

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

●武田 洋幸¹⁾ ◆工藤 明²⁾

1) 東京大学大学院理学系研究科 2) 東京工業大学大学院生命理工学研究科

＜研究の目的と進め方＞

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により、脊椎動物の発生・再生システムの全体像を理解することを目指す。具体的には、有用な変異体の大規模なマッピングと原因遺伝子のクローニング、変異体における発現プロフィールの解析を中心に研究をすすめる。特に一遺伝子の変異でシステム全体（発現プロフィール）がどのように変化するかにも注目する。メダカのゲノム情報の基盤（ゲノム配列、EST、BACライブラリーなど）は、日本国内でほとんど整備され、また突然変異体もその多くが日本人研究者の手によって単離されている。これらを有効に使うことにより、国際的な情報発信とこの分野をリードする研究拠点を作る。

＜2007年度の研究の当初計画＞

武田研究室：①左右軸関連の変異体、5系統について順次原因遺伝子の同定を行っている。3系統は既に原因遺伝子が判明しており、その遺伝子の機能解析を実施する。②内臓器官、とくに肝臓と甲状腺の後期発生に注目して、得られている変異体の解析を進める。③体節形成における時計機構のメカニズムをゼブラフィッシュとメダカを用いて解析する。

工藤研究室：①メダカ骨格発生機構の解明：すでに原因遺伝子がわかっている7種類の変異体について、その分子メカニズムの解明を目指すとともに、骨形成特異的のトランスジェニックメダカを用いて骨発生システムについて明らかにし、論文にして発表する。②メダカ心臓・血球・ヒレ突然変異体の原因遺伝子の解明；5種類の変異体について、ポジショナルクローニングを行う。③ヒレ再生ESTクローンをを用いた、ヒレ再生システムの解明；再生芽によるヒレ再生機構について、ESTクローンの特徴を駆使して解明する。

＜2007年度の成果＞

武田研究室：①これまでにクローニングに成功したメダカ左右軸異常変異体 *knt* (*ut016*)の原因遺伝子の機能解析を行った。*Knt*は繊毛、鞭毛のダイニンアーム形成に必須な新規タンパク質であることが判明した。また、フライブルグ大学の研究者と共同で、繊毛病 (*primary ciliary dyskinesia*) の約100家系のゲノムDNAをスクリーニングしたところ、2家系においてヒトKTU遺伝子に変異を見いだした。Western blotの解析により、この患者ではKTUタンパク質の発現は認められなかった。つまり、メダカ変異体の

解析より、ヒト遺伝病の新規原因遺伝子を見つけることができた。②肝臓の後期発生に異常を示すメダカ変異体 *aA7*の原因遺伝子を同定することに成功した。*aA7*は鉄代謝に必須なABCトランスポーターである *abcb7*をコードしていた。この変異体の肝臓は、いわゆる脂肪肝の表現型を示している。マイクロアレイによる解析により、*aA7*ホモ変異体と正常胚（孵化1-2日目）の肝臓で、鉄代謝に関係する多くの遺伝子の発現に差があることが判明した。実際 *abcb7*はヒトの貧血性の遺伝病の原因遺伝子として報告があった。しかし、貧血と脂肪肝という現象は直接結びつかず、現在さらなる解析を進めている。③シミュレーションと移植実験の相互検証により、分節時計の出現機構を探った。本年度はその基礎データとして時間的・空間的に高解像度なmRNA検出手法を用いて、協調的振動の出現過程の詳細な記載を行った。その結果、初期の分節時計は2つ段階を経て成熟した振動モードを確立することが判明した。一つはごく狭い領域の細胞集団が示す数サイクルの同調振動である。もう一つは移動波の出現で、これは波状の振動パターンがマージン領域を起点に生じ、将来の分節領域内を進行する。同調振動と移動波は、成熟した分節時計では連続した振動パターンであるが、振動開始時には時間的ギャップを伴って形成される。すなわち移動波は、マージンで数サイクル同調振動が起こった後に、突然出現するのである。

工藤研究室：①メダカ骨格発生機構の解明：メダカ *twist-EGFP*, *osteocalcin-EGFP* の2つの骨芽細胞特異的のトランスジェニックラインを樹立し、メダカ椎骨形成を解析した。その結果硬節にある骨芽細胞プロジェクターは脊索周囲に移動し、椎間板領域に局限する。局限した椎間板の細胞は椎体に移動し、骨芽細胞に分化し、石灰化する。このようにして、椎骨は長軸方向に伸び続ける。この結果から、我々は小型硬骨魚類の脊椎骨形成を細胞レベルで初めて明らかにした。②メダカ変異体の解析では、脊椎骨が石灰化しない変異体の原因遺伝子が、小胞体—ゴルジ間の蛋白輸送に関わる *COPII* 被覆小胞の構成因子の1つある *sec24d*であった。*sec24d*が活性を示さないことにより、タイプIIコラーゲンの分泌異常が見られ、その結果椎骨が形成されないことが明らかになった。もう1つの頭蓋骨と尾鰭の過形成が見られる変異体では、原因遺伝子がクロマチン形成因子で、ヒストンのアセチル化に関与している *brpf1*であった。この遺伝子が機能しないことにより、*hox family* 遺伝子の転写が異常になり、その結果、骨形態異常がもたされた。③ヒレ再生のアレイ解析により、軟骨、傷上皮、再生芽に特異的な新たな遺伝子群が明らかになった。また *PI3K*の阻害剤を投与することにより、ヒレ再生の阻害。特に再生芽形成の阻害が観察され、*PI3K*のヒレ再生における関与が明らかになった。

<国内外での成果の位置づけ>

我々は、メダカマイクロアレイ、EST情報、そしてゲノム解読をおこない、国内外にその情報を発信している。また、変異体解析の成果を順次公表予定で、メダカ変異体解析において中心的な役割を担っている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

同定された遺伝子の機能解析に集中したため、一部変異体の原因遺伝子の同定が遅れている。

<今後の課題>

昨年度以来取り組んできた、BACを用いたトランスジェニック技術が当研究室で漸く確立した。この手法を用いて、変異体の原因遺伝子の確定やその制御領域の絞り込みを迅速に進めることが可能になった。

<成果公表リスト>

1) 論文／プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 0708091425 [論文] Hojo, M., Takashima, S., Kobayashi, D., Sumeragi, A., Shimada, A., Tsukahara, T., Yokoi, H., Narita, T., Jindo, T., Kage, T., Kitagawa, T., Kimura, T., Sekimizu, K., Miyake, A., Setiamarga, D., Murakami, R., Tsuda, S., Ooki, S., Kakihara, K., Naruse, K. and Takeda, H. Right-elevated expression of charon is regulated by fluid flow in medaka Kupffer's vesicle. *Dev Growth Differ* 49, 395-405 (2007).
2. 0708091442 [論文] Ishimatsu, K., Horikawa, K. and Takeda, H. Coupling cellular oscillators: a mechanism that maintains synchrony against developmental noise in the segmentation clock. (review) *Dev Dyn* 236, 1416-21 (2007).
3. 0708091431 [論文] Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Shimizu, N., Hashimoto, S., Yang, J., Lee, Y., Matsushima, K., Sugano, S., Sakaizumi, M., Narita, T., Ohishi, K., Haga, S., Ohta, F., Nomoto, H., Nogata, K., Morishita, T., Endo, T., Shin, I. T., Takeda, H.*, Morishita, S.* and Kohara, Y.* (* equal correspondence). The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 447, 714-9 (2007).
4. 0801202043 [論文] Sekimizu, K., Tagawa, M. and Takeda, H. Defective Fin Regeneration in Medaka Fish (*Oryzias latipes*) with Hypothyroidism. *Zoolog Sci* 24, 693-9 (2007).
5. 0708091314 [論文] Takashima, S., Shimada, A., Kobayashi, D., Yokoi, H., Narita, T., Jindo, T., Kage, T., Kitagawa, T., Kimura, T., Sekimizu, K., Miyake, A., Setiamarga, D. H., Murakami, R., Tsuda, S., Ooki, S., Kakihara, K., Hojo, M., Naruse, K., Mitani, H., Shima, A., Ishikawa, Y., Araki, K., Saga, Y. and Takeda, H. Phenotypic analysis of a novel chordin mutant in medaka. *Dev Dyn* 236, 2298-310 (2007).
6. 0705071509 [論文] Yokoi, H., Shimada, A., Carl, M., Takashima, S., Kobayashi, D., Narita, T., Jindo, T., Kimura, T., Kitagawa, T., Kage, T., Sawada, A., Naruse, K., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Shima, A., Tsutsumi, M., Hori, H.,

Wittbrodt, J., Saga, Y., Ishikawa, Y., Araki, K. and Takeda, H. Mutant analyses reveal different functions of fgfr1 in medaka and zebrafish despite conserved ligand-receptor relationships. *Dev Biol* 304, 326-37 (2007).

7. 0704251933 (論文) : Nakatani, Y., Kawakami, A. and Kudo, A. Cellular and molecular processes of regeneration, with special emphasis on fish fins. (review) *Dev. Growth Differ.* 49:145-154 (2007)
8. 0702081916 (論文) : Nemoto, Y., Higuchi, K., Baba, O., Kudo, A.+, and Takano, Y.+ (+:equal correspondence). Multinucleate osteoclasts in medaka as evidence of active bone remodeling. *Bone* 40: 399-408 (2007).
9. 0801172036 [論文] 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.* 236:3031-3046 (2007)
10. 0801172045 [論文] Nishidate, M., Nakatani, Y., Kudo, A.+, and Kawakami A+. (+:equal correspondence) Identification of novel markers expressed during fin regeneration by microarray analysis in madaka fin. *Dev. Dyn.* 236: 2685-2693 (2007)
11. 0801172056 [論文] Nemoto, Y., Chatani, M., Inohaya, K., Hiraki, Y. and Kudo, A. Expression of marker genes during otolith development in medaka. *Gene Exp. Patterns* 8: 92-95 (2008)
12. 0801172109 [論文] Nakatani, Y., Nishidate, M., Fujita, M., Kawakami, A. and Kudo, A. Migration of mesenchymal cell fated to blastema is necessary for fish fin regeneration. *Dev. Growth Differ.* 2007 Nov. 26 on-line pub.
13. 0801202055 [論文] Shimada, A., Yabusaki, M., Niwa, H., Yokoi, H., Hatta, K., Kobayashi, D. and Takeda, H. Maternal-zygotic medaka mutants for fgfr1 reveal its essential role in the migration of the axial mesoderm but not the lateral mesoderm. *Development* 135, 281-90 (2008).