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・再生システムの遺伝子ネットワークの理解を目指す。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。

＜ 2008 年度の研究の当初計画＞

武田研究室：①左右軸関連のメダカ変異体 5 系統のうち 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。また、残りの 2 系統についても遺伝子の同定を目指して、マッピングを進める。②神経組織および内臓器官（とくに肝臓、内耳、体節）の発生に注目して、得られているメダカ変異体の原因遺伝子のクローニングと同定された遺伝子の機能解析を行う。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原因遺伝子が判明した骨格変異体 6 系統において、原因遺伝子の機能解析を進める。②ポジショナルクローニングにより、ヒレ形成、骨格形成、血球、それぞれの変異体 4 種類について原因遺伝子を同定する。

＜ 2008 年度の成果＞

武田研究室：①今年度は特に左右軸変異体 ktu の解析が進み、その成果を論文発表した（Omran et al., 2008）。ktu 変異体は繊毛の運動性が喪失するもので、研究の過程でヒト遺伝病である繊毛病の新しい原因遺伝子が判明した。ktu がコードするタンパク質はダイニン複合体の細胞質内での形成に必須なもので、生物界に広く存在する運動性細胞小器官、繊毛・鞭毛の複雑な形成過程の一端が明らかになった。イオンチャンネルと関連した膜タンパク質および cytoplasmic dynein2 が原因であった 2 つの変異体の機能解析も現在進めている。一方原因遺伝子が決まっていない 2 系統に関しては、表現型が安定せず組み換えによる原因領域の絞り込みに苦労している。②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., 2008）。基底膜の主要構成タンパク質であるラミニン（γ 1 鎖）が変異しているメダカ変異体 tab は、神経管内の神経前駆細胞の核移動に異常を示す。詳しい解析の結果、ラミニンが integrin/FAK 経路介してダイニンの活性調節に関与していることが判明し、細胞外のシグナルがダイニン／微小管系を通して核移動を制御しているあたらたな知見を得た（論文準備中）。内耳の膨張と耳石喪失が起こる変異体 ha の原因遺伝子をポジショナルクローニングでほぼ特定した。また分節の境界形成が異常となる変異体 NIG127 の原因遺伝子も同様に特定した。それぞれ、機能が十分解析されていない酵素と細胞分裂に必須なタンパク質をコードしていた。来年度にこれら遺伝子の機能解析を行う計画である。③分節時計は細胞を振動単位（ヘアリ遺伝子の振動）とする結合振動系であるが、発生初期に後方で起こる同調的振動から頭部へ向かっての移動波が生じる。この移動波が発生する機構をゼブラフィッシュ胚で解析した。その結果、Fgf により後方から徐々に個々の細胞の振動が誘発されることおよび濃度依存的にそれぞれの振動周期が調節されること、の 2 つによって移動波が誘導・制御されていることを見いだした（論文準備中）。一方、体節の分化異常によりからだの外形（体型やヒレの形）が変化するメダカ自然突然変異体 Da の解析も進めた。Da の原因領域はすでに Zic1, 4 遺伝子が存在する領域に絞り込まれていたが、ゲノム支援班の配列決定により、この領域に 20Kb 以上の DNA 断片の挿入が存在することがわかった。Zic 遺伝子の発現が変異体の体節で特異的に低下している事実を考慮すると、DNA 断片の挿入により Zic 遺伝子の体節特異的エンハンサーの活性が落ちた可能性が高い。また、Da 変異体と野生型胚との間での体節交換移植実験により、体節の分化異常がヒレを含む Da 個体の外形の変化を説明できることも確かめた。

工藤研究室：①メダカ骨格異常変異体 3 種類の原因遺伝子はそれぞれ wnt family, クロマチンリモデリング因子 BRPF1、小胞体因子 secD であり、脊索から椎骨形成、頭蓋骨からヒレ軌条形成について分子レベルで明らかになった。BRPF1 についてはさらに同じクロマチンリモデリング因子ファミリーである Moz についてそのノックアウトマウスで調べたところ、メダカ変異体と同様の表現型が観察されるとともに、Hox 遺伝子ファミリーの転写制御に関与することが明らかになった。以上から BRPF1・Moz の機能は脊椎動物共通であることが明らかになった。②ヒレが無い変異体 (all fin less)、血球異常変異体 (beni fuji) のそれぞれの原因遺伝子が明らかになった。骨格異常、特に脊椎骨融合変異体については原因遺伝子を数個に絞り込んでいる。

＜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しており、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＞

2 つの研究室における、メダカ変異体の原因遺伝子の同定は順調に進んでいる。変異体の表現型から出発する順遺伝学の宿命として、予想されていたこととはいえ、同定された遺伝子は新規も含めて多岐にわたり、それぞれの遺伝子について詳細な機能解析に時間がかかっている。来年度中にさらにできるだけ多くの論文を発表したい。

＜今後の課題＞

マイクロアレイで変異体における遺伝子発現プロファイルの変化を探っているが、今後はより信頼性の高い、5'SAGE を Solexa/SOLiD 用に拡張した方法も試したい。特に体節組織がからだの外形（体型）を支配するという新しい知見が得られた Da 変異体の研究に、この方法を適応して、Zic 遺伝子の下流で体節分化と体節と隣接する組織（表皮やヒレ原基）の相互作用に関わる遺伝子の単離を試みたい。

＜成果公表リスト＞

論文／プロシーディング

1.901051430 (論文)
Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N. T., Hagiwara, H., Zhang, Q., Leblond, G., O'Toole, E., Hara, C., Mizuno, H., Kawano, H., Fliegauf, M., Yagi, T., Koshida, S., Miyawaki, A., Zentgraf, H., Seithe, H., Reinhardt, R., Watanabe, Y., Kamiya, R., Mitchell, D. R. and Takeda, H.: Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. Nature, 456, 611 - 616 (2008)

2.901061159 (論文)
Miyake, A., Higashijima, S., Kobayashi, D., Narita, T., Jindo, T., Setiamarga, D. H., Ohisa, S., Orihara, N., Hibiya, K., Konno, S., Sakaguchi, S., Horie, K., Imai, Y., Naruse, K., Kudo, A. and Takeda, H.: Mutation in the abcb7 gene causes abnormal iron and fatty acid metabolism in developing medaka fish. Dev Growth Differ, 50, 703-716 (2008)

3.0801202055(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).

4.0812251526(論文)
Yoshinari, N., Ishida, T., Kudo, A. and Kawakami, A. Gene expression and functional analysis f zebrafish larval fin fold regeneration. Dev Biol 2008 Oct. 10, Epub

5.0812251508(論文)
Kashima, TG., Nishiyama, T., Shimazu, K., Shimazaki, M., Kii, I., Grigoriadis, AE. Fukayama, M. and Kudo, A. Periostin, a novel marker of intramembranous ossification, is expressed in fibrous dysplasia and in c-Fos-overexpressing bone lesions. Human Pathol 2008 Sep 15 (Epub)

6.0812251456(論文)
Fukushima, N., Kikuchi, Y., Nishiyama, T., Kudo, A. and Fukayama, M. Periostin deposition in the stroma of invasive and intraductal neoplasms of the pancreas. Mod Pathol 21, 1044-1053 (2008)

7.0812221913(論文)
Kikuchi, Y., Kashima, TG., Nishiyama, T., Shimazu, K., Morishita, Y., Shimazaki, M., Kii, I., Horie, H., Nagai, H., Kudo, A. and Fukayama, M. Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon. J Histochem Cytochem 56: 753-764 (2008)

8.0805011956 (論文)
Shimazaki, M., Nakamura, K., Kii, I., Kashim a , T., Amizuka, N., Li, M., Sato, M., Fukuda, K., Nishiyama, T., Kitajima, S. et al., Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction, J. Exp. Med, 205, 295-303 (2008)

9.801172056 (論文) Nemoto, Y., Chatani, M., Inohaya, K., Hiraki, Y., and Kudo, A., Expression of marker genes during otolith development in medaka, Gene Expr. Patterns, 8, 92-95 (2008)

10.0805012010 (論文)
Shimazaki, M., and Kudo, A., Impaired capsule formation of tumors in periostin-null mice, Biochem. Biophys. Res. Commun., 367, 736-742 (2008)

11.0801172109 (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, Develop. Growth Differ. 2008 50(2):71-83

12.0806201241 (論文)
Mise, T., Iijima, M., Inohaya, K., Kudo, A. and Wada, H. Function of Pax1 and Pax9 in the sclerotome of medaka fish. Genesis 46: 185-192 (2008)