

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15116

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答破綻による双頭を伴う発生初期異常誘導機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism under the occurrence of bicephaly during development in medaka fish with a defective UPR pathway

研究代表者

石川 時郎 (Ishikawa, Tokiro)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：70632545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレス応答は小胞体の恒常性を維持するための生体防御機構である。本研究では小胞体ストレス応答の破綻が頭が2つある表現型を高頻度で引き起こす問題に着手し、一つの経路の破綻が他の経路を活性化してしまうことが原因の一つであることを明らかにした。同時に、TILLING法により得られた系統(遺伝子X変異)が双頭を引き起こす問題を解決するため掛け合わせを行い、遺伝子Xが双頭の原因ではなく、遺伝子X近辺の未知の遺伝子が原因であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレス応答は小胞体の恒常性を維持するために不可欠な分子機構であり、生命の発生から発達など様々な場面で重要な役割を果たす。本研究においては発生の過程で頭が2つになってしまう発生異常を小胞体ストレス応答の破綻が引き起こす分子機構を明らかにするため、メダカを用いた解析を行った。結果として、ひとつのストレス解消経路が破綻することでその他の経路が強く活性化されてしまい、双頭が生じてしまうことを示唆するデータを得た。同時に頭が2つになりやすい系統の樹立も試みた。

研究成果の概要(英文)：To cope with ER stress, cells activate the unfolded protein response(UPR). In this study, we showed that defect occurred in one of the UPR pathway leads to increased the ER stress and the activation of another UPR pathway. Consequently, it causes the occurrence of bicephaly during early stage of embryonic development in medaka. Meanwhile, we generated the medaka strain carrying a mutation in gene X, causing bicephaly at a high frequency, by TILLING method, and showed that the occurrence of bicephaly is not caused by the genetic defect in gene X, but caused by genetic defects in some unknown genes close to gene X.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス応答 メダカ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小胞体ストレス応答は小胞体の恒常性を保つための生体防御機構である。脊椎動物においては 10 つの小胞体ストレスセンサーが存在し、これらが小胞体内の異常を感知し、シグナルを核や細胞質に伝達することで個体レベルでの恒常性が維持されている。

申請者はこれらの 10 つのセンサー分子の生理的な役割を明らかにするため、10 年以上前より、小型のモデル生物であるメダカを用いた逆遺伝学的な解析を行っている。この実験過程において、1 つの小胞体ストレスセンサー分子のノックアウト系統において有意に高頻度(1%程度)で頭が 2 つある双頭の個体が生じることを見出した(図 1)。

同時に、変異原処理により遺伝子変異を導入する TILLING 法により遺伝子に傷をつけたことで得られた 1 系統についてはさらに高頻度(10%程度)で双頭個体が生じることから、発生過程において何らかの役割を果たす遺伝子に異常が生じているものと思われた。

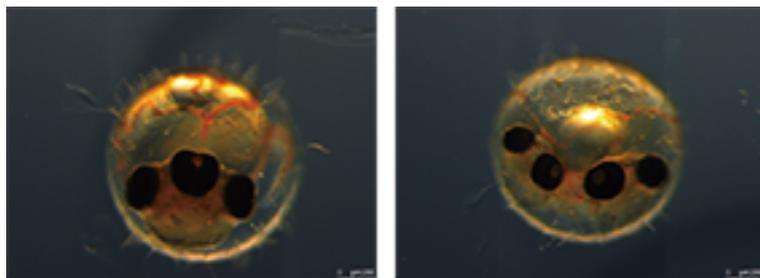


図 1 双頭のメダカ初期胚

2. 研究の目的

本研究の目的は 2 つある。

- (1) 小胞体ストレス応答の破綻が双頭を引き起こすのかを明らかにする。
- (2) TILLING 法で得られた変異体の表現型の原因遺伝子を探索する。

これらを明らかにすることで、小胞体内の品質管理機構が発生過程に果たす役割を明らかにできると考えた。

3. 研究の方法

(1) 申請者がこれまでに作出した小胞体ストレス応答センサー分子のノックアウト系統をかけ合わせ、得られた胚で双頭の表現型が見られるかを検証する。さらに、ノックアウト系統をかけ合わせていくことで、双頭の表現型の生じる頻度がどのように変化するかを検証する。

(2) 得られている変異体は TILLING 法により既知の遺伝子に変異が入っているため、双頭の変異がこの遺伝子変異によるものかを検証する。この既知遺伝子の変異によらない場合、既知遺伝子への変異のみをかけ合わせにより取り除き、純粋な変異系統を樹立した後、変異の探索を行う。

4. 研究成果

(1) 当研究室ですでに樹立済みの遺伝子破壊系統同士をかけ合わせ、双頭の変異が生じる割合を調べた(図 2)。その結果、1 つの小胞体ストレスセンサー(A)をノックアウトした個体では、1%程度の高い割合で双頭個体を得られた(レーン 2,3)。

そして、他のセンサーB,C,D についてにおいて遺伝子破壊個体同士をかけ合わせたものこれらでは双頭の個体は得られなかった(レーン 4-9)。

さらに、遺伝子破壊では致死になってしまうセンサーE においてヘテロ変異個体同士をかけ合わせてモノのこれらでも双頭の個体は得られなかった(レーン 10,11)。

興味深いことに小胞体ストレスセンサーF が常時活性化している系統においては比較的高い割合で双頭個体が見られた(レーン 12,13)。さらに、センサーA とセンサーF の二重変異体を作製したところ、双頭の発生が顕著に抑えられた。

これらの結果はセンサーA のノックアウトにより処理しきれなくなった生理的な小胞体ストレスがストレスセンサーF を活性化しており、その下流の因子が双頭化に寄与していることを示唆している。

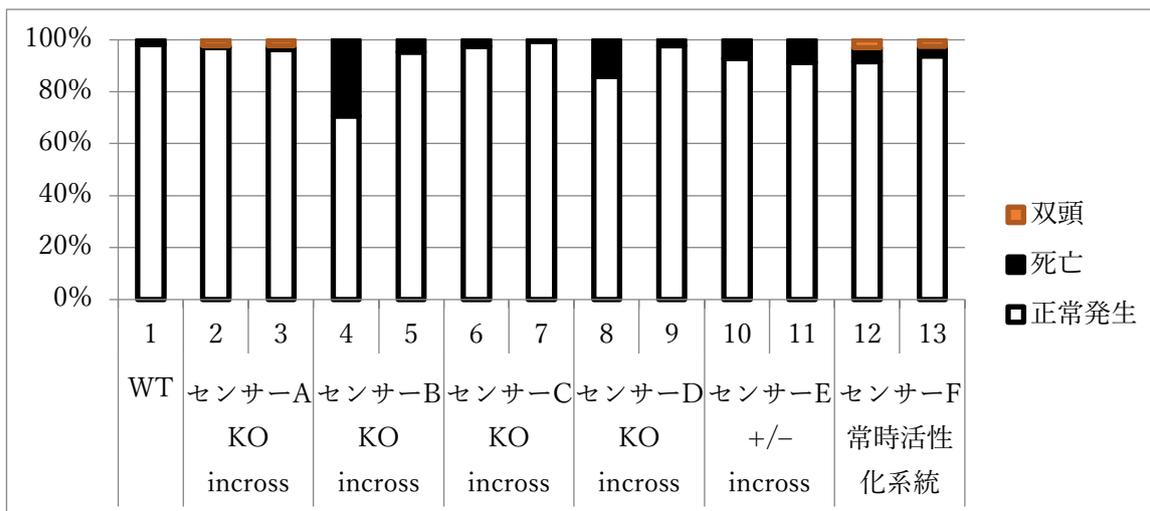


図2 小胞体ストレスセンサー分子ノックアウト・活性化による双頭の出現頻度

(2) 当研究室で見出した高い頻度で双頭を生み出す系統を持つ、TILLING により変異を導入した遺伝子 X が双頭の原因であるかを調べるため、この変異をホモ、ヘテロで持つ親を雌とした掛け合わせを行った(図 3)。その結果、この遺伝子をホモで持つ個体でも双頭を全く生み出さないものがある(レーン 1, 2)一方で、ヘテロで変異を持ち、遺伝子 X の機能が損なわれていない系統においても双頭個体の発生が観察できたため、この双頭の表現型は遺伝子 X の変異によるものではないと結論づけた。

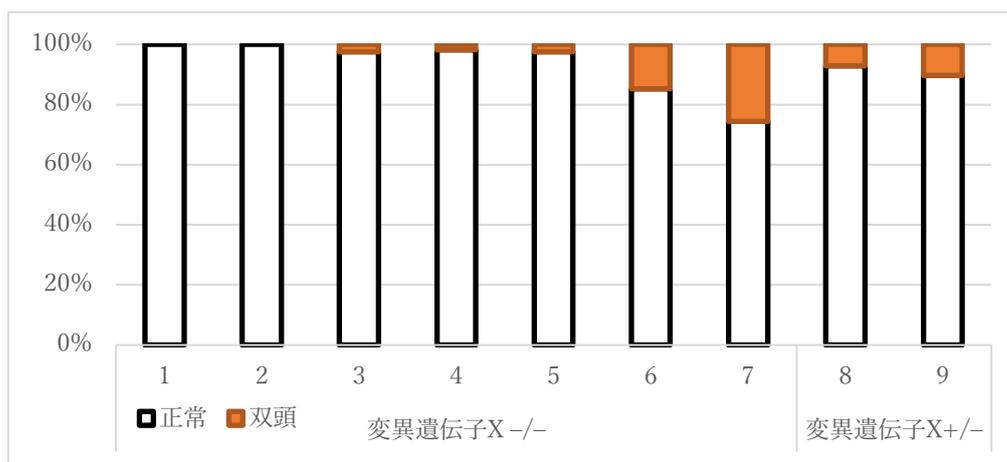


図3 遺伝子 X の欠損は双頭の原因ではない。

次に、遺伝子 X が+/+であり、双頭を生み出す個体を作成すべく上記図 3 レーン 8, 9 で示す +/- の個体を親とした掛け合わせを行い 50 匹程度の子孫を得て野生型との掛け合わせを行った。しかしながら、これらのうちで高頻度で双頭を生み出すものはなく、樹立には至らなかった。

遺伝子 X 変異系統は TILLING 法により取得してから 10 回程度の野生型との掛け合わせを経た個体である。そのため、この系統に残る遺伝子変異の多くは遺伝子 X の近傍に位置する。すなわち、目的の変異は遺伝子 X 変異と強く連鎖しているため、今回の掛け合わせにより遺伝子 X 変異との分離が行えなかったと考えられる。

これからはさらに個体数を増やして解析を行う。さらに、十分な数の個体を用いても変異が分離できない場合は、遺伝子 X をマーカーとして次世代シーケンサーによるゲノム解析により変異を同定する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① ***Tokiro Ishikawa, Satoshi Ansai, Masato Kinoshita and Kazutoshi Mori**
 “A Collection of Transgenic Medaka Strains for Efficient Site-Directed Transgenesis Mediated by phiC31 Integrase”
 G3: Genes Genomes Genetics, 2018 August 1 vol. 8 no. 8 2585-2593 査読あり

*corresponding author

② Ishikawa T, Kashima M, Nagano AJ, Ishikawa-Fujiwara T, Kamei Y, Todo T, Mori K
“Unfolded protein response transducer IRE1-mediated signaling independent of XBP1
mRNA splicing is not required for growth and development of medaka fish.”

eLife, 2017 Sep 27;6 査読あり

F1000prime に選ばれました。

③. Tokiro Ishikawa, Takuya Toyama, Yuki Nakamura, Kentaro Tamada, Hitomi Shimizu,
Satoshi Ninagawa, Tetsuya Okada, Yasuhiro Kamei, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Takeshi
Todo, Eriko Aoyama, Masaharu Takigawa, Akihiro Harada and Kazutoshi Mori

“UPR Transducer BBF2H7 Allows Export of Type II Collagen in a Cargo- and
Developmental Stage-Specific Manner”

Journal of Cell Biology.,2017, 216-6 1761-1774 査読あり

In focus で取り上げられました。

④ Takehiro Sugimoto, Satoshi Ninagawa, Shimpei Yamano, Tokiro Ishikawa, Tetsuya
Okada, Shunichi Takeda, Kazutoshi Mori “SEL1L-dependent Substrates Require Derlin2/3
and Herp1/2 for Endoplasmic Reticulum-associated Degradation” Cell Structure and
Function, 2017, 42-2, 81-94. 査読あり

2017年度 日本細胞生物学会論文賞 (CSF Award) を受賞しました。

[学会発表] (計 4 件)

① Tokiro Ishikawa, Satoshi Ansai, Masato Kinoshita and Kazutoshi Mori

“A Collection of Transgenic Medaka Strains for Efficient Site-Directed Transgenesis
Mediated by phiC31 Integrase”

第 24 回小型魚類研究会

2018年8月25日 名古屋大学(愛知県)

② Tokiro Ishikawa, Makoto Kashima, Atsushi J. Nagano, Tomoko Ishikawa-Fujiwara,
Yasuhiro Kamei, Takeshi Todo, and Kazutoshi Mori

"Unfolded protein response transducer IRE1-mediated signaling independent of XBP1
mRNA splicing is not required for growth and development of medaka fish"

International Symposium on ER stress, glycosylation, homeostasis and diseases (国際学会)

2018年3月8日 理化学研究所(埼玉県)

③ Tokiro Ishikawa, Tetsuya Okada, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Satoshi Ansai, Yasuhiro
Kamei, Masato Kinoshita, Takeshi Todo, Kazutoshi Mori

"メダカ発生過程における小胞体ストレス応答生理的機能の解析"

2017年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)

2017年12月8日 神戸ポートアイランド(兵庫県)

④ Tokiro Ishikawa, Takuya Toyama, Yuki Nakamura, Kentaro Tamada, Hitomi Shimizu,
Satoshi Ninagawa, Tetsuya Okada, Yasuhiro Kamei, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Takeshi
Todo, Eriko Aoyama, Masaharu Takigawa, Akihiro Harada and Kazutoshi Mori]

"UPR Transducer BBF2H7 Allows Export of Type II Collagen in a Cargo- and
Developmental Stage-Specific Manner"

第 23 回 小型魚類研究会

2017年8月30日 山梨県立図書館 (山梨県)

[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
<https://orcid.org/0000-0003-1718-6764>

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。