

ゼブラフィッシュの順遺伝学で解明された 心臓形成を司る分子実体

川原 敦 雄

順遺伝学的解析手法とは、化学変異原などにより生殖細胞のゲノムにランダムな変異を誘導し特定の表現型を示す突然変異体を単離し、遺伝学的な解析により原因遺伝子を同定する手法であり、生命現象を司る機能分子を明らかにすることができる。ゼブラフィッシュは初期胚が透明で遺伝学的解析に適したモデル脊椎動物であり、大規模な突然変異体のスクリーニングから形態形成異常やヒト疾患と類似した表現型を示す突然変異系統が多数単離されている。本稿では、心臓の器官形成をモデルに、ゼブラフィッシュ変異体を用いた順遺伝学的解析から明らかとなった心臓の形成機構を紹介する。

はじめに

遺伝学的解析は、生命現象を司る分子実体および分子機能を解明する手法として大変有用である。特定の形態異常を示す突然変異体を単離し、その原因遺伝子を同定する順遺伝学的手法 (forward genetics) および既知の遺伝子を人為的に破壊し、誘導される表現型から分子機能を解析する逆遺伝学的手法 (reverse genetics) がある。ゼブラフィッシュは、毎週 200 個程の卵を産み、母体外で短い時間で発生し、初期胚が透明であるなど遺伝学的解析に適したモデル脊椎動物である。ゼブラフィッシュとヒトの器官形成は非常に良く保存されており、ゼブラフィッシュ変異体の単離とその機能解析は、ヒトの発生システムや遺伝性疾患の理解に大変有用であると考えられている¹⁾。1990年代にドイツ・チュービンゲンと米国・ボストンでゼブラフィッシュを用いた大規模な変異体スクリーニングが行われ、様々な器官形成過程に特徴的な異常を示す変異体が多数単離された。心臓は、個体発生の極めて初期に形成し機能する器官であり、ゼブラフィッシュの場合、受精後 25 時間

には実体顕微鏡下で心臓の拍動が観察される。ゼブラフィッシュの特質として、たとえ心臓形成に重篤な異常を示した個体であっても表皮からの酸素の拡散によって器官形成が完了する受精後 7 日までは生存できるため、心臓形成を司る機能分子が破壊された時にどのような形態異常を伴うのかを詳細に解析できる。米国の Fishman らと Stainier らのグループが循環器系に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の势力的な解析を進め、心臓形成を司る分子の実体を明らかにしてきた^{2,3)}。本稿では、既に原因遺伝子が同定された変異体に焦点を絞り (それぞれユニークな変異体名が付けられているが、本稿では基本的に遺伝子名を変異体名として解説している)、ゼブラフィッシュ変異体の解析から明らかとなった心臓の形成機構を概説したい。

1. 循環器系に異常を示す変異体の作製

ゼブラフィッシュ・ゲノム上の遺伝子を破壊する方法としては、化学変異原により点突然変異などを誘導する方法やレトロウイルスやトランスポゾンのゲノムへの挿入により近傍の遺伝子機能を阻害・破壊する方法 (挿入型変異体のスクリーニング) が開発されている。後者に関しては、川上らがメダカ Tol2 トランスポゼンを用いたユニークな変異体の作製技術を独自に開発しており、他の文献を参照していただきたい⁴⁾。本稿では、突然変異誘発の効率が高く汎用性のある ENU (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea) を用いた化学的突然変異誘起法を解説する。

国立循環器病研究センター 細胞生物学部 (〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1)

Genetic dissection of cardiac morphogenesis in zebrafish
Atsuo Kawahara (National Cardiovascular Center Research Institute, Department of Cellular Biology, Fujishirodai 5-7-1, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

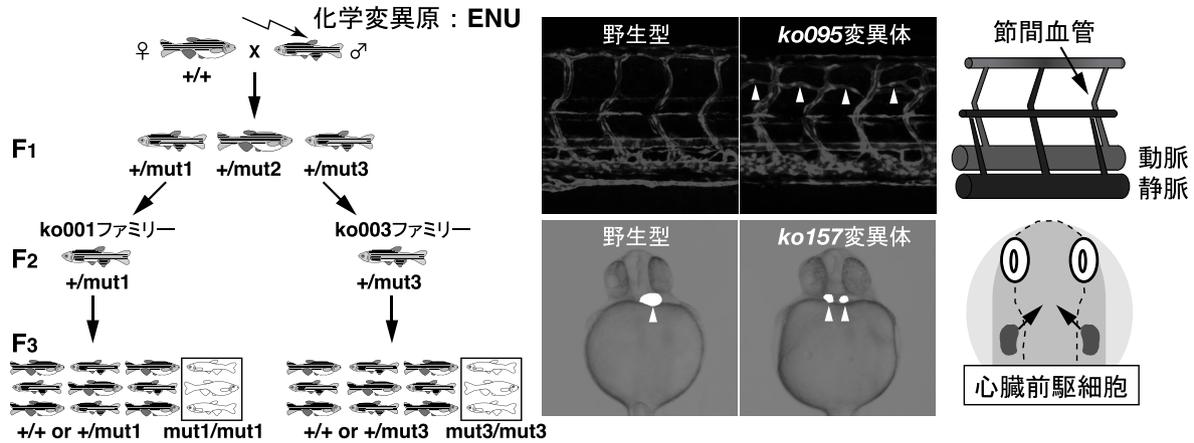


図1 循環器系に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の作製

ENUにより誘導された変異 (mut1, mut2, mut3 など) を持つ F₂ ファミリー内で交配することにより, F₃ 世代で現れる劣性変異の表現型を調べた. *ko095* 変異体において, 節間血管が神経管の近傍で走行異常を示すことが観察された (上段の白矢印). 一方, *ko157* 変異体は, 心臓前駆細胞の移動異常による二股心臓の表現型を示した (下段の白矢印は心臓の位置を示す).

アルキル化剤である ENU は, DNA の塩基の特定部位を修飾し, 複製の過程で塩基置換などの突然変異を誘導する. 筆者らは, 若い成魚の雄に 2.5mM ENU 処理を 1 週間おきに数回行い, 生殖細胞の DNA に損傷を与えた (図 1). 突然変異が生殖細胞に固定された後に, 未処理の雌と交配し F₁ 世代を作製する. 次に, F₁ の雄と雌を交配し F₂ ファミリーを作製する. 理論的には, F₁ に含まれる多様な変異遺伝子 (キャリア) は, F₂ ファミリーの半数に継承されることになる. そこで, F₂ ファミリーの雄と雌を交配した時 (4 ペアに 1 ペアの割合で), 変異遺伝子をホモで持つ個体が 25% の割合で生まれるので, この劣性変異の表現型を調べる (F₃ スクリーニング: 図 1). このスクリーニングの過程が最も重要で, 各々の研究者が独自のスクリーニング法を考案することにより, 器官形成過程に様々な異常を示す変異体が作製されている.

筆者らは, 形態学的に心臓の拍動および血流の有無を調べ, さらに, *in situ* ハイブリダイゼーション法により心臓や血管マーカー遺伝子の発現異常を調べた. 取れてきた変異候補を, 心臓や血管の可視化システムと掛け合わせることで, 次の世代では, 心臓や血管発生における形態異常を蛍光タンパク質の発現としてリアルタイムで解析できるように工夫した. *ko095* 変異体は, 血管のネットワーク形成に異常を示す変異体で, 腹側の血管から神経管に向かって体節の間を縫うように走る節間血管が神経管近傍で異常な枝分かれを示した (図 1). 筆者らは, *ko095* 変異体の原因遺伝子である *seryl-tRNA synthetase* が血管リモデリングを調節する新たな機能分子であることを提唱している^{5,6)}. 一方, *ko157* 変異体は, 心臓の形成過程に異常を示した (図 1). 器官形成過程において, 体の両側に存在する心臓前駆細胞は, 正中線方向に移動して融合することにより心臓を

形成するが, *ko157* 変異体は心臓前駆細胞の移動異常により二股心臓となった⁷⁾. この *ko157* 変異体を例に, ゲノムマッピングによる原因遺伝子の同定とその検証のプロセスを解説する.

2. *ko157* 変異体の原因遺伝子の同定

ENU を用いた化学的突然変異誘起法により作製されたゼブラフィッシュ変異体の原因遺伝子を同定するためには, その遺伝子座を決定する必要がある. まず, *ko157* 変異体系統を他の野生型系統 (図 2 では TL 系統) と掛け合わせ, 3 世代からなるファミリー (連鎖パネル: F₁, F₂ など) を作製する. ここで作製した連鎖パネルから調整したゲノム DNA を用い, 父方と母方の染色体を識別しうる多型性 DNA マーカーを用い, 各 F₂ 個体での DNA マーカーの挙動を調べる (図 2A). ゼブラフィッシュは, 25 対の相同染色体からなり, 3,000 を超える SSLP (simple sequence length polymorphism) マーカーが染色体上にマップされている. 遺伝子座と異なる染色体に存在する SSLP マーカーは不規則な挙動を示す一方, 同じ染色体に存在する SSLP マーカーは, 両者の遺伝子距離に依存した挙動を示す (図 2A). つまり, 変異体の近傍に存在する SSLP マーカーほど連鎖が強まり, 離れると組換えの頻度が高まる. 100 回の減数分裂で 1 回の組換えが起こる遺伝子距離が 1 センチモルガン (1 cM) と定義されている (ゼブラフィッシュの場合, 1 cM が約 700 kb に相当する). *ko157* 変異体の場合, 遺伝的連鎖地図から, z9419 と z63525 マーカーが変異体の遺伝子座と強く連鎖していることが分った (図 2B: 800 回の減数分裂を調べたが組換えは認められない). ゼブラフィッシュのゲノム情報を基に z9419 と z63525 の近傍に存在する遺伝子を調べた結果,

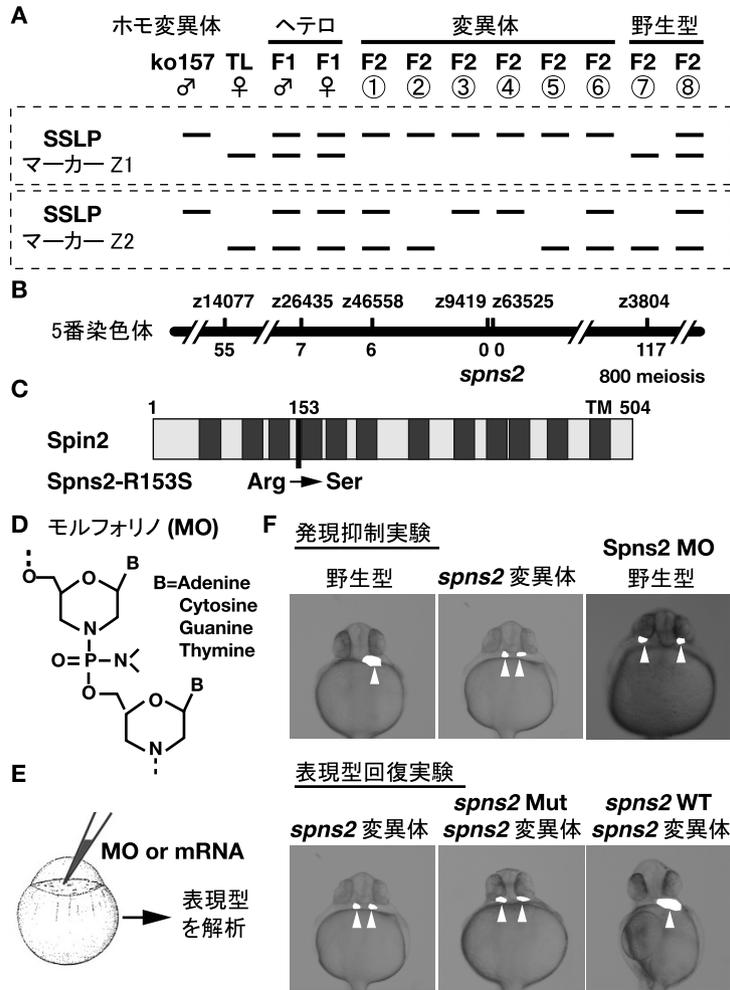


図2 ゼブラフィッシュを用いた順遺伝学的解析手法と実験手法
 (A) SSLP マーカーの挙動: 連鎖パネルから調整したゲノム DNA を用い SSLP マーカー (Z1, Z2: 仮想上のマーカー) の挙動を示している。Z1 マーカーは、変異体の表現型とリンクしているが、Z2 はリンクしていない。次に、Z1 マーカーが存在する染色体の SSLP マーカーを網羅的に調べることで変異体の表現型と強く連鎖する遺伝子座を同定する。TL: マッピングに使用した野生型系統。(B) *ko157* 変異体の遺伝子座は、5 番染色体上の SSLP マーカー z9419 と z63525 近傍にマップされ、その領域に位置する *spns2* 遺伝子が、原因遺伝子の候補と考えられた。図中の数字は、組換えが確認された数を示している。(C) *Spns2* 分子は、12 回の膜貫通ドメイン (TM) を有する新規の膜分子であり、*ko157* 変異体において、153 番目の Arg が Ser に点突然変異していた。(D) モルフォリノの構造 (E) 受精卵にモルフォリノ (MO) あるいはメッセンジャー RNA (mRNA) を注入することにより遺伝子の機能を調べる。(F) *Spns2* MO の野生型胚への注入は、*spns2* 変異体と類似した二股心臓の表現型を誘導した。また、野生型 *spns2* mRNA を *spns2* 変異体胚に注入すると二股心臓の表現型が抑制された。

spns2/spinster homolog 2 遺伝子が原因遺伝子の候補と考えられた (図 2C)。 *ko157* 変異体の場合、ORF 上に変異部位があったので問題がないが (図 2C: *Spns2* 分子の 153 番目の Arg が Ser に点突然変異していた)、プロモーター領域などの非翻訳領域や micro RNA をコードする領域などに変異が生じ表現型を示すケースも考えられる。後者

は、突然変異の同定やその解析が難しいためか、挿入型変異体以外でそのような報告例は極めて少ない。

ゲノムマッピングから取れてきた候補遺伝子が本当に変異体の原因遺伝子であるかは、以下の基準を調べることにより証明する。(1) 候補遺伝子の中に変異を同定する (図 2C: *Spns2* 変異体では点突然変異であった)。また、原因

遺伝子が何らかの機能を持つと考えられた場合、その変異により分子機能がどのような影響を受けているかを解析する (Spns2 の機能解析は後半に述べる)。(2)原因遺伝子に導入された変異により分子機能が破壊された場合、原因遺伝子に対するアンチセンス・モルフォリノ (MO) を受精卵に注入する発現抑制実験により変異体の表現型が誘導できることを確認する (図 2D-F: phenocopy: 表現型模写)。ENU による点突然変異により遺伝子の機能が部分的に抑制された場合も (hypomorph), 注入する MO の容量を調整することにより類似した表現型を再現できる可能性がある。なお、ヒトの遺伝病の多くは、遺伝子機能が部分的に消失したケースが多いので、hypomorph 型ゼブラフィッシュ変異体は、ヒト遺伝病の良いモデル疾患生物となりうるであろう。(3)変異体の表現型が、原因遺伝子の野生型 mRNA を注入することにより回復できるかを調べる (rescue: 表現型回復実験, ただし表現型が現れる前の発生段階で強い生物活性を示す mRNA は、表現型の回復を調べることが困難な場合もある)。図 2F に示すように、Spns2 MO を野生型の受精卵に注入することにより二股心臓の表現型が誘導されること、*ko157* 変異体の二股心臓の表現型が *spns2* mRNA の注入により回復することから、*spns2* 遺伝子がこの変異体の原因遺伝子であると結論づけた。Spns2 分子の機能解析は後半に述べることにして、大規模な変異体スクリーニングから分かってきた心臓形成を司る分子実体を次に紹介する。

3. ゼブラフィッシュ変異体から同定された心臓形成を司る分子

ゼブラフィッシュの器官形成期において、前方の両側に

位置する心臓前駆細胞は、正中線方向に移動し融合することにより管状の心筒を形成し、受精後 25 時間頃には拍動を開始する (図 3)。その後、心筒は右側へ屈曲したループを作り (心臓ルーピング), 流入路・心房・心室・流出路の領域に明確に区分され、心臓が循環器系のポンプとしての機能を発揮し始める⁸⁾。ゼブラフィッシュの心臓は哺乳類の心臓と異なり 1 心房 1 心室であるが、心臓の形成過程や心機能は非常に良く保存されている。本稿では、(i)心臓前駆細胞の移動と心筒形成、(ii)心房・心室・心臓弁の形成と心臓ルーピング、(iii)心機能の指標となる心筋収縮・拍動数の三つのプロセスに異常を示すゼブラフィッシュ変異体について概説する。なお、本稿では変異体の原因遺伝子とその分子機能を列挙する形をとっているため、より詳細な解析結果は、それぞれの文献を参照していただきたい。

4. 心臓前駆細胞の移動を制御する分子

(i)心臓前駆細胞の移動異常により二股心臓となる変異体は、*mixer*⁹⁾, *sox32*^{10,11)}, *gata5*¹²⁾, *oep* (*one eye pinhead*; Nodal 分子の補助受容体)¹³⁾, *hand2*¹⁴⁾, *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (hmgcr1b)*¹⁵⁾, *S1PR2*¹⁶⁾, *spns2*^{7,17)}, *fibronectin*^{18,19)} 変異体である (図 3)。Mixer と Sox32 は、内胚葉組織の形成に必須な転写因子であり、*mixer* 変異体は内胚葉組織の形成不全を、*sox32* 変異体は内胚葉組織を完全に欠損している⁹⁻¹¹⁾。Gata5 転写因子は、内胚葉組織の形成にも重要であるが、心臓前駆細胞にも発現しておりその増殖・分化を制御する¹²⁾ (マウスでは、*Gata4* の遺伝子破壊で二股心臓となる²⁰⁾)。 *oep* 変異体は、内胚葉と中胚葉の形成不全を示した¹³⁾。Oep 分子 (哺乳類

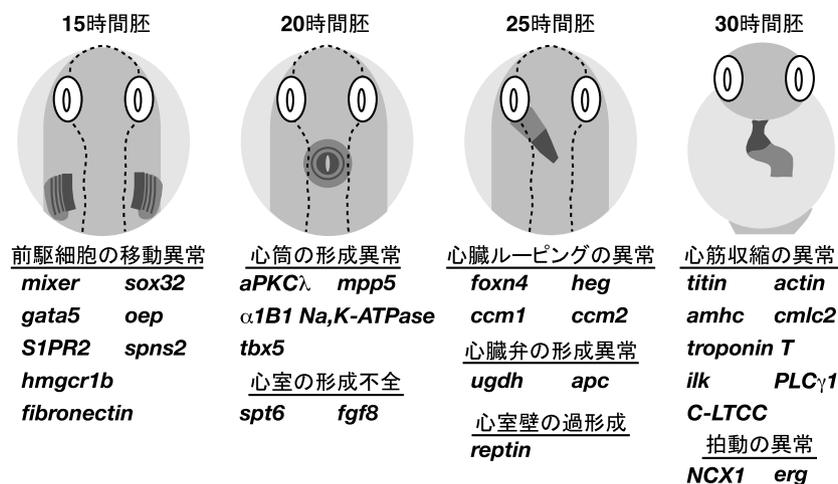


図 3 心臓形成を司る機能分子

15 時間胚において、体の両側に存在する心臓前駆細胞は、正中線方向へ移動し融合することにより心房・心室へ分化する。心臓発生に異常を示すゼブラフィッシュ変異体を主な表現型に分類し、それらの原因遺伝子を記載している。30 時間胚は正面からの模式図で、それ以外は背側から見た模式図である。

では *Cripto/Tdgf1* と呼ばれる) は、液性因子 *Nodal* の補助受容体として機能していることが明らかとされている。*oep* 変異体では、心臓発生において心臓前駆細胞の数が減少し二股心臓となる²¹⁾。つまり、上記の変異体の解析から、心臓前駆細胞の形成と移動には、隣接する前方内胚葉からのシグナルが極めて重要であることが明らかとなっている。また、心臓前駆細胞に発現する *Hand2* 転写因子は、その増殖・分化に不可欠な役割を担うため、*hand2* 変異体においても二股心臓の表現型を示す¹⁴⁾。*hmgcr1b* 変異体は、心臓前駆細胞の正中線への移動が遅れ、心筒と心臓ルーピングの不全と心臓の浮腫を示す¹⁵⁾。*Hmgcr1b* 分子は、コレステロール合成系の酵素であり、HMGCR 特異的阻害剤であるメビノリン処理により心臓前駆細胞の移動異常による二股心臓を誘導することができる。*hmgcr1b* 変異体に HMGCR の下流の生成物であるメバロネートを注入することにより表現型が回復することから酵素活性が必須であると考えられている。細胞の移動を制御する Rho ファミリー (低分子 G タンパク質) などは、HMGCR の下流に位置するゲラニルゲラニルピロリン酸により修飾を受けるので、それらの機能異常が表現型を誘導している可能性が考えられているが、実際の標的分子は分かっていない。接着分子フィブロネクチンは、前方内胚葉と移動している心臓前駆細胞の間に発現しており、*fibronectin* 変異体も二股心臓の表現型を示すことが報告されている^{18,19)}。*spns2* 変異体と *SIPR2* 変異体の機能に関しては後述する。

5. 心房・心室・心臓弁の形成に関与する分子

(ii) 心房・心室・心臓弁の形成と心臓ルーピングに異常を示す変異体は、*apical protein kinase Cλ (aPKCλ)*²²⁾、*mpp5*²³⁾、*α1B Na*、*K-ATPase*²⁴⁾、*spt6*²⁵⁾、*fibroblast growth factor 8 (fgf8)*²⁶⁾、*foxn4*²⁷⁾、*tbx5*²⁸⁾、*heart of glass (heg)*²⁹⁾、*ccm1 (krit1)*³⁰⁾、*ccm2*³¹⁾、*UDP-glucose dehydrogenase (ugdh)*³²⁾、*adenomatous polyposis coli (apc)*³³⁾、*reptin*³⁴⁾ 変異体である (図 3)。タンパク質リン酸化酵素 aPKCλ に変異を持つ aPKCλ 変異体は、心室が心房内に形成される。これは心筋細胞の細胞極性異常に起因しており、aPKCλ の酵素活性が必須であることが明らかとなっている²²⁾。*mpp5* 変異体は、心筒の伸張不全を示す²³⁾。*Mpp5* も細胞極性を制御している分子であり、*Mpp5* の発現抑制胚において、aPKCλ の発現が散在することから、*Mpp5* が aPKCλ の局在を調節していることが示唆されている。つまり、aPKCλ と *Mpp5* が心筋細胞の細胞極性を制御することが心筒の伸張に重要であると考えられる。*α1B Na*、*K-ATPase* 変異体も心筒の伸張および心筋収縮に異常を示す²⁴⁾。この変異体の心筒が短い表現型は、aPKCλ 変異体や *mpp5* 変異体と類似しているが、この分子が細胞極性を調整しているかは不明である。*spt6* 変異体は、心房と比較して心室が極端

に小さい²⁵⁾。*Spt6* は転写伸張因子として機能することが知られている。*spt6* 変異体では、心臓発生の鍵となる転写因子 *nkx2.5* と *gata4* の発現が抑制されている。*fgf8* 変異体も心室の形成不全を示す²⁶⁾。*fgf8* 遺伝子は、まず心臓前駆細胞に発現が認められ、その後、心室に限局した発現となる。*fgf8* 変異体においても *nkx2.5* と *gata4* の発現が減弱していることが示されている。*foxn4* 変異体は、房室管の形成不全と心内膜の浮腫を示す²⁷⁾。*foxn4* は、*tbx2* 遺伝子 (T-box 転写因子) と同じように房室管に発現している。興味深いことに、*foxn4* 変異体では *tbx2* 遺伝子の房室管での発現が消失していた。*tbx2* 遺伝子のプロモーター領域に *Foxn4* 転写因子の結合配列が存在し *Foxn4* がその配列に結合しうること、その配列を破壊したプロモーター配列を持つコンストラクトは房室管での発現が認められなくなることから、心臓発生において *Foxn4* による *tbx2* 遺伝子の発現制御が房室管の形成に重要であることが示唆されている (*Tbx2* の発現抑制胚も房室管の形成不全を示す)。*T-box* 転写因子群は心臓発生に極めて重要な役割を担っている。*tbx5* 変異体は、心臓原基の形成は起こるが、心内膜の浮腫を引き起こす (また胸鱗の欠損も見られる)²⁸⁾。*ヒト TBX5* は、心臓と手の形成異常を示す *Holt-Oram* 症候群の原因遺伝子であることが知られており、*tbx5* 変異体は、そのモデル疾患生物となりうる。

heart of glass (heg)、*ccm1 (krit1)* および *ccm2* 変異体は、心筒の形成に異常は見られないが、心臓のルーピングに異常を示し肥大した心臓となる。*Heg* は、心内膜に発現している新規の膜分子で分子機能は不明であったが²⁹⁾、最近、マウス *Heg1* (ゼブラフィッシュ *Heg* の相同分子) が、*Ccm1*、*Ccm2* と機能的に相互作用していることが明らかとなった³⁵⁾。海綿状血管腫 (cerebral cavernous malformation: CCM) は、中枢神経系に発生する血管病変を示す疾患であり、海綿状血管腫に関連する遺伝子として *Ccm1*、*Ccm2*、*Ccm3* が同定されている。*Heg1* 欠損マウスは、心臓・血管の形成過程に機能異常が認められ、遺伝学的解析から *Heg1* と *Ccm2* が同じ経路上に位置すると考えられた³⁵⁾。さらに、*Heg1* 膜分子の細胞内領域が *Ccm1* との会合を介して *Ccm2* と複合体を形成することが示され、*Heg1-Ccm1-Ccm2* 複合体が心臓や血管の細胞-細胞間の安定性に貢献していると考えられている。*ugdh*、*reptin*、*apc* 変異体の解析結果は、心臓形成における新たな分子機序を提唱しており、大変注目されている。*ugdh* 変異体は、房室弁の形成不全といった特徴的な表現型を示している³²⁾。*Ugdh* は、細胞外マトリックスの修飾に利用される基質の生成を制御している。ショウジョウバエの *Sugarless* (ゼブラフィッシュ *Ugdh* の相同分子) が、*Wnt* のシグナルに必須な分子であることから、*Ugdh* は、*Wnt/β-カテニン* のシグナルを調節することにより房室弁の形成を制御してい

ると考えられている。興味深いことに、Wnt シグナルの負の制御因子である APC 分子に変異を持つ *apc* 変異体も、弁形成異常を示すことが報告されている³³⁾。つまり、APC の変異により Wnt/ β -カテニンのシグナルが亢進することが心内膜床の過形成と房室弁の形成不全を誘導すると考えられている。*reptin* 変異体では、初期の心臓形成は正常に起こるが、受精後 3 日までに心室壁が肥大する³⁴⁾。Reptin 分子は、ATPase 活性を持つ分子で、Wnt/ β -カテニンのシグナルを負に制御していることが報告されている。変異型 Reptin は、Reptin が持つ ATPase 活性が高まっており、 β -カテニン-TCF 依存性の転写活性を野生型 Reptin より強く抑制しうることが明らかとなった（この結果は、心室壁の肥大には Reptin による Wnt/ β -カテニンのシグナルの抑制が関与していることを示唆しているが、より詳細な機能解析が必要であろう）。*reptin* 変異体は、肥大性心筋症と類似した表現型を示しているため、ヒト肥大性心筋症の病態の進行に Reptin が関与しているかが大変興味深い。

6. 心機能を司る分子

(iii) 心筋収縮や拍動数などの心機能に異常を示す変異体は、*titin*³⁶⁾、*actin*³⁷⁾、*atrial myosine heavy chain (amhc)*³⁸⁾、*cardiac myosine light chain 2 (cmlc2)*³⁹⁾、*troponin T*⁴⁰⁾、*integrin-like kinase (ilk)*⁴¹⁾、*phospholipase C γ 1 (PLC γ 1)*⁴²⁾、 α 1C L-type calcium channel subunit (C-LTCC)⁴³⁾、*cardiac-specific NCX1*⁴⁴⁾、*K⁺ channel erg*⁴⁵⁾ 変異体である（図 3）。ゼブラフィッシュの心臓は、他の脊椎動物と同じように刺激伝導系により拍動が制御されている。洞房結節で起こった電気的興奮は、まず心房へ伝わり、房室結節でその興奮を受け心室へ伝える。心臓の収縮能が低下する変異体として、心臓の筋原繊維の構成分子が破壊された *titin*、*actin*、*amhc* および *cmlc2* 変異体が単離されている。例えば、*actin* 変異体では、種を超えて保存されている 177 番目の Arg が His に置換されており（Actin-R177H）、心筋収縮の低下による血液循環の不全を示す³⁷⁾。また、筋原繊維のコンポーネントである *troponin T* 変異体は、心臓形成は正常に起こるが心臓の拍動が全く認められない⁴⁰⁾。それに伴い心臓弁の形成不全、流出路からの血管系の形態異常が報告されている。*ilk* (*integrin-like kinase*) 変異体は、心筋の収縮能が低下し、心内膜の浮腫を示す⁴¹⁾。ILK 分子は、 β 1-インテグリンの細胞内領域に結合しうる Ser/Thr リン酸化酵素であり、サルコメア Z 盤の α -アクチニンと共局在していることが抗体染色で明らかにされている。*ilk* 変異体では、種間を超えて保存されている 308 番目の Leu が Pro に置換されており（ILK-L308P）酵素活性がほとんど消失していることから、ILK の酵素活性が心収縮の制御に必須であると考えられる。ILK は protein kinase B (PKB) のリン酸化 (Ser473) を介し PKB を活性化することで *vascular endothe-*

lial growth factor (vegf) 遺伝子の発現を制御していることが報告されている。興味深い知見としては、PKB の活性化型や *vegf* mRNA を *ilk* 変異体胚に注入すると表現型が回復することである。つまり、ILK-PKB-VEGF 経路が心筋収縮に重要であると考えられる。*PLC γ 1* 変異体では、心室での筋収縮の低下と血液循環の不全が報告されている⁴²⁾。PLC γ 1 は、VEGF シグナルの下流で機能するシグナル伝達分子であり、VEGF の発現抑制胚でも心室の収縮機能の低下が認められ、VEGF-PLC γ 1 経路の心室機能への重要性が示されている。

心筋型 L 型カルシウムチャンネルに変異を持つ C-LTCC 変異体は、心筒の形成に異常は見られないが、心室の分化段階で心筋細胞の数が減少し心室での心収縮が低下する⁴³⁾。これは、カルシウムシグナルが、心室の心筋細胞の増殖にも重要な役割を担うことを示唆している。異常な周期で心臓が拍動する不整脈に似た症状を示す変異体として、心臓特異的 1 型 Na⁺/Ca²⁺ 交換体に変異を持つ *NCX1* 変異体がある⁴⁴⁾。心臓特異的 *NCX1* は、心筋細胞において筋小胞体から放出される Ca²⁺ を部分的に細胞外へ汲み出す機能を担っている。特に、心房の拍動が乱れ心房拍動のリズムが短縮する。K⁺ チャンネルに変異を持つ *erg* 変異体は、再分極の異常による不整脈の表現型を示している⁴⁵⁾。ILK や PLC γ 1 が VEGF シグナルを調節することで心室の分化や筋収縮を調節するという興味深い知見が得られているが、それ以外は心機能に関する新しい概念を提唱しうるゼブラフィッシュ変異体は単離されていない。しかしながら、ゼブラフィッシュとヒトの筋原繊維の構造や拍動の分子メカニズムが非常に良く保存されていることが分かった。つまり、心機能に異常を示す変異体は、ヒト心疾患に対するモデル疾患ゼブラフィッシュとなりうるであろう。実際に、ヒト *Titin* の遺伝子異常は、拡張型心筋症の患者に見つかっており^{46,47)}、また、ヒト *Troponin T* 遺伝子の変異で、心筋症が引き起こされることが報告されている⁴⁸⁾。上記のゼブラフィッシュ変異体をモデル疾患生物として利用することで、心筋症や不整脈を制御する新しい治療薬のスクリーニングが期待される。また、様々なヒト疾患に対する開発段階の薬剤候補をゼブラフィッシュ胚に処理することにより、心機能に影響を与える薬剤候補を除外することにも有用であろう。

7. 脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸と心臓発生

心臓に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の機能解析から、心臓発生を司る分子の実体が明らかになってきている。しかしながら、それぞれの変異体間の関連性を調べる解析や変異体と既知の機能分子との関連性は十分に調べられておらず、心臓形成の全体像は明らかとなっていない。

ko157 変異体の原因遺伝子は未解析の新規膜分子 *Spns2* であったが、筆者らは、*S1PR2* 変異体との機能的相互作用の検証および培養細胞株を用いた生化学的な解析から *Spns2* 分子の新たな生理活性を見出すことができたので紹介する。

脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、ゼブラフィッシュの心臓形成において重要な機能を担っている⁴⁹⁾ (図4)。このことは、S1P受容体 (S1PR) である *S1PR2* の破壊が二股心臓となることから明らかである¹⁶⁾。哺乳類において、*S1PR1*–*S1PR5* の5種類のS1PR (全て7回膜貫通型のGタンパク質共役受容体) が報告されており、S1Pは、各S1PRと共役するシグナル伝達系を介し細胞増殖や細胞移動など多彩な生物活性を発揮する^{50–52)}。*S1PR2* 変異体と *spns2* 変異体は、二股心臓に加えて尾の水疱の表現型が観察されており (これら特徴的な表現型が同時に観察される変異体は他に知られておらず)、両者の間に強い遺伝学的な相関性が存在すると考えられた。予測された *Spns2* の高次構造がバクテリアのグリセロール-3-リン酸に対する輸送体と相同性を示したことから、*Spns2* がS1Pの輸送体として機能する可能性を想定し、細胞培養のシステムを用いて *Spns2* によるS1Pの放出活性を解析した。野生型の *Spns2* 分子は、標識された細胞内のS1Pを細胞外に放出する活性が検出されたが、変異体型である *Spns2*-R153Sは、その放出活性が消失していた⁷⁾ (図4B)。S1P分泌の分子機序は哺乳類を含め十分に理解されていなかったが、*spns2* 変異体の解析から *Spns2* が

生体内でS1Pの輸送体として機能することが明らかとなった (図4C)。放出されたS1Pは、*S1PR2* を介して心臓前駆細胞の移動を直接あるいは間接的に調節していると考えられた。なお、*spns2* は器官形成期に体節、造血・血管発生のある中間細胞塊や尾の先端などに発現しているが心臓発生以外の機能は不明であり、今後、*Spns2* の初期発生における包括的な機能解析を行う必要がある。

おわりに

ゼブラフィッシュを用いた順遺伝学的解析手法の醍醐味は、化学変異原を用いバイアスを掛けずにゲノム上の遺伝子をランダムに破壊することにより、例えば、循環器系の形成過程に特徴的な異常を示す変異体を単離できることである。さらに、その原因遺伝子を同定し心臓発生における機能を解析することにより、循環器システムを司る分子実体および分子機能を明らかにすることができる。二股心臓の表現型を示す *ko157/spns2* 変異体の機能解析においては、*S1PR2* 変異体との遺伝学的関連性を示す知見を手がかりに、*Spns2* がS1Pの輸送体として機能し心臓前駆細胞の移動を制御していることを明らかにすることができた。脂質メディエーターS1Pの分泌機構はこれまで十分に理解されておらず、S1P輸送体 *Spns2* の発見は、S1Pの生理機能の包括的な理解に貢献できるであろう。S1Pは、哺乳類において、血管発生や神経発生に重要な役割を担っており、また、成体においては、リンパ球の再循環を制御している^{51,52)}。現在注目されている免疫抑制剤FTY720 (フィ

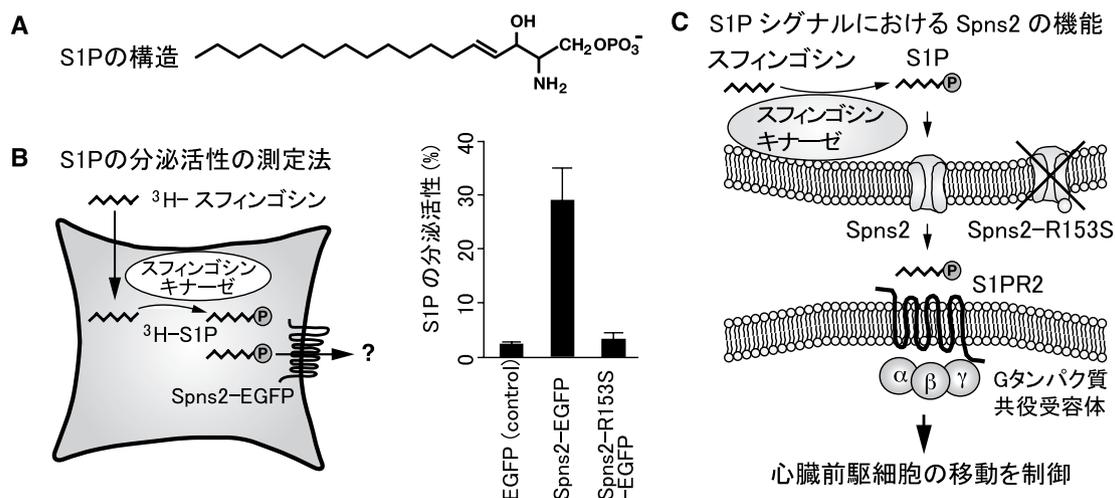


図4 S1Pシグナルにおける *Spns2* の役割

(A)スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の構造: スフィンゴシンキナーゼによるスフィンゴシンのリン酸化により生成される。(B)S1Pの放出活性の測定方法。 ³Hラベルされたスフィンゴシンを投与すると細胞内でスフィンゴシンキナーゼによるリン酸化により ³Hラベルされた水溶性のS1Pへと変換される。 *Spns2*-EGFPを遺伝子導入することにより、 ³HラベルされたS1Pが細胞外へ分泌されるかを調べた。その結果、 *Spns2* がS1Pを細胞外へ放出できることが明らかとなった。変異体型である *Spns2*-R153Sには、放出活性はない。(C) *Spns2* 分子は、細胞内で生成されたS1Pを細胞外へ分泌する。分泌されたS1Pが *S1PR2* を活性化することにより、心臓前駆細胞の移動を直接あるいは間接的に制御していると考えられた。

ンゴリモド：スフィンゴシンと構造が類似している）は、細胞内でスフィンゴシンキナーゼによりリン酸化を受け（FTY720 リン酸）、S1P 受容体（主に S1PR1）に結合しエンドサイトーシスを亢進することにより S1P シグナルの不活性化を誘導すると考えられている⁵³。つまり、FTY720 の投与により血液中のリンパ球数を減少させる新しい作用機序の免疫抑制剤である。最近、ヒト Spns2 分子が、S1P に加えて FTY720 リン酸を細胞外へ放出できることが明らかとなり⁵⁴、今後、Spns2 分子を標的とした治療薬の開発が期待される。

心筋梗塞・狭心症などの心疾患は、日本人の死因でがんについて 2 番目に多く、心疾患の病態の解明や治療法の確立は、現代医学の抱える重要な課題である。本稿で紹介したように、心臓形成に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の順遺伝学的解析から心臓形成を司る分子実体が明らかとなってきた。これらの分子の中には、哺乳類の心臓形成での機能が不明である分子も多いので、ゼブラフィッシュ変異体で同定された原因遺伝子の哺乳類での分子機能を解析することにより、種を超えた普遍的な心臓の形成機構が明らかとなるであろう。また、ヒト心疾患との関連性を調べることで、新たなヒト疾患遺伝子の同定へとつながることを期待したい。本稿で紹介した変異体は、ヒト心疾患に対するモデル疾患ゼブラフィッシュとなりうるので、ヒト心疾患の病態の解明や症状を緩和させる薬剤のスクリーニングに貢献できると考えられる。

最後に、本稿で紹介した *spns2* 変異体は、京都大学先端領域融合医学研究機構の若手研究者支援プロジェクトのサポートで行った変異体スクリーニングから単離された系統であり、機構長の上代淑人先生ならびに共同研究者の皆様へ感謝いたします。また、本稿を執筆するにあたり貴重なご助言をいただきました九州大学の横溝岳彦先生ならびに筑波大学の小林麻己人先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Stainier, D.Y.R. (2001) *Nat. Rev. Genetics*, **2**, 39–48.
- 2) Chen, J.-N. & Fishman, M.C. (2000) *Trends Genetics*, **16**, 383–388.
- 3) Schoenebeck, J.J. & Yelon, D. (2007) *Semin. Cell Dev. Biol.*, **18**, 27–35.
- 4) Urasaki, A. & Kawakami, K. (2009) *Methods. Mol. Biol.*, **546**, 85–102.
- 5) Fukui, H., Hanaoka, R., & Kawahara, A. (2009) *Cir. Res.*, **104**, 1253–1259.
- 6) Kawahara, A. & Stainier, D.Y.R. (2009) *Trends Cardiovasc. Med.*, **19**, 179–182.
- 7) Kawahara, A., Hishi, T., Hisano, Y., Fukui, H., Yamaguchi, A., & Mochizuki, N. (2009) *Science*, **323**, 524–527.
- 8) Yelon, D. (2001) *Dev. Dyn.*, **222**, 552–563.
- 9) Kikuchi, Y., Le, A., Reiter, J.F., Alexander, J., Yelon, D., & Stainier, D.Y.R. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 1279–1289.
- 10) Dickmeis, T., Mourrain, P., Saint-Etienne, L., Fischer, N., Aanstad, P., Clark, M., Strahle, U., & Rosa, F. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 1487–1492.
- 11) Kikuchi, Y., Agathon, A., Alexander, J., Thisse, C., Waldron, S., Yelon, D., Thisse, B., & Stainier, D.Y.R. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 1493–1505.
- 12) Reiter, J.F., Alexander, J., Rodaway, A., Yelon, D., Patient, R., Holder, N., & Stainier, D.Y.R. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 2983–2995.
- 13) Zhang, J., Talbot, W.S., & Stainier, D.Y.R. (1998) *Cell*, **92**, 241–251.
- 14) Yelon, D., Ticho, B., Halpern, M.E., Ruvinsky, I., Ho, R.K., Silver, L.M., & Stainier, D.Y.R. (2000) *Development*, **127**, 2573–2582.
- 15) D'Amico, L., Scott, I.C., Jungblut, B., & Stainier, D.Y.R. (2007) *Curr. Biol.*, **17**, 252–259.
- 16) Kupperman, E., An, S., Osborne, N., Waldron, S., & Stainier, D.Y.R. (2000) *Nature*, **406**, 192–195.
- 17) Osborne, N., Brand-Arzamendi, K., Ober, E.A., Jin, S.W., Verkade, H., Holtzman, N.G., Yelon, D., & Stainier, D.Y.R. (2008) *Curr. Biol.*, **18**, 1882–1883.
- 18) Trinh, L.A. & Stainier, D.Y.R. (2004) *Dev. Cell*, **6**, 371–382.
- 19) Koshida, S., Kishimoto, Y., Ustumi, H., Shimizu, T., Furutani-Seiki, M., & Takada, S. (2005) *Dev. Cell*, **8**, 587–598.
- 20) Narita, N., Bielinska, M., & Wilson, D.B. (1997) *Dev. Biol.*, **189**, 270–274.
- 21) Reiter, J.F., Verkade, H., & Stainier, D.Y.R. (2001) *Dev. Biol.*, **234**, 330–338.
- 22) Peterson, R.T., Mably, J.D., Chen, J.-N., & Fishman, M.C. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, 1481–1491.
- 23) Rohr, S., Bit-Avragim, N., & Abdelilah, S. (2005) *Development*, **133**, 107–115.
- 24) Shu, X., Cheng, K., Patel, N., Chen, F., Joseph, E., Tsai, H.-J., & Chen, J.-N. (2003) *Development*, **130**, 6165–6173.
- 25) Keegan, B.R., Feldman, J.L., Lee, D.H., Koos, D.S., Stainier, D.Y.R., & Yelon, D. (2002) *Development*, **129**, 1623–1632.
- 26) Reifers, F., Walsh, E.C., Leger, S., Stainier, D.Y.R., & Brand, M. (2000) *Development*, **127**, 225–235.
- 27) Chi, N.C., Shaw, R.M., Val, S.D., Kang, G., Jan, L.Y., Black, B.L., & Stainier, D.Y.R. (2008) *Genes Dev.*, **22**, 734–739.
- 28) Garrity, D.M., Childs, S., & Fishman, M.C. (2002) *Development*, **129**, 4635–4645.
- 29) Mably, J.D., Mohideen, M.P.K., Burns, C.G., Chen, J.-N., & Fishman, M.C. (2003) *Curr. Biol.*, **13**, 2138–2147.
- 30) Mably, J.D., Chuang, L.P., Serluca, F.C., Mohideen, M.P.K., Chen, J.-N., & Fishman, M.C. (2006) *Development*, **133**, 3139–3146.
- 31) Hogan, B.M., Bussmann, J., Wolburg, H., & Schulte-Merker, S. (2008) *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 2424–2432.
- 32) Walsh, E.C. & Stainier, D.Y.R. (2008) *Science*, **293**, 1670–1673.
- 33) Hurlstone, A.F.L., Haramis, A.-P.G., Wienholds, E., Begthel, H., Korving, J., van Eeden, F., Cuppen, E., Zivkovic, D., Plassterk, R.H.A., & Clevers, H. (2003) *Nature*, **425**, 633–637.
- 34) Rottbauer, W., Saurin, A.J., Lickert, H., Shen, X., Burns, C.G., Wo, Z.G., Kemler, R., Kingstone, R., Wu, C., & Fishman, M. (2002) *Cell*, **111**, 661–672.
- 35) Kleaveland, B., Zheng, X., Liu, J.J., Blum, Y., Tung, J.J., Zou, Z., Sweeney, S.M., Chen, M., Guo, L., Lu, M., Zhou, D., Kitajewski, J., Affolter, M., Ginsberg, M.H., & Kahn, M.L. (2009)

- Nat. Med.*, 15, 169–176.
- 36) Xu, X., Meiler, S.E., Zhong, T.P., Mohideen, M., Burggren, W. W., & Fishman, M. (2002) *Nat. Genet.*, 30, 205–209.
- 37) Bartman, T., Walsh, E.C., Wen, K.-K., McKane, M., Ren, J., Alexander, J., Rubenstein, P.A., & Stainier, D.Y.R. (2004) *PLOS Biol.*, 2, 673–681.
- 38) Berdugo, E., Coleman, H., Lee, D.H., Stainier, D.Y.R., & Yelon, D. (2003) *Development*, 130, 6121–6129.
- 39) Rottbauer, W., Wessels, G., Dahme, T., Just, S., Trano, N., Hassel, D., Burns, C.G., Katus, H.A., & Fishman, M.C. (2006) *Cir. Res.*, 99, 323–331.
- 40) Sehnert, A.J., Huq, A., Weinstein, B.M., Walker, C., Fishman, M., & Stainier, D.Y.R. (2002) *Nat. Genet.*, 31, 106–110.
- 41) Bendig, G., Crimmler, M., Huttner, I.G., Wessels, G., Dahme, T., Just, S., Trano, N., Katus, H.A., Fishman, M.C., & Rottbauer, W. (2007) *Genes Dev.*, 20, 2361–2372.
- 42) Rottbauer, W., Just, S., Wessels, G., Trano, N., Most, P., Katus, H.A., & Fishman, M.C. (2007) *Genes Dev.*, 19, 1624–1634.
- 43) Rottbauer, W., Baker, K., Wo, Z.G., Hohideen, M.P.K., Cantiello, H.F., & Fishman, M.C. (2001) *Dev. Cell*, 1, 265–275.
- 44) Langenbacher, A.D., Dong, Y., Shu, X., Choi, J., Nicoll, D.A., Goldhaber, J.I., Philipson, K.D., & Chen, J.-N. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 17699–17704.
- 45) Hassel, D., Scholz, E.P., Trano, N., Friedrich, O., Just, S., Meder, B., Weiss, D.L., Zitron, E., Marquart, S., Vogel, B., Karle, C.A., Seemann, G., Fishman, M.C., Katus, H.A., & Rottbauer, W. (2008) *Circulation*, 117, 866–875.
- 46) Itoh-Satoh, M., Hayashi, T., Nishi, H., Koga, Y., Arimura, T., Koyanagi, T., Takahashi, M., Hohda, S., Ueda, K., Nouchi, T., Hiroe, M., Marumo, F., Imaizumi, T., Yasunami, M., & Kimura, A. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291, 385–393.
- 47) Gerull, B., Gramlich, M., Atherton, J., McNabb, M., Trombitas, K., Sasse-Klaassen, S., Seidman, J.G., Seidman, C., Granzier, H., Labeit, S., Frenneaux, M., & Thierfelder, L. (2002) *Nat. Genet.*, 30, 201–204.
- 48) Thierfelder, L., Watkins, H., MacRae, C., Lamas, R., McKenna, W., Vosberg, H.-P., Seldman, J.G., & Seldman, C.E. (1994) *Cell*, 77, 701–712.
- 49) Kawahara, A. (2009) *Inflammation and Regeneration*, 29, 324–328.
- 50) Hla, T. (2004) *Semin. Cell Dev. Biol.*, 15, 513–520.
- 51) Kihara, A., Mitsutake, S., Mizutani, Y., & Igarashi, Y. (2007) *Prog. Lipid Res.*, 46, 126–144.
- 52) Takuwa, Y., Okamoto, Y., Yoshioka, K., & Takuwa, N. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, 1781, 483–488.
- 53) Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G.-J., Card, D., Keohane, C., Rosenbach, M., Hale, J., Lynch, C.L., Rupprecht, K., Parsons, W., & Rosen, H. (2002) *Science*, 296, 346–349.
- 54) Hisano, Y., Kobayashi, N., Kawahara, A., Yamaguchi, A., & Nishi, T. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 1758–1766.
-