

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860197

研究課題名(和文)メダカを用いた臓器に特有な形態と適切なサイズを制御する分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms regulating organ size and shape by using medaka

研究代表者

殿山 泰弘 (Tonoyama, Yasuhiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：20467393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メダカ器官形成における重要性が示唆されたTMEM141に着目し、細胞レベルおよび個体レベルでの機能を明らかにすることを目的として、機能解析を実施した。その結果、TMEM141は、細胞分裂時において娘細胞間で非対称に分配される興味深い特性を有し、細胞の増殖・分化の制御機構において重要な役割を担う新規の膜小胞関連分子であることが示唆された。さらに、複数のがん細胞株において、当該分子のアミノ酸配列を基にデザインされたペプチドが細胞増殖を抑制することが明らかとなった。本研究により得られた知見は、脊椎動物の器官形成機構の解明に留まらず、がん幹細胞を標的とした新しい抗腫瘍薬開発にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied functions of TMEM141 that is a candidate gene from our screening study, on cellular and organism level by using mammalian cells and medaka. Subsequently, our data suggest the possibilities that the novel vesicular membrane protein, TMEM141 plays important roles in cell proliferation and maintenance of cancer stem cells. Additionally, some peptides designed based on the deduced amino acid sequence of TMEM141 inhibited proliferation in several human cancer cell lines. The knowledges obtained from the project provide the important insights not only into aspects of vertebrate organogenesis, but also into aspects of medicinal development based on novel concepts targeting cancer stem cells.

研究分野：発生生物学・細胞生物学

キーワード：メダカ organogenesis asymmetric cell division novel gene transmembrane protein

## 1. 研究開始当初の背景

現在、iPS 細胞を様々な細胞種へと分化誘導させることが可能となっていることから、今後は複数の細胞種から機能性組織を再構築するための研究が中心的課題となると予想される。しかし、発生過程において他の細胞種や細胞外環境との相互作用を通じて、適切な臓器の形態やサイズを制御する機構については未だ不明な点が多い。未知の現象に関わる新規遺伝子の発見は、その現象の理解に大きく貢献する。例えば、最近、臓器の形態やサイズ制御に関わる新たなシグナル伝達経路 (Hippo signaling pathway (後述)) が発見され、この分野は新たな局面を迎えている。しかし、この新規シグナル伝達経路の構成分子にも相互作用相手が不明のものが未だ多く存在することから、本研究が目指す臓器形成過程における未同定の遺伝子がまだ存在する可能性は極めて高いと考えられる。

ヒトゲノム 23,000 遺伝子の中には塩基配列から機能を予測できないものが未だ多く存在している。申請者らはこれまでにタンパク質のモチーフ・ドメインが不明な遺伝子を厳密な定義を設定した上で、データベースから慎重に *in silico* 選別を繰り返して 1,029 個を厳選し、「カオナシ遺伝子」と命名し、独自のカオナシデータベース (Kaonashi-DB) を構築した。カオナシ遺伝子は他の動物 (マウス、魚類、ショウジョウバエ、線虫) にも一定の割合で存在したが、脊椎動物の発生モデルであるメダカに特に注目し、ヒトカオナシ遺伝子の正体を暴く「メダカ作戦」として、これまで 3 段階のアプローチを遂行し、いくつかの興味深い成果を得た。

(1) 約 100 種のメダカカオナシ遺伝子に対するモルフォリノアンチセンスオリゴ (MAO) をメダカ受精卵に注入してノックダウンを行い、脳形成異常を示すカオナシ遺伝子 (2 種) や心臓・血管形成異常を

示すカオナシ遺伝子 (2 種) を同定した。

(2) (1) で同定されたカオナシ遺伝子について、その変異体を取得するために基礎生物学研究所が供給するナショナルリソース / TILLING ライブラリーから、メダカ突然変異体をスクリーニングした結果、脳形成異常を示すカオナシ遺伝子で MAO 注入胚と表現型が一致する変異体を得た。

(3) 眼形成に必須である転写因子 Rx3 のノックダウンによって無眼となるメダカ胚のマイクロアレイ解析を行った結果、コントロール胚に比べて発現量が増加 (3 種) または減少するカオナシ遺伝子 (2 種) を同定した。

以上の結果から、申請者らは、カオナシ遺伝子群の中には生体内で未知の機能を有する遺伝子が確かに存在し、対象遺伝子が既に決まっている場合、特定の現象との相関を調べるためには、メダカマイクロアレイ解析は有効であるという考えに至った。

## 2. 研究の目的

(1) これまでに同定した脳、心・血管及び眼形成に関わるカオナシ遺伝子が発生どの過程でどのような役割をしているのかを明らかにする。

(2) 本申請で実施するマイクロアレイ解析により特定の臓器形成に関与する遺伝子 (特にカオナシ) を同定し、その遺伝子の臓器形成過程における役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

臓器形成に関わるカオナシ遺伝子を探索するため、以下の 3 つの流れに沿って研究を進める。

(1) 臓器形成や臓器サイズ制御に関わる Hippo signaling pathway に関連する遺伝子のノックダウン胚、または強制発現胚を試料としてマイクロアレイ解析を行い、コントロールとの間で発現量に 2 倍以上の差がある遺伝

子群の中からカオナシ遺伝子リストと一致するものを探す（平成 26 年度）。また、(2) カオナシ遺伝子に対するプローブを作製し Whole mount *in situ* hybridization 解析を行い、メダカ胚で臓器特異的な局在を示すカオナシ遺伝子を探す（平成 26 年度）。(3) 発現量に差が認められたカオナシ遺伝子については、発現プロファイルや相互作用分子といった情報を収集しつつ、ゲノム編集の新技术である TALEN による臓器特異的あるいは、熱ショックにより誘導可能なノックアウト胚を作製して臓器形成における詳細な機能解析を行う。

#### 4. 研究成果

メダカ器官形成過程における重要性が示唆された TMEM141 に着目し、細胞レベルおよび個体レベルでの機能を明らかにすることを目的として、機能解析を実施した。

HeLa 細胞において、siRNA 処理によるノックダウン実験を行った結果、コントロール siRNA 処理細胞に比べて増殖率の低下が確認された。これらの細胞において細胞周期解析を行った結果、コントロール細胞と比較して G1 期の割合が増加することが明らかとなった。さらに、Yeast two hybrid 法により、相互作用分子の探索を行った結果、cAMP responsive element binding protein 3、Reticulon 1/3、Vesicle-associated membrane protein)-associated protein A との結合が確認されたことから小胞輸送に関与することが示唆された。これらのことから、TMEM141 は、細胞の増殖・分化の制御機構において重要な役割を担う新規の膜小胞関連分子であることが示唆された。さらに、複数のがん細胞株において、ヒト TMEM141 のアミノ酸配列の一部と同配列のペプチドが細胞増殖を抑制することが明らかとなった。

一方、個体レベルでの機能解明を目指し、

ゲノム編集技術 TALEN 法を用いてノックアウトメダカを作製した結果、TMEM141<sup>-/-</sup>メダカの一部で脊椎の著しい彎曲が観察された。このような骨形成異常は、TMEM141<sup>-/-</sup>の全てで観察されないことから、環境要因または複数の遺伝子の多型が関係している可能性が考えられるものの、この異常は親を同じくする野生型の子孫において見られないことから、TMEM141 が正常な骨形成過程に関与していることが示唆された。上記のメダカの表現型解析の一環として、メダカを用いた脂肪組織量の定量法を確立した。当初は、複数の遺伝子を対象として機能解析を進めていく予定であったが、研究体制や研究実施場所の変更を余儀なくされたため、器官形成過程における重要性が示唆された 1 種類の遺伝子だけに絞って解析を進めることとなった。しかしながら、当該遺伝子に関しては、個体レベルおよび細胞レベルの両面から解析を進め、骨形成との関連を明らかにしただけでなく、共同研究により当該分子の機能を抑制しうるペプチド群を見出すなど期待を上回る結果を得ることもできた。

小胞膜輸送に関連する新規の膜タンパク質 TMEM141 が幹細胞の増殖分化制御に関与することや TMEM141 ノックアウト個体の一部で、脂肪組織量の増大および骨形成の異常が観察されることから、これらの前駆細胞にあたる間葉系幹細胞において重要な役割を担っている可能性が示唆されることについて、論文作成を進めつつ、国内や海外の学会で口頭発表やポスター発表を積極的に行った。その一方で、本研究で機能解析を行った TMEM141 の相互作用分子探索の結果、相互作用分子がラミンと共通することが明らかとなった。そこで、ラミンの修飾に関わり、かつヒトにおいて早老症の責任遺伝子の一つとして知られる *zmpste24* のノックアウトメダカの表現型解析を行い、メダカでは、ヒトと同様に異型核が観察されるにも関わら

ず、寿命の著しい短縮がみられないことなどを論文として報告した。さらに、TMEM141 および *zmpste24* との遺伝学的相互作用があることが予想されたため、それぞれの遺伝子のノックアウトメダカを交配させることにより、二重欠損メダカを作成したが、単独欠損の表現型と二重欠損の表現型と顕著な差が見られなかったことから、これらの遺伝子は遺伝学的な相互作用はしていないことが示唆された。今後は、幹細胞（特に間葉系幹細胞）の増殖分化制御機構において、TMEM141 およびその相互作用分子がどのような役割を担っているかをさらに詳細に調べる必要があるものと考えられる。

#### 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2件)

1: Tonoyama Y, Shinya M, Toyoda A, Kitano T, Oga A (他 12 名) “Abnormal nuclear morphology is independent of longevity in a *zmpste24*-deficient fish model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS)”, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 209 (2018) 54-62

査読有

2: Nishi M, Jian N, Yamamoto K, Seto H, Nishida Y, Tonoyama Y, Shimizu N, Nishi Y. “Ligation-based assembly for constructing mouse synthetic scFv libraries by chain shuffling with in vivo-amplified VH and VL fragment”

*J Immunol Meth.* 2014 412: 53-69

査読有

〔学会発表〕(計10件)

1: 殿山泰弘、安立珠美、塚田匡輝、今井良政、河内浩行、杉浦省三、ベイリー小林菜穂子、吉田徹彦、工藤純

「メダカを用いた脂肪組織の定量的評価法の確立と PPAR $\gamma$  アゴニスト経口摂取のメダカ脂肪組織形成への影響」

2018 年度薬学会

2018

2: Tonoyama Y, Adachi T, Shimizu A, Takayanagi A, Mitsuyama S, Bailey Kobayashi N, Yoshida T, and Kudoh J

“Functional analyses of a novel vesicular membrane protein, TMEM141 during the growth stage in medaka (*Oryzias latipes*) larvae”

18<sup>th</sup> International Congress of Developmental Biology

2017

3: Tonoyama Y, Adachi T, Iwakura N, Shimizu A, Mitsuyama S, Bailey Kobayashi N, Yoshida T, and Kudoh J

“Functional analysis of a novel vesicular membrane protein, TMEM141 that is divided asymmetrically into one of daughter cells produced by asymmetric cell division”

第 69 回日本細胞生物学会

2017

4: Tonoyama Y, Adachi T, Shimizu A, Takayanagi A

“TMEM141 is a novel vesicular membrane protein affecting the survival rate during the growth stage in Medaka (*Oryzias latipes*) larvae”

第50回 日本発生生物学会

2017

5: 殿山泰弘 今井良政 塚田匡輝 真田的貴  
岡郷平 河内浩行 杉浦省三 掘伸明

清水淑子 清水信義

「メダカを用いた脂肪細胞分化に影響を与  
える物質の評価系の開発」

アクアゲノム研究会

2015

6: Tonoyama Y, Shimizu A, Takayanagi A,  
Shimizu Y, Shimizu N

“Functional analyses by genome editing of two  
KAO-NASHI genes during vertebrate  
organogenesis using medaka model”

第37回日本分子生物学会

2014

7: Taniguchi Y, Tonoyama Y, Kamei Y  
“The impact of the ageing-associated  
Zmpste24 deficiency in Oryzias  
latipes”

第37回日本分子生物学会

2014

8: Tonoyama Y, Shimizu A, Takayanagi A,  
Shimizu Y, Shimizu N

“Functional analyses of two KAO-NASHI  
genes during vertebrate organogenesis using  
medaka model”

第20回小型魚類研究会

2014

9: Tonoyama Y, Shimizu A, Izumiyama T,  
Iwakura N, Shimizu Y, Shimizu N

“Identification and Intracellular Localization of  
Two KAO-NASHI Genes during Vertebrate  
Organogenesis using Medaka Model”

第66回日本細胞生物学会

2014

10: Tonoyama Y, Shimizu A, Iwakura N,  
Shimizu Y, Shimizu N

“Functional analyses of two KAO-NASHI  
genes during vertebrate organogenesis using  
medaka model”

第47回日本発生生物学会

2014

〔図書〕(計1件)

高畑 京也、蔡 晃植、齋藤 修 編著、今  
村 綾、宇佐美 昭二、尾山 廣(他13名、  
16番目)、建帛社、バイオテクノロジー入門、  
2016、pp.98-100(総ページ数:157)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:抗腫瘍ペプチドおよびその利用

発明者:ベイリー小林 菜穂子、吉田 徹彦、  
澤田 誠、工藤 純、安立 珠美、殿山 泰  
弘

権利者:学校法人慶應義塾

種類:特許

番号:特願 2016-225236

出願年月日:2016年11月18日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

殿山 泰弘(TONUYAMA, Yasuhiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助  
教

研究者番号:20467393