

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570216

研究課題名（和文）順遺伝学を基盤とした造血・心血管発生の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of hematopoietic and cardiovascular development in zebrafish

研究代表者

川原 敦雄 (KAWAHARA ATSUO)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・細胞生物学部・室長

研究者番号：10362518

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、心臓・血管発生に特異的な異常を示すゼブラフィッシュ変異体の病態解析および原因遺伝子の同定を行うことにより、循環器系の発生過程を制御する分子の実体およびその機能を明らかにすることである。ko095 変異体は、体幹部の節間血管が神経管の近傍で分岐する表現型を示す。この ko095 変異体では、血管発生の鍵分子である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF: vascular endothelial growth factor) の発現が増強し、血管のリモデリングの亢進が認められた。この ko095 変異体の原因遺伝子は、タンパク質合成に必須の役割を担う Sars (Seryl-tRNA synthetase) であった。Sars は、タンパク質合成を司る酵素としての機能に加えて、血管発生を制御していると考えられた。一方、ko157 変異体は、体節形成期に体の両側に位置する心臓前駆細胞の正中線方向への移動に異常が認められ、二股心臓の表現型を示した。この ko157 変異体の原因遺伝子は、12 回膜貫通領域を持つ新規の膜分子 Spns2 (Spinster-like 2) であった。生化学的な解析から、Spns2 が脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の輸送体として機能していることが明らかとなった。本研究において、血管および心臓発生に異常を示す ko095 変異体および ko157 変異体の機能解析から、Sars が血管発生の新たな制御因子であること、また、Spns2 が S1P の輸送体として働くことにより心臓発生を制御していることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

I aimed to reveal novel key molecules in vascular and cardiac development by the characterization of novel cardiovascular zebrafish mutants. In the ko095 mutants, aberrant branching of intersegmental vessels besides of the neural tube was observed. Further, the increased expression of VEGF (vascular endothelial growth factor), which is a key factor in angiogenesis, caused the excessive vascular remodeling in the ko095 mutant. I found that the gene responsible for the ko095 is Sars (Seryl-tRNA synthetase) that is known as an enzyme essential for protein synthesis: Sars possesses a novel function involved in angiogenesis. On the other hand, the ko157 mutant exhibited the impairment of cardiac progenitor migration, resulting in two hearts known as cardia bifida. I found that the gene responsible for the ko157 is a twelve-pass transmembrane-domain protein Spns2 (Spinster-like 2). Biochemical analysis of Spns2 presented that Spns2 functions as a transporter of a sphingolipid mediator, sphingosine-1-phosphate (S1P). Thus, I found that Sars and Spns2 play important roles in vascular and cardiac development in zebrafish, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：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

1. 研究開始当初の背景

我々日本人の主な死因は、癌・心疾患・脳血管疾患である。これら疾患の病態の理解や治療法の開発には、心臓・血管の形成機構の解明が必要不可欠である。我々哺乳類の心臓・血管発生は、母胎内で進行するため、その解析は非常に困難である。モデル脊椎動物であるゼブラフィッシュは、その発生機構が哺乳類と良く保存されていることが近年の研究により明らかとなってきている。そこで、本研究では、まず、化学変異原によりゼブラフィッシュのゲノムに変異を誘導することにより、心臓や血管発生に特異的な異常を示すゼブラフィッシュ変異体を作製し、次に、それらの原因遺伝子を同定する順遺伝学的な解析を行うことにより、心臓・血管発生を制御する分子の実体を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、初期発生過程が我々哺乳類と良く保存されているゼブラフィッシュをモデル脊椎生物として活用し、心臓や血管の発生過程を制御する分子の実体を明らかにすることである。私は、化学変異原処理によりゼブラフィッシュのゲノムに突然変異を導入し、心臓や血管発生に特異的な異常を示すゼブラフィッシュ変異体を作製してきた。本研究において、心臓や血管発生を蛍光タンパク質の発現でモニターできる可視化システムをゼブラフィッシュ変異体系統と掛け合わせることで、病態進行の形態学的な異常をリアルタイムで3次元画像として捉える。さらに、これら変異体の原因遺伝子をゲノム・マッピング法で同定し、その原因遺伝子の心臓・血管発生における働きを解明することにより、脊椎動物の間で種を超えて保存されている心臓・血管発生分子メカニズムの一端を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 心臓および血管発生の可視化システムの樹立
- ① 心筋細胞や血管細胞特異的なプロモーター領域の下流に蛍光タンパク質を接続した外来遺伝子を、メダカの To12 トランスポゼースの活性を利用しゼブラフィッシュのゲノムに組み込む（可視化システムの樹立）。

- ② 上記の可視化システムをゼブラフィッシュ変異体系統と掛け合わせ、病態の進行過程を蛍光タンパク質の発現として解析できるシステムを樹立する。

- (2) 心臓・血管発生に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の原因遺伝子の同定
- ① 上記の変異体系統を共焦点レーザー顕微鏡を用いた3次元画像解析を行うことにより、心臓や血管発生の形態学的な異常を解析する。
- ② 上記の変異体系統を TL 野生型系統と掛け合わせ、表現型とリンクする SSLP (simple sequence length polymorphism) マーカーを検索することにより、変異体の遺伝子座を同定する。次に、遺伝子座の近傍に位置するゼブラフィッシュのゲノム情報を調べ、原因遺伝子の候補を単離し、化学変異原により導入された突然変異を同定する。

- (3) 心臓・血管発生に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の機能解析
- ① 原因遺伝子の一次構造から機能ドメインや生物活性が類推できた場合、変異体の表現型との関連性、特に、変異体型の生物活性を調べる。また、原因遺伝子が新規の場合、心臓・血管発生のどの段階で機能しているのか、上記の可視化システムを用いた原因遺伝子の発現抑制実験で解析する。
- ② 変異体の原因遺伝子の哺乳類での分子機能を明らかにする目的で、原因遺伝子の哺乳類ホモログを単離する。さらに、心筋細胞や血管内皮細胞などの哺乳類細胞培養系を用いて、分子機能が種を超えて保存されているかを明らかにする。

4. 研究成果

- (1) ko095 変異体の機能解析
ゼブラフィッシュの血管は、1日胚の腹側部で血管前駆細胞が動脈および静脈へと分化することにより形成される。引き続き、腹側の動脈から背側の神経管へ体節の間を縫うように節間血管が発生する。ko095 変異体は、この節間血管が神経管近傍で枝分かれをする表現型を示した。ko095 変異体の機能解析から、以下の実験結果が得られた。
- ① ko095 変異体の形態学的異常を血管の可

視化システムを活用し共焦点レーザー顕微鏡により解析した結果、2日胚までは節間血管を含む体幹部の血管ネットワークの形成に異常が見られなかったが、2.5日胚の時期から節間血管が神経管近傍で糸状仮足を盛んに伸ばし始め、その後血管が無秩序に分岐する血管のリモデリングの異常が認められた(図1)。中脳領域でも野生型に比べ異常な血管網の形成が認められた。また、ko095変異体は、心臓発生にも異常を示し、心外膜の浮腫を伴う排出路の閉塞が観察された。

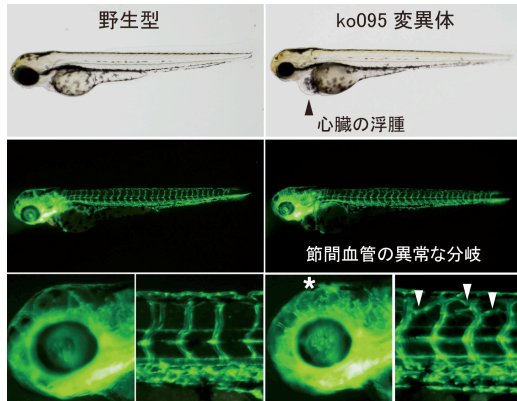


図1: ko095変異体の表現型

- ② ko095変異体の原因遺伝子は、Seryl-tRNA synthetase (Sars: タンパク質合成に必須なアミノアシル基転移酵素の一つ)であった。ko095変異体では、402番目のグルタミンが終止コドンへ変異しており、C末部分(114アミノ酸)を欠失していた(図2: Sars-ko095)。変異体であるSars-ko095は、セリンをtRNAへ結合させる酵素活性を消失していた。この酵素活性の消失がko095/Sars変異体の表現型に必須であるかを調べる目的で、酵素活性を失った点突然変異型Sars-T429A(429番目のスレオニンがアラニンへ置換されている)によるko095/Sars変異体の機能回復実験を行った。このSars-T429Aも野生型Sarsと同様にko095/Sars変異体の表現型を抑制しうることから、Sarsがこれまで知られていた酵素活性以外の新規の生物活性により血管発生を制御していると考えられた。

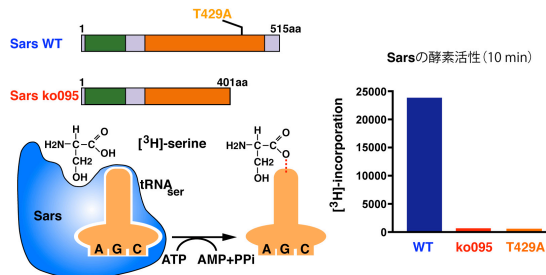


図2: ko095変異体の原因遺伝子 Sars

- ③ ko095/Sars変異体における血管発生の制御因子群の挙動を調べた結果、血管内皮細胞増殖因子であるVEGFの発現が特異的に亢進していることが明らかとなった(図3)。さらに、ko095/Sars変異体にVEGFやVEGF受容体に対するアンチセンス・モルフォリノを注入すると、ko095/Sars変異体の表現型が抑制された。
- ④ 上記の結果は、Sarsが血管のリモデリングを調節する新たな分子であること、さらに、SarsがVEGFの発現を負に制御することにより血管のネットワーク形成を調節していることを示している(図3)。

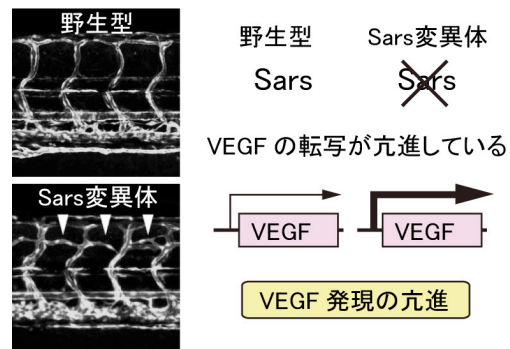


図3: Sarsの血管発生における役割

- (2) ko157変異体の機能解析
- ゼブラフィッシュの心臓は、体節形成期に体の両側に位置する心臓前駆細胞が正中線方向へ移動し融合することにより形成される。ko157変異体は、この移動に異常を示し二股心臓の表現型を示した。ko157変異体の機能解析から、以下の実験結果が得られた。
- ① ko157変異体の形態学的異常を心筋細胞の可視化システムを用いて解析した結果、心臓前駆細胞の正中線方向への移動不全により両側で心房・心室への分化が進行し二股心臓の表現型を示した(図4)。この二股心臓は、心房と心室のマーカ遺伝子の発現および心臓の拍動は認められたが、血管との接続に不全を示し、血液の循環は認められなかった。また、この変異体の尾の先端に浮腫が認められた。

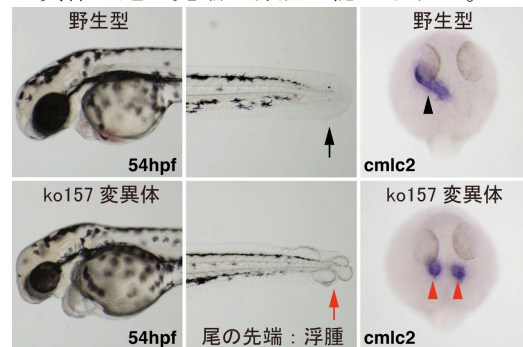


図4: ko157変異体の表現型

- ② ko157 変異体のゲノム・マッピングの結果、ko157 変異体の原因遺伝子は、12 回膜貫通領域を持つ新規の膜分子 Spns2 (Spinster-like 2) であることが明らかとなった (図 5)。ko157 変異体では、153 番目のアルギニンがセリンへ点突然変異していた。

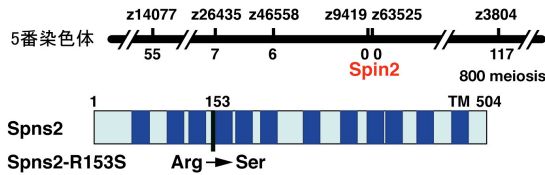


図 5: ko157 変異体の原因遺伝子 Spns2

- ③ ko157/Spns2 変異体の二股心臓の表現型は、脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の受容体 S1PR2 の変異体の表現型と極めて類似していた。そこで、Spns2 と S1PR2 の遺伝学的な関連性を検討した。ko157/Spns2 変異体の表現型は、Spns2 変異体胚への S1P の注入により抑制できたことから、Spns2 が S1PR2 の上流で機能していることが示唆された。
- ④ Spns2 の一次構造が輸送体と弱く相同性示したことから S1P に対する輸送活性を調べた結果、ゼブラフィッシュ Spns2 が細胞内で生成された S1P を細胞外へ放出できることが明らかとなった (図 6)。これに対して、変異体型である Spns2-R153S は、分泌活性を消失していた。また、ヒト Spns2 にも S1P 分泌活性が認められ、種を超えた普遍的な機能であると考えられた。

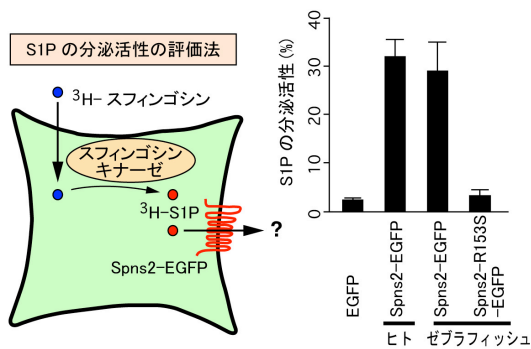


図 6: Spns2 は S1P 輸送体として機能する

- ⑤ Spns2 は、初期発生過程で胚体外の組織である卵黄多核層に発現していた。この卵黄多核層は、栄養分が蓄えられている卵黄嚢と胚体とを隔てるバリア構造である。卵黄多核層で Spns2 の発現を抑制すると ko157/Spns2 変異体と同様に二股心臓となり、また、ko157/Spns2 変異体胚

に、野生型 Spns2 RNA を注入すると表現が抑制された。

- ⑥ 上記の結果は、Spns2 が S1P 輸送体として機能していることを示しており、卵黄嚢に蓄えられている S1P を胚体へ放出することにより心臓前駆細胞の移動を直接あるいは間接的に制御していると考えられた (図 7)。

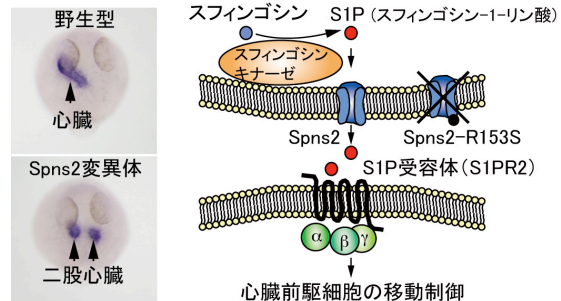


図 7: Spns2 の心臓発生における役割

本基盤研究において、心臓および血管発生を制御する新たな制御因子を同定できた。Sars は、これまで、アミノアシル基転移酵素としての機能しか知られていなかったが、ko095 変異体の解析から、血管のリモデリングを調節する新規の生物活性を持つことが明らかとなった。ko095 変異体の表現型は、ヒト Sras RNA の注入によっても抑制されることから、この Sras の新機能は哺乳類においても保存されていることが期待される。今後、ヒト Sars と血管新生が亢進している癌との関連性を明らかにする必要がある。また、ko157 変異体の解析から、Spns2 が S1P の輸送体として機能していることが明らかとなった。これは、これまで不明であった脂質メディエーターの分泌機構を解明した研究結果である。S1P は、ヒトにおいて癌や自己免疫疾患との関連性が指摘されており、今後、ヒト Spns2 の機能の解明および自己免疫疾患との関連性を明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Minehata K., Kawahara A. and Suzuki K. meis1 regulates the development of endothelial cells in zebrafish **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 347, 647-652 (2008)
- ② Fukui H., Hanaoka R., Kawahara A. Non-canonical activity of Seryl-tRNA synthetase is involved in vascular development **Circulation Research** 104, 1253-1259 (2009)
- ③ Kawahara A., Stainier D.Y.R. Noncanonical activity of seryl-tRNA synthetase and vascular development

Trends in Cardiovascular Medicine 19, 179-182 (2009)

- ④ Kawahara A. Genetic dissection of cardiac progenitor migration **Inflammation and Regeneration** 29, 324-328 (2009)
- ⑤ Kitaguchi T., Kawakami K., Kawahara A. Transcriptional regulation of a myeloid-lineage specific gene lysozyme C during zebrafish myelopoiesis **Mechanisms of Development** 126, 314-323 (2009)
- ⑥ Kawahara A., Nishi T., Hisano Y., Fukui H., Yamaguchi A., Mochizuki N. The sphingolipid transporter Spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors **Science** 323, 524-527 (2009)
- ⑦ 川原敦雄、西毅、山口明人、望月直樹 スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の輸送体である Spns2 は、心臓前駆細胞の移動を制御する **細胞工学** 28, 390-391 (2009)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 川原敦雄、望月直樹 Functional analysis of a novel zebrafish mutant that has defects in the migration of myocardial precursor cells. 日本発生生物学会第 41 回大会 徳島市 平成 20 年 5 月 28 日
- ② 川原敦雄、西毅、山口明人、望月直樹 Zebrafish spinster 2 involved in the migration of myocardial precursors in a novel regulator in sphingosine-1-phosphate (S1P) signaling. The zebrafish 2008 Conference, Wisconsin, USA 平成 20 年 6 月 27 日
- ③ 川原敦雄 順遺伝学を用いたゼブラフィッシュの心臓・血管細胞の発生機構の解析 第 29 回日本炎症・再生医学会 東京都 平成 20 年 7 月 9 日
- ④ 川原敦雄 The sphingolipid transporter Spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. Keystone Symposium, California, USA 平成 21 年 4 月 26 日
- ⑤ 川原敦雄 Zebrafish Spns2 functioning as an S1P transporter is essential for the myocardial precursor migration. 第 5 回武田科学財団シンポジウム 東京都 平成 21 年 5 月 26 日

- ⑥ 川原敦雄 Zebrafish Spns2 functioning as an S1P transporter is essential for the myocardial precursor migration. 第 4 回 iCeMS 国際シンポジウム 京都市 平成 21 年 5 月 28 日
- ⑦ 川原敦雄 Sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 regulates cardiac progenitor migration. FASEB Summer Research Conferences, Arizona, USA 平成 21 年 7 月 2 日
- ⑧ 川原敦雄、西毅、久野悠、山口明人、望月直樹 心臓前駆細胞の移動を制御するスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)輸送体:Spns2 第 51 回日本脂質生化学会 名古屋市 平成 21 年 7 月 31 日
- ⑨ 川原敦雄、西毅、久野悠、山口明人、望月直樹 Spns2 はスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の細胞外への放出を制御する 第 82 回日本生化学会 神戸市 平成 21 年 10 月 22 日
- ⑩ 川原敦雄、西毅、久野悠、山口明人、望月直樹 The Sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 is involved in cardiac morphogenesis. 第 31 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 吹田市 平成 21 年 11 月 30 日
- ⑪ 川原敦雄、西毅、久野悠、山口明人、望月直樹 Sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 regulates cardiac morphogenesis 第 32 回日本分子生物学会 横浜市 平成 21 年 12 月 11 日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称:スフィンゴシン 1-リン酸の新規トランスポーター分子

発明者:望月直樹、川原敦雄、西毅、山口明人

権利者:国立循環器病研究センターと大阪大学

種類:特許

番号:特開 2010-077045

公開年月日:22 年 4 月 8 日

国内外の別:国内

[その他]

ホームページ:<http://www.ri.ncvc.go.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原 敦雄 (Kawahara Atsuo)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・細胞生物学部・室長

研究者番号:10362518

