

## 魚類の初期発生期におけるサイトカイン遺伝子群の機能を探る

吉浦康寿<sup>\*1</sup>・乙竹 充<sup>\*1</sup>・伊藤かな子<sup>\*2</sup>

### Expression and function of cytokine genes in the early development of fish

Yasutoshi YOSHIURA<sup>\*1</sup>, Mitsuru OTOTAKE<sup>\*1</sup>, and Kanako ITO<sup>\*2</sup>

**Abstract** Cytokines are a group of proteins that are involved in a variety of immunological and inflammatory reactions. Recently, it has been reported that cytokine genes also play an important role during development in mammals. In fish, however little is known about the role of immune-related genes during embryogenesis. Here, we report the expression and function of some cytokines during embryonic development in zebrafish. In RT-PCR analysis, the expression of three cytokines (MIF, IL-1  $\beta$  and TNF-  $\alpha$  2) was detected before the development of the immune system in zebrafish embryos. Moreover, to elucidate the function of MIF during embryonic development in fish, we examined expression patterns and function of the zebrafish MIF gene using antisense morpholino-mediated knockdown (morpholino oligonucleotide-MO). In whole-mount *in situ* hybridization analysis, zebrafish MIF mRNA was detected in developing eyes, tectum, branchial arches, pectoral fin buds, liver and gut. MIF-MO-injected embryos (morphants) displayed malformed eyes, abnormal swelling in the tectum and fourth ventricle region, and undeveloped jaw cartilage and pectoral fins. An increased number of apoptotic cells in the eye and neural tissues were observed in MIF morphants. These results suggest that MIF is essential for normal embryonic development even at the level of teleost.

**Key words :** cytokine, Macrophage migration inhibitory factor (MIF), early development, zebrafish, morpholino

サイトカインは細胞間の情報を伝達する一群のタンパク質であり、生体防御、発生・形態形成、生殖などの生命現象の様々な場面で重要な働きをすることが知られている。近年、トラフグ、ミドリフグ、ゼブラフィッシュ、メダカ、トゲウオと次々に全ゲノムが解読され、これらの情報を利用して、魚類のサイトカイン遺伝子群の単離が急速に進み、哺乳類サイトカインと相同な一連のサイトカイン遺伝子群が魚類にも存在することが明らかになりつつある。しかしながら、魚類サイトカインの生理機能、生物学的意義については、未だ十分に明らかにされていないのが現状である。特に、初期発生期および仔稚魚期における魚類サイトカ

インの機能に関する報告は殆どない。また魚類に比べて研究が進んでいる哺乳類においても、個体発生が生体外で行えないため、初期発生期におけるサイトカインに関する研究は、成体に関する研究に比べて遅れている。

そこで本研究では、生体外で発生し、その過程が容易に観察でき、実験発生学に適したゼブラフィッシュをモデルとして、魚類の初期発生期におけるサイトカイン遺伝子群の発現動態および機能解析を行い、初期発生期におけるサイトカインの機能を探ることを目的とした。

2008年4月23日 受理 (Received on April 23, 2008)

<sup>\*1</sup> 水産総合研究センター養殖研究所 〒519-0423 三重県度会郡玉城町昼田 224-1 (National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research agency, Hiruta 224-1, Tamaki, Mie 519-0423, Japan)

<sup>\*2</sup> 日本大学生物資源科学部獣医学科 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866 (Department of Veterinary Medicine, College of Bio resource Sciences, Nihon University, Kameino 1866, Fujisawa, Kanagawa, 252-8510, Japan)

### 初期発生期に発現するサイトカイン遺伝子群の同定

まず、ゼブラフィッシュのゲノムデータベースを用いて、サイトカイン遺伝子群のBLASTサーチ等のホモロジー検索およびシンテニー解析を網羅的に行い、多くのサイトカイン遺伝子を *in silico* で同定した。それらの情報を基に、一連のサイトカイン遺伝子群の中でも、炎症性サイトカイン群を中心に、各サイトカイン遺伝子を特異的に増幅するプライマーを設計し、RT-PCRを確立した。次に、これらのRT-PCR法を用いて、初期発生期におけるサイトカイン遺伝子群の発現パターンを調べた。その結果、初期発生期におけるサイトカイン遺伝子群は、以下の4つの発現パターンに分類された。発現パターン①は卵割期から幼生期まで恒常的に強い発現が認められるもの (macrophage migration inhibitory factor: 以下 MIF) (Fig.1A)、発現パターン②は卵割期、胞胚期に強い発現が認められるが、その後、発現が弱くなるもの (IL-1 $\beta$ ) (Fig.2)、発現パターン③は卵割期には発現が認められないが、胞胚期後期から原腸胚期に強く発現し、その後発現が弱くなるもの (TNF- $\alpha$  2) (Fig.2)、発現パターン④は初期発生期において明瞭な発現が認められないもの (TNF- $\alpha$  1, Type1 IFN, IFN- $\gamma$ , IL-12p35, IL-12p40, FasL) (データ未掲載)であった。以上のことから、初期発生期において明瞭な発現が確認されるサイトカインは、MIF、IL-1 $\beta$ 、および TNF- $\alpha$  2 の3つであることが明らかになった。その中でも、MIFは、初期発生期を通じて恒常的に強い発現が認められることから、初期胚において重要な役割を果たすことが予想された。また MIF 遺伝子の成体での発現を調べた結果、調べたすべての器官で強い発現が認められた (Fig.1A)。

### 初期発生期における MIF 遺伝子の発現動態解析

RT-PCRの結果から、初期発生期において MIF が強く発現することが明らかになったが、初期胚における発現部位および時期の詳細は不明である。そこで、初期発生期における MIF の機能を探るために、MIF 遺伝子の初期胚における発現部位および時期を whole mount *in situ* hybridization (WISH) を用いて、より詳細に調べた。その結果を Fig.1C に示す。MIF mRNA は、第一卵割期から胞胚期には、検出されなかった (データ未掲載) が、中期原腸胚期 (受精後 5 時間) には胚全体に弱い発現が認められた (Fig.1C(i))。さらに受精後 14 時間の体節期になると、胚全体の弱い発現に加えて、眼の原器での局所的な発現が観察

された (Fig.1C(iii))。受精後 19 時間になると、眼での発現はより強くなり、さらに中脳での発現も認められた (Fig.1C(v))。受精後 24 時間では、眼領域と頭部神経系 (中脳、小脳および菱脳) での発現が認められた (Fig.1C(vii))。受精後 48 時間では、それまでの器官に加えて、鰓 (咽頭弓) および胸鰭での発現が観察された (Fig.1C(ix and xi))。さらに、この時期の眼について組織切片を作製して調べた結果、眼での MIF の発現は、網膜の幹細胞が存在する分裂が盛んな領域 (ciliary marginal zone: CMZ) であった (Fig.1C(xv))。受精後 72 時間では、眼領域と頭部神経系に加えて、新たに肝臓、消化管での発現が認められた (Fig.1C(xiii))。以上のことから、MIF 遺伝子は、眼、頭部神経系、鰓および胸鰭の各器官が形成される初期に発現することが明らかになった。

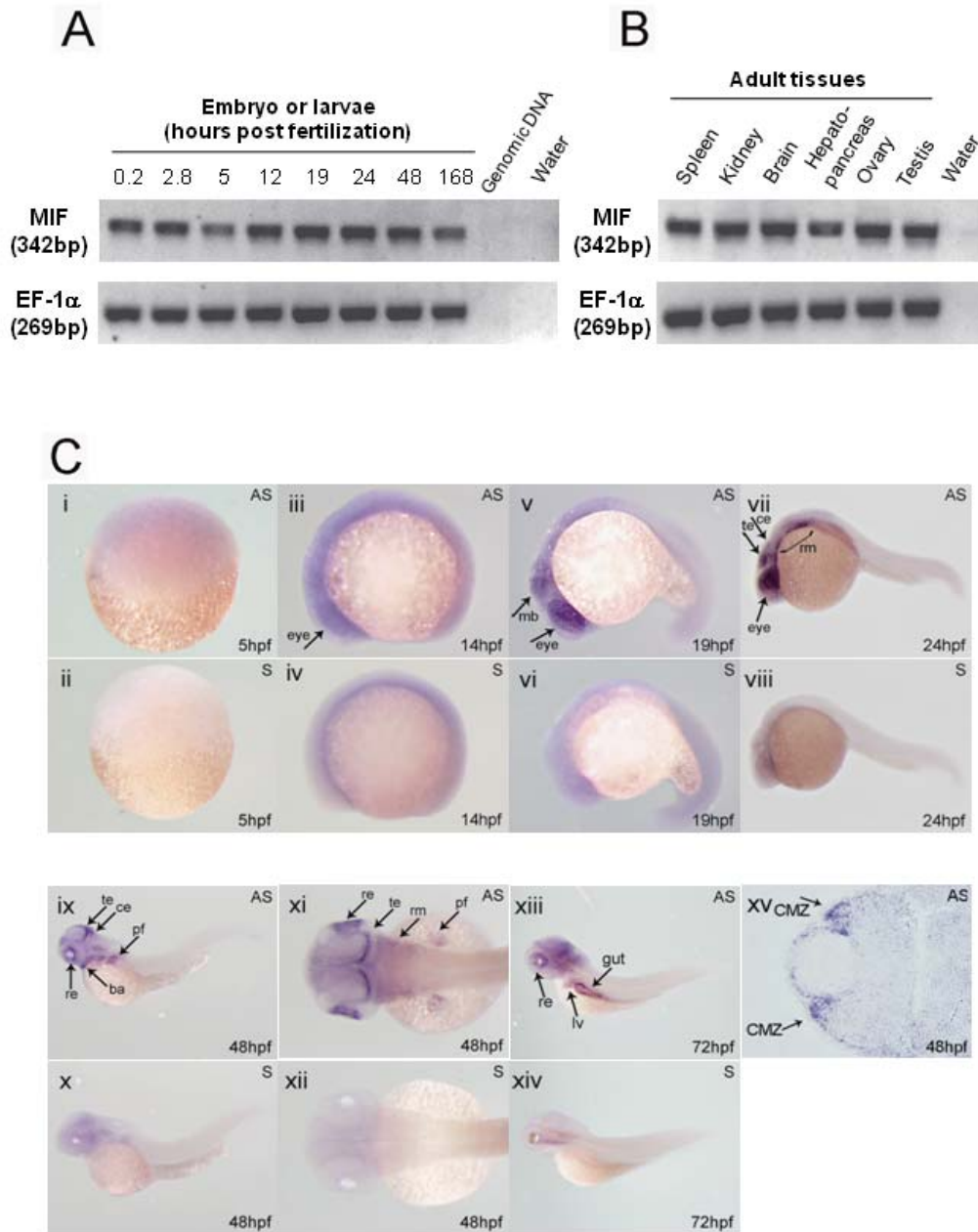
### 初期発生期における MIF 遺伝子の機能解析

初期発生期における MIF の機能を解析するために、モルフォリノオリゴ (MO) による MIF 遺伝子のノックダウン (翻訳阻害) を行った。MIF の mRNA に対する 3 種類のアンチセンス MO を作製し、1-4 細胞期の受精卵の細胞質に顕微注入した。3 種類の MO 注入胚ともほぼ同様な表現型を示したが、3 種類の MO の中で、MO3 が最も効率よく異常な表現型 (注入胚の 66%) を誘導することができた (Table 1)。そこで、以後の翻訳阻害実験はすべて MO3 を用いて行った。MO 注入胚における異常は、受精後 36 時間後に初めて観察され、その表現型は、さらに顕著になった。受精後 36 時間においては、中脳蓋と第 4 脳室が肥大し、菱脳が萎縮した (Fig.3(ii))。受精後 48 時間では、中脳蓋はさらに肥大化し、頭部および眼部は小さく、体全体が彎曲した胚が多く観察された (Fig.3(iv and vi))。受精後 3 日では、これまでの異常はさらに顕著になるとともに、胸鰭および顎の形成不全が認められた (Fig.3(vii, x and xii))。その後、MO 注入胚は、数日生存するが、受精後 7 日までは、すべて死亡した。以上のことから、MIF 遺伝子は、魚類初期発生期において眼、頭部神経系、顎および胸鰭の器官形成に必須であることが明らかとなった。

次に、眼、頭部神経系、顎および胸鰭の器官形成において、MIF がどのような役割を果たしているのかを解明するために、MIF 遺伝子の翻訳阻害がアポトーシスおよび細胞増殖に及ぼす影響を調べた。アポトーシス検出は、MO 注入胚をアクリジンオレンジ染色し、蛍光顕微鏡観察によりアポトーシスを検出した。その結果、MO 注入胚では、形成不全を示す眼、頭部神経系

において顕著なアポトーシスが検出された (Fig.4A)。従って、MO 注入により MIF の発現が抑制されると本来の発現部位でのアポトーシスが誘導されると推察された。また、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

抗体により増殖細胞を免疫組織学的に調べた結果、MO 注入胚の眼では、PCNA 陽性細胞が減少していた (Fig.4B)。以上のことより、MIF は初期発生期の器官形成において成長因子として機能することが示唆された。



**Fig. 1.** Temporal and spatial expression patterns of zebrafish MIF mRNA. (A) RT-PCR results from various stages of embryos and larvae. (B) RT-PCR results from different adult tissues. Molecular weight markers and a control PCR reaction lacking DNA template are shown in the first and last lanes, respectively. EF-1 $\alpha$  is used as a control for cDNA synthesis. Genomic DNA was also used as a control for genomic contamination during the RT-PCR procedure. Amplified zebrafish MIF and EF-1 $\alpha$  are 342 and 269 bp, respectively. (C) In situ hybridization reactions of embryos and larvae: Whole-mount embryos or larvae at 5 hpf (i, ii), 14 hpf (iii, iv), 19 hpf (v, vi), 24 hpf (vii, viii), 48 hpf (ix-xii) and 72 hpf (xiii, xiv). Lateral views with anterior to the left (i-x, xiii, xiv). Dorsal views with anterior to the left (xi, xii). Frontal sections of 48 hpf embryos at the level of the eye (xv). Abbreviations: ba, branchial arches; ce, cerebellum; CMZ, ciliary marginal zone; lv, liver; mb, midbrain; pf, pectoral fins; re, retina; rm, rhombomere; te, tectum; AS, antisense probe; S, sense probe. (From Ito *et al.*, 2008a)

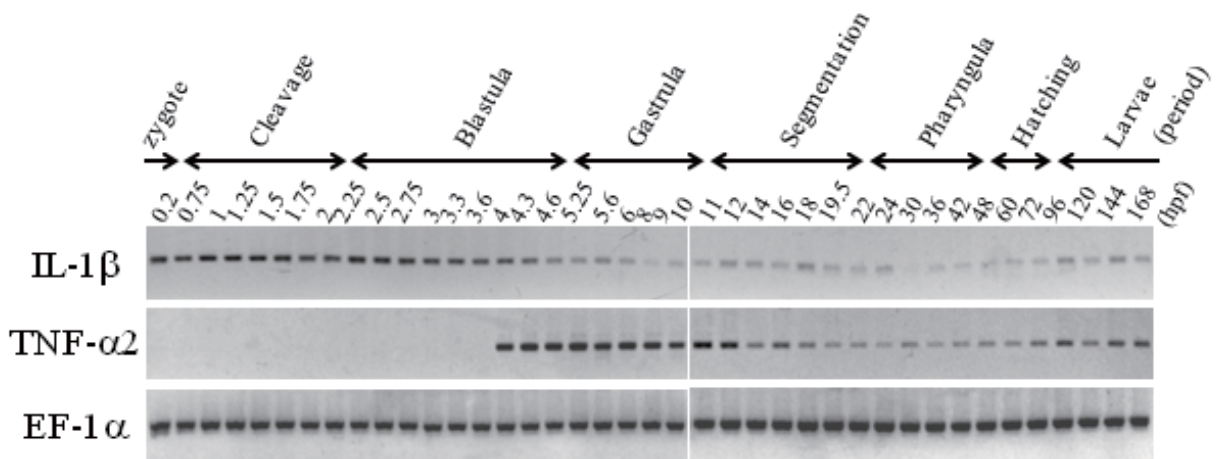


Fig.2. Expression of IL-1  $\beta$  and TNF-  $\alpha$  2 mRNAs during embryonic zebrafish development. RT-PCR results from various stages of embryos and larvae. The developmental stages examined were as follows: 0.2 (hpf) (zygote period), 0.75 hpf to 2 hpf (cleavage period), 2.25 hpf to 4.6 hpf (blastula period), 5.25 hpf to 10 hpf (gastrula period), 11 hpf to 22 hpf (segmentation period), 24 hpf to 42 hpf (pharyngula period), 48 hpf to 72 hpf (hatching period) and 96 hpf to 144 hpf (early larval period). hpf represents hours post fertilization. (From Ito *et al.*, 2008b)

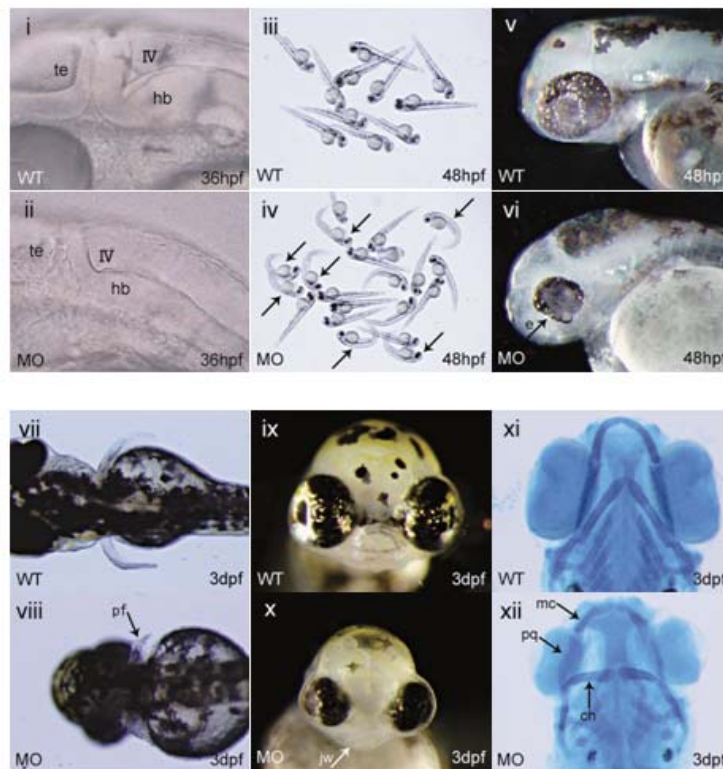
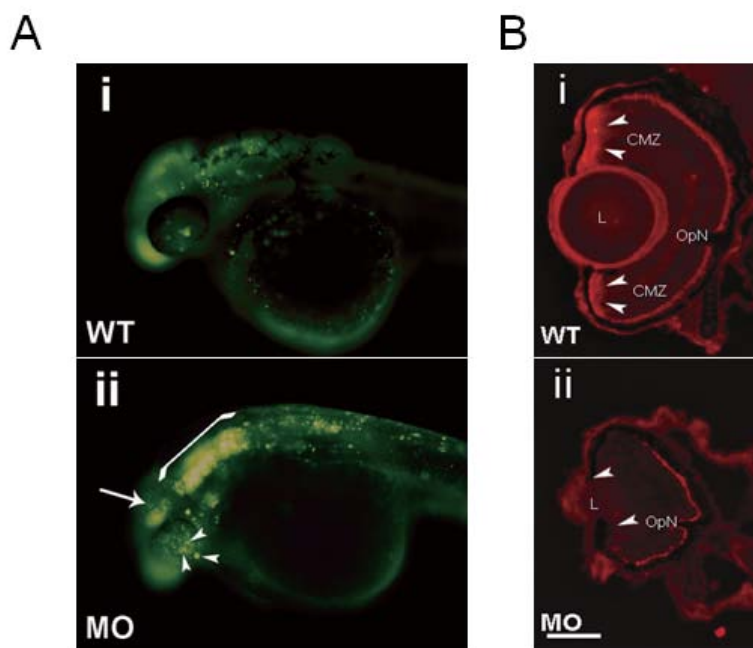


Fig.3. MIF-knockdown phenotypes in zebrafish. Morphology of wild-type embryos (WT) and MIF morphants (MO) observed at the times indicated. Lateral views with anterior to the left (i, ii, v, vi). Dorsal views with anterior to the left (vii, viii). Frontal views with dorsal to the top (ix, x). Ventral views with anterior to the top (xi, xii). At 48 hpf, morphants have a slightly smaller head than wild-type and curled tail (iv; arrow), small eyes (vi; arrow). At 3 dpf, morphants lack normal pectoral fins (viii; arrow) and jaws (x; arrow). Three dpf larvae stained with alcian blue (xi, xii). Abbreviations: ch, ceratohyal; e, eye; hb, hindbrain; jw, jaw; mc, Meckel' s cartilage; pf, pectoral fins; pq, palatoquadrate; te, tectum; IV, the fourth ventricle. (Modified from Ito *et al.*, 2008a)



**Fig. 4.** Comparison of apoptotic cells and proliferative cells between morphants and wild-type embryos. (A) Detection of apoptosis in MIF morphants. Wild-type embryos (i) and MIF morphants (ii) at 36 hpf are stained with acridine orange. Lateral views with anterior to the left. Excess cell death is detected in the eyes (arrow heads), tectum (arrow) and hindbrain region (bracket) in MIF morphants. (B) Comparison of proliferative cells between morphant and wild-type eyes. PCNA-positive cells are detected at the retinal margin of a wild-type eye at 5 dpf (i; arrow heads), while few signals are detected in the morphants (ii; arrow heads). Frontal views with dorsal to the top. Abbreviations: CMZ, ciliary marginal zone; OpN, optic nerve. The scale bars indicate 50  $\mu$ m. (Modified from Ito *et al.*, 2008a)

**Table 1** Effects of morpholino-mediated knockdown of zebrafish MIF (From Ito *et al.*, 2008a).

Morpholino oligos	Total embryos	No. (%) of embryos with normal or abnormal phenotypes		
		Normal	abnormal	lethal
MO1	331	182 (55)	72 <sup>a</sup> (22)	77 (23)
MO2	881	380 (43)	308 (35)	193 (22)
MO3	915	76 (8)	602 (66)	237 (26)
Control morpholino*	69	64 (93)	0 (0)	5 (7)

<sup>a</sup> Number of embryos with abnormal phenotypes, i.e., abnormal swelling in the tectum region, small malformed eye at 48 hpf (see Fig.3). \* :control morpholino is relative to MO2.

## おわりに

本研究によって、魚類の初期発生期におけるサイトカイン遺伝子群の機能の一端を明らかにすることができた。初期発生期において発現するサイトカイン遺伝子群を網羅的に調べた結果、3種類の炎症性サイトカイン (MIF、IL-1 $\beta$ 、およびTNF- $\alpha$  2) が、初期発生期において発現することが明らかになった。その中で、初期発生期を通じて恒常的に強い発現が認められるMIFに関しては、WISHによる詳細な発現解析の結果、眼、頭部神経系、鰓および胸鰭の各器官が形成される初期に発現することが明らかになった。さらに、MOによるMIF遺伝子の翻訳阻害により、MIFが発現する各器官において形成不全が誘導された。以上のことから、MIF遺伝子は、魚類初期発生期において眼、頭部神経系、鰓および胸鰭の器官形成に必須であることが明らかとなった。

一方、MIF以外のサイトカイン遺伝子の機能の解明に関しては、十分な成果を得るには至らなかった。その原因としては、MOは発生のごく初期に機能する遺伝子については有効であるが、発生の後期やそれ以降のステージで機能する遺伝子のついては、機能を阻害することができないことが挙げられる。当然、稚魚や成魚における機能も阻害することはできない。この問題を克服する遺伝子機能解析法として、遺伝子破壊(ノックアウト)が最も有効な手段であるが、脊椎動物で遺伝子破壊ができるのはマウスだけであった。しかし、近年、魚類でも遺伝子破壊実験系がゼブラフィッシュ(Wienholds *et al.*, 2002)およびメダカ(Taniguchi *et al.*, 2006)で確立され、魚類でも遺伝子破壊が可能になった。現在、メダカの遺伝子破壊実験系を確立した京都大学のグループと共同研究により、サイトカイン遺伝子のノックアウトメダカの作製を試みている。今後、各種のサイトカインおよび免疫関連遺伝子について、ノックアウト個体を作製することにより、魚類の免疫系や生体防御機能の初期発生機構の解明が飛躍的に進展することが期待される。

## 文 献

- Ito K., Yoshiura Y., Ototake M., and Nakanishi T., 2008a: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is essential for development of zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Comp. Immunol.*, 32:664-672.
- Ito K., Takizawa F., Yoshiura Y., Ototake M., and Nakanishi T., 2008b: Expression profile of cytokine

and transcription factor genes during embryonic development of zebrafish, *Danio rerio* *Fisheries Sci.*, 74:391-396.

Taniguchi Y., Takeda S., Furutani-Seiki M., Kamei Y., Todo T., Sasado T., Deguchi T., Kondoh H., Mudde J., Yamazoe M., Hidaka M., Mitani H., Toyoda A., Sakaki Y., Plasterk RH., and Cuppen E., 2006: Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis. *Genome Biol.*, 7(12):R116.

Wienholds E., Schulte-Merker S., Walderich B., and Plasterk RH., 2002: Target-selected inactivation of the zebrafish rag1 gene. *Science*. 297(5578):99-102.