

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号： 11301
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2009～2011
 課題番号： 21570216
 研究課題名（和文） 脊椎動物内耳・三半規管の形態形成機構の解析
 研究課題名（英文） Mechanism of inner ear and semicircular canal morphogenesis
 研究代表者
 舟橋 淳一（Jun-ichi Funahashi）
 東北大学・加齢医学研究所・准教授
 研究者番号： 00270827

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物の内耳の三半規管は、その機能と形態が密接に結びついているため、生き物の形づくりの仕組みを研究する対象として非常に魅力的な器官である。本課題では、ニワトリとゼブラフィッシュをモデル生物として用いて、それぞれの利点を最大限に利用しつつ、細胞レベルと組織レベルでの研究を最新の画像解析技術などを駆使して行うとともに、三半規管の形づくりに関わる遺伝子のクローニングと機能解析も進めてきた。そして、Sox5 という遺伝子が、三半規管の形づくりに非常に重要な働きをしている事をつきとめた。

研究成果の概要（英文）：

Semicircular canals are intriguing model system to study the mechanism of morphogenesis. In this study, two model organisms, zebrafish and chick are used. Utilizing each of its own advantage, cellular and histological analysis was carried out with cutting edge imaging technology. In parallel to these analyses, cloning and functional analysis of the genes related to morphogenesis was done. As a result, it is revealed that Sox5 gene plays a critical roll in semicircular canal morphogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：器官形成・形態形成・ニワトリ・ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の内耳背側にある三半規管は、その三次元的構造と機能が密接に結びついていて、脊椎動物の種に関わらず基本的な形態が共通しているため、形態形成機構の解析のモデル系として魅力的な器官である。内耳の発生は、目の発生と同様に古くから注目されてきたにもかかわらず、意外なほど研究が進んでいない。これらの点に着目し、申請者は、2000年頃からニワトリ胚の内耳原基、さらに2002年頃からはゼブラフィッシュの内耳原基をモデル系として形態形成のメカニズムを探る研究を始めた。

ここ10年程の内耳の発生に関する研究の成り立ちをみると、その多くが「たまたま」内耳の原基に発現する遺伝子を見つけて解析を始めたものということである。これに対し、この計画は始めから内耳の発生に焦点を絞って系統的に解析を行うもので、十分競争力のあるものだと考えた。

これまでの形態形成過程の研究では、固定した（死んだ）組織の観察が主体であった。したがって同じ個体で時間を追って変化を記録する事は不可能であった。本研究ではこれまでに開発してきた、生きたままの組織の中の細胞をいろいろな方法で標識して観察する方法を応用・発展させつつ、同時に分子生物学的アプローチも併用する事で、発生のメカニズムの研究に新たな方向性を付け加える事を目指した。

2. 研究の目的

(1) ゼブラフィッシュ胚を用いた解析
ゼブラフィッシュの三半規管形成は、図1に

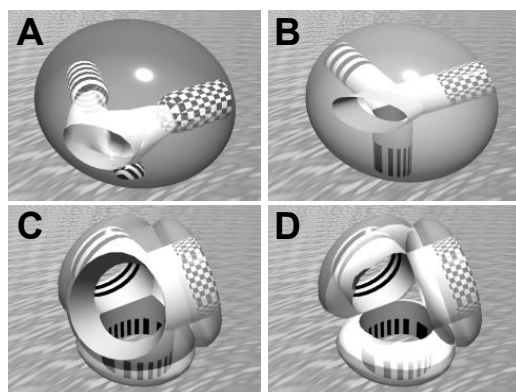


図1 A~D ゼブラフィッシュ正常発生における三半規管形成過程の模式図（左耳）
耳胞（グレーの球）内部への上皮の突出（白，側方：横縞，前方：市松模様，後方：縦縞，腹側）が融合し、トンネル状の構造を形成する，この構造が後のそれぞれの半規管の中心の穴に相当する。

示すように、リンパ液に満たされた袋状の上皮が内腔へ向かって突出を形成する事で開始される。突出の先端で強く GFP を発現するエンハンサートラップ系統 SAGFF237B（図2）では、Sox5 遺伝子のコード領域上流にトランスポゾンベクターが挿入されていた。その発現パターンから、Sox5 が三半規管形成の初期段階でおこる耳胞内部への上皮の突出の形成・伸長あるいは融合の過程で重要な働きをしていると予想された。そこでまず、

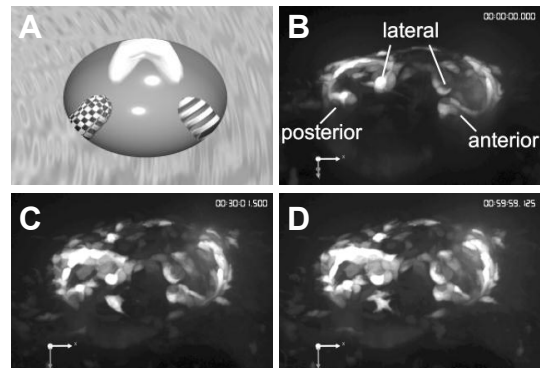


図2 SAGFF237B 系統の三次元タイムラプス観察（左耳を背面から透視）
(A) 模式図. (B~D) 耳胞の内腔へ向かって伸びる上皮の突出の先端に GFP を強く発現する細胞が数個存在するため、先端が二股に分かれている側方からの突出（Aの白色、Bの lateral）と、前方（A横縞、B anterior）および後方（A市松模様、B posterior）からの突出が融合して行く様子を克明に観察できる. B~D は30分間隔で撮影。

この仮説の検証を目的とした。

いっぽう、これまでの研究で同定した、4本の突出のうち側方から以外の突出の伸長が異常となる変異系統 *gallery* と SAGFF237B を掛け合わせて GFP の発現パターンを解析したところ、側方以外の3つの突出の先端での発現が極端に低下していた。これより、この変異の原因遺伝子（同定は現在進行中）が、Sox5 の発現を制御している可能性がある。そこで、これらの遺伝子間の相互作用を明らかにする事を目指した。

(2) ニワトリ胚を用いた解析
Sox5 のニワトリ胚内耳での発現は今まで報告が無いので、この確認を行うとともに、確認されれば、機能解析を行う。さらに、ゼブラフィッシュの変異系統の原因遺伝子が同定出来れば、この相同遺伝子をニワトリで同定し、同様に機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュ胚を用いた解析
エンハンサートラップ系統 SAGFF237B の解析から、Sox5 が三半規管形成の初期段階でお

こる耳胞内部への上皮の突出の形成・伸長あるいは融合の過程で重要な働きをしていると予想されるので、モルフォリノ・オリゴヌクレオチドを用いた機能阻害により、この仮説の検証を行う。

いっぽう、変異系統 *gallery* の原因遺伝子（同定は現在進行中）が、Sox5 の発現を制御している可能性があるため、これらの遺伝子間の相互作用を明らかにするため、Sox5 遺伝子の制御領域の解析を行う。

加えて、エンハンサー／遺伝子トラップ系統のスクリーニングも継続し、内耳原基で興味深い発現パターンを示す遺伝子の同定を行う。

(2) ニワトリ胚を用いた解析

Sox5 のニワトリ胚内耳での発現の確認を、免疫組織化学や *in situ* ハイブリダイゼーションで行うとともに、確認されれば、エレクトロポレーション法を利用して機能解析を行う。さらに、ゼブラフィッシュの変異系統の原因遺伝子が同定出来れば、この相同遺伝子をニワトリで同定し、同様に機能解析を行う。

4. 研究成果

ゼブラフィッシュのエンハンサートラップ系統 (SAGFF237B) の解析の結果、トラップされた遺伝子は Sox5 であることが確実となった。モルフォリノ・オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子ノックダウン（機能阻害）により内耳の形態形成が阻害され、mRNA の注入によりその表現型は回復出来た（図3）。

内耳における発現のパターンから、Sox5 は三半規管形成の初期段階で重要な働きをしていると予想されたため、三次元タイムラプス解析により、上皮で Sox5 を発現する細胞の形態形成運動の詳細な観察・解析を行った。その結果、上皮突出の先端に位置する Sox5 発現細胞は、突出形成前からその発現を開始し、突出の融合後も発現を続けることや、より突出の基部に近い Sox5 発現細胞は、その形態を突出の伸長方向に対して細長く変化させることで、突出の伸長に寄与していること（図4）など、様々な現象が明らかになった。

これらの成果は、脊椎動物の形態形成メカニズムの理解に大きく寄与すると言える。

一方ニワトリ胚を用いた解析では、Sox5 に特異的な抗体を用いた免疫組織化学による正常胚での発現パターンの解析を行い、非常に興味深い発現パターンを見いだした。今後は、ニワトリ胚を用いて機能阻害などを行って、高等脊椎動物の内耳発生における役割を明らかにして行きたい。

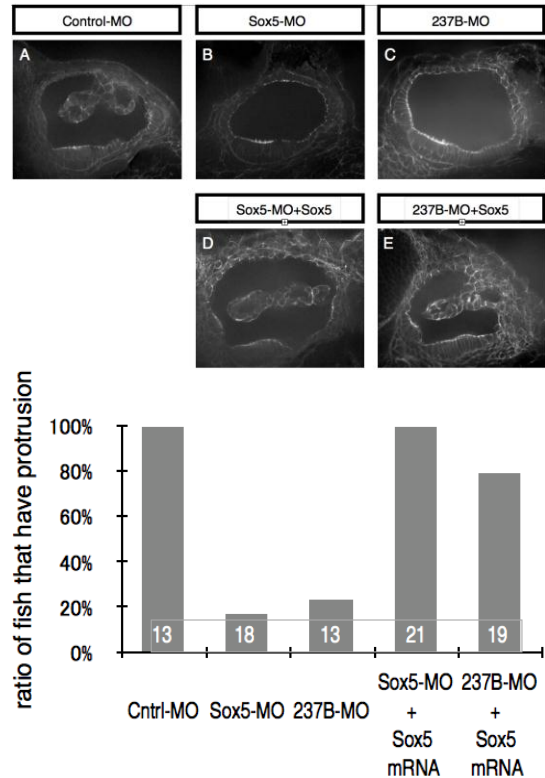


図3 モルフォリノ・オリゴヌクレオチドによる機能阻害とmRNA注入による表現型の回復

既知のSox5の翻訳開始点 (Sox5-MO) あるいは今回明らかとなった翻訳開始点 (237B-MO) に対するモルフォリノ・オリゴヌクレオチドを受精卵へ注入した。その結果、耳胞内部への上皮の突出が著しく阻害された (B、CをAと比較)。これに対して、同時にSox5のmRNAを注入することで、表現型が回復出来た (D、E)。グラフの縦軸は突出を形成した胚の数を示し、バーの中の数字は例数を示す。

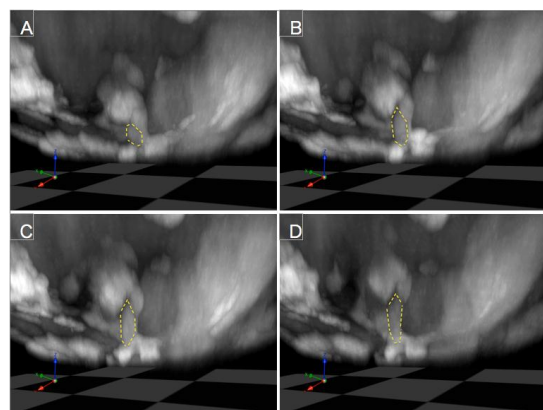


図4 突出伸長時の細胞の形態の変化

AからDの順に30分間隔で撮影。点線で囲った細胞が、体積を増やすとともに、突出の伸長方向である図の上へ向かって扁平な形状に変化している。

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) Harukazu Nakamura and Junichi Funahashi, Electroporation: Past, present and future, Develop. Growth Differ. 2013, 15-19 (査読有) DOI 10.1111/dgd.12012

[学会発表] (計7件)

- (1) 舟橋淳一、仲村春和:Time-lapse imaging system with shell-less culture chamber、7th International Chick meeting、2012年11月14日~2012年11月18日(名古屋市)
- (2) 舟橋淳一、光るゼブラフィッシュで“観る”内耳の発生、加齢研シンポジウム「発生生物学の適応放散」、2011年10月21日~2011年10月21日(仙台市)
- (3) 谷野俊平、阿部玄武、川上浩一、仲村春和、舟橋淳一、essential roll of SOX5 in the semicircular canal development of zebrafish、第44回日本発生生物学会年会、2011年05月18日~2011年05月21日(宜野湾市)

[図書] (計1件)

- (1) 舟橋淳一、他11名(訳)、仲村春和、大谷浩(監訳):西村書店2013年:ラーセン解剖学第4版、第17章視覚器と聴覚器の発生

[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.idac.tohoku.ac.jp/dep/molneuro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舟橋 淳一 (JUN-ICHI FUNAHASHI)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号:00270827

(2) 研究分担者

該当者無し

(3) 連携研究者

該当者無し