

「生命活動のプログラム」  
平成8年度採択研究代表者

浅島 誠

(東京大学大学院総合文化研究科 教授)

## 「器官形成の分子機構」

### 1. 研究実施の概要

試験管内での未分化細胞塊(アニマルキャップ)から新しい臓器として膵臓をつくることに成功した。これらのつくられた膵臓は形態学的分化のみならず、インスリンやグルカゴンなどの遺伝子を発現し、また、免疫組織学的にもこれら特異的タンパク質を合成していることが証明された。また新規の遺伝子としては初期発生に働くノーダルのNodal5をクローニング、解析し、これらが他の因子の中で最も初期に発現していることを示した。他に腎臓形成では新しい遺伝子としてXsal-3、アクチビンのタイプIに細胞内で結合するタンパク質(XARIP)についてクローニングし、これらが腎臓形成に関与することを明らかにした。

### 2. 研究実施内容

#### (1) 膵臓形成の成功

試験管内で未分化細胞であるアニマルキャップをとり出し、高濃度のアクチビンとレチノイン酸を時差処理することによって今まで困難とされていた膵臓を試験管内で作り出すことに成功した。このことはインスリンやグルカゴンの遺伝子発現をRT-PCR法による確認の他にインスリンとグルカゴンの抗体を用いて免疫組織学的にもタンパク質として特異的に発現していることも証明された。

これらの新しく形成された膵臓からできるホルモンの遺伝子量およびタンパク質量はこれらのin vitro系とin vivo系(正常な胚)とまったく同じであった。また電子顕微鏡を用いて調べたところ内分泌顆粒も外分泌顆粒も分泌しており、完全な膵臓形成を試験管内で成功したといえる。今後この新しい臓器形成をつかっの分子生物学的研究へも新しい道筋をつくり出せたといえる。

#### (2) 感覚器官の形成とそれらに関与する遺伝子群の探索と同定

アニマルキャップをコンカナバリンAとレチノイン酸の混合液で処理することで感覚器官である目と耳の形成が可能となった。ConAを1mg/mlと一定にしておいてレチノイン酸を $10^{-8}$ Mの時には目を、 $10^{-6}$ Mの時には耳胞を形成することができた。また、これら感覚器官に関与する遺伝子としてXTbx-2やhitomi、Xranなどがクローニングされ、解析された。

(3) 試験管内の腎管および心臓形成について

アニマルキャップにアクチビン10ng/mlとレチノイン酸 $10^{-4}$ Mを3時間処理した後、時間をおいて、サブトラクションなどを行うことによって、新たな遺伝子としてXSMP-30、XSat3などの遺伝子がクローニングされ、また、それらの機能についても解析された。Sal-3はヒトではTownes-Brocks症候群の原因遺伝子であることもわかってきたので、腎形成と疾患とを結びつけることにもなった。このようにして腎形成における遺伝子のカスケードが明らかになってきた。一方、イモリのアニマルキャップにアクチビンを処理して心臓形成を行っていたが、処理後、未分化細胞を加えるなどすることによって形成率が20%から60%に上昇した。

(4) 解離細胞をアクチビン処理した後の細胞接着と選別

2細胞期に別々の卵に赤と緑の色素を注入しておいてからst.9の胞胚期までもってきてアニマルキャップの細胞を解離し、いろいろな濃度でアクチビン処理した後、混合した。その結果、濃度差が100倍になると明確な細胞選別が5時間からおこり、どのような結合でも脊索が中心にくることがわかった。また試験管内で脊索のみをつくることもできた。従来は必ず脊索のまわりに表皮がついていたが、それがない単独の脊索ができた。またこの細胞接着と選別にかかわる遺伝子として新しく完全型のXAPCがクローニングされ、解析された。

(5) アクチビンの細胞の内外でのシグナル伝達に関する様式

アクチビンをアニマルキャップに与えた時に濃度依存的に様々な器官や組織をつくることは知られているが、今回はその中で細胞外でアクチビン活性を制御していると思われるフォリスタチンと関係のある遺伝子の探索を行って、フォリスタチン関連遺伝子(FRP)の細胞内でアクチビンのタイプIIに結合する(XARIP)についてのクローニングと解析を行った。FRPはフォリスタチンと比べて著しくアクチビンとの結合が弱いが、アクチビン処理によってのみ活性化されるのでアクチビンの下流で何らかの役割をもっていると考えられる。一方、XARIPについてはこれはアクチビンタイプII Aに特異的に結合する。このmutant遺伝子を背側にinjectionすると頭部の形成が異常となり小さくなることがわかった。

このようにして今年度もこの研究プロジェクトは予想を超える勢いで研究が発展し、新しい臓器である脾臓形成に成功し、また、腎臓、神経、心臓などにおいても新規の遺伝子のクローニングと解析がなされたので順調に研究が進んでいるといえる。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

cDNA Cloning and Distribution of the Xenopus Follistatin-Related Protein Okabayashi, K., Shoji, H., Onuma, Y., Nakamura, T., Nose, K., Sugino, H., and Asashima, M. Biochem. Biophys. Res. Commun.. 254, 42-48 (1999)

A Model system for Organ Engineering: Transplantation of in vitro Induced Embryonic Kidney Chan, T., Ariizumi, T., and Asashima, M. *Naturwissenschaften*, 86, 224-227 (1999)

Blood cell induction in *Xenopus* animal cap explants: effects of fibroblast growth factor, bone morphogenetic proteins, and activin Miyanaga, Y., Shiurba, R., and Asashima, M. *Dev. Genes Evol.* 209, 69-76 (1999)

Role of Activin and Other Peptide Growth Factors in Body Patterning in the Early Amphibian Embryo Asashima, M., Kinoshita, K., Ariizumi, T., and Malacinski, G. M. *Int. Rev. Cytology* 191, 1-52 (1999)

Cytochalasin B inhibits morphogenetic movement and muscle differentiation of activin-treated ectoderm in *Xenopus* Tamai, K., Yokota, C., Ariizumi, T., and Asashima, M. *Develop. Growth Differ.* 41, 41-49 (1999)

Peptide growth factors in amphibian embryogenesis: intersection of modern molecular approaches with traditional inductive interaction paradigms Asashima, M., Yokota, C., Takahashi, S., Lau, C. L. and Malacinski, G. M. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 1-10 (1999)

Effects of hepatocyte growth factor (HGF) and activin A on the morphogenesis of rat submandibular gland-derived epithelial cells in serum-free collagen gel culture Furue, M., Okamoto, T., Hayashi, H., Sato, J. D., Asashima, M., and Saito, S. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, 35, 131-135 (1999)

Changes in the adhesive properties of dissociated and reaggregated *Xenopus laevis* embryo cells Kuroda, H., Sakumoto, H., Kinoshita, K. and Asashima, M. *Develop. Growth Differ.* 41, 283-291 (1999)

Activin-treated Urodele Animal Caps: II. Inductive Interactions in Newt Animal Caps After Treatment with Activin A Ariizumi, T., Komazaki, S. and Asashima, M. *Zoological Science*, 16(1), 115-124 (1999)

Bio Experiment on Space Flyer Unit: Effects of Gravity on Early Development of Japanese Red Bellied Newt Yamashita, M., Izumi-Kurotani, A., Imamizo, M., Mogami, Y., Koike, H., Komazaki, S. and Asashima, M. *J. Space Technology and Science* 13(2), 12-17(1999)

Endoderm differentiation and inductive effect of activin-treated ectoderm in *Xenopus* Ninomiya, H., Takahashi, S., Tanegashima, K., Yokota, C. and Asashima, M. *Develop. Growth Differ.* 41, 391-400 (1999)

Activin Incorporation into Vitellogenic Oocytes of *Xenopus laevis* Fukui, A., Shiurba, R., Asashima, M. *Cellular and Molecular Biology* 45(5), 545-554 (1999)

Expression of Brachyury-like T-box transcription factor, Xbra3 in *Xenopus* embryo

Hayata, T., Eisaki, A., Kuroda, H., Asashima, M. *Dev. Genes Evol.* 209, 560-563 (1999)

In vitro organogenesis of pancreas in *Xenopus laevis* dorsal lips treated with retinoic acid Moriya, N., Komazaki, S. and Asashima, M. *Develop. Growth Differ.* 1999

Expression of *Xenopus* T-box transcription factor, *Tbx2* in *Xenopus* embryo yata, T., Kuroda, H., Eisaki, A. and Asashima, M. *Dev. Genes Evol.* 209, 625-628 (1999)

Bioassays of Inductive Interactions in Amphibian Development Ariizumi, T., Takano, K., Asashima, M and Malacinski, G.M. *Methods in Molecular Biology* 135: Developmental Biology Protocols 1, 89-112 (1999)

Molecular Cloning of a Novel *Xenopus* spalt Gene (*Xsal 3*) Onuma, Y., Nishinakamura, R., Takahashi, S., Yokota, T. and Asashima, M. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, 151-156 (1999)

Evidence that Far-Infrared Radiation Promotes Growth of *Xenopus Laevis* Shiurba, R., Hirabayashi, T., Kiyokawa, S., Fukui, A., Miyanaga, Y., Kojima, I. and Asashima, M. *Adv. Space Res.* 23(12), 2041-2044 (1999)

In vitro control of organogenesis and fundamental embryonic form by the peptide growth factor activin Ariizumi, T., Asashima, M. *J. Artif Organs* 2, 117-123 (1999)

Activation of Stat3 by cytokine receptor gp130 ventralizes *Xenopus* embryos independently of BMP-4 Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Matsuda, T., Heike, T., Asashima, M. and Yokota, T. *Dev. Biol.* 216, 481-490 (1999)

Bioassays for Studying the Role of the Peptide Growth Factor Activin in Early Amphibian Embryogenesis Asashima, M., Ariizumi, T., Takahashi, S. and Malacinski, G.M. *Methods in Molecular Biology* 136: Developmental Biology Protocols II (1999)

Effect of TGF- $\beta$  on morphogenesis in rat salivary gland-derived RSMG-1 cells Furue, M., Okamoto, T. and Asashima, M. *Tiss. Cult. Res. Commun.* 18:339-343(1999)

早田匡芳、浅島 誠、シャーレの中の器官形成 アクチビン処理による形態形成と器官形成の制御、*化学と生物*、第37巻、第2号、74-76、1999、社団法人日本農芸化学会

有泉高史、セン徳川、浅島 誠、試験管の中でつくったオタマジャクシの腎臓の移植、*遺伝*、第53巻、第3号、9-10、1999、裳華房

浅島 誠、金子邦彦、複雑系の科学の挑戦：要素間の相互作用が生み出す生物の柔らかさ、「ふれきてる」、第71号SPRING、28-35、1999、(株)東芝(広報室)

一木順二、福井彰雅、浅島 誠、両生類培養細胞の遺伝子発現と形態形成、*宇宙生物科学*、第12巻、第3号、242-243、1999

浅島 誠、生命の奥深さ「谷口財団70周年の歩み- 学術研究と国際シンポジウム」、1999、谷口財団

盛屋直美、浅島 誠、両生類の初期胚を用いた試験管内での人工臓器の形成と移植、バイオインダストリー、第16巻、第6号、12-19、1999

有泉高史、古賀裕美子、浅島 誠、動物の完全な形づくりと臓器形成をめざして、科学、第69巻、第6号、529-536、1999

浅島 誠、臓器の培養時代がきた、Health Tribune, 8月号, 12-17, 1999

浅島 誠、オーガナイザー研究を通して：実験発生学から分子発生学、そして発生工学へ、細胞工学、Vol.18 No.10, 1522-1532, 1999

浅島 誠、木下 圭 細胞の分化、図説細胞生物学、改訂2版、12章, 142-149, 1999, 丸善

浅島 誠、発生における胚葉と器官形成、生き物の形づくり, 24-39, 1999, 第13回「大学と科学」公開シンポジウム組織委員会

古賀裕美子、有泉高史、浅島 誠、アクチビンによる両生類の器官形成と形づくりの制御、Molecular Medicine, Vol.36, No.12, 1372-1380, 1999

岡林浩嗣、浅島 誠、人工臓器の基礎研究－発生学の立場から、生化学、Vol.71, No.12, 1436-1441, 1999

Chan, T.-C., Asashima, M. Development of the embryonic kidney, Clinical and Experimental Nephrology-Official Journal of the Japanese Society of Nephrology, 1999

浅島 誠、臓器移植を考える－新しい一つの可能性、(財)東京大学新聞社, 1999

Asashima, M., Kinoshita, K., Ariizumi, T., and Malacinski, G. M., Role of Activin and Other Peptide Growth Factors in Body Patterning in the Early Amphibian Embryo International Review of Cytology, A Survey of Cell Biology, Vol. 191, 2-52, 1999

木下 圭、浅島 誠、卵の秘密、第4章 発生の重要なターニングポイント1999, 東京化学同人