

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 年度～2009 年度

課題番号：20780152

研究課題名 (和文) 魚類筋発生における遅筋細胞の移動の分子機構

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms on migration of slow muscle cells in fish myogenesis

研究代表者

木下 滋晴 (KINOSHITA SHIGEHARU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：40401179

研究成果の概要 (和文)：

魚類の筋発生では、脊索近傍の adaxial cell から生まれた遅筋細胞が体の表層に移動することが重要なステップとなるが、その分子機構の詳細は不明である。本研究では遅筋の中でも移動する細胞と移動しない細胞があることに着目し、蛍光タンパク質でそれぞれを可視化したトランスジェニック魚を作出し、遅筋細胞の発生過程を生きた個体で詳細に解析できる系を確立した。また、それを活用し、両者で特異的に働く遺伝子の発現制御機構は大きく異なることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Lateral migration of adaxial cell-derived slow muscle cells is crucial in fish myogenesis. However, detailed molecular mechanisms responsible for the migration are largely unknown. In this study, we established transgenic fish which expresses fluorescent protein in migrating and not migrating slow muscle cells. By using the transgenic fish, we revealed that distinct mechanisms are involved in gene expression specifically to migrating and not migrating slow muscle cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：水圏生物工学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：筋発生・魚類・遅筋・細胞移動

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の移動は器官形成において重要な役割を果たしている。発生の様々な局面で、幹細胞から分化した細胞は特定の場所へ特定

の経路をたどって移動し、そこで最終成熟し器官を形成する。筋肉についても、例えば、ほ乳類の四肢の筋肉は体幹部の dermomyotome から肢芽へと移動する細胞に

よって形成される。一方、魚類においては速筋と遅筋が、それぞれ深部および表層に位置し、解剖学的に分離していることが知られるが、この異なる筋線維の層の形成にも細胞の移動が決定的な役割を果たしている。魚類の筋発生はゼブラフィッシュでよく研究されており、始めに脊索に沿って存在する一層の細胞群である *adaxial cell* が、遅筋線維としての性状を特徴づける遅筋型のみオシン重鎖 (myosin heavy chain, MYH) を発現し始め、表層へ向かって放射状に移動し遅筋の層を形成する。続いて、残る筋節部分が速筋へと分化し、速筋型の MYH を発現する。さらに、速筋の分化の開始には、遅筋細胞の移動が刺激となるという報告もあり、魚類の筋形成には遅筋細胞の移動がきわめて重要であることがわかる。

遅筋細胞の移動には、幾つかの細胞接着因子が何らかの関与をすることは明らかである。細胞接着因子は筋細胞だけでなく、細胞間相互作用を通じて様々な細胞の移動に関わるが、Cortes ら (2003) は細胞接着因子の一つである *m-cadherin* と *n-cadherin* がゼブラフィッシュ胚の筋節で発現し、遅筋細胞の移動に対応して発現領域が変化することを示した。さらに、これら遺伝子をノックダウンすると、遅筋細胞は移動するものの、体表まで届かず途中で止まるものが多く現れた。一方で、移動が完全に止まるわけではないことから、さらに別の分子が関与することも示唆されている。また、Mann ら (2006) はゼブラフィッシュ筋節で発現する新たな細胞接着因子として *neuroilin* と *neuroilin-like cell adhesion molecule* を、Dumont ら (2007) はニジマス筋節の遅筋細胞で発現する細胞接着因子 *NLRR-1* を報告したが、これら分子の遅筋細胞の移動への関与は全く不明である。このように、遅筋細胞の移動は魚類の筋形成の重要なイベントであるが、その分子機構にはまだ不明な点が多く残されている。ところで、魚類には、同じく *adaxial cell* から分化する細胞として *muscle pioneer* 細胞が存在する。当該細胞は遅筋型 MYH を発現する遅筋細胞であるが、発生後はほとんど移動せずに脊索近傍の水平筋隔に止まる。すなわち、遅筋細胞と *muscle pioneer* 細胞は発生の系譜は同じながら移動性という点が大きく異なり、両者の違いを検討することで移動に関わる分子機構に迫れるものと期待できる。

他方、ゼブラフィッシュやメダカといった小型魚類は、器官形成における細胞の移動を解析するのに格好のモデル生物である。これらは、体外で発生し胚が透明であるため発生過程の観察が容易であること、特定の細胞をラベルする胚操作の技術や遺伝子導入、遺伝子の機能阻害の技術が確立されていること、さらに生きた個体において一細胞レベルでの観察が可能なことなど、様々な利点を備える。また、ゲノムデータベースが充実し、種々の遺伝子の単離も容易である。したがって、両魚種は筋発生に関わらず、神経発生など様々な細胞移動を伴う生命現象の解析系として広く用いられている。申請者らはトラフグの遅筋型 MYH である *MYH<sub>M5</sub>* の遺伝子上流 4kb を単離し、これに緑色蛍光タンパク質 (*green fluorescent protein, GFP*) をつないだコンストラクトを作製した。そして、これを導入したゼブラフィッシュ胚において、遅筋と心筋を特異的に可視化できることをみい

だした。さらに、申請者が所属する研究室ではメダカの *muscle pioneer* 細胞で発現する MYH が同定されており、同様に当該 MYH の遺伝子上流域を用いることで *muscle pioneer* 細胞を可視化することも可能と考えられる。生きた個体でこれら筋細胞を特異的に可視化できれば、その発生過程を詳細に観察できるとともに、それら細胞を抽出し、両細胞の遺伝子発現パターンの違いを検討することもできる。こうした手法を用いることで、遅筋細胞の移動に関わる新しい分子の発見など、先駆的な研究の展開が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は、ゼブラフィッシュやメダカを主対象に、移動する遅筋細胞 (表層遅筋) と移動しない遅筋細胞 (*muscle pioneer*) の個別の可視化と、それら細胞で特異的に働く遺伝子の発現制御機構を解析し、魚類の筋発生における遅筋細胞の移動の分子機構の解明に基礎的知見を提供することを目的とする。

## 3. 研究の方法

トラフグの遅筋型 MYH である *MYH<sub>M5</sub>* の遺伝子上流 4kb に GFP をつないだコンストラクト作製し、これを導入したゼブラフィッシュ胚において、移動する遅筋で GFP が発現することを免疫染色やライブイメージングの手法を用いて確認する。また、移動しない遅筋である *muscle pioneer* 細胞で発現するメダカの MYH につき、同様に遺伝子上流域を GFP 遺伝子に結合したコンストラクトを作成し、これをメダカ受精卵に導入して、*muscle pioneer* 細胞を可視化する。GFP の特異的な発現は遅筋細胞を認識する抗体や *muscle pioneer* 細胞のマーカーである *engrailed* の抗体との共染色で確認する。また、移動する遅筋細胞や *muscle pioneer* 細胞で特異的に GFP を発現する個体については、トランスジェニック系統として確立すべく、次世代を作製する。さらに、上流領域のデリーションターゲットを作成し、*in vivo* レポーターアッセイにより、転写に必要なプロモーター領域を明らかにし、移動する細胞とそうでない細胞における違いを検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 移動する遅筋の可視化

魚類の遅筋において *adaxial cell* として誕生し表層に移動する遅筋細胞の発生には、*hedgehog* (Hh) シグナルが決定的に関わるが、*MYH<sub>M5</sub>* の遺伝子上流 4kb に GFP 遺伝子を連結したレポーターベクターをゼブラフィッシュ胚に導入し、さらに薬剤処理で Hh シグナルを阻害したところ、無処理胚に比べて明らかに GFP の発現が減少した。すなわち *MYH<sub>M5</sub>* プロモーターで GFP を発現する遅筋細胞の発生は Hh シグナルに依存することが示され、移動する遅筋線維を可視化できていると考えられた。さらに、遅筋細胞が移動している時期のゼブラフィッシュ胚を観察したところ、*adaxial cell* および移動途中の遅筋と思われる細胞で GFP が発現していることを確認した (図 1)。

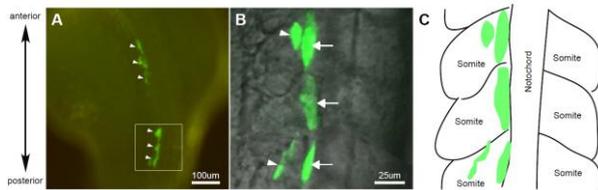


図 1. 移動する遅筋細胞の可視化. トラフグの遅筋/心筋型 MYH 遺伝子のプロモーターを使うことで、誕生したばかりの遅筋細胞 (adaxial cell) と移動途中の遅筋細胞が可視化できた. A, トランスジェニック魚における GFP の発現. 背面図. 上が頭側. B, A の枠内の拡大図. Adaxial cell (矢印) および移動途中の遅筋細胞 (矢尻) が GFP を発現している. C, B の模式図.

## (2) 移動しない遅筋の可視化

移動しない遅筋細胞すなわち muscle pioneer に相当する領域で発現するメダカの *MYH<sub>emb1</sub>* につき、その翻訳開始点上流 1.9kb を GFP 遺伝子に連結したコンストラクトを構築し、同コンストラクトを染色体に固定したトランスジェニック・メダカ系統を確立した。この系統では GFP が水平筋隔で特異的に発現することを確認した (図 2)。GFP の発現部位は muscle pioneer のマーカーである *engrailed* の発現部位と重なること、Hh シグナルを阻害することで、プロモーター活性が抑制されることが示され、*mMYH<sub>emb1</sub>* が muscle pioneer で発現することが確認された。

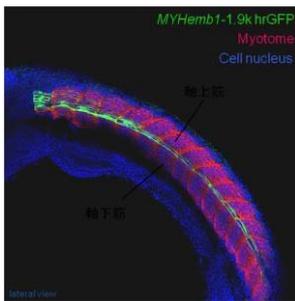


図 2. 移動しない遅筋細胞の可視化. メダカの水平筋隔にある muscle pioneer 細胞で発現する MYH 遺伝子のプロモーターを使うことで、移動しない遅筋細胞を可視化できた. 図はトランスジェニックメダカの側面図で筋線維を赤色で染色した。背側と腹側の筋肉の間の水平筋隔で GFP が発現している。

## (3) 移動する遅筋細胞と移動しない遅筋細胞に特異的な遺伝子の発現制御機構の検討

Adaxial cell に由来し、発生過程で魚体表層へと移動する遅筋で特異的に発現するトラフグのミオシン重鎖遺伝子 *MYH<sub>M5</sub>* につき、ゼブラフィッシュオーソログである *MYH7B* との比較解析から、両遺伝子上流にある保存領域を同定し、さらにその欠損変異体の解析から、*MYH<sub>M5</sub>* の翻訳開始点上流 479b~606b の 128bp 中にその特異的な遺伝子発現を正に制御する cis エレメントが含まれることが明らかになった。また、移動しない遅筋である muscle pioneer で特異的に発現するメダカ *mMYH<sub>emb1</sub>* を対象に *in vivo* レポーター解析を行った。さらに、欠損変異体や点変異体を作成してプロモーター領域を絞り込み、トラフグオーソログである *MYH<sub>M2528-2</sub>* の上流配列と相同性を示す 61bp の配列が、*mMYH<sub>emb1</sub>* のプロモーター活性に大きく寄与することを明らかにした。この 61bp の領域につき、先の *MYH<sub>M5</sub>* のプロモーター 128bp との間で共通する転写因子は検索されなかった。また、この領域に含まれる既報の転写因子の結合配列

に変異を導入してもプロモーター活性は変化せず、未知の cis エレメントの存在が考えられた。

以上の結果、*MYH* をマーカーとすることで、移動する遅筋と移動しない遅筋を的確に区別できることが示された。これらを用いることで、遅筋細胞の移動の様子など、その発生過程を生きた個体で詳細に解析できる系が確立できた。また、両者の発生は共に Hh シグナルに依存するものの、結果として発現する *MYH* は異なり、発現に必須の転写制御領域は両者で保存されておらず、遺伝子発現の制御機構は全く異なることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Yosuke Ono, Shigeharu Kinoshita, Daisuke Ikeda, and Shugo Watabe: Early development of medaka *Oryzias latipes* muscles as revealed by transgenic approaches using embryonic and larval types of myosin heavy chain genes. *Developmental Dynamics*, 2010, 239, 1807-1817. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ① S. Kinoshita, Y. Sugano, Y. Ono, and S. Watabe: Identification functional analysis of the promoter region in the torafugu myosin heavy chain gene, *MYH<sub>M5</sub>*, involved in cardiac and superficial slow muscle specific expressions. 6<sup>th</sup> European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009年7月18日, Roma, Italy
- ② Y. Ono, S. Kinoshita, and S. Watabe: The spatio-temporal expression of sarcomeric myosin heavy chain genes during muscle development of medaka *Oryzias latipes* are regulated by their 5'-flanking region as revealed by transgenic constructs. 6<sup>th</sup> European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009年7月18日, Roma, Italy
- ③ D.B. Akolkar, S. Kinoshita, Y. Ono and S. Watabe: Expression patterns of multiple myosin heavy chain genes identify tissue-specific fibre types in adult skeletal muscles of torafugu *Takifugu rubripes*. Annual Main Meeting 2009 of the Society for Experimental Biology, 2009年6月28日, Glasgow, UK
- ④ L. Yasmin, S. Kinoshita, D. Ikeda, Y. Ono, D.B. Akolkar, and S. Watabe: A 5'-flanking region of the myosin heavy chain gene from torafugu (*Takifugu rubripes*) promotes developmental stage-specific transcription. WFC2008 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress, 2008年10月23日, 横浜

- ⑤ Y. Ono, S. Kinoshita, D. Ikeda, and S. Watabe: The regulation in the expression of sarcomeric myosin heavy chain genes during muscle development in medaka *Oryzias latipes*. WFC2008 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress, 2008年10月23日, 横浜
- ⑥ D.B. Akolkar, S. Kinoshita, L. Yasmin, Y. Ono, D. Ikeda, and S. Watabe: Dominant sarcomeric myosin heavy chain genes expressed in adult fast, slow and cardiac muscles in torafugu *Takifugu rubripes*. WFC2008 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress, 2008年10月23日, 横浜
- ⑦ S. Kinoshita, Y. Ono, D. Ikeda, and S. Watabe: Fiber type-specific transcriptional regulation in the expression of fish myosin heavy chain genes. WFC2008 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress, 2008年10月23日, 横浜
- ⑧ 木下滋晴・Md. Asaduzzaman・小野陽介・D.B. Akolkar・浅川修一・渡部終五: 遅筋/心筋型魚類ミオシン重鎖遺伝子トラフグ *MYH<sub>M5</sub>* の組織特異的発現に關与するプロモーターの解析. 平成22年度日本水産学会春季大会, 2010年3月27日, 藤沢
- ⑨ 木下滋晴・Md. Asaduzzaman・小野陽介・D.B. Akolkar・浅川修一・渡部終五: ミオシン重鎖アイソフォームを用いた筋特異的プロモーターの解析. 2010年生体運動研究合同班会議, 2010年1月9日, 東京
- ⑩ 木下滋晴・Md. Asaduzzaman・小野陽介・D.B. Akolkar・浅川修一・渡部終五: 魚類の表層遅筋および心筋に特異的な遺伝子発現に必要な転写制御領域の解析. 平成21年度日本水産学会秋季大会, 2009年10月1日, 盛岡
- ⑪ 小野陽介・木下滋晴・渡部終五: メダカの筋発生におけるミオシン重鎖遺伝子 *MYH<sub>emb1</sub>* の発現制御と機能. 第5回 東京大学生命科学シンポジウム. 2008年4月19日, 東京
- ⑫ 小野陽介・木下滋晴・渡部終五: メダカ胚発生における骨格筋型ミオシン重鎖の発現制御機構. 生体運動研究合同班会議2009, 2009年1月10日, 東京
- ⑬ 小野陽介・木下滋晴・渡部終五: メダカ胚型ミオシン重鎖遺伝子の発現を制御する上流領域の解析. 平成21年度日本水産学会春季大会, 2009年3月28日, 東京
- ⑭ 木下滋晴・菅野雄耶・小野陽介・渡部終五. 魚類の心筋および遅筋に特異的なプロモーターの単離と機能解析. 平成21年度日本水産学会春季大会, 2009年3月28日, 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.suikou.fs.a.u-tokyo.ac.jp/in dex.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木下滋晴 (KINOSHITA SHIGEHARU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 40401179