

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651211

研究課題名(和文) 無胃魚と有胃魚の比較ゲノム解析から解き明かす新規胃酸分泌機序

研究課題名(英文) Identification of novel gastric systems by comparing genomic sequences between stomachless fishes and true stomach fishes

研究代表者

加藤 明 (Kato, Akira)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：40311336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：公開されている魚類ゲノムデータを無胃魚(フグ、ゼブラフィッシュなど)と有胃魚(イトヨなど)に分類し、無胃魚で共通に欠損する遺伝子の解析から胃の機能を担う未知因子を探索した。比較ゲノム解析から無胃魚で共通に欠損する16遺伝子を特定した。これらは胃の機能を担うことが知られる遺伝子(atp4a, kcne2, slc26a9, vsig1, cldn18など)を含む一方、酸で活性化されるアミノ酸輸送体に相同性を有する未知遺伝子(c3orf55)を含んでいた。この結果は、酸により活性化される未知のアミノ酸輸送体がアミノ酸センシングもしくはアミノ酸代謝を介して胃の生理機能に深く関わる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Some species of teleost fishes lack stomach and are called stomachless fishes. It is likely that the genomes of stomachless fishes lack genes involved in the function of the stomach and that the genes commonly deleted in stomachless fishes contain unknown gene. To understand stomachless characteristics at genome level and to identify an uncharacterized gene that is involved in known or unknown stomach function, we compared open genome resources of stomachless fishes (pufferfish, zebrafish, etc.) and true stomach fishes (stickleback, etc.). Seven genes involved in the gastric function (atp4a, atp4b, kcne2, slc26a9, vsig1, cldn18, pgc) are commonly absent in the genome databases of stomachless fishes. Stomachless fishes also lacked an uncharacterized gene, c3orf55, which is homologous to acid-activated amino-acid transporter family. This finding suggests that the novel acid-activated amino-acid transporter mediates amino-acid sensing or metabolism in the stomach.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学、ゲノム生物学

キーワード：比較ゲノム

1. 研究開始当初の背景

2001年にヒト、2002年にトラフグのゲノム解読が完了して以来、10年後の2011年の時点で脊椎動物では約40種の哺乳類、7種の魚類、1種の両生類、1種のは虫類、4種の鳥類のゲノムが公開されていた。それらの基本的な遺伝子構成は脊椎動物間で驚くほど良く似ており、一方で種や系統に特異的な遺伝子重複、遺伝子欠損、低ホモロジー領域が存在する。

魚類の陰イオン代謝の研究過程で、我々は陰イオン輸送体遺伝子 *Slc26a9* (solute carrier family 26) がトラフグ、ミドリフグ、ゼブラフィッシュ、メダカで欠損していること、及びイトヨ、ウナギ、サケ、ティラピア、タラに存在することを見出した。イトヨとウナギで *Slc26a9* は胃に特異的に高発現しており、興味深いことに *Slc26a9* を欠損する魚は全て無胃魚、*Slc26a9* を有する魚は全て有胃魚であった。これらの知見は胃の機能に関わる遺伝子の一部は無胃魚で欠損していること、及び無胃魚と有胃魚の比較ゲノム解析を行うことで胃の機能に関わる未知の因子を探索出来ること示唆した。

2. 研究の目的

そこで我々は、無胃魚と有胃魚の比較ゲノム解析という新たなアプローチから胃の機能に関わるこれまで知られなかった分子機構を明らかにすることを目的とし、以下の解析を行った。(1) 公開されている無胃魚と有胃魚の比較ゲノム解析を網羅的に行い、無胃魚で欠損する遺伝子の正確なリストを作成する。(2) 得られたリストの中から有胃魚(イトヨ)の胃で高発現する遺伝子を選別する。もし胃で高発現する新規遺伝子を同定することができれば、(3) 胃の生理機能に関わる新たな分子機構の提案を行う。

3. 研究の方法

(1) 無胃魚で欠損する遺伝子リストの作成。公開されている魚類ゲノムデータベースから遺伝子リストをダウンロードし、テキスト検索により無胃魚(トラフグ、ミドリフグ、ゼブラフィッシュ、メダカ)で共通に annotation されていない遺伝子を約90特定し、一次候補とした。一次候補遺伝子が本当に欠損遺伝子なのかどうか確認するために、1つ1つの遺伝子配列についてホモロジー解析とシクエンス解析を行った。不完全な annotation 解析により見かけ上欠損するように見えるが実際には無胃魚ゲノムにも存在する遺伝子を候補リストから除外した結果、無胃魚で共通に欠損する16遺伝子を特定した。

(2) 無胃魚で欠損する遺伝子の発現部位の同定。有胃魚のイトヨから胃を含む14種類の臓器(脳、眼、エラ、心臓、胃、腸、鰾、肝臓、腎臓、脾臓、皮膚、筋肉、ヒレ、卵巣)を採取し、RNAを抽出した。RT-PCR法により(1)で同定した16遺伝子の発現部位を解析した。

(3) イトヨ胃の組織学的解析。イトヨ胃のパラフィン切片を作製し、胃腺を組織学的に観察した。

4. 研究成果

(1) ゲノム配列が公開されている無胃魚(トラフグ、ミドリフグ、ゼブラフィッシュ、メダカ)と有胃魚(イトヨ、ティラピア、タラ)の系統関係を図1に示す。有胃魚ゲノムに存在する16遺伝子(*atp4a*, *atp4b*, *kcne2*, *slc26a9*, *vsig1*, *cldn18*, *pgc*, *pradc1*, *c3orf55*, *atp6v0d2*, *mtch1*, *ano4*, *dc2c*, *ankub1*, *tssk1b*, *bank1*)が無胃魚ゲノムで共通に欠損していた(表1)。シクエンス解析からこれら遺伝子は ortholog であることが確認され(図2)、無胃魚ゲノムの同じ遺伝子座からそれぞれの系統で独立に欠損したことが明らかとなった。

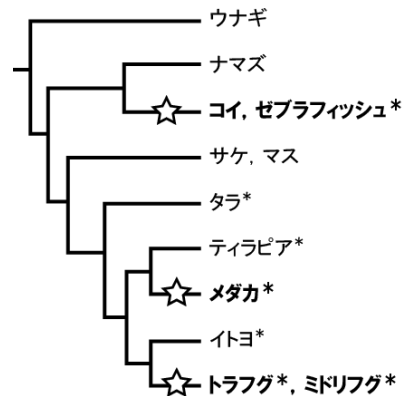


図1 代表的な無胃魚(太字)と有胃魚の系統関係。*は研究開始当初ゲノム配列が公開されていた魚種。は胃が欠損したタイミングを示す。

表1 無胃魚で共通に欠損する遺伝子

遺伝子	タンパク質
<i>atp4a</i>	ATPase, H ⁺ /K ⁺ exchanging, alpha polypeptide
<i>atp4b</i>	ATPase, H ⁺ /K ⁺ exchanging, beta polypeptide
<i>kcne2</i>	potassium voltage-gated channel
<i>slc26a9</i>	solute carrier family 26, member 9
<i>vsig1</i>	V-set and immunoglobulin domain containing 1
<i>cldn18</i>	claudin 18
<i>pgc</i>	progastricsin (pepsinogen C)
<i>pradc1</i>	protease-associated domain containing 1
<i>c3orf55</i>	chromosome 3 open reading frame 55
<i>atp6v0d2</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 38 kDa
<i>mtch1</i>	mitochondrial carrier 1
<i>ano4</i>	anoctamin 4
<i>dc2c</i>	doublecortin domain containing 2C
<i>ankub1</i>	ankyrin repeat and ubiquitin domain containing 1
<i>tssk1b</i>	testis-specific serine kinase 1B
<i>bank1</i>	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1

(2) イトヨ組織における発現解析の結果、*atp4a*, *atp4b*, *kcne2*, *slc26a9*, *vsig1*, *cldn18*, *pgc* の7遺伝子は胃特異的に高発現することを確認した(図3)。*pradc1*, *c3orf55*, *atp6v0d2*, *mtch1*, *ano4* の5遺伝子は胃を含む様々な組織で中~低レベルの発現を示した。一方 *dc2c*, *ankub1*, *tssk1b*, *bank1* の4遺伝子は、胃における発現が

観察されなかった。

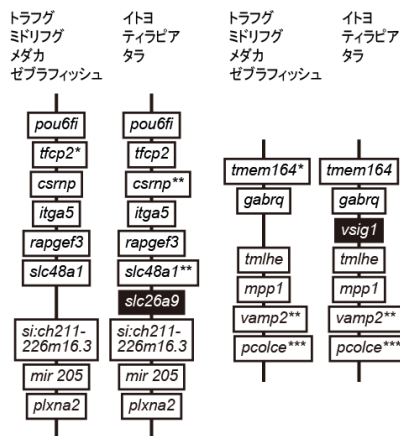


図2 シンテニー解析。slc26a9とvsig1の例を示す。前後の遺伝子の並びは全ての種間で良く保存されているが、slc26a9およびvsig1は無胃魚(トラフグ、ミドリフグ、メダカ、ゼブラフィッシュ)で欠損していた。

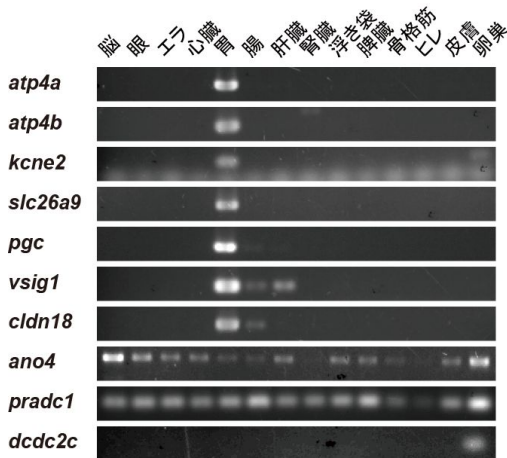


図3 無胃魚で共通に欠損する遺伝子のイトヨにおける組織発現。RT-PCRの結果を一部示す。胃で特異的に発現する遺伝子、胃を含む様々な臓器に発現する遺伝子、胃以外の臓器で特異的に発現する遺伝子が存在した。

(3)イトヨ胃のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびPAS染色を行った。観察の結果、胃の切片に発達した胃腺が観察された(図4)。

(4)考察

哺乳動物では *atp4a*, *atp4b*, *kcne2*, *slc26a9* 遺伝子の産物(タンパク質)は胃の壁細胞(胃酸分泌細胞)に発現してイオン輸送を担い、また *pgc* は主細胞(ペプシン前駆体を分泌)で発現する消化酵素前駆体であることが知られる。また *vsig1* 及び *cldn18* 遺伝子の産物は胃壁上皮細胞の細

胞間結合部位に局在することが知られる。本研究の結果は、これら胃で機能する遺伝子が無胃魚において独立かつ共通に欠損したことを示した。一方有胃魚のイトヨは発達した胃腺を有し、これらの遺伝子を胃特異的に高発現することが確認された。*pradc1*, *c3orf55*, *atp6v0d2*, *mtch1*, *ano4* は胃を含む様々な組織で発現するにもかかわらず、無胃魚で共通に欠損していた。この結果はこれらの遺伝子の胃における機能は他の遺伝子で代替不可能だが、他の臓器における機能は他の臓器で代替可能なことを示す。胃で全く発現しない遺伝子がなぜ無胃魚で共通に欠損していたのか、現時点では理由が分からない。

c3orf55 はヒトを含む多くの生物種においても未解析の遺伝子である。イトヨ *c3orf55* は酸依存性のアミノ酸輸送体とホモロジーがあることから、胃におけるアミノ酸代謝もしくはアミノ酸のセンシングを介して胃の生理機能に深く関わる可能性が示唆された。

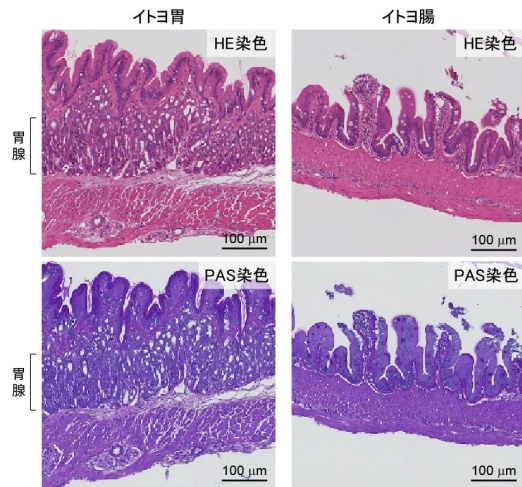


図4 イトヨ胃切片のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色及びPAS染色(左)。対称にイトヨ腸切片の染色像を示す(右)。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 明 (KATO, Akira)
東京工業大学・生命理工学研究科・助教
研究者番号: 40311336

(2) 研究分担者

竹井 祥郎 (TAKEI, Yoshio)
東京大学・大気海洋研究所・教授
研究者番号: 10129249

(3) 連携研究者

日下部 誠 (KUSAKABE, Makoto)
東京大学・大気海洋研究所・助教
研究者番号: 40451893

広瀬 茂久 (HIROSE, Shigehisa)
東京工業大学・生命理工学研究科・教授
研究者番号: 10134199

(4) 研究協力者

渡邊 太郎 (WATANABE, Taro)
東京大学・大気海洋研究所・技術職員

Michael F. Romero
Mayo Clinic (USA), Professor