

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2009
課題番号：19570201
研究課題名 (和文) ゼブラフィッシュ幼生の淡水適応を担う表層イオン代謝細胞の細胞分化機構の解明
研究課題名 (英文) Developmental mechanism of ionocytes in the skin of zebfaish larvae to acclimate fresh water
研究代表者
星島 一幸 (HOSHIJIMA KAZUYUKI)
東京工業大学・バイオフィロンティアセンター・バイオフィロンティア研究教員
研究者番号：70397032

研究成果の概要 (和文)：

淡水魚の体表に発達する表層イオン代謝細胞は、淡水中より様々なイオンを取り込み、体内のイオン濃度を一定に保つために必要不可欠な細胞群と考えられてきた。我々はこれまでに *foxi3a* 遺伝子が表層イオン代謝細胞の発生分化に必須であることを明らかにしてきたが、本研究ではさらに *foxi1* 遺伝子、*deltaC* 遺伝子、および *gcm2* 遺伝子とその細胞分化形成に関わっていることを示し、それら遺伝子間相互作用、作用機序を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Ionocytes that are developed in the skin of the freshwater fish have been presumed to be the primary sites for ion uptake from the environment and to be essential for ion-homeostasis of the body fluid. We have already revealed that *foxi3a* is a key gene to control the ionocytes development in zebrafish larvae. In this study, we further found that *foxi1*, *deltaC*, and *gcm2* are involved in the developmental process and demonstrated the genetic interaction and the function.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2008年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2009年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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：環境，発現制御，発生・分化，イオンホメオスタシス

1. 研究開始当初の背景

淡水魚が接する淡水中のイオン濃度は体内イオン濃度と比べて極端に低く、その濃度勾配に従って様々なイオンが体外へ流出する傾向にある。淡水魚が淡水環境中において高い体内イオン濃度を維持するためには流出したイオンの相当分を淡水環境中から積極的に吸収する必要がある。体表、特にエラに点在して形成される表層イオン代謝細胞は淡水中からの能動的なイオン吸収を担うことが古くから指摘されてきたが、遺伝子レベルでの作用機序、細胞分化機構は全く解明されてこなかった。しかしながら、我々のこれまでの研究から、表層イオン細胞の発生分化が初期発生の囊胚後期（ゼブラフィッシュ胚では受精後9時間）までさかのぼることが明らかとなった。脊椎動物では予定表皮領域が囊胚期にすでに異なった複数の細胞運命を持つ細胞集団に分かれていることは報告されておらず、表層イオン代謝細胞の細胞分化機構の解明は脊椎動物の初期発生の常識に挑戦する問題でもある。また表層イオン代謝細胞の特徴的な細胞構造は、細胞の機能分化という観点からも非常に興味深く、その機能発現の解明が細胞生物学に与える意義は大きい。特筆すべきことは表層イオン代謝細胞と同様の形態を持つ細胞がヒト腎臓の集合管にも存在し、イオン代謝機能を担っている点である。本研究が焦点をあてる表層イオン代謝細胞は体外に露出した細胞であり、体内の深部にある腎臓のイオン代謝細胞の *in vivo* 解析系としての応用が期待できる。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュ幼生のエラ発生以前に体表に形成される表層イオン代謝細胞を

モデル系として、その細胞発生と機能分化のメカニズムを明らかにすることを目的とする。これまでの研究から *foxi3a* 遺伝子が表層イオン代謝細胞の発生を制御するマスター転写調節因子であることが明らかであり、*foxi3a* 遺伝子の発現調節を指標に遺伝子レベルでの解析を進める。また表層イオン代謝細胞は少なくとも vH-タイプと NaK-タイプの2種類のサブタイプがあることから、これらのサブタイプの分化機構についても解析を進める。

3. 研究の方法

(1) 表層イオン代謝細胞の発生分化に関与する候補遺伝子の検索

foxi3a 遺伝子は表層イオン代謝細胞の発生分化に必須であり、*foxi3a* 遺伝子の発現を抑制したゼブラフィッシュ幼生では表層イオン代謝細胞が形成されない。*foxi3a* 遺伝子は囊胚後期（受精後9時間）に予定表皮領域に点在して現れることから、この時期においてすでに表層イオン代謝細胞への細胞分化が始まっていると言える。本研究では、まず初めにゼブラフィッシュデータベース、ZFIN を検索し、囊胚後期前後に *foxi3a* 遺伝子と同じく予定表皮領域に発現する遺伝子として、*foxi1* 遺伝子、*deltaC* 遺伝子、および *gcm2* 遺伝子を同定した。

(2) 候補遺伝子の解析

上に挙げた候補遺伝子についての発現プロファイルを確認した後、アンチセンスモルフォリノ (MO) を用いた発現抑制、逆に mRNA をゼブラフィッシュ胚に顕微注射した過剰発現、さらに利用可能な突然変異体を用い、これらの遺伝子が *foxi3a* 遺伝子の発現調節に与える影響を調べる。また表層イオン代謝細胞のサブタイプに特異的な抗体を用い、こ

これらの細胞分化に与える影響を調べる。

4. 研究成果

(1) *foxi1* 遺伝子

foxi1 遺伝子は *foxi3a* 遺伝子と同じ Fox 転写調節因子ファミリーの1つであり、囊胚初期（受精後6時間）から予定表皮領域全体に発現する。その発現は一過的であり、体節期（受精後12時間）には消失する。しかしながら、この *foxi1* 遺伝子の発現は *foxi3a* 遺伝子よりも早いことから、*foxi3a* 遺伝子の発現を制御していることが考えられる。実際に Foxi1-MO を顕微注入して *foxi1* 遺伝子の発現を抑制すると、*foxi3a* 遺伝子の発現が抑えられた。同様の結果は *foxi1* 遺伝子の null 突然変異体である *quadro (quo)* でも得られた。*quo* 変異体では *foxi3a* 遺伝子の発現は抑えられていた。一方、*foxi1* mRNA を顕微注入し、*foxi1* 遺伝子をゼブラフィッシュ胚に過剰発現させると、*foxi3a* 遺伝子の過剰発現が見られた。これらの結果は *foxi1* 遺伝子が *foxi3a* 遺伝子の発現に必要な不可欠な機能を担うことを意味している。

foxi1 遺伝子の発現を抑制したゼブラフィッシュ胚での表層イオン代謝細胞の形成を調べると、vH-タイプの表層イオン代謝細胞の形成のみが阻害され、NaK-タイプはほぼ正常に形成された。また *foxi1* 遺伝子の過剰発現させた胚では vH-タイプは過剰形成されるが、NaK-タイプの表層イオン代謝細胞の形成には影響がなかった。これらの結果は *foxi1* 遺伝子が vH-タイプの表層イオン代謝細胞の形成に必須であるが、NaK-タイプには不要であることを意味している。

この結果は *foxi3a* 遺伝子の発現調節の結果に矛盾する。Foxi3a-MO を用いて *foxi3a* 遺伝子の発現を抑制したゼブラフィ

ッシュ胚では vH-タイプと NaK-タイプの両方の表層イオン代謝細胞が形成されないからである。*foxi1* 遺伝子が *foxi3a* 遺伝子の発現に必須であるにもかかわらず、NaK-タイプの表層イオン代謝細胞の形成に影響を与えない理由は現在不明であり、今後の課題である。*foxi1* 遺伝子に影響を受けず *foxi3a* 遺伝子が一過的に発現している可能性、あるいは検出限界以下の *foxi3a* 遺伝子の発現レベルでも NaK-タイプの表層イオン代謝細胞が形成される可能性等が考えられる。

(2) Delta-Notch シグナル伝達経路

foxi1 遺伝子は予定表皮領域全体に発現するのに対し、これに続く *foxi3a* 遺伝子の発現は点在している。*foxi1* 遺伝子が *foxi3a* 遺伝子の発現を誘導できることを考えれば、予定表皮領域全体が表層イオン代謝細胞へ分化する潜在能力を持っているはずであるが、実際には *foxi3a* 遺伝子の発現に見られるように表層イオン代謝細胞への分化は限定されたものとなっている。このような細胞分化能力の限局化のメカニズムとしては Delta-Notch シグナル伝達経路による側方阻害が第一に考えられる。実際 *delta* 遺伝子ファミリーの発現を注意深く調べると、その1つである *deltaC* 遺伝子の発現が囊胚期に予定表皮領域に点在して発現していた。*deltaC* 遺伝子の発現開始時期は *foxi3a* 遺伝子より早く、Delta-Notch 系が *foxi3a* 遺伝子の発現の局在性に関与していることが考えられる。

mind bomb (mib) 突然変異体は Delta リガンドのシグナルが Notch 受容体発現細胞に伝達されない変異体である。*mib* 変異体における *foxi3a* 遺伝子の発現を調べたところ、その発現は過剰に誘導され、もはや個々の細胞に点在した発現とはならな

かった。このことは *foxi3a* 遺伝子の発現、すなわち表層イオン代謝細胞の分化は Delta-Notch シグナル伝達経路によって局化されていることを示している。

(3) *gcm2* 遺伝子

gcm2 遺伝子は転写調節因子であり、囊胚期後の体節期（受精後 1 1 時間）より体表に点在して発現する。この発現開始時期は *foxi3a* 遺伝子より遅く、*gcm2* 遺伝子の発現は *foxi3a* 遺伝子の制御を受けていることが考えられる。実際に Foxi3a-MO を顕微注入し、*foxi3a* 遺伝子の発現を抑制したゼブラフィッシュ胚では *gcm2* 遺伝子の発現が阻害された。一方、Gcm2-MO を用いて *gcm2* 遺伝子の発現を抑制すると、vH-タイプの表層イオン代謝細胞の形成は阻害されたが、NaK-タイプの表層イオン代謝細胞の形成には影響が見られなかった。*gcm2* 遺伝子は *foxi3a* 遺伝子の制御下にあり、vH-タイプの表層イオン代謝細胞の形成に必須の役割を担うと考えられる。さらに興味深いことに、*gcm2* 遺伝子の発現を抑えると、*foxi3a* 遺伝子の体節期以降での発現が阻害された。*gcm2* 遺伝子は *foxi3a* 遺伝子の発現開始には影響を与えないが、その発現維持に必要であり、*foxi3a* 遺伝子の発現維持を通して vH-タイプの表層イオン代謝細胞への分化を促していることが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

① Saito, K., Nakamura, N., Ito, Y., Hoshijima, K., Esaki, M., Zhao, B., and Hirose, S., Identification of zebrafish FXYP protein that is highly expressed in ion-transporting epithelium of the gill and skin and its possible role in ion homeostasis., *Frontiers in Aquatic Physiology*, (2010) *in press*, 査読有り

② Gribble, S. L., Nikolaus, O. B., Carver, M. S., Hoshijima, K., and Dorsky, R. I. Chromosomal position mediates spinal cord expression of a *dbx1a* enhancer. *Developmental Dynamics* 238, 2929-2935 (2009), 査読有り

③ Esaki, M., Hoshijima, K., Nakamura, N., Munakata, K., Tanaka, M., Ookata, K., Asakawa, K., Kawakami, K., Wang, W., Weinberg, E. S., and Hirose, S., Mechanism of development of ionocytes rich in vacuolar-type H⁺-ATPase in the skin of zebrafish larvae., *Developmental Biology*, 320, 116-120 (2009), 査読有り

④ Sultana, N., Nag, K., Hoshijima, K., Kawakami, A., Laird, D. W., and Hirose, S., Zebrafish early cardiac connexin, 36.7/Ecx regulates heart morphogenesis by establishing *nkx2.5* expression., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105, 623-631 (2008), 査読有り

⑤ Nakada, T., Hoshijima, K., Esaki, M., Nagayoshi, S., Kawakami, K., and Hirose, S., Localization of ammonia transporter Rhcg1 in mitochondrion-rich cells of yolk sac, gill, and kidney of zebrafish and its ionic strength-dependent expression., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 293, R1743-R1753 (2007), 査読有り

⑥ Hoshijima, K. and Hirose, S., Expression of endocrine genes in zebrafish larvae in response to environmental salinity., *Journal of Endocrinology*, 193, 481-491 (2007), 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

① Hoshijima, K., Dahlem, T., Grunwald, D., ZFN construction using OPEN Pool in B1H system, Zebrafish Phenome Project Workshop, 2010年3月13日, Bethesda, Maryland, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星島 一幸 (HOSHIJIMA KAZUYUKI)

東京工業大学・バイオフィロンティアセンター・バイオフィロンティア研究教員

研究者番号：70397032

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし