

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号 23659035

研究課題名（和文）新規な分泌性形態形成因子遺伝子の探索とその役割の解明

研究課題名（英文）Roles of novel genes encoding secreted proteins in morphogenesis

研究代表者

伊藤 信行 (ITO NOBUYUKI)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：10110610

研究成果の概要（和文）：新規な分泌性因子遺伝子を探索し、数多くの分泌性因子遺伝子候補を同定し、その発現をゼブラフィッシュ胎児で調べた。BrorinとBrorin-likeはいずれも受精後16時間から腹側視床において発現が認められた。BrorinとBrorin-likeの機能阻害胚も前脳の萎縮および脳室の膨張などの脳の形成異常が認められた。従って、BrorinとBrorin-likeは脳形成因子である。Neucrinは胎生期の神経組織特異的に発現していた。その機能阻害胚では中脳、後脳の領域決定に異常が観察され、NeucrinはWnt antagonistとして胎生期の神経系の形成に重要な役割を果たしている。Fgf22は胎生期中脳・後脳領域に特異的に高発現していた。その機能阻害胚では中脳、中脳・後脳の領域決定に異常が観察され、中脳、中脳・後脳の領域決定に重要な役割を果たしている。

研究成果の概要（英文）：We identified a gene encoding a novel secreted protein in mice, humans, and zebrafish including Brorin, Brorin-like, Neucrin, and Fgf22. The inhibition of Brorin and Brorin-like functions in zebrafish resulted in the impairment of neural development. Brorin-like potentially plays roles in neural development and functions. The knockdown of neucrin also suppressed neuronal differentiation and caused increased cell proliferation and apoptosis in developing neural tissues. Neucrin plays roles in neural development in zebrafish. The Fgf22 morphants were defective in proper formation of the MHB constriction and the midbrain. The knockdown of Fgf22 caused decreased cell proliferation in the midbrain, expanded expression of roof plate and tegmental marker genes, and decreased expression of tectal marker genes. Furthermore, Fgf22 partially rescued the Fgf3/fgf8 double morphant phenotype. Fgf22 is involved in midbrain development downstream of Fgf3 and Fgf8 in the MHB but not of Hh in the floor plate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子生物学

1. 研究開始当初の背景

新規な形態形成因子の発見は「形態形成のしくみ」の解明のみならず、「再生医療」にも貢献すると期待される。FGF などの分泌性因子は形態形成で重要な役割を果たしている。我々は FGF の構造上の類似性に着目し、9 種類の新規な FGF 遺伝子を発見し、その形態形成における役割を明らかにした。さらに、その成果は医療への応用も期待されている。形態形成には分泌性因子が重要な役割を果たしている。DNA データベースに存在する多くの機能不明な分泌性因子遺伝子の中には重要な形態形成因子遺伝子も存在すると期待され、新規な形態形成因子の発見は発生生物学と再生医療の発展に貢献できるものと期待された。

2. 研究の目的

新規な形態形成因子の発見は「形態形成のしくみ」の解明のみならず、「再生医療」にも貢献すると期待される。FGF などの分泌性因子は形態形成で重要な役割を果たしている。我々は FGF の構造上の類似性に着目し、9 種類の新規な FGF 遺伝子を発見し、その形態形成における役割を明らかにした。さらに、その成果は医療への応用も期待されている。形態形成には分泌性因子が重要な役割を果たしている。DNA データベースに存在する多くの機能不明な分泌性因子遺伝子の中には

重要な形態形成因子遺伝子も存在すると期待され、新規な形態形成因子の発見は発生生物学と再生医療の発展に貢献できるものと期待された。

3. 研究の方法

(1) ヒト、マウス、ゼブラフィッシュ分泌性因子遺伝子の探索

DNA データベースにあるヒト、マウス、ゼブラフィッシュの機能不明な遺伝子がコードしていると期待されるアミノ酸配列を無作為に選択し、PSORT(a computer program for the prediction of protein localization sites in cells)などのアミノ酸配列解析ソフトを活用して新規な分泌性因子遺伝子を探索する。さらに、これらの遺伝子の内、遺伝子の homology 解析をして酵素遺伝子である可能性のある遺伝子は除くとともに、ヒト、マウス、ゼブラフィッシュに共通にする遺伝子を絞り込む。

(2) ヒト、マウス、ゼブラフィッシュ分泌性因子遺伝子の単離

上記により同定された遺伝子が実際に発現しているかを確認するため、ヒト、マウス、ゼブラフィッシュ cDNA を鋳型にし、PCR で遺伝子を増幅し、その遺伝子の配列を確認する。さらに、その増幅された遺伝子はベクター DNA を用いてクローニングする。

(3) 分泌性因子遺伝子のマウス、ゼブラフィッシュ胎児期における発現の検討 (伊藤担当) 様々な発達段階にあるマウス、ゼブラフィッシュ胎児における分泌性因子遺伝子の発現を whole mount in situ hybridization や section in situ hybridization 法により調べる。その発現様式から興味深い発現様式を示す遺伝子を絞り込む。

(4) アンチセンス DNA を用いたゼブラフィッシュ胎児の遺伝子機能抑制とその表現形質の解析

アンチセンス DNA を用いたゼブラフィッシュ胎児の遺伝子機能抑制は簡便で、特異的に個体レベルで遺伝子の機能を解析する方法として極めて優れていることが明らかにされている。興味深い発現様式を示す遺伝子のアンチセンス DNA をゼブラフィッシュの受精卵に導入し、その後の発生過程を顕微鏡下で観察し、興味深い形態形成異常を示す遺伝子を発見する。

4. 研究成果

(1) DNAデータベースにあるヒト、マウス、ゼブラフィッシュの機能不明な遺伝子がコードしていると期待されるアミノ酸配列を無作為に選択し、PSORT(a computer program for the prediction of protein localization sites in cells)などのアミノ酸配列解析ソフトを活用して新規な分泌性因子遺伝子を探索した。これまで、数多く(20種類以上)の分泌性因子遺伝子候補を同定し、その発現をゼブラフィッシュ胎児やマウス胎児で調べた。

(2) 新規な分泌性BMP antagonist遺伝子を発見し、Brorin, Brorin-likeと名付けた。Zebrafish BrorinとBrorin-likeはいずれも受精後16時間から腹側視床において発現が認められた。その発現様式はいずれも類似していた。受精後24時間では前交連や、後脳の神経節、松果体、下垂体など脳神経系特異的に発現していた。その発現は受精後36時間胚においても持続していた。BrorinとBrorin-like機能阻害胚の形態観察を行った。いずれの機能阻害胚も前脳の萎縮および脳室の膨張などの脳の形成異常が認められた。従って、BrorinとBrorin-likeは脳形成因子であることが明らかになった。

(3) 新規なWnt antagonist遺伝子を発見し、Neucrinと名付けた。Zebrafish Neucrinは胎生期の神経組織特異的に発現していた。Neucrin機能阻害胚の形態観察を行った。その機能阻害胚では中脳、後脳の領域決定に異常が観察された。また、これらの神経組織での神経細胞分化の阻害、神経細胞増殖の増大が観察された。従って、NeucrinはWnt antagonistとして胎生期の神経系の形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(4) 新規なFgfであるZebrafish Fgf22も同定した。Fgf22は胎生期中脳・後脳領域に特異的に高発現していた。Fgf22機能阻害胚の形態観察を行った。その機能阻害胚では中脳、中脳・後脳の領域決定に異常が観察された。また、Fgf22シグナルはその特異的受容体であるFgf受容体2bを介することが明らかになっ

た。Fgf22機能阻害胚の表現形質はFgf3/Fgf8機能阻害胚の表現形質と極めて類似していた。その作用メカニズムを調べたところ、Fgf22シグナルはFgf3, Fgf8シグナルの下流に存在し、中脳、中脳・後脳の領域決定に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

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3件)

(1) H. Yamauchi, M. Goto, M. Katayama, A. Miyake, N. Itoh, Fgf20b is required for the ectomesenchymal fate establishment of cranial neural crest cells in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 705-710 (2011) (10.1016/j.bbrc.2011.05.069) (査読有)

(2) A. Miyake, S. Nihno, Y. Murakoshi, A. Satsuka, Y. Nakayama, N. Itoh, Neucrin, a novel secreted antagonist of canonical Wnt signaling, plays roles in developing neural tissues in zebrafish. *Mechanism of Development* 128, 577-590 (2012) (10.1016/j.mod.2012.01.001) (査読有)

(3) A. Miyake, N. Itoh, Fgf22 regulated by Fgf3/Fgf8 signaling is required for zebrafish midbrain development. *Biology Open* (2013) 印刷中 (10.1242/bio.20134226) (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 信行 (ITO NOBUYUKI)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：10110610

(2) 連携研究者

三宅 歩 (MIYAKE AYUMI)

京都大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：40346044