

下垂体隆起部の発生期に特異的に発現する遺伝子 Cytokine-like 1, Gap junction protein alpha 5の同定

Identification of Marker Gene of Pars Tuberalis Morphogenesis in Chicken Embryo. The expression of Cytokine-like 1 and Gap junction protein alpha 5 in the pars tuberalis

相澤 清香、檜垣佑理子、御輿 真穂、竹内 栄、高橋 純夫

Sayaka Aizawa, Yuriko Higaki, Maho Ogoshi, Sakae Takeuchi, Sumio Takahashi

岡山大学大学院自然科学研究科

Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

Summary

Adenohypophysis delivered from oral ectoderm consists of pars distalis (PD), pars intermedia and pars tuberalis (PT). The mechanisms of development of PD has been well studied, and the cell differentiation of PD has been well understood. However, the morphogenesis and the differentiation of PT are still unclear, and the gene expression during the PT development remains largely unknown. In this study, we explored the specifically expressing genes in PT during development and analyzed its spatiotemporal expressions pattern. Microarray analysis on laser-captured PT and PD tissues obtained from chicken embryos on embryonic day 10 (E10.0) showed high expressing genes, Cytokine-like 1 (CYTL1) and Gap junction protein alpha 5 (GJA5) in PT. A detail analysis of spatiotemporal expressions pattern during chick embryo development by *in situ* hybridization revealed that CYTL1 mRNA was first detected in lateral head ectoderm and ventral head ectoderm in E1.5. The CYTL1 expressions moved into Rathke's pouch at E2.5, then it was localized in PT primordium and continuously expressed in PT primordium until E12.0. On the other hand, GJA5 mRNA was transiently detected in PT primordium from E6 to E14.0, while the expression was not detected in PD during development. These results suggested that these genes may be involved in the regulation mechanism of PT development and could be a useful marker in the PT development.

はじめに

脊椎動物の内分泌制御の中核的存在である下垂体は、口腔上皮に由来する腺性下垂体と間脳腹側に由来する神経性下垂体からなる。腺性下垂体は主部(pars distalis, PD), 中間部(pars intermedia, PI), 隆起部(pars tuberalis, PT)から構成され、隆起部は腺性下垂体が口吻側に広がり正中隆起を覆う薄い細胞層として形成される。隆起部は主部とは異なる興味深い特徴を示す組織である。隆起部にはメルトニン受容体が高発現していることが古くから知られており、さらには生物時計を作り出す時計遺伝子の発現に日内リズムが認められ、それは光環境の変化に依存することから、隆起部は外部環境の日周期的、季節的なメッセージを生体内へ仲介する重要な役割をもつのではないかと考えられてきた。また下垂体前葉ホルモンのひとつである甲状腺刺激ホルモンは、下垂体主部と隆起部の両部位で産生されるが、それぞれの生理的役割は異なると考えられる。隆起部の甲状

腺刺激ホルモンは日内変動をもって発現する特徴を示し(Aizawa et al. 2007)、脳内に作用し季節繁殖制御に関与する(Nakao et al. 2008)。

下垂体主部は発生に伴い 5 つのホルモン産生細胞へと分化する。そのため、古くからホルモン産生細胞の分化メカニズム研究の有用なモデルとして多数の研究がなされ、細胞系譜が示されてきた(Zhu et al. 2007)。一方、隆起部の形態形成や分化はほとんど明らかにされておらず、発生過程に関与する因子の発現も不明な点が多い。

そこで本研究では隆起部の形態形成、発生機構に焦点をあてて解析を行った。ニワトリ胚を用いて発生期隆起部に特徴的に発現する遺伝子の探索とその時間・空間的発現動態を明らかにすることで、隆起部発生のマーカーとなる遺伝子を検討することを目的とした。

材料と方法 組織の採取

ニワトリ(White Leghorn)の有精卵を孵卵させ、Hamburger & Hamilton の発生段階表と照合し胚を採取した。

レーザーマイクロダイセクション法とマイクロアレイ解析

E10 ニワトリ胚頭部の凍結ブロックから $30\ \mu\text{m}$ の連続前額断切片を作製し、アセトン固定の後、トルイジンブルー染色し、レーザーマイクロダイセクションにより主部と隆起部を採取した(図 1)。60 個体から得られた隆起部と主部から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析(Agilent Expression Array, Chicken オリゴ DNA マイクロアレイ Ver.2.0,1 色法)を行った。一部の RNA は cDNA 作成に用い遺伝子発現解析を行った。

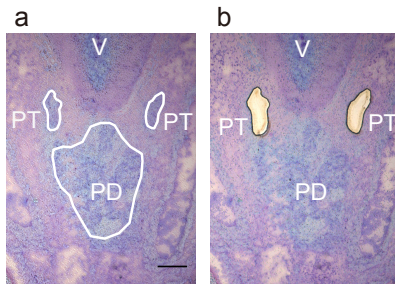


図 1 LMD によるニワトリ胚(E10)の隆起部と主部の採取 (a)LMD 前 (b)LMD 後 PT:隆起部, PD:主部, V:第三脳室, Bar=100 μm

in situ hybridization 法

遺伝子発現の組織学的解析には Dig 標識 cRNA プロブを用いた in situ hybridization 法 (ISH)を用いた。E1.0 から E2.5 のニワトリ胚は Whole mount in situ hybridization 法を用いて遺伝子発現部位を解析した。E3.0 以降は $10\ \mu\text{m}$ の切片を作成し,ISHを行った。

結果

マイクロアレイ解析より、主部と比較して隆起部で高発現する因子を解析したところ、Cytokine-like 1 (*CYTL1*), Gap junction protein alpha 5 (*GJA5*), RAS-like family 11 member A (*RASL11A*), Visual system homeobox 1 (*VSX1*), A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-like motifs 17 (*ADAMTS17*), Retinaldehyde binding protein 1 (*RLBP1*)などが隆起部マーカー遺伝子の候補因子として同定された。E10 の隆起部および主部の LMD サンプルから得られた cDNA を用いて、それぞれの遺伝子の発現を RT-PCR で検討したところ、隆起部での発現が確認された。さらに発現レベルを qPCR で解析したところ、それぞれの遺伝子発現は主部よりも

隆起部で高く、*CYTL1* は 240 倍、*GJA5* は 1000 倍の発現が見られた。

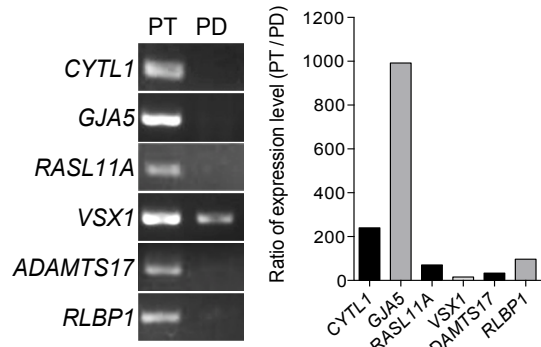


図 2 隆起部マーカー遺伝子候補の発現。E10 の PT, PD での発現を RT-PCR, qPCR で解析した。

そこで次に ISH 法を用いて *CYTL1* および *GJA5* の時間・空間的な発現動態を詳細に解析した。*CYTL1* mRNA 発現は E1.0 では見られず、E1.5 より頭部側方外胚葉(Lateral head ectoderm, LHE)で観察された(図 3)。その発現は E2.5 では腹側へ移行し、ラケ陥入部での発現が確認された。

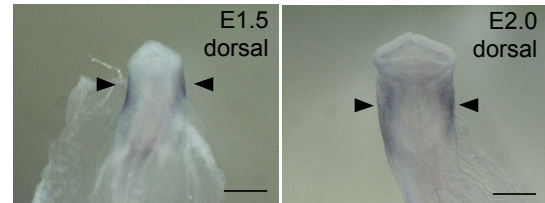


図 3 ニワトリ胚における *CYTL1* 発現部位

E3 および E3.5 ではラケ囊の前方部位で、E4 ではラケ囊の側方で *CYTL1* の発現が見られた(図 4a-c, 矢頭)。E5 からは隆起部原基における発現が強くなり、E12 までシグナルは見られたが、E14 では消失していた。

一方 *GJA5* mRNA の発現は、E1 から E5 まで見られなかったが、ラケ陥入口が閉じ隆起部が間脳底へと上方に伸びはじめる E6 から隆起部原基での発現が確認された。続く E7 から E10 では強いシグナルが見られ、E12 でも発現が確認できたが、E14 では消失していた(図 5)。

考察

本研究ではニワトリ胚を用いて発生期隆起部に特徴的な遺伝子の探索とその時間・空間的発現動態を明らかにし、隆起部発生のマーカーとなる遺伝子を同定した。マイクロアレイ解析の結果、E10 では既に主部と隆起部で遺伝子発現が異なっていることが明らかとなった。特に隆起部で特異的に高発現する因子として *CYTL1* と *GJA5* が同

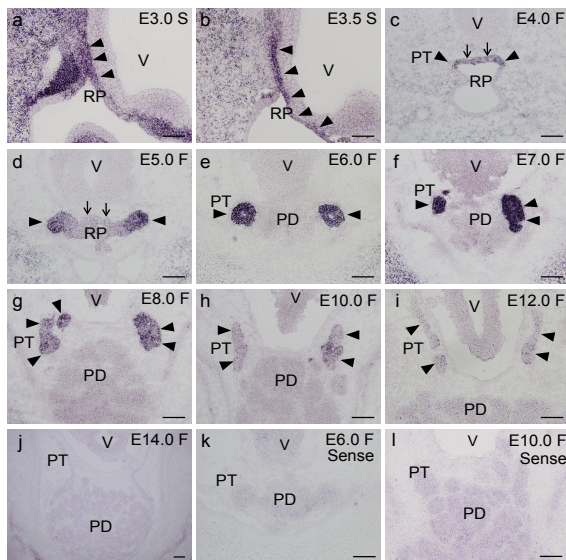


図4 ニワトリ胚(E3~E12)頭部における *CYTL1* 発現。RP:ラトケ嚢, PT:隆起部, PD:主部, V:第三脳室, Bars=100 μ m

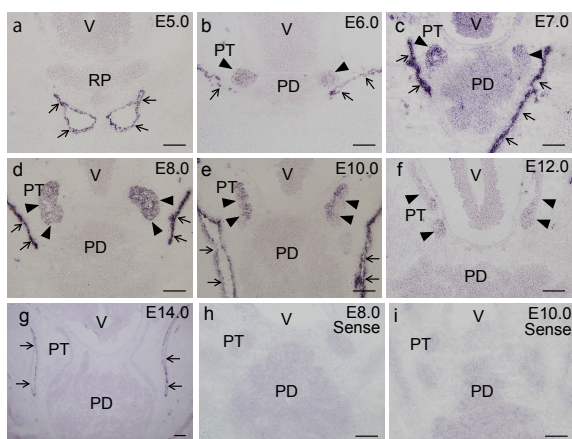


図5 ニワトリ胚(E5~E12)頭部における *GJA5* 発現。RP:ラトケ嚢, PT:隆起部, PD:主部, V:第三脳室, Bars=100 μ m

定された。*CYTL1*は2007年にKimらによる軟骨形成に関わるESTの解析で同定された分泌タンパクであり、*Sox9*と*IGF1*の発現を誘発することで軟骨形成を引き起こすことが知られている(Kim et al. 2007)。*CYTL1* mRNAはマウス胚軟骨細胞で一過性に強く発現し、その後減弱することが報告されている。本研究でも、下垂体の周囲に位置するトルコ鞍を形成する軟骨細胞で一過性発現が確認されている。本研究では、*CYTL1* mRNAは胚発生期に隆起部で発現することを明らかにした。隆起部での*CYTL1*発現は胚発生の初期であるE1.5から見られた。興味深いことに、*CYTL1*発現部位は頭部側方外胚葉(LHE)でみられ、その発現部位は頭部腹側外胚葉(VHE)へと移行し、ラ

トケ嚢の一部となった。従来、腺性下垂体は神経板前方の正中神経隆起(anterior neural ridge, ANR)が前脳底方向へと移動したのちに形成されたラトケ嚢に由来することが、ヒキガエルやラット、ウズラを用いた研究より報告されている(Kawamura et al. 1992, Kouki et al. 2001)。しかし、腺性下垂体の起源ではないとされる頭部側方外胚葉(LHE)やレンズ外胚葉原基と間脳腹側領域を共培養すると下垂体ホルモン産生細胞が誘導されることから、これらの領域も下垂体への分化能を有する可能性も示されている(Gleiberman et al. 1999)。今回得られた*CYTL1* mRNA発現領域がLHEから下垂体原基へ移動するという結果は、ANRに加えてLHEの一部も腺性下垂体の形成に関与するという考えを強く支持している。また、*CYTL1*は隆起部原基に特異的に高発現していたため、LHEは腺性下垂体の特に隆起部の形成に重要であることが考えられる。

Gap junction protein alpha5(GJA5;connexin40)は、40kDaのコネキシンであり、隣接する細胞間の情報伝達に参与する。下垂体前葉におけるギャップジャンクションの存在は1975年にFletcherらによって初めて示された(Fletcher et al. 1975)。しかし、これまでの下垂体における報告は、主部のGap junction protein alpha 1(GJA1; connexin43, Cx43)に着目したものが中心であり、GJA5や隆起部に着目した例は本研究が初めてである。GJA5 mRNAはE6からE12の隆起部に特異的に発現していた。GJA5が発現し始めるE6は、ラトケ陥入が閉じ隆起部が間脳底に沿って上方に伸びはじめる時期である。ギャップジャンクションの機能を考えると、GJA5が隆起部の伸長の形態形成に参与する可能性も示唆される。

本研究では、隆起部発生期における*CYTL1*、*GJA5*の発現を明らかにした。隆起部原基では α GSU mRNAが高発現し、ニワトリ胚では発生初期のE3.5のラトケ陥入側方で最初に現れる(Inoue et al. 2013)。そのため、発生期初期から成体で隆起部に高発現する α GSUが隆起部マーカーとして用いられてきたが、下垂体主部でも発現が観察される事から、その特異性に問題があった。本研究で同定した*CYTL1*、*GJA5*は主部ではほとんど発現していないため、隆起部の発生に特異的なマーカーとして利用が可能であり、隆起部発生機構の解明に有用であると考えられる。

参考文献

Aizawa S, Higaki Y, Dudani A, Nagasaka M, Takahashi S, Sakata I, Sakai T. Identification of marker genes for pars tuberalis morphogenesis in

the chicken embryo: the expression of Cytokine-like 1 and Gap junction protein alpha 5 in the pars tuberalis. *Cell and Tissue Research*, 2016. 366(3):721-731.