

腸管上皮形成に異常を示す新規ゼブラフィッシュ変異体の解析

Analysis of new zebrafish mutants that show the defects in gut epithelium formation

(日本発生生物学会推薦)

代表研究者 広島大学 菊池 裕 Hiroshima University Yutaka KIKUCHI

The digestive system plays an essential role in vertebrate physiology. In vertebrate, after specification of endoderm, the endodermal cells move to the most ventral layer of the embryo and form gut tube. The endodermal organs, such as liver, pancreas and lung, are induced and differentiated from the gut tube through the interaction between endodermal cells and mesenchymal cells. Although several factors have been identified for the morphogenesis of digestive organs, the molecular mechanisms underlying the differentiation and maintenance of these organs are not well understood. To analyze the molecular mechanisms, we have performed a genetic screening using zebrafish and have isolated *morendo* (*mor*) and *legato* (*leg*) mutants, which exhibit hypoplastic digestive organs. The phenotypic analyses revealed that *mor* is required for the endoderm-intestine transition. In addition, we identified a responsible gene for *mor* by genetic mapping. We are now analyzing the function of *Mor* in the formation of endodermal organs.

研究目的

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・中胚葉の形成機構及び外胚葉性器官（表皮・神経系など）・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。しかし内胚葉及び内胚葉性器官（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。私は、このような内胚葉性器官の中でも消化・吸収に重要な機能を有する腸管上皮に注目した。非常に複雑な腸管上皮形成機構の解明を目的に、私は2004年よりゼブラフィッシュを実験動物とした突然変異体のスクリーニングを行った。その結果、腸管上皮形成が異常になる2種の新規変異体（*legato*, *morendo*）を得ることに成功した。*legato* (*leg*) 変異体では腸管のヒダ状の絨毛構造が見られず腸管特異的な異常が観察された。また *morendo* (*mor*) 変異体では *leg* 変異体に見られた絨毛構

造の形成不全に加え、顎の異常・眼胞の形成不全が観察された。本研究では、2種変異体 (*leg*, *mor*) 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により、腸管上皮形成機構の解明を研究目的とする。

更に私の研究グループでは、内胚葉細胞特異的に蛍光を発するトランスジェニックフィッシュ (*sox17:EGFP*) の作製に成功している。この *sox17:EGFP* を用いて発生初期における内胚葉細胞の移動や腸管形成過程を可視化することにより、細胞移動・器官形成機構を明らかにすることを目指す。

研究経過

1. *mor* 及び *leg* 変異体の解析

本研究では、*mor* 変異体の表現型を様々なマーカー遺伝子の発現により解析した結果、*mor* 変異体では内胚葉細胞の分化及び腸管形成は正常であるが、その後の器官形成で異常が生じることが明らかになった (Fig.1)。更に *mor*, *leg* 変異体 (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。更に *mor* 遺伝子機能を明らかにするため変異体を詳細に解析した結果、変異体の腸管上皮では成熟型マイクロ RNA (miRNA) 量が減少していることが明らかになった。そのため、現在 miRNA 生合成における 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。

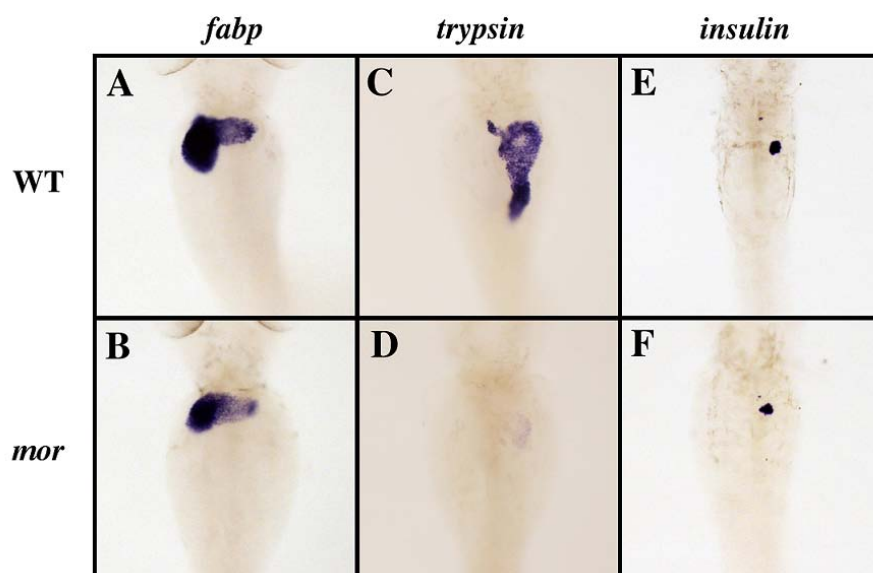


Fig.1 Expression of genes for digestive organs was not maintained in *mor* mutants. (A-D) Expression of *fatty acid binding protein (fabp)* and *trypsin* was reduced in *mor* mutants at 4 days post fertilization. (E,F) On the other hand, *insulin* expression was unchanged at 5 days post fertilization.

2. *Tg(sox17:EGFP)*を用いた内胚葉性器官形成の解析

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移動に関して解析を行った。内胚葉細胞特異的に発現する *cxcr4a* 遺伝子のノックダウン実験を行った結果、原腸陥入期における内胚葉細胞移動の阻害が観察された。更に *Cxcr4a* のリガンドである *Sdf1* は内胚葉細胞層を覆っている中胚葉細胞で発現しており、*sdf1* 遺伝子のノックダウン実験でも同様の阻害効果が観察されたことから、中胚葉細胞が内胚葉細胞の運動を制御している可能性が示唆された。

考察

本研究により、腸管上皮形成に異常を示す *mor* 変異体の表現型及び原因遺伝子の機能解析を行った結果、*Mor* タンパクが *miRNA* の生合成過程に機能していることが明らかになった。現在まで、*Mor* タンパクのホモログが *miRNA* の生合成過程に関与しているという報告は無いため、新規な発見であると考えている。また、*miRNA* による遺伝発現制御に関する研究は多数報告されているが、*miRNA* の生合成過程に関しては未だ不明な点が多い。そのため、*Mor* タンパクの機能が明らかになることにより、新たな *miRNA* 生合成過程（経路）の解明が期待できる。

また、原腸陥入期における内胚葉細胞の移動に関しては、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、生きた状態で細胞の動き・形態を観察することが可能になった。このトランスジェニックフィッシュ胚において *Sdf1-Cxcr4* シグナルを阻害することにより、*Sdf1* が化学誘引タンパクとして内胚葉細胞の移動方向を制御していることを初めて明らかにすることに成功した。

研究発表

口頭発表

1. Shunya Hozumi, Mitsuko Ogata, Akio Yoshizawa, Tohru Ishitani, Makiko Tsutsumi, Atsushi Kuroiwa, Motoyuki Itoh, Yutaka Kikuchi
Analysis of zebrafish mutant *morendo* showing defects of the digestive organ formation.
Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 29, 2008, Tokushima
2. Rie Asada, Mitsuko Ogata, Shunya Hozumi, Akio Yoshizawa, Tohru Ishitani, Makiko Tsutsumi, Atsushi Kuroiwa, Motoyuki Itoh, Yutaka Kikuchi
Phenotypic analysis of zebrafish mutant *legato* that shows defects of the digestive organ formation.
Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 29, 2008, Tokushima
3. 穂積俊矢、尾形光津子、吉澤明生、石谷太、堤真紀子、黒岩厚、伊藤素行、菊池裕
ゼブラフィッシュの内胚葉性器官に異常を示す *morendo* 変異体の解析
日本分子生物学会、2008年12月10日、神戸
4. Shunya Hozumi, Mitsuko Ogata, Akio Yoshizawa, Tohru Ishitani, Makiko Tsutsumi, Atsushi Kuroiwa,

Motoyuki Itoh, Yutaka Kikuchi

Analysis of zebrafish mutant *morendo* showing defects of the digestive organ formation.

Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 29, 2009, Niigata

5. Shunya Hozumi, Ryo Hirabayashi, Akio Yoshizawa, Tohru Ishitani, Makiko Tsutsumi, Atsushi Kuroiwa,

Motoyuki Itoh, Yutaka Kikuchi

Analysis of zebrafish mutant *morendo* showing defects of the digestive organ formation.

Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Dec. 11, 2009, Yokohama

論文発表

投稿準備中