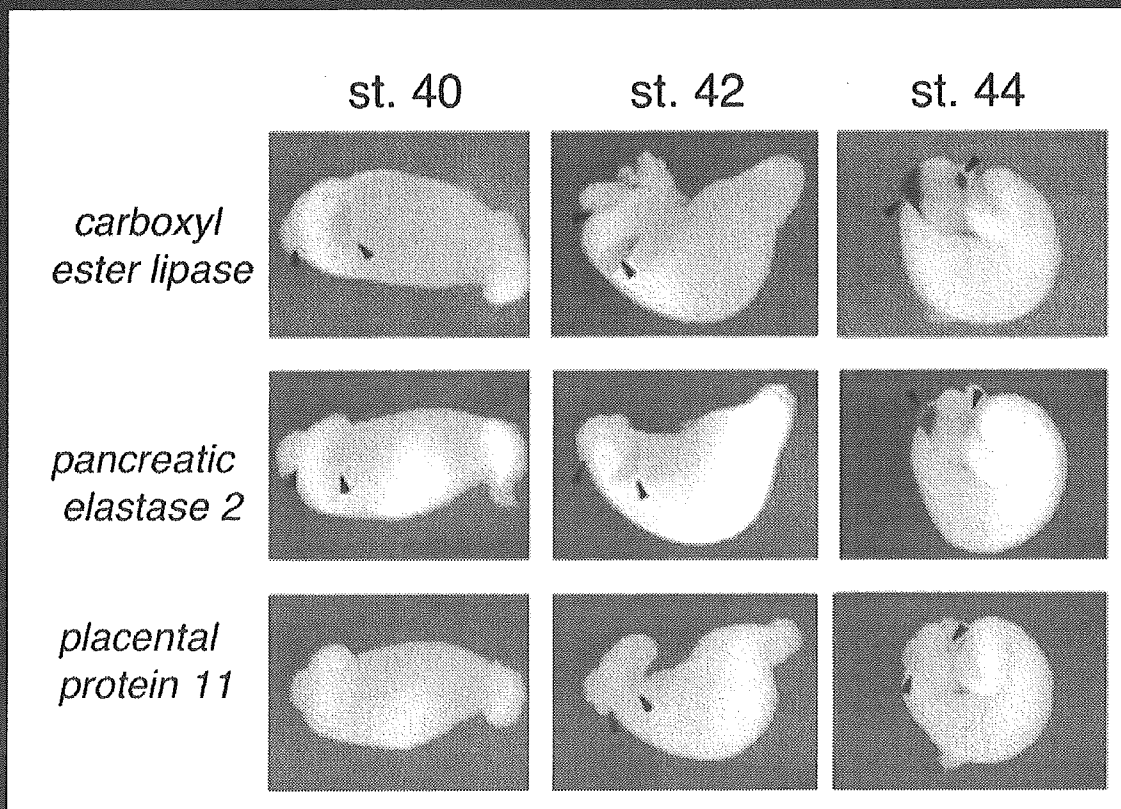


図 5

D. 考察

我々の構築した膵臓誘導条件は、アクチビンとレチノイン酸という2種類の誘導因子を、タイミングをずらせて反応させるという新しい方法を用いることによって可能となった。この系は、ほ乳類の胚性幹細胞（ES細胞）に応用可能であることが期待できる。また、この誘導条件で処理したアニマルキャップから得られた新規遺伝子は、実際膵臓で発現していることが明らかになったことから、我々の確立した系は正常発生における膵臓の形成を正しく模倣していると考えられる。

今回得られた新規遺伝子に関しては、全長をクローニングすると共に、ツメガエル胚への mRNA の微量注入実験、モルフオリノアンチセンスオリゴなどを用いた loss of function 解析などを行うこ

とによって膵臓の発生における遺伝子の役割を解析していきたい。また、これらの遺伝子の解析をさらに発展させ、膵臓の機能との関係についても詳しく調べていく。特に、新規の遺伝子は今後、単にカエルだけではなく、マウスにも応用出来ると思うので、そのあたりについても解析を行いたい。

E. 結論

我々が開発した独自の膵臓形成系は膵臓形成メカニズムを知る上で極めて有効なものであり、今後、遺伝子間の相互作用を調べることによって、膵臓形成や治療などに有効であろうと考えられる。

未知の遺伝子(54H)の発現パターン

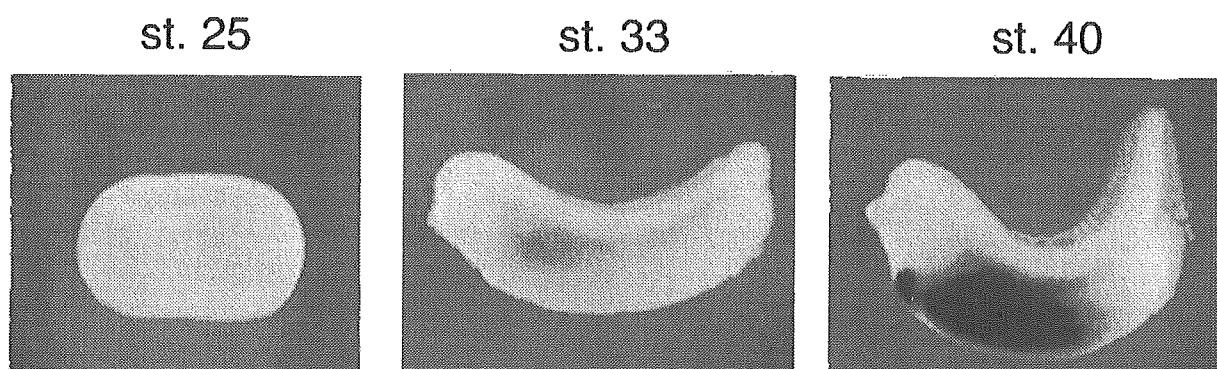


図 6

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Michiue, T. and Asashima, M.

Temporal and spatial manipulation of gene expression in *Xenopus* embryos by injection of heat shock promoter-containing plasmids. *Developmental Dynamics*, 232, 369-376, 2005

2. Goto, T., L. Davidson, M. Asashima, R. Keller
Planar cell polarity genes regulate polarized extracellular matrix deposition during frog gastrulation. *Current Biology*, 15(8), 787-793, 2005

3. Qinghua Tao, Yokota, C., Helbert Puck, Matt Kofron, Bilge Birsoy, Dong Yan, Asashima, M., C. C. Wylie, Xinhua Lin, and Janet Heasman
Maternal Wnt11 activates the canonical Wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, 120, 857-871, 2005

4. Abe, T., Furue, M., Kondow, A., Matsuzaki, K., Asashima, M.

Notch signaling modulates the nuclear localization of carboxyl-terminal-phosphorylated smad2 and controls the competence of ectodermal cells for activin A. *Mechanisms of Development*, 122, 671-680, 2005

5. Li, Dong-hui, Chan, T., Satow, R., Komazaki, S., Hashizume, K. and Asashima, M.

The role of XTRAP- γ in *Xenopus* pronephros development. *Int. J. Dev. Biol.*, 49(4), 401-408, 2005

6. Honda, M., Hamazaki, S. T., Komazaki, S., Kagechika, H., Shudo, K. and Asashima, M.

RXR agonist enhances the differentiation of cardiomyocytes derived from embryonic stem cells in serum-free conditions. *B. B. R. C.*, 333, 1334-1340, 2005

7. Kobayashi, H., Michiue, T., Yukita, A., Danno, H., Sakurai, K., Fukui, A., Kikuchi, A. and Asashima, M.

Novel Daple-like protein positively regulates both the Wnt/b-catenin pathway and the Wnt/JNK pathway in *Xenopus*. *Mechanisms of Development*, 122(10), 1138-1153, 2005

8. Yoshida, S., Furue, M., Nagamine, K., Abe, T., Fukui, Y., Myoishi, Y., Fujii, T., Okamoto, T., Taketani, Y. and Asashima, M.

Modulation of activin a-induced differentiation in vitro by vascular endothelial growth factor in *Xenopus* presumptive ectodermal cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Animal*, 41(3), 104-110, 2005

9. Furue, M., Okamoto, T., Hayashi, Y., Okochi, H., Fujimoto, M., Myoishi, Y., Abe, T., Ohnuma, K., Sato, H. Gordon, Asashima, M. and Sato, J. Denry

Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Animal*, 41(1), 19-28, 2005

10. Kitamoto, J., Fukui, A. and Asashima, M.
Temporal regulation of global gene expression and cellular morphology in *Xenopus* kidney cells in response to clinorotation. *Advances in Space Research*, 35(9), 1654-1661, 2005

11. Nagamine, K., Furue, M., Fukui, A. and Asashima, M.

Induction of cells expressing vascular endothelium markers from undifferentiated *Xenopus* presumptive ectoderm by co-treatment with activin and angiopoietin-2. *Zoological Science*, 22, 755-761, 2005

12. Kurisaki, A., Hamazaki, S. T., Okabayashi, K., Iida, T., Nishine, T., Chonan, R., Kido, H., Tsunasawa, S., Nishimura, O., Asashima, M., Sugino, H.

Chromatin-related proteins in pluripotent mouse embryonic stem cells are downregulated after removal of leukemia inhibitory factor. *B. B. R. C.*, 335, 667-675, 2005

13. Sugimoto, K., Hayata, T., Asashima, M.
XBtg2 is required for notochord differentiation

during early *Xenopus* development. *Develop. Growth Differ.*, 47(7), 435-443, 2005

14. Onuma, Y., Takahashi, S., Haramoto, Y., Tanegashima, K., Yokota, C., M. Whitman, and Asashima, M.

Xnr2 and Xnr5 unprocessed proteins inhibit Wnt signaling upstream of dishevelled. *Developmental Dynamics*, 234, 900-910, 2005

15. Asashima, M.

Structure and sequential gene expression of in vitro-induced pronephros (kidney) in the amphibian development. *Kidney International*, 68(5), 1963, 2005

16. Osafune, K., Takasato, M., Kispert, A., Asashima, M., Nishinakamura, R.

Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development*, 133, 151-161, 2005

17. Itoh, Y., Oinuma, T., Takano, K., Komazaki, S., Obata, S., Asashima, M.

CyNodal, the Japanese newt nodal-related gene, is expressed in the left side of the lateral plate mesoderm and diencephalon. *Gene Expression Patterns*, (in press), 1-5, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ihara K, Miyako K, Ishimura M, Kuromaru R, Wang HY, <u>Yasuda K</u> , Hara T.	A case of hyper-insulinism/hyperammonaemia syndrome with reduced carbamoyl-phosphate synthetase-1 activity in liver : A pitfall in enzymatic diagnosis for hyperammonaemia.	J Inherit Metab Dis	28(5)	681-7	2005
Yano S, Ito Y, Fujimoto M, Hamazaki TS, Tamaki K, <u>Okochi H</u>	Characterization and localization of side population cells in mouse skin	Stem Cells	23	834-841	2005
Yano S, <u>Okochi H</u>	Long-term culture of adult murine epidermal keratinocytes	Br J Dermatol	153	1101-1104	2005
Kurisaki, A., <u>Hamazaki, T.S.</u> , Okabayashi, K., Iida, T., Nishine, T., Chonan, R., Kido, H., Tsunasawa, S., Nishimura, O., <u>Asashima, M.</u> , Sugino, H.	Chromatin-Related Proteins in Pluripotent Mouse Embryonic Stem Cells Are Downregulated after Removal of Leukemia Inhibitory Factor.	Biochem. Biophys. Res Commun.	335	667-675.	2005
Honda, M., <u>Hamazaki, T.S.</u> , Komazaki, S., Kagechika, H., Shudo, K. <u>Asashima, M</u>	RXR Agonist Enhances the Differentiation of Cardiomyocytes Derived from Embryonic Stem Cells in Serum-Free Conditions.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	333	1334-1340.	2005
Nakatsu M, Doshi M, Saeki K, <u>Yuo A</u>	Synergistic effects of dehydroepiandrosterone and retinoic acid on granulocytic differentiation of human promyelocytic NB4 cells.	Int J Hematol	81	32-38	2005

Horiuchi A, Yasugi E, <u>Yuo A</u>	Structural requirement of dolichyl phosphate as an apoptosis inducer.	J Oleo Science	54	341-346	2005
Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, <u>Kaburagi Y.</u> <u>Yuo A</u>	Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin.	Am J Physiol Endocrinol Metab	289	E419-E428	2005
Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, <u>Yasuda K.</u> <u>Yuo A</u>	PPAR γ ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in the human leukemia NB4 cells.	Dev Growth Differ	In press		
Yamazaki T, Sasaki E, Kakinuma C, Yano T, Miura S, <u>Ezaki O</u>	Increased VLDL secretion and gonadal fat mass in mice over-expressing liver acyl CoA:Diacylglycerolacyl transferase1.	J Biol Chem	280	21506-21514	2005
Kamei Y, Suzuki M, Miyazaki H, Tsuboyama-Kasaoka N, Wu J, Ishimi Y, <u>Ezaki O</u>	Ovariectomy in Mice Decreases Lipid Metabolism-Related Gene Expression in Adipose Tissue and Skeletal Muscle with Increased Body Fat.	J Nutr Sci Vitaminol	51	110-117	2005
Yajima H, Noguchi T, Ikesima E, Shiraki M, Kana-ya T, Tsuboyama-Kasaoka N, <u>Ezaki O</u> , Oikawa S, Kondo K	Prevention of diet-induced obesity by dietary iso-merized hop extract contain-ing isohumulones, in rodents.	Int J Obesity	29	991-997	2005
Nakatani T, Katsumata A, Miura S, Kamei Y. <u>Ezaki O</u>	Effects of fish oil feeding and fasting on LXR α /RXR α binding to LXRE in the SREBP-1c promoter in mouse liver.	Biochim Biophys Acta	1736	77-86	2005

Kamei Y, Lwin H, Saito K, Yokoyama T, Yoshiike N, <u>Ezaki O</u> , Tanaka H	The 2.3 genotype of ESRR A23 of the ERR α gene is associated with a higher BMI than the 2.2 genotype.	Obes Res	13	1843-1844	2005
Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, <u>Ezaki O</u> , Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J	Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation.	Nature	439	484-489	2006
Michiue, T. and <u>Asashima, M.</u>	Temporal and spatial manipulation of gene expression in Xenopus embryos by injection of heat shock promoter-containing plasmids.	Dev Dyn	232	369-376	2005
Abe, T., Furue, M., Kondow, A., Matsuzaki, K., <u>Asashima, M.</u>	Notch signaling modulates the nuclear localization of carboxyl-terminal-phosphorylated smad2 and controls the competence of ectodermal cells for activin A.	Mech Dev	122	671-680	2005
Furue, M., Okamoto, T., Hayashi, Y., Okochi, H., Fujimoto, M., Myoishi, Y., Abe, T., Ohnuma, K., Sato, H. Gordon, <u>Asashima, M.</u> Sato, J. Denry	Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells.	In Vitro Cell. Dev. Biol. -Animal	41(1)	19-28	2005