

機関番号：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17017003

研究課題名（和文）メダカゲノム・EST 情報と突然変異体を駆使した発生・再生システムの解明

研究課題名（英文）Analysis of the vertebrate development and regeneration system using medaka genome, EST and mutant resources

研究代表者

武田 洋幸 (TAKEDA HIROYUKI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：80179647

研究成果の概要（和文）：

2006 年までに、メダカドラフトゲノム (2007)、および詳細な SNP 地図、BAC ライブラリー等の情報が充実し、メダカ突然変異体から原因遺伝子同定の労力と時間は飛躍的に減少した。2005 から 2009 年の間に、武田研究室および工藤研究室において、それぞれ 9 系統（肝臓、体軸形成、原腸形成、左右軸変異体、内耳形成）と 15 系統（心臓、血球、血管、椎骨、頭蓋・ヒレ骨形成、ヒレ形成変異体、ヒレ再生）の原因遺伝子を特定し、目標を達成した。

研究成果の概要（英文）：

The medaka draft genome, together with genomic resources (SNP map, BAC contig, etc.), has been published by the Japanese group in 2007. This greatly facilitated developmental genetics using medaka as a model. In this project, we focused on the medaka developmental mutants isolated by Takeda's and Kudo's laboratories during 2005 to 2009. By the end of this project Takeda and Kudo successfully identified and functionally examined responsible genes for nine mutants (defective in gastrulation, body axes, liver and otolith), and fifteen ones (heart, blood cells, blood vesicle, vertebra, head skeletons, fin morphogenesis and fin regeneration), respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	22,000,000	0	22,000,000
2006 年度	23,500,000	0	23,500,000
2007 年度	23,800,000	0	23,800,000
2008 年度	29,100,000	0	29,100,000
2009 年度	30,100,000	0	30,100,000
総計	128,500,000	0	128,500,000

研究分野：発生遺伝学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：メダカ、ゲノム、EST、突然変異体

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の基本的体制を備えた最も古い動物群である魚類は脊椎動物の進化を考える上で重要な存在である。また、小型魚類は発生・遺伝学の研究の他に、ヒレが切断後約 2

週間で再生することから遺伝学が可能な再生モデル動物としても注目されている。本研究では、特定領域研究「統合ゲノム」で得られたゲノム・EST 情報と二つの研究室で単離された突然変異体を効率的に融合すること

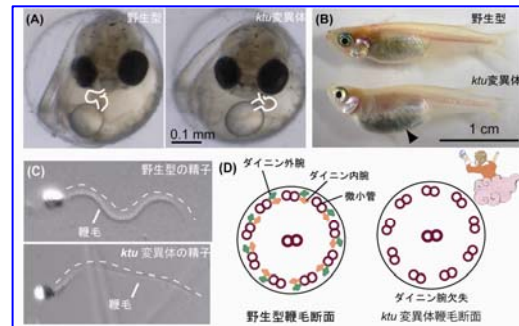
ha/fat-related enzyme LG20 (耳石), nmk/abcb7 LG10 (肝臓)

以下に代表的成果である、ktu と tab 解析、発現解析、そして本特定計画研究代表の近藤滋博士と班員間の共同で行ったゼブラフィッシュ体節形成の原理解析についても記述する。

①左右軸変異体 kintoun (ktu)

これまでの研究で、繊毛は幅広い生命現象に関わっており、例えば左右軸形成において、運動性繊毛が水流をつくり、その流れが左右非対称な内臓配置を引き起こすことが知られている。一方、繊毛の形成や機能の異常によって引き起こされる遺伝病も多数知られている。代表的なものは、多発性嚢胞腎 (polycystic kidney disease, PKD) と繊毛病 (primary ciliary dyskinesia, PCD、一部カルタンガー症候群ともよばれる) である。両者とも複数の原因遺伝子がすでに単離されているが、200 種類以上のタンパク質で構成される繊毛の形成過程や関連する遺伝病の全体像はまだ謎である。左右軸形成に異常を示すメダカ突然変異体 ktu は、内臓配置がランダムになる左右軸喪失の変異体で、さらに必ず多発性嚢胞腎を発症し、下腹部がふくれ背筋が曲がる。この姿が、孫悟空が空を飛ぶために用いる筋斗雲 (きんとうん) に似ていることから、変異体は kintoun (ktu) と名付けられた。詳しい表現型の解析により、ktu 変異体では繊毛のダイニンアームが欠失するために運動性を喪失する典型的な繊毛病であることが判明した。ポジショナルクローニングにより同定された原因遺伝子は、脊椎動物から単細胞生物 (クラミドモナスなど) まで保存された全く新しい遺伝子であった。次にヒト遺伝病との関連を H. Omran 教授 (フライブルグ大学) との共同で調べた。遺伝的に繊毛病を発症する 100 家系のゲノム DNA を調べた結果、2 家系でヒト Ktu 遺伝子の変異があることが見つかった。さらに、D. R. Mitchell および神谷律教授 (東京大学・生物科学専攻) との共同で、クラミドモナスの変異体 pf13 (鞭毛の運動性喪失) の原因遺伝子も ktu の相同遺伝子であること、相賀裕美子教授 (国立遺伝学研究所) と共同で作成したノックアウトマウスが典型的な繊毛症の表現型を示すことが判明した。つまり ktu 遺伝子の変異は、ヒト、マウス、メダカ、クラミドモナスにおいて繊毛・鞭毛の運動能喪失をもたらしたのである。クラミドモナスとマウスを用いた生化学的解析から、新規遺伝子がコードするタンパク質は、細胞質内でダイニ

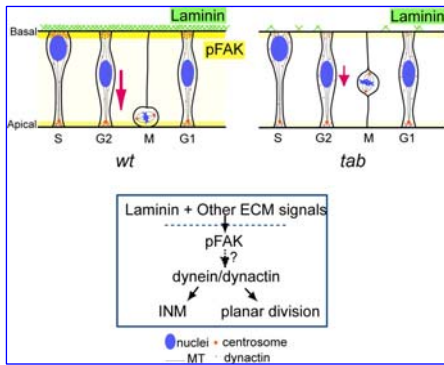
ン前駆体の形成に必須な細胞質タンパク質であること結論した。このようにメダカ変異体の単離がきっかけとなり、生物界に広く存在する繊毛・鞭毛の複雑な形成過程の理解が



進んだ (Omran, H. et al., Nature (Article), 2008)。

②ラミニン変異体 tab を用いた神経組織構築の解析

基底膜は、細胞外基質により形成される特徴的構造で、組織構造の維持や細胞の分化、移動など発生の様々な過程に重要な機能を持つ。基底膜の形成や機能には、その主要構成成分である三量体糖タンパク質 Laminin が必須である。tacobo (tab) 変異体は、放射線医学研究所と共同のスクリーニングで得られたメダカ ENU 誘発突然変異体であり、神経管、脊索、網膜、胸鰭などに形態異常を示す。tab の positional cloning を行った結果、tab locus は laminin $\gamma 1$ ($lam \gamma 1$) 鎖をコードすることが判明し、Laminin1 タンパク質が、変異体において著しく減少していることが明らかとなった。tab では神経管の形態異常が最初に認められる。この原因を探るため、脳の領域化について領域 marker の発現を観察した結果、tab においても脳の領域化は正常に行われていることが分かった。さらに神経管での分裂細胞の分布を観察した。その結果、tab においては分裂細胞が神経管の脳室面 (apical) に局在せず、管内に散在することが判明した。神経管上皮細胞では、分裂時に細胞体が apical 側へ移動し、分裂後に basal 側に戻る、いわゆるエレベータ運動を示す。この運動は、未分化神経細胞が分化誘導因子に曝露される時間を制御することで神経細胞の分化と未分化の状態を調節しているとされる。細胞外基質とこのエレベータ運動の関係はまったくわかっておらず、この現象に焦点を当てて研究を進めた。その結果、ラミニンは、インテグリン-FAK-microtubule 系を通して、細胞核の移動と分裂の方向を制御していることが判明した (Tsuda et al., J. Cell Sci., 2010)。



③遺伝子発現プロファイルの解析

一つの遺伝子の変異がシステム全体に影響を及ぼす過程は、medaka microarray を用いて、nmk 変異体と Da 変異体で解析した。脂肪肝を発症する変異体 nmk は、ABC トランスポーターの一つ *abcb7* が原因遺伝子であった。マクロアレイを用いた発現解析の結果、肝臓で鉄と脂肪代謝関連の遺伝子の発現に異常を見いだした (Miyake et al., Dev. Growth Differ. 2008)。Da 変異体は *zic1&4* のエンハンサー変異体で、体節背側での *zic* 遺伝子が特異的に消失する。これにより体幹部全体の背腹パターンが変化する。現在 Da 変異体における *zic1*, 4 の下流因子を medaka microarray および Solid AB SOLiD を用いて探索した (計画班員森下博士と共同研究)。

(2) 工藤研究室

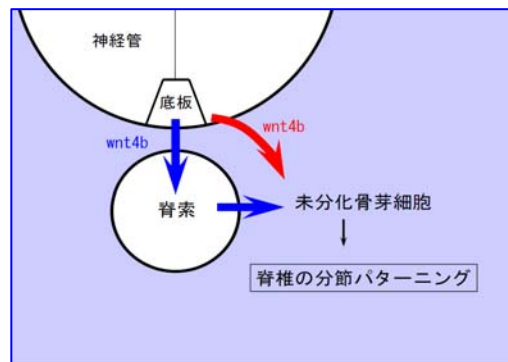
器官形成、中でも骨格形成のシステム解明のため、ゼブラフィッシュにはない新規な表現型の変異体 20 種類を選び、表現型の解析と原因遺伝子の同定を続けてきた。ようやく骨格、ヒレ、心臓、血球などの 15 種類の変異体の原因遺伝子が同定でき、これらの機能を基に、器官形成システムの確立と、それが破綻したヒト疾患への応用が可能になってきた。

以下に 15 種類の変異体の原因遺伝子について、その名前/遺伝子名/染色体を記す。

骨格変異体: *fsc/wnt4a/LG16*, *bis/brpf1/LG7*, *ki173/slp/LG6*, *ki174/sec23d/LG18*, *ki106/raldh2/LG3*, *ki71/unknown/LG22*, *ki15/shp2/LG12*, *ki126/notch1/LG12*, ヒレ・骨格変異体: *ufi/hoxb8a/LG8*, *afl/eda/LG10*, 血球変異体: *who/alad/LG12*, *bef/c-myb/LG24*, 心臓: *zac/filamin-c/LG6*, *bht/versican/LG9*, *hoz/v-mhc/LG17*

以上の中で 3 種類が論文掲載済み、2 種類が投稿中である。同時にこれらの変異体はすでに基礎生物学研究所のメダカリソースセンターに登録し、精子保存されているため、世界中で研究に使うことができる。代表的な変異体を具体的に挙げると、ヒレ形

成異常変異体は *Hoxb8* が (Sakaguchi et al., Dev. Biol. 2006) が原因遺伝子でありヒレの軌条形成を制御していること、また骨格異常変異体として体軸異常変異体では、ヒストンアセチル化に関わる *brpf1* が *Hox* の転写制御を介して頭部とヒレの骨格形成を制御していた (Hibiya et al., Dev. Biol. 2009)。次に椎骨異常変異体では、小胞輸送に関与する *sec24D* がタイプ II コラーゲンの分泌を通して椎骨形成を制御し (大久ら, zebrafish meeting 2008), また 特筆すべきは floor plate (底板) から分泌される *wnt4b* が椎骨のパターニングに関与するという、これまで全く想像していなかった底板の機能を発見した (Inohaya et al., 2010)。さらに、*Brpf1* についてはその複合体を構成する *Moz* ノックアウトマウスを解析し、*brpf1* の機能は脊椎動物共通であることが明らかになった。一方、骨格と同じ中胚様由来の器官に心臓がある。骨格と心臓はメカニカルストレスに反応し、リモデリングする器官であり、多くの分子を共用していることが指摘されている (Lincoln et al; Hearts and bones, Dev. Biol. 2006)。我々はメカニカルストレスに関連した表現型を持つ心臓異常変異体から原因遺伝子を単離し、その結果一つは筋節の形成に関与する *filamin C* であり、もう一つは心室特異的ミオシン重鎖であった。ともに心筋の物理的な力に反応する遺伝子であり、特に *filamin C* 変異体は筋肉にも異常がみられ、その骨格形成への寄与が注目される。



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 42 件)

以下すべて査読あり

(1) 武田研究室

- ① Kamura, K., Kobayashi, D., Uehara, Y., Koshida, S., Iijima, N., Kudo, A., Yokoyama T. & Takeda, H. Pkd111 complexes with Pkd2 on motile cilia and functions to establish the left-right axis. Development 138, 1121-9 (2011)
- ② Takeda, H. & Shimada, A. The art of

- medaka genetics and genomics: what makes them so unique? *Ann. Rev. Genet.* 44, 217 – 241. (2010)
- ③ Sato, A., Koshida, S. & Takeda, H. Single-cell analysis of somatotopic map formation in the zebrafish lateral line system. *Dev. Dyn.* 239, 2058–65. (2010)
- ④ Ishimatsu, K., Takamatsu, A. & Takeda, H. Emergence of traveling wave in the zebrafish segmentation clock. *Development* 137, 1595–9. (2010)
- ⑤ Tsuda, S., Kitagawa, T., Takashima, S., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Shima, A., Tsutsumi, M., Hori, H., Naruse, K., Ishikawa, Y. & Takeda, H. FAK-mediated extracellular signals are essential for interkinetic nuclear migration and planar divisions in the neuroepithelium. *J. Cell Sci.* 123, 484–96. (2010)
- ⑥ Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N. T., Hagiwara, H., Zhang, Q., Leblond, G., Toole, E. O', Hara, C., Mizuno, H., Kawano, H., Fliegau, M., Yagi, T., Koshida, S., Miyawaki, A., Zentgraf, H., Seithe, H., Reinhardt, R., Watanabe, Y., Kamiya, R., Mitchell, D. R., Takeda, H. Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature*, 456, 611–616, (2008)
- ⑦ Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, Nakatani Y, Qu W, Ahsan B, Yamada T, Nagayasu Y, Doi K, Kasai Y., et al The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*, 447, 714–719 (2007)
- ⑧ Horikawa, K., Ishimatsu, K., Yoshimoto, E., Kondo, S., Takeda, H. Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock, *Nature*, 441, 719–723 (2006)
- (2) 工藤研究室
- ⑨ Inohaya K, Takano Y, Kudo A. Production of Wnt4b by floor plate cells is essential for the segmental patterning of the vertebral column in medaka. *Development* 137, 1807–13 (2010)
- ⑩ Kii, I., Nishiyama, T., Li, M., Matsumoto, K., Saito, M., Amizuka, N. and Kudo, A. Incorporation of tenascin-C into the extracellular matrix by periostin underlies an extracellular meshwork architecture. *J. Biol. Chem.* 285, 13294–13303 (2009)
- ⑪ Hibiya, K., Katsumoto, T., Kondo, T., Kitabayashi, I. and Kudo, A. Brpf1, a subunit of the MOZ histone acetyltransferase complex, maintains expression of anterior and posterior Hox genes for proper patterning of craniofacial and caudal skeletons. *Dev. Biol.* 329, 176–190 (2009)
- ⑫ Yoshinari, N., Ishida, T., Kudo, A. and Kawakami, A. Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. *Dev. Biol.* 325, 71–81 (2009)
- ⑬ Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, Saito M, Fukuda K, Nishiyama T, Kitajima S, Saga Y, Fukayama M, Sata M, Kudo A. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *J. Exp. Med.*, 205, 295–303 (2008)
- ⑭ Inohaya, K., Takano, Y., and Kudo, A. The teleost intervertebral region acts as a growth center of the centrum: in vivo visualization of osteoblasts and their progenitors in transgenic fish. *Dev. Dyn.*, 236, 3031–46 (2007)
- ⑮ Nishidate, M., Nakatani, Y., Kudo, A., and Kawakami, A., Identification of novel markers expressed during fin regeneration by microarray analysis in medaka fish, *Dev. Dyn.*, 236, 2685–93 (2007)
- ⑯ Sakaguchi, S., Nakatani, Y., Takamatsu, N., Hori, H., Kawakami, A., Inohaya, K. and Kudo, A. Medaka unextended-fin mutants suggest a role for Hoxb8a in cell migration and osteoblast differentiation during appendage formation. *Dev. Biol.* 293, 426–438 (2006)
- ⑰ Fujita, M., Isogai, S. and Kudo, A. Vascular anatomy of the developing medaka, *oryzias latipes*: A complementary fish model for the cardiovascular research of vertebrate. *Dev. Dyn.* 235, 734–746 (2006)
- [学会発表] (計 214 件)
- (1) 武田研究室
- ① Takeda, H. “Mesodermal origin of scales and fins of the medaka – Insight into origin and evolution of mineralized skeleton in vertebrates” JSDB-GFE Joint Meeting of Developmental Biology, Dresden, Germany, March 23–26, 2011

- ② Moriyama, Y., Nakamura, R., Kawanishi, T., Shimada, A., Takeda, H. “The zic genes as master regulators in dorsoventral patterning of the fish trunk structures” 2nd Joint Meeting of the SFBD and JSDB, Paris, France, May 26-28, 2010
- ③ Shimada, A., Kawanishi, T., Inohaya, K., Takeda, H. “Embryonic origin of osteoblasts in scales and fins of medaka fish” 2010 SDB-JSDB Joint Meeting, Albuquerque, U.S.A. August 5-9, 2010
- ④ Kawanishi, T., Moriyama, Y., Nakamura, R., Shimada, A., Takeda, H. “zic1 and zic4 expression in the somite regulates dorsalization of the fish trunk structures” 2010 SDB-JSDB Joint Meeting, Albuquerque, U.S.A. August 5-9, 2010
- (2) 工藤研究室
- ⑤ Chatani, M., Kubota, I., Kudo, A. “Live imaging of osteoclast activities in medaka under hypergravity” ELGRA biennial symposium and general assembly, Bonn, Germany, September 1-4, 2009
- ⑥ Moriyama, A., Maruyama, K., Kudo, A. “Characterization of medaka C-MYB mutant BENIFUJI, which displays defective hematopoietic progenitor differentiation, an insight into hematopoietic ontogenesis in medaka” 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, Italy, Rome, July 15-19, 2009
- ⑦ Chatani, M., Inohaya, K., Kudo, A. “In-vivo imaging for osteoclasts in medaka, showing the evidence of bone modeling” The 8th international meeting on zebrafish development and genetics, Madison, USA, June 25-29, 2008
- ⑧ Kawakami, A., Ishida, T., Yoshinari, N., Kudo, A. “Identification and functional analysis of regeneration-associated molecules using the fin-fold regeneration model in juvenile zebrafish” The 8th international meeting on zebrafish development and genetics, Madison, USA, June 25-29, 2008

[その他]

(1) ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/h>

assei/

(2) 新聞発表

① 武田研究室

雑誌論文⑥について

2008年12月9日 FujiSankei Business 13頁

「絨毛異常の遺伝子 メダカ変異で発見」

2008年12月5日日経産業新聞 9頁「絨毛病 原因遺伝子を特定 東大、変異のメダカから」

2008年12月04日 日刊工業新聞 32頁

「東大、絨毛病の原因遺伝子を確認—患者のDNAも解析」

2008年12月4日 06時03分 時事通信

「変異メダカから疾患遺伝子発見—細胞表面の絨毛動かさず—東大など」

雑誌論文⑦について

2007年6月7日 朝日新聞 33面

2007年6月7日 東京新聞 26面

2007年6月7日毎日新聞 2面

2007年6月15日(金) 科学新聞 1面

雑誌論文⑧について

2006年6月8日 日経産業新聞 11頁

2006年6月8日 日刊工業新聞 News Web

② 工藤研究室

雑誌論文③について

2008年3月2日 毎日新聞

「心筋を修復し がん増殖を抑制? たんぱく質ペリオスチン研究最前線」

雑誌論文⑬について

2008年1月25日 朝日新聞

「心臓修復するたんぱく質」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 洋幸 (TAKEDA HIROYUKI)

研究者番号: 80179647

(2) 研究分担者

工藤 明 (KUDO AKIRA)

研究者番号: 90270925