

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21370098

研究課題名(和文) Gcm遺伝子と血中カルシウム濃度調節器官の獲得に関する環境進化発生学的研究

研究課題名(英文) Environmental, Evolutionary Developmental Study on Changes in Gcm genes and Regulating Organs for Blood Calcium Concentration.

研究代表者

岡部 正隆(Okabe, Masataka)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：10300716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物はその進化の過程で水中から陸上に進出した。血中カルシウム濃度は生命維持のために一定に保たれていなければならないが、これを制御する器官は棲息環境中のカルシウムの濃度や分布形態によって多様である。我々は、マウス、ゼブラフィッシュ、両者の共通祖先に近い原始的条鰭類魚類であるポリプテルスなどの各種脊椎動物を用いて、ゲノム中のGcm遺伝子の数やその発現制御機構の変化がどのように各器官の形成や機能に影響を与えたのかを調べることに着想し、コンディショナルノックアウトマウスの作成、ゼブラフィッシュ塩類細胞エンハンサーの解析、ポリプテルス外鰓の発生解析、比較ゲノム解析を行った。

研究成果の概要(英文)：During their evolution, vertebrate animals had invaded the land from water. Blood calcium needs a constant concentration to maintain normal life activities. However, a number of organs do exist for calcium regulation among vertebrate animals, depending on calcium concentration and/or its distribution in a given environment. Using mice, zebrafish and Polypterus, one of living species representing common ancestors of ray-finned fishes (actinopterygians), we have investigated evolutionary effects of changes in a number of Gcm genes and their regulatory pathways on development and function of each organ. We have carried out a construction of conditional knockout mice, enhancer analyses of Gcm genes involved in the formation of zebrafish ionocytes, developmental analyses of external gills in Polypterus and comparative genomics of Gcm genomes.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化発生

キーワード：脊椎動物 進化 発生 Gcm カルシウム

1. 研究開始当初の背景

四肢動物は転写制御因子 Gcm をコードする遺伝子を2つ持つ。マウスの Gcm1 遺伝子は胎盤や後腎近位尿細管に、Gcm2 は血中カルシウム濃度を調節する副甲状腺に特異的に発現する。それぞれのノックアウトマウスは胎盤形成不全と副甲状腺欠損により致死であり、Gcm(Gcm1 および Gcm2)はこれを発現する器官の発生に必須であった。研究代表者は、Gcm2 の進化発生学的解析から、魚類で水中のカルシウムを吸収する鰓弁の細胞が、上陸に伴い四肢動物の副甲状腺へと進化したことを明らかにした。胎盤、副甲状腺、腎尿細管、内鰓(真骨魚類)以外にも Gcm2 は両生類や原始的条鰭類ポリプテルスの外鰓にも発現していることを発見し、Gcm はこれらのお互いに似ても似つかぬ器官の発生に最初の役割を果たし、その後その器官でカルシウム調節という共通の生理機能を果たしているのではないかと考えた。

各種脊椎動物の Gcm 遺伝子に着目すると、無顎類ヤツメウナギからは Gcm2 のみが見いだされて、その後のゲノム倍加によって Gcm2 から Gcm1 が生じるように予測される。しかしゼブラフィッシュやフグなどの各種真骨魚類からは Gcm2 のみが見いだされ、Gcm 遺伝子の進化とくに Gcm1 遺伝子のどのように成立したのか、また Gcm 遺伝子の増減の過程は不明であった。

そこで研究代表者は、各種脊椎動物の棲息環境中のカルシウム濃度に着目して、この生物を生理学的、発生学的、比較ゲノム学的比較して、Gcm 遺伝子の進化について検討することに着想した。

2. 研究の目的

各種脊椎動物の棲息環境中のカルシウムに着目し、進化の過程で環境が器官の発生機構や生理機能にどのような影響を与えたのかを明らかにする目的で、各種脊椎動物における血中カルシウム濃度調節を行う多様な器官の発生とその生理機能を司る転写制御因子 Gcm の機能と遺伝子進化を明らかにする。成獣マウスにおける Gcm 遺伝子の生理機能を明らかにする。Gcm2 遺伝子のみが見いだされる真骨魚類におけるカルシウム調節機構と Gcm 遺伝子の関係を明らかにする。四肢動物と真骨魚類のゲノム構造の変化を理解するために、原始的な条鰭類ポリプテルスの Gcm 遺伝子の構造を明らかにし、Gcm 発現器官である外鰓の発生と機能を明らかにする。各種脊椎動物のゲノム情報を用いて Gcm 遺伝子とそのシンテニーブロックの進化過程を明らかにする。これらの情報をもとに、各種脊椎動物の Gcm 遺伝子の機能の変化と、環境、器官の発生機構の進化を有機的に結びつける。

3. 研究の方法

1) マウス成獣における Gcm 遺伝子の機能解析を行うために、Gcm1 および Gcm2 コンディ

ショナルノックアウトマウスの作成とマウス Gcm1 と Gcm2 それぞれに対するウサギポリクローナル抗体とマウスモノクローナル抗体の作成を行う。遺伝子組換えマウス作成においては理化学研究所 CDB の協力を得て行う。Gcm1 および Gcm2 遺伝子の完全欠失マウスは生理学研究所の池中教授の研究グループから譲渡を受ける。

2) ゼブラフィッシュ塩類細胞の発生における Gcm2 遺伝子の機能解析とエンハンサー解析を行う。Gcm2 遺伝子座を緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子に置き換えた BAC ゲノムクローンや、Gcm2 遺伝子の周辺ゲノム断片に GFP 遺伝子を連結したベクターを用いた遺伝子組換えゼブラフィッシュを作成し、カルシウム調節器官における Gcm 遺伝子の発現調節機構を明らかにする。Gcm2 遺伝子の機能評価はアンチセンスモルフォリーノを用いて器官形成時における Gcm2 遺伝子の機能を低下させて行う。

3) 四肢動物と真骨魚類を比較検討する上で、四肢動物と真骨魚類の共通祖先形質をもつポリプテルスのカルシウム調節器官の発生と Gcm 遺伝子の解析を行う。ゲノム BAC ライブラリーの作成など Gcm 遺伝子座のゲノム解析を行う他、塩類細胞や外鰓の発生を調べる目的で、研究室内で安定して胚を確保する方法の確立と、実験発生学的方法論の確立を行う。

4) 各種脊椎動物のゲノムデータベースを用いて Gcm 遺伝子の進化過程を検討する。年々豊富になっていく脊椎動物のゲノム情報を利用して Gcm 遺伝子とそのシンテニーブロックの進化を比較ゲノム解析によって検討する。特に四肢動物と真骨魚類の共通祖先に近いと考えられるポリプテルスのゲノムはゲノムデータベースがないため、国立遺伝学研究所と共同でゲノム解析を行う。

4. 研究成果

1) Gcm1 と Gcm2 のコンディショナルノックアウトマウスを作成した。ベクターの作成と ES 細胞の選択において予想外のトラブルに見舞われたため、当初の予定よりもマウスの作成が遅延した。各遺伝子ともに3つの独立した ES 細胞のクローンから作成し、各遺伝子3系統で合計6系統のマウスを樹立した。このうち ES 細胞選択用のネオマイシン耐性遺伝子が Gcm2 遺伝子座に残存しているマウス系統では、Gcm2 遺伝子を除去する cre 遺伝子が存在しなくても、副甲状腺の位置が正常のマウスと異なり、さらに異所性副甲状腺が生じていた。RT-PCR 法にて Gcm2 遺伝子座に挿入されたネオマイシン耐性遺伝子が Gcm2 遺伝子の発現量に影響している可能性が示唆されたため、Flp 遺伝子を用いて Gcm2 遺伝子座に挿入されたネオマイシン耐性遺伝子

を除去した。現在は、他施設の作製した Gcm2 遺伝子欠失マウスを組み合わせ、タモキシフェン誘導型 cre 存在下で成獣になってから Gcm2 遺伝子を除去した場合の表現型の解析を行っている。また Gcm1 コンディショナルノックアウトマウスも同様にネオマイシン耐性遺伝子を除去し、他施設で系統樹立した Gcm1 遺伝子欠失マウスを組み合わせ、表現型の解析を継続して行っている。また Gcm1 と Gcm2 の特異的ポリクローナル抗体の作製と Gcm2 のモノクローナル抗体の作製を行い、特異的抗体を得た。

2) ゼブラフィッシュの塩類細胞における Gcm2 遺伝子の発現に十分な塩類細胞特異的エンハンサーを、Gcm2 遺伝子の 5' 側と 3' 側に同定した。そのエンハンサーはそれぞれ 245 塩基と 220 塩基の中に存在した。このエンハンサーはプロトンポンプ型塩類細胞 (HRC) において Gcm2 遺伝子を発現させるものであった。得られたエンハンサーの塩基配列に複数の転写因子結合配列の候補を見だし、この部分を欠失した改変エンハンサーの活性をゼブラフィッシュ胚で検証したが、各候補結合配列を改変してもエンハンサー活性は残存し、上流候補転写因子を絞り込むには至らなかった。この HRC 特異的エンハンサーは、真骨魚類であるメダカ、クサフグ、トゲウオの公開されているゲノム塩基配列においては、どの種においても未解析部分に相当し相同領域の同定には至らなかった。一方、メダカとクサフグ胚の Gcm2 遺伝子を同定し、この遺伝子の発現パターンを解析したところ、メダカやクサフグにおいても Gcm2 が一部の体表塩類細胞に発現していることを確認した。さらに、メダカ胚とクサフグ胚への遺伝子導入実験により、メダカ胚とクサフグ胚の体表塩類細胞においてもゼブラフィッシュの HRC 特異的エンハンサーが塩類細胞で転写活性を示すことを明らかにした。このことはゼブラフィッシュで同定した HRC 特異的エンハンサーに類似した機構が真骨魚類に保存されていることを強く示唆している。またより原始的な条鰭類魚類であるチョウザメとポリプテルス、両生類アフリカツメガエルにおいては、体表塩類細胞は存在するが、これらの細胞に Gcm2 は発現していないことも明らかとなった。このことから、ゼブラフィッシュの HRC 特異的エンハンサーは真骨魚類が進化する際に真骨魚類独自に獲得されたエンハンサーであると結論した。一方で、ゼブラフィッシュにおいてカルシウムチャンネルを発現する塩類細胞は Gcm2 発現塩類細胞自体ではなく、隣接する細胞であることが明らかとなった。この2つの細胞はお互いに隣接して存在することから、発生学的にないしは生理学的に関連している可能性があり、今後明らかにしていきたい。

3) Gcm2 を発現するポリプテルスの外鰓の発

生を解析するために、実験発生学的アプローチが可能になるように安定して受精卵を得るための方法の確立を行った。その結果、性腺刺激ホルモン放出ホルモン剤 (Ovaprim) を用いる方法と、水温を飼育水内の塩類の調整する方法で、8ペアの雌雄を順次産卵させて定期的に胚を得るが可能となった。これにより組織移植や細胞標識実験、遺伝子の発現抑制実験など実験発生学的アプローチが可能となった。蛍光色素標識実験から、外鰓は神経胚期の頭部神経褶の後端腹側上皮から生じることが明らかとなった。神経褶の舌骨弓領域とその腹側下方の表皮外胚葉を除去すると、表皮外胚葉の領域を除去した場合のみ外鰓芽が形成されなかった。この表皮外胚葉領域を切り取り異所的に移植すると、舌骨弓領域の表皮外胚葉に移植した場合のみ余剰の外鰓が形成された。さらに、内部構造を経時的に調べると、神経胚期になると外鰓形成領域の内胚葉が外側へと肥厚し膨出し外鰓芽へと入り込んでいくことが明らかになった。以上の結果から、表皮外胚葉の領域からのシグナルによって内胚葉が肥厚膨出し外鰓芽形成が誘導され、その後神経褶から分化した神経堤細胞とともに外鰓が形成されることが示唆された。Gcm2 遺伝子の発現はこの外鰓芽の発生と共に開始し、表皮外胚葉に発現していた。

4) 脊椎動物の Gcm 遺伝子の系統進化に関しては、原索動物ナメクジウオに2つの Gcm 遺伝子を同定したが、Gcm1 か Gcm2 であるかの区別がつかなかった。また、無顎類ヤツメウナギから4つの Gcm 遺伝子を同定したが、明らかな Gcm2 は1つであり、残りの3つは Gcm1 か Gcm2 の区別が困難であった。一部は偽遺伝子化している可能性もある。軟骨魚類ゾウギンザメのゲノムからは現在のところ Gcm2 遺伝子しか見いだせない。軟骨魚類、条鰭魚類、肉鰭類の進化分岐点で、どのように Gcm1 と Gcm2 が進化してきたのか、特に Gcm1 遺伝子が如何にして生じたのかを明らかにするため、条鰭類には存在しない Gcm1 の遺伝子のシンテニーブロックの比較解析を進めた。真骨魚類であるゼブラフィッシュの Gcm2 遺伝子の周辺領域の塩基配列は、他の四肢動物の Gcm2 遺伝子間よりも格段に保存性が低く、これは真骨魚における全ゲノム倍加による遺伝子の多様化が原因であると予想された。このため Gcm 遺伝子の進化に関して、真骨魚類のゲノムデータは比較検討が難しく、全ゲノム倍加前のゲノム形態を残すと予想されるポリプテルスの Gcm2 遺伝子の周囲の塩基配列を明らかにする必要性が生じた。

米国の研究者が作成した既存のポリプテルスのゲノム BAC ライブラリーには残念ながら Gcm2 周辺領域を含むクローンが存在しなかったため、新たにゲノム BAC ライブラリーを構築した。さらに国立遺伝学研究所の協力で全ゲノムショットガンシーケンシングも

開始した。これらのポリプテルスのゲノム解析から、四肢動物にまで保存される Gcm1 及び Gcm2 シンテニープロックの存在が明らかになった。Gcm2 シンテニープロックでは各遺伝子が四肢動物と同じ配置で保存されていた。Gcm1 シンテニープロックには四肢動物同様に Ick, Fbxo9, Elov15 遺伝子が存在したが、そこに Gcm1 遺伝子自体の痕跡は全くなかった。肉鰭魚類シーラカンスのゲノム解析により、シーラカンスは Gcm1, Gcm2 遺伝子の両方をもつことがわかった。以上のことから、Gcm2 は脊椎動物の起源から存在すること、Gcm1 は肉鰭魚類で新たに進化したものである可能性が示唆された。しかし、ポリプテルスの Gcm1 シンテニープロックには Gcm1 は存在しないものの、Ick, Fbxo9, Elov15 遺伝子が存在するため、Gcm1 が脊椎動物の進化の過程でいつ生じいつ失われたのかに関してはさらなる解析が必要である。ナメクジウオに存在する2つの Gcm 遺伝子の一つは、脊椎動物の Gcm2 と同様に MAK, Elv12 とシンテニープを持っていて、ヤツメウナギは Gcm2 遺伝子と Gcm1 遺伝子を有していた。すべての脊椎動物の系統で Gcm2 遺伝子を確認したが、Gcm1 を有することが確認されたのは四肢動物、シーラカンス、ガー、ヤツメウナギだけであった。すなわち Gcm1 と Gcm2 は脊椎動物が進化した時点で生じ、Gcm1 は条鰭魚類から真骨魚類の進化課程で、独立に失われてきたことが示唆された。

5) 現段階のデータから棲息環境のカルシウム濃度と Gcm 遺伝子の関係を考察する。四肢動物は Gcm1 と Gcm2 の2つの Gcm を持ち、食餌からしかカルシウムが得られない陸上という超低カルシウム環境に適応している。四肢動物が魚類から生じた古生代の海水中のカルシウム濃度は現在の淡水とほぼ同じであるが、その後海水中のカルシウム濃度は2倍以上増加し、高カルシウム環境に変化した。現存の真骨魚類では Gcm2 は存在するものの、Gcm1 は見いだせない。高カルシウム環境下では体内のカルシウムを排泄することの方が重要であるため、真骨魚類の祖先は Gcm を2つも必要としなかったのかもしれない。しかしその後、真骨魚類が再び淡水のような低カルシウム環境に適応するためには、塩類細胞のような新たなカルシウム調節器官の獲得が必要だったのかもしれない。そのため真骨魚類は残された唯一の Gcm 遺伝子である Gcm2 遺伝子に新たなエンハンサーを獲得することによって、既存の塩類細胞に Gcm2 を発現させることでカルシウムを吸収する新たな器官を構築したのかもしれない。

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7件)

①Nikaido M, Noguchi H, Nishihara H, et al. (以下25名 Okabe M は17番目) Coelacanth genomes reveal signatures for evolutionary transition from water to land. *Genome Res.* 査読有 2013 Oct;23(10):1740-8. doi: 10.1101/gr.158105.113.

②Moriyama Y, Kawanishi T, Nakamura R, et al. (以下18名 Okabe M は17番目) The medaka enhancer mutant for zic1/zic4 provides molecular insights into teleost caudal fin evolution. *Curr Biol.* 査読有 2012 Apr 10;22(7):601-7. doi: 10.1016/j.cub.2012.01.063.

③Richardson J, Shono T, Okabe M, Graham A. The presence of an embryonic opercular flap in amniotes. *Proc Biol Sci.* 査読有 2012 Jan 22;279(1727):224-9. doi: 10.1098/rspb.2011.0740.

④Shono T, Kurokawa D, Miyake T, Okabe M. Acquisition of glial cells missing 2 enhancers contributes to a diversity of ionocytes in zebrafish. *PLoS ONE.* 査読有 2011;6(8):e23746. doi: 10.1371/journal.pone.0023746.

〔学会発表〕(計19件)

①岡部 正隆 副甲状腺はどこから来たのか? 日本透析学会 平成25年6月21日 福岡

②Fujimura K, Okabe M. Development of external gills in Senegal bichir, *Polypterus senegalus*. *Euro Evo Devo* 2012. 平成24年7月11日 リスボン

③内山 威人、辰巳 徳史、鈴木 英明、大城戸 一郎、横山 啓太郎、岡部 正隆 胎生期のミネラル環境がミネラル恒常性に与える影響の検討 日本分子生物学会 平成23年12月16日 横浜

④庄野 孝範、三宅 力、岡部 正隆 真骨魚の塩類細胞における gcm2 エンハンサーの獲得による進化 日本解剖学会総会 平成23年3月28日 神戸

⑤Okabe M. Transition from aquatic to terrestrial life and evolution of the vertebrate lung. 20th CDB Meeting 平成23年2月24日 神戸

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡部 正隆 (OKABE, Masataka)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：10300716

(2)研究分担者

齋藤 三郎 (SAITO, Saburo)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10186934

三宅 力 (MIYAKE, Tsutomu)

慶應義塾大学・理工学研究科 (矢上)・特
任教授

研究者番号：20529763