

平成21年4月27日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570204
 研究課題名（和文） 内胚葉・内胚葉性器官形成に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の原因遺伝子の解析
 研究課題名（英文） Identification and functional analysis of genes that affect the formation of endoderm and endodermal organs
 研究代表者
 菊池 裕 (KIKUCHI YUTAKA)
 広島大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号：20286438

研究成果の概要：

本研究では、内胚葉性器官、特に消化器官形成の異常が顕著な新規変異体 *morendo* (*mor*) と *legato* (*leg*) 変異体の解析を中心に研究を進め、*mor* 変異体の原因遺伝子の同定に成功した。現在 *Mor* タンパク質の機能に関して研究を進めている段階である。また、*leg* 変異体に関しては、原因遺伝子が含まれるゲノム領域の絞り込みに成功した。今後の解析により、原因遺伝子を同定することが出来ると考えている。

更に私は、内胚葉細胞が特異的に蛍光を発するトランスジェニックゼブラフィッシュ *Tg(sox17:EGFP)* を用いることにより、原腸陥入期における内胚葉細胞の運動がケモカインシグナル (*SDF1/Cxcr4* シグナル) により制御されていることを明らかにし、論文発表 (Mizoguchi et al., 2008) を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ゼブラフィッシュ・内胚葉性器官・器官形成・変異体・原因遺伝子

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の初期発生過程において、多分化能を持つ胚性幹細胞は、原腸陥入の開始に伴い三つの胚葉（内胚葉・中胚葉・外胚葉）に分化することが知られている。このような胚性幹細胞から三胚葉への分化及びその後起こる器官形成過程は、発生現象の解明を目的

とした基礎研究のみならず、再生医療を目指した応用研究にも極めて重要である。以上のような考えを基に、外胚葉性器官（神経系など）や中胚葉性器官（筋肉・心臓・腎臓・骨など）の形成機構は、非常に数多くの研究が為されてきた。しかし内胚葉性器官（肺・胃・小腸・大腸・肝臓・膵臓など）は生存・生命

維持に必要不可欠な器官であるにも関わらず、現在まで解析が非常に遅れていた。その理由としては、体の内部の器官であることから、マーカーとなる遺伝子や突然変異体を用いた解析が進まず、分子生物学的知見が大きく欠如していたことが原因と考えられる。

2. 研究の目的

脊椎動物の初期発生過程において、多分化能を持つ胚性幹細胞は、原腸陥入の開始に伴い三つの胚葉（内胚葉・中胚葉・外胚葉）に分化することが知られている。このような胚性幹細胞から三胚葉への分化及びその後起こる器官形成過程は、発生現象の解明を目的とした基礎研究に極めて重要である。三胚葉の中でも内胚葉細胞由来の内胚葉性器官（肺・胃・小腸・大腸・肝臓・膵臓など）は生存・生命維持に必要不可欠な器官であるにも関わらず、現在まで解析が非常に遅れていた。私は、内胚葉及び内胚葉性器官形成に至る過程を遺伝学的手法により解明することを目的に、2004年より新規変異体のスクリーニングを開始した。変異体スクリーニングの結果、内胚葉及び内胚葉性器官形成が異常になる4種の新規変異体;*quintet (qnt)*, *leg, decrescendo (dec)*, *lullaby (11b)*の単離に成功した。**本研究課題では、4種突然変異体の原因遺伝子のクローニング及び遺伝子産物の機能解明を行うことを研究目的としている。本研究結果より、内胚葉形成・腸管上皮形成・うきぶくろや膵臓の形成機構に関する理解を大いに促進させることが出来ると考えている。**

3. 研究の方法

<原因遺伝子のポジショナルクローニングによる同定>

変異体として単離された *qnt*, *leg*, *dec*, *11b* と最近新たに単離同定された *mor* に関して、原因遺伝子のポジショナルクローニングを行う。原因遺伝子が明らかになった段階で、変異胚への原因遺伝子の過剰発現によるレスキュー実験やアンチセンスオリゴ（モルフオリノオリゴ）によるノックダウン実験を行い、クローニングした遺伝子の変異を引き起こしていることを多方面から検証する。

<原因遺伝子産物の機能解析>

変異体の原因遺伝子産物が、既に報告され

ているシグナル経路との関係が予想される場合には、シグナル経路に関連する変異胚への原因遺伝子の過剰発現実験や2重変異体の作製等を行い、シグナル伝達経路における原因遺伝子の遺伝学的位置を明らかにする。また、特定の蛋白質やDNAの塩基配列との相互作用が考えられる場合には、蛋白質間の結合やDNAとの結合等の生化学的実験を行う。更に、原因遺伝子産物に特徴的なドメインが見られない場合には、遺伝子の塩基配列を部分的に欠損させた変異型mRNAを変異胚に注入し、変異体の表現型をレスキューできるかを確認する。この結果より、原因遺伝子産物において重要な機能を有する部位を明らかにすることができる。

4. 研究成果

<*mor* 及び *leg* 変異体の解析>

本研究では、内胚葉性器官、特に消化器官形成の異常が顕著な新規変異体 *mor* と *leg* 変異体の解析を中心に研究を行った。*mor*, *leg* 変異胚 (AB 系統) の原因遺伝子をクローニングするため、AB 系統に対して多型を示す India 系統と交配させた map cross を作製した。この map cross から得られたゲノム DNA を用い、マイクロサテライトマーカーによるマッピングを行った結果、***mor* 変異体の原因遺伝子の同定に成功した。現在 Mor タンパク質の機能に関して研究を進めている段階であるが、新規機能が予測されていることから、論文発表を行えばインパクトのある研究成果になると考えている。** また、*leg* 変異体に関しては、原因遺伝子が含まれるゲノム領域の絞り込みに成功した。今後解析を進めることにより、原因遺伝子を同定することが出来ると考えている。

<原腸陥入期における内胚葉細胞運動の制御機構の解析>

更に私は、内胚葉細胞が特異的に蛍光を発するトランスジェニックゼブラフィッシュ *Tg(sox17:EGFP)* を用いることにより、原腸陥入期における内胚葉細胞運動の制御機構に関して解析を行った。

最初に私達は、*cxcr4a* は内胚葉細胞特異的に発現しているが、リガンドである *sdf1a*, *sdf1b* は中胚葉細胞に発現していることを示した。Sdf1/Cxcr4 シグナルは細胞の移動を制御していることが知られているため、

Sdf1/Cxcr4 シグナルが内胚葉細胞の移動に関与する可能性に関して解析を行った。アンチセンスモルフォリノオリゴを用いて Sdf1/Cxcr4 シグナルの阻害実験を行った結果、Sdf1/Cxcr4 シグナル阻害胚では3体節期において著しい内胚葉細胞の移動の阻害が観察された。また受精後24時間のコントロール胚では一本の消化管を形成するが、Sdf1/Cxcr4 シグナル阻害胚では二股に分かれた消化管が観察された。以上のことから Sdf1/Cxcr4 シグナルが内胚葉細胞の移動制御に関与することが示された。Sdf1は遊走惹起物質(ケモアトラクタント)として機能し、*cxcr4*を発現する細胞を誘引することが知られている。そこでゼブラフィッシュの内胚葉細胞の移動にも Sdf1a, Sdf1b がケモアトラクタントとして機能しているかに関して解析を行った。Sdf1a と Sdf1b の両方の機能を阻害した *Tg(sox17:EGFP)*胚に、*sdf1a* mRNA もしくは *sdf1b* mRNA の過剰発現細胞を移植することにより、内胚葉細胞は移植細胞に誘引されることを示した。この結果よりゼブラフィッシュの内胚葉細胞の移動においても Sdf1a, Sdf1b がケモアトラクタントとして機能していることが明らかにされた。さらに *Tg(sox17:EGFP)*胚を用いて1細胞レベルで観察を行うと、Sdf1/Cxcr4 シグナル阻害胚では内胚葉細胞における糸状仮足形成の低下が観察された。

以上の結果から私達はゼブラフィッシュの内胚葉細胞の移動において次のようなモデルを考えている。中胚葉細胞ではリガンドである *sdf1a*, *sdf1b* が発現している。内胚葉細胞ではレセプターである *cxcr4a* が発現している。収斂伸長運動によりリガンドソースである中胚葉細胞は背側へ移動する。Sdf1a, Sdf1b がケモアトラクタントとして作用し、内胚葉細胞は移動する中胚葉細胞に引きつけられるように移動する。結果として内胚葉細胞は背側へ移動する。

本研究成果により、現在まで不明であった内胚葉細胞移動の制御にケモカインシグナル(Sdf1/Cxcr4シグナル)が関与することを明らかにすることに成功した。以上の研究成果を *Development* に発表した(Mizoguchi et al., 2008)。

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10件)

- Mizoguchi, T., Verkade, H., Heath, J., Kuroiwa, A. and **Kikuchi, Y.** (2008). Sdf1/Cxcr4 signaling controls the dorsal migration of endodermal cells during zebrafish gastrulation. *Development*, **135**: 2521-2529. (査読有り)
- Iizuka, M., Tomita, M., Shimizu, K., **Kikuchi, Y.** and Yoshizato, K. (2008). Translational enhancement of recombinant protein synthesis in transgenic silkworms by a 5'-untranslated region of polyhedrin gene of *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **105**: 595-603. (査読有り)
- Motoi, N., Suzuki, K., Hirota, R., Johnson, P., Oofusa, K., **Kikuchi, Y.** and Yoshizato, K. (2008). Identification and characterization of nucleoplasmin 3 as a histone-binding protein in embryonic stem cells. *Development Growth & Differentiation*, **50**: 307-320. (査読有り)
- Nomiyama, H., Hieshima, K., Osada, N., Kato-Unoki, Y., Otsuka-Ono, K., Takegawa, S., Izawa, T., Yoshizawa, A., **Kikuchi, Y.**, Tanase, S., Miura, R., Kusuda, J., Nakao, M., and Yoshie, O. (2008). Extensive expansion and diversification of the chemokine gene family in zebrafish: identification of a novel chemokine subfamily CX. *BMC Genomics*, **9**: 222. (査読有り)
- Wilkins, S., Yoong, S., Verkade, H., Mizoguchi, T., Plowman, S., Hancock, J., **Kikuchi, Y.**, Heath, J. and Perkins, A.

(2008). Mtx2 directs zebrafish morphogenetic movements during epiboly by regulating microfilament formation. *Developmental Biology*, **314**: 12-22. (査読有り)

6. 溝口貴正, 菊池 裕

「内胚葉分化にかかわるシグナル、転写因子群の機能」

内分泌・糖尿病科 (2008) **26**: 106-114 (査読無し)

7. 溝口貴正, 菊池 裕

「Sdf1/Cxcr4 シグナルはゼブラフィッシュの原腸陥入期において内胚葉細胞の背側への移動を制御する」

細胞工学 (2008) **27**: 1160-1161 (査読無し)

8. Nikaido, M., Doi, K., Shimizu, T., Hibi, M., Kikuchi, Y. and Yamasu, K.

(2007). Initial specification of the epibranchial placode in zebrafish embryos depends on the fibroblast growth factor signal.

Developmental Dynamics, **236**: 564 -571.

(査読有り)

9. 菊池 裕

特集 “内胚葉分化の分子メカニズム”

(編集; 菊池 裕)

「序論 -器官形成から再生を目指して-」

蛋白質核酸酵素 (2007) **52**: 101-104 (査読無し)

10. 溝口貴正, 菊池 裕

「脊椎動物における内胚葉形成の分子機構」 **蛋白質核酸酵素** (2007) **52**: 105-111

(査読無し)

[学会発表] (計1件)

1. 溝口貴正, 黒岩 厚, 菊池 裕

「ゼブラフィッシュ原腸陥入期における内胚葉細胞の移動機構」

第30回日本分子生物学会 ワークショップ招待講演 (神奈川県横浜市)

2007年12月14日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 裕 (KIKUCHI YUTAKA)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 20286438

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者