

静岡大学大学院  
理工学研究科シンポジウム（第9回）



# 生物学の最前線

～ ゲノム、生物発生、生物適応の観点から見た

生物学の最先端 ～

2005年3月11日（金）午後0時50分から5時30分  
場所 静岡大学理学部C棟C309室

## プログラム

12:50 - 13:00 田中滋康 理工学研究科長 挨拶

13:00 - 13:30 木崎暁子 (静岡大学理学部生物地球環境科学科助教授)  
「トウモロコシの花成制御のしくみを解く」

13:30 - 14:00 鈴木雅一 (静岡大学理学部生物地球環境科学科助教授)  
「ニジマス咽頭派生体の形成と転写調節因子」

14:00 - 14:30 亀田芙子 (北里大学医学部教授)  
「咽頭派生体内分泌器官の形成と分化」

14:40 - 15:10 塩尻信義 (静岡大学理学部生物地球環境科学科教授)  
「肝臓発生における細胞社会学」

15:10 - 15:40 仁科博史 (東京医科歯科大学難治疾患研究所教授)  
「マウスやメダカを用いた肝形成および肝機能の解明」

### 特別講演

15:50 - 16:40 松岡 信 (名古屋大学生物機能開発利用研究センター教授)  
「イネゲノム情報を利用した作物育種の試み  
— 「緑の革命遺伝子」が教えてくれるもの — 」

16:40 - 17:30 武田洋幸 (東京大学大学院理学研究科教授)  
「小型魚類における発生遺伝学とゲノミクス」

### 懇親会

理学部 A527 室で 18:00 より行います。ふるってご参加下さい。

(教職員 5000 円; 院生・学生 1000 円)(申し込みは理学部/塩尻まで)

## トウモロコシの花成制御のしくみを解く

木崎 暁子（静岡大学理学部生物地球環境科学科）

トウモロコシは、イネ、ムギとともに世界の主要穀物であり、その花成制御のしくみを明らかにすることは、その生産性向上のためにも重要な課題である。近年、イネやシロイヌナズナなどのモデル植物を用いた研究により、花成制御にかかわる多くの遺伝子が単離され、そのメカニズムの解明が進んでいる。一方、トウモロコシにおいて花成を制御している遺伝子として単離された *indeterminate 1* (*id1*) 遺伝子は、これまでに単離された花成制御に関わる遺伝子とは異なるのもで、ジンクフィンガーをもつ転写因子をコードしている。また、この遺伝子は未熟葉でのみ発現し、花芽が分化する茎頂では発現していないため、*id1* により制御される花成シグナルは、葉から茎頂へ移動するものと考えられる。

我々は、トウモロコシの花成制御のメカニズムを解明するために、*id1* の下流遺伝子の同定を試みている。まず、*id1* により発現調節される遺伝子を同定するために、ID1 タンパク質の結合配列を同定した。この過程で ID1 タンパク質は4つのジンクフィンガーをもつが、このうち2つのジンクフィンガーのみで 11 bp の配列に特異的に結合するという、ユニークな結合様式をもつジンクフィンガーであることを明らかにした。現在はこの配列およびゲノムのデータベースをもとに、標的遺伝子の同定を試みている。トウモロコシは、イネやシロイヌナズナと異なり、日長などの外部シグナルではなく、齢など内的要因により花芽を形成することから、トウモロコシの花成のメカニズムを明らかにすることで、今まで解明されていない花成制御の仕組みを明らかにできるものと期待される。

# ニジマス咽頭派生体の形成と転写調節因子

鈴木雅一（静岡大学理学部生物地球環境科学科）

鰓裂で特徴づけられる脊椎動物の咽頭部からは生命の維持に重要な様々な器官が分化する。そして、その分化様式は魚類から哺乳類に至る進化の過程である程度の共通性を保ちながらも、成長後少しずつあるいは大きく異なる構造体として変化していく。例えば、内分泌器官の甲状腺、鰓後腺(哺乳類では濾胞傍細胞)、免疫器官の胸腺などはすべての脊椎動物で相同な器官が発生するが、呼吸器官としての鰓は魚類、両生類だけで分化する。私達はニジマスを主な実験動物として咽頭派生体の研究をしているが、本発表ではカルシウム代謝に関与するホルモン・カルシトニン (CT)を産生する鰓後腺の研究を中心に紹介する。

## 1. CT cDNA の解析

ニジマス鰓後腺由来 cDNA ライブラリーから 4 種類のサケ型 CT 前駆体(sCT-Ia、sCT-Ib、sCT-IV、および新規の sCT-V)をコードする cDNA を得た。前駆体は全て、シグナルペプチド、N-プロ CT、sCT、および C-プロ CT から構成されていると予想された。組織分布の解析から、各 sCT はそれぞれが特徴的な組織分布を持ち、固有の局所作用を果たしている可能性があることが推察された。さらに、鰓後腺実質細胞では全てのニジマス sCT の遺伝子発現が著しく高く、特有の転写調節因子が関与していることが示唆された。

## 2. 鰓後腺の個体発生

鰓後腺原基は受精後 17 日目 (17 dpf) の胚で心臓後方の静脈洞と消化管の間に 1 対の細胞塊として確認され、sCT-I mRNA は 1 日遅れの 18 dpf 以降の胚で検出された。また、sCT-I 免疫陽性細胞は 19 dpf (孵化 2 日前) 以降で検出された。20 dpf 以降の胚では、鰓後腺に濾胞様構造が観察された。以上の結果から、18 dpf 以前に鰓後腺細胞の分化に重要な転写因子が発現することが予想された。

## 3. 転写因子の解析

私達はニジマスから 4 種類の Nkx2.1 (a-d) を得た。アミノ酸配列をもとに分子系統樹を作成すると、甲状腺から得られた Nkx2.1a、b、c は魚類特異的なアイソフォームであり、Nkx2.1d は四足類のオーソログであることが示唆された。このうち Nkx2.1d は成魚の鰓後腺で発現量が多く、ラット CT 遺伝子のプロモーターに対して転写促進活性が検出された。鰓後腺の発生過程でも、CT mRNA が検出される以前の 15 dpf の胚の鰓後腺原基で発現が確認された。これらの結果から、Nkx2.1 は CT 遺伝子の発現を促進したり鰓後腺の分化に関与したりしている可能性があると考えられる。

# 咽頭派生体内分泌器官の形成と分化

亀田 芙子（北里大学医学部解剖学）

咽頭領域から重要な内分泌器官が派生する。第3咽頭嚢からは上皮小体と胸腺が、第3鰓弓では鰓弓動脈壁に頸動脈小体が形成される。第4咽頭嚢から鰓後体が形成され、鳥類以下の下等脊椎動物では鰓後体として存続するが、哺乳類では舌盲孔となる咽頭底部から生じる甲状腺と結合し、C細胞として甲状腺内に散在する。分節化を制御するHox遺伝子群のうち、Hoxa3は第3鰓弓に入る神経堤細胞に発現し、第3鰓弓および第3咽頭嚢の分化に関与している。Hoxa3ノックアウト・マウス、神経分化に関与する転写調節因子Mash1 (mammalian *achaete-scute* homologue) ノックアウト・マウス、および神経堤細胞を遺伝的にラベルしたConnexin(Cx)43-lacZトランスジェニック・マウスを用いて甲状腺と鰓後体、上皮小体、および頸動脈小体の発生と分化を調べ、またニワトリ胚でのこれら内分泌器官の発生・分化を哺乳類と比較して検討したので、その結果を報告する。

## 1) 上皮小体

上皮小体の発生は特異的マーカがなかったため不明な点が多かったが、マウス上皮小体原基はSP-1/chromograninA抗体で染色でき、胎生11.5日に第3咽頭嚢背側部から生じることが分かった。Hoxa3<sup>-/-</sup>マウスでは第3咽頭嚢は正常に形成され、また神経堤細胞も第3鰓弓に侵入するが、第3咽頭嚢上皮の分化が阻害されるため、上皮小体は形成されなかった(Kameda et al., J. Histochem. Cytochem. 52:641-651, 2004)。

## 2) 頸動脈小体

頸動脈分岐部に存在する頸動脈小体は、マウスでは交感神経上頸神経節に接している。胎生期上頸神経節由来の神経様細胞が頸動脈小体原基に侵入しグロムス細胞へと分化する。Hoxa3<sup>-/-</sup>マウスでは第3鰓弓動脈が退化するため頸動脈小体は形成されない(Kameda et al., Dev. Biol. 247:197-209, 2002; Kameda et al., Cell Tissue Res. 311:343-352, 2003)。一方Mash1<sup>-/-</sup>マウスでは上頸神経節が欠損するため原基に侵入する神経様細胞はなく、頸動脈小体は支持細胞のみからなっていた。このような結果から、頸動脈小体は由来を異にする2種類の神経堤細胞から構成されると考えられる。

## 3) C細胞の起源

ニワトリ・ウズラのキメラ実験で神経堤細胞が鰓後体に侵入することが示され、またC細胞が多くの神経細胞様の特徴を呈することから神経堤由来細胞として一般に受け入れられてきた。ニワトリ胚で鰓後体の発生を調べると、鰓後体原基は迷走神経下神

経節 (DVG) の近くに形成され、DVG 由来の TuJ1-陽性細胞が鰓後体内に進入し、TuJ1 および *enkephalin* の陽性反応を示す C 細胞に分化した (Kameda, J. *Comp. Neurol.* 359:1-14, 1995; Kameda et al., *Brain Res.* 852:453-462, 2000)。またニワトリ胚鰓後体をラミニン・コート培地上で培養すると、C 細胞は 300  $\mu\text{m}$  におよぶ長い神経突起を突出し、神経細胞と類似の形態を示した (Miura and Kameda, *Brain Res.* 905:1-11, 2001)。一方 Cx43-lacZ マウスにおいて神経堤細胞の移動を調べると、鰓後体およびそれを形成する第 4 咽頭嚢上皮に神経堤細胞が侵入することはなかった。また神経細胞やその前駆細胞と反応する TuJ1 およびネスチン抗体による染色でも、陽性細胞がこれらに侵入することはなかった。Mash1<sup>-/-</sup>マウスにおいて鰓後体の発生を調べると、野生型と同様に鰓後体は正常に形成され、胎生 13.5 日で甲状腺と結合した。野生型マウスでは胎生 14.5 日で鰓後体は C 細胞として甲状腺内に散在、このとき Mash1 を発現し、また TuJ1、CGRP およびソマトスタチンなどの免疫反応を示した。一方 Mash1<sup>-/-</sup>マウスでは鰓後体は甲状腺内で退縮し、C 細胞は欠損した。鳥類とは異なり、哺乳類では内胚葉由来の鰓後体が甲状腺内で刺激を受けて Mash1 を発現し、神経細胞様の特徴を呈する内分泌細胞へと分化すると考えられる。

# 肝臓発生における細胞社会学

塩尻信義（静岡大学理学部生物地球環境科学科）

肝臓は代謝の中心臓器で、その機能的な単位は肝小葉とされるが、その発生メカニズムは長らく不明であった。その理由の一つは、肝臓の発生が他の臓器に比べ非常に複雑で（特に胎児期は造血器官としてはたらく）、扱いにくいということであった。しかし、近年の分子生物学の著しい進展により、肝臓発生の研究は、肝臓発生異常を示す変異動物の人為的作出とその解析など、これまでにない新しい展開を見せている。

私たちは、肝臓の発生のうち、肝臓で作られる胆汁の通路である胆管系に注目し、その上皮細胞の分化を研究することで肝臓発生メカニズムを追求している。成体肝臓において、胆汁は肝細胞で作られ、門脈に沿って連続的に走る樹枝状の胆管系に出た後、胆嚢を経て、十二指腸に分泌される。したがって、胆管系の形成異常は胆汁の腸管への分泌不全とそれに引き続く胆汁の血流への放出（黄疸）にいたり、いくつかの難病が知られる。マウス肝臓の発生過程で、胆管系のでき方を調べてみると、肝芽細胞という実質細胞が門脈周囲に不連続かつデタラメに並んだ後、連続的な胆管系を作る。そしてこれらの初期の胆管前駆体は過剰に形成され、次にそのうちある特定の管だけが選別され、最終的には数の限られる、連続的な胆管系となる。しかもこれらの過程は、マウス個体間で非常に個体差のあるものであり、遺伝的な背景がほぼ同一の近交系マウスを使っても、著しい個体差が見られた。このことは、連続的な胆管の形成が、遺伝子 DNA に一義的に決められているのではなく、細胞の社会レベルでコントロールされていることを示している。細胞が一種の社会を形成し、秩序だった胆管系を形作る自己組織化のメカニズムは大変興味深いものであるが、現在までのところまだよくわかってはいない。

一方、胆管系の発生に異常を来す変異マウスも最近続々作出されてきている。bHLH 遺伝子である Hes1 の欠失は肝外胆管・胆嚢の形成不全を引き起こすと同時に、肝外胆管は膵臓へとその分化を変える。またこの遺伝子欠失マウスで肝臓内の胆管系は正常であるので、肝臓内外の胆管系の起源は異なるものと考えられる。C/EBP は、尿素回路酵素等の肝特異遺伝子群の転写に関わる転写因子であるが、その遺伝子欠失は肝内胆管増生を引き起こす。したがって C/EBP の発現抑制が胆管分化に重要である可能性が高い。本発表では、これらの遺伝子欠失マウスを用いた私たちの研究成果についてもお話ししたい。

# マウスやメダカを用いた肝形成および肝機能の解明

仁科博史（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

発生期の肝形成は、幹細胞である肝芽細胞が内胚葉由来の前腸から発生することから始まる。肝芽細胞は増殖を繰り返した後、胆管上皮細胞や成熟肝細胞へ分化・成熟する。近年の *in vitro* 組織培養系の進歩やノックアウトマウスの解析によって、肝形成に参与する様々な遺伝子が明らかになりつつある。我々もノックアウトマウスの作出によって、ストレス応答性 MAP キナーゼカスケードの SAPK/JNK シグナル伝達経路が肝芽細胞の増殖や生存に必須であることを明らかにしている。本シンポジウムでは“肝芽細胞の増殖を制御する分子機構”や“肝芽細胞の生死を制御する分子機構”について紹介する。また器官形成やヒト疾患のモデル生物として最近注目されている“メダカを用いて行われている肝形成及び肝機能に関する研究”の現状についても紹介する予定である。我々はこれまでに肝臓の大きさや形の異常な肝形成不全変異体や脂質代謝など肝機能に異常のある変異体、さらに脂肪肝になってしまう変異体の単離に成功している。

## 参考文献

- (1) *Development* 126: 505-516 (1999).
- (2) *Dev. Biol.* 250: 332-347 (2002).
- (3) *J. Biol. Chem.* 278: 16595-16601 (2003).
- (4) *Nat. Cell Biol.* 6: 215-226 (2004).
- (5) *Mech. Dev.* 121: 791-802 (2004).
- (6) *J. Biochem.* 136: 123-126 (2004)

## イネゲノム情報を利用した作物育種の試み —「緑の革命」遺伝子が教えてくれるもの—

松岡 信（名古屋大学生物機能開発利用研究センター）

イネ、トウモロコシ、コムギなど人類にとって最重要の穀類は、すべてイネ科に属し、お互いに高いゲノムの相同性（ゲノムシンテニー）を有する。イネはこれらの穀類中で、ゲノムサイズが最も小さいことから、イネ科植物ひいては単子葉植物のモデル生物として位置づけられ、日本を中心とした国際ゲノムコンソーシアムによってゲノム配列の決定が行われた。

イネ育種の歴史は人類がイネを作物として利用し始めた時から始まるが、この育種の歴史の中で最も成功を収めたのが、緑の革命に用いられた短稈多収イネ「IR8」である。我々はイネの短稈のメカニズムに注目して、「緑の革命」に寄与した半矮性遺伝子 *SD1* の単離を行い、*SD1* 遺伝子がジベレリン合成酵素である GA20 酸化酵素をコードしていることを明らかにした（Nature 2001）。

次に、この知見を生かし、*SD1*（GA20 酸化酵素）以外の GA 関連酵素遺伝子を用いて形質転換植物の草丈を人為的に制御する可能性を試みた。GA2 酸化酵素は GA を不可逆的に不活性化する酵素である。我々は GA の不活性化により形質転換植物を矮化させることを目的として、イネから GA2 酸化酵素をコードする遺伝子 *OsGA2ox1* を単離した（Plant Physiol. 2002）。イネ体内で恒常的に発現するアクチンプロモーターで *OsGA2ox1* を発現させた形質転換イネは、極矮性の表現型を示すとともに、GA は生殖器官の分化・発達にも必要であるため、出穂期は著しく遅延し穎花は不稔であった。そこで茎葉の GA 合成に重要な役割を果たしている GA3 酸化酵素遺伝子（*D18*）に着目して、この遺伝子が担っている GA 生合成の場に GA 不活性酵素遺伝子の特異的に発現させることを考えて、*D18* プロモーターにより *OsGA2ox1* を発現させた形質転換イネを作出した。得られた形質転換個体はすべて半矮性の表現型を示す一方、出穂期および花粉稔性には有意差は認められず、穂の生育や粒形も正常であった（Nature Biotech. 2003）。

この結果は、GA 不活性酵素を有効に使うことにより「緑の革命」遺伝子と同等もしくはそれ以上に優良な半矮性イネ品種を作出できることを示している。

## 小型魚類における発生遺伝学とゲノミクス Genomics and developmental genetics in fish model systems

武田洋幸（東京大学大学院理学研究科）

1960年代後半にオレゴン大学で始まったゼブラフィッシュの研究は、1990年代初めの大規模な突然変異体のスクリーニングの成功で、一躍発生学の中心に位置するようになった。一方、メダカは日本で開発された実験系で、性決定や種分化などの研究で優れた業績をあげてきた。ゼブラフィッシュとメダカは進化的に大きく（1.1 から 1.6 億年程度）離れており、使用している遺伝子のレパートリーはかなり異なっていることが期待される。既存の自然突然変異に加えて、ゼブラフィッシュで単離できない新規の変異体を求めてメダカ変異体のスクリーニングが日本の研究室を中心に行われている。実際にユニークな変異体が多数得られており、ゼブラフィッシュとは相補的な実験系と考えられている。最近、全ゲノム配列を決定するプロジェクトがゼブラフィッシュでは 2001 年 2 月より英国サンガーセンターで、メダカでは 2002 年 9 月より国立遺伝学研究所と東京大学の共同プロジェクトとして開始され、それぞれの概要が間もなく明らかになる。すでに公開されている情報を駆使して、突然変異体の原因遺伝子の迅速な単離とゲノム進化の研究が加速している。

我々の研究室ではこのような小型魚類を用いて、脊椎動物の器官形成機構を調べている。今回は突然変異体を用いた実際の解析例とメダカゲノムプロジェクトの現状を紹介したい。