

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目： 若手研究（スタートアップ）

研究期間： 2007 ~ 2008

課題番号： 19870021

研究課題名（和文） 非定型ミオシン I による左右非対称性に必要な結合因子の探索

研究課題名（英文） Exploration of the partners of unconventional Myosin I involved in left-right asymmetric development

研究代表者

前田 礼男（MAEDA REO）

東京理科大学・基礎工学部 生物工学科・助教

研究者番号： 40453831

研究成果の概要：

左右相称動物の多くは、その内臓器官や外部形態に左右非対称性を示す。我々は、これまでの研究から、ショウジョウバエにおいて、非定型ミオシン I ファミリーに属する Myo31DF をコードする遺伝子の突然変異体では、胚の中腸と後腸の左右性が 80% 以上の頻度で逆転することを明らかにしている。本研究では、左右非対称性の分子的機構を明らかにするために、Myo31DF と複合体を形成する因子を生化学的手法を用いて探索した。その結果、Myo31DF の挙動を制御することが示唆される因子やアクチン細胞骨格系の制御に関与することが示唆されている因子を同定することに成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,200,000	0	1,200,000
平成 20 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	420,000	3,020,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：遺伝子、消化管、発生、左右非対称性、ショウジョウバエ、ミオシン、アクチン細胞骨格、TAP

1. 研究開始当初の背景

左右相称動物の多くは、内臓器官や外部形態に左右非対称性を持つことが知られている。左右非対称な形態は、これらが正常に機能する上で重要であることがある。たとえば、ヒトの心臓は、複数の組織が左右非対称に配置することで複雑な機能をはたしていることが知られている。左右非対称性の形成機構に関する研究は、脊椎動物を中心に行われており、その機構が明らかになりつつある。脊

椎動物では、共通して、*nodal*、*lefty*、*pitx2* など遺伝子が左側特異的に発現しており、これらの突然変異体や機能阻害した個体では、内臓器官の左右非対称性が異常になることが知られている。しかしながら、最初の左右対称性が破れる段階については、まだ十分には理解されていない。たとえば、マウスやゼブラフィッシュでは、結節（node）に存在する単繊毛の回転により胚体外液の一方向の流れが生じ、この流れが最初の対象性の破れ

を生むと考えられている（ノード流モデル）が、その他の脊椎動物においては、ノード流以外の機構で左右対称性の破れが生じていることが示唆されている。また、脊椎動物以外の動物門では、結節に相当する部位がなく、ノード流モデルでは左右非対称性の形成を説明することはできない。このことは、多くの動物門においては、ノード流以外の機構で、左右非対称性が形成されていることを示している。しかし、分子レベルでの機構は、ほとんど明らかになっていない。

我々は、遺伝学的手法を駆使できる、ショウジョウバエを用いて左右非対称性の形成に関わる遺伝子の網羅的探索を行ってきた。その結果、非定型ミオシンIファミリーに属する *Myo31DF* の突然変異体胚においては、胚の消化管の左右非対称性が 80%以上の頻度で逆転することが明らかにしている (Hozumi et al., Nature, vol.440, 798-802, 2006)。また、*Myo31DF* の突然変異体は成虫まで生存可能であり、成虫の消化管や精巣、雄性外生殖器においても、左右非対称性の逆転が観察される (Hozumi et al., Nature, vol.440, 798-802, 2006, Speder et al., Nature, vol.440, 803-807)。このことから、*Myo31DF* 遺伝子は、左右非対称性の形成において、重要な役割をはたしていることが考えられる。特に、突然変異体でみられる表現型が、左右非対称性のランダム化ではなく、逆転しているという点から、最初の極性形成に関与していることが推測された。したがって *Myo31DF* の機能を明らかにすることで、ノード流モデルとは異なる、まったく新しい左右非対称性の形成機構を提唱できる可能性が期待された。

2. 研究の目的

ショウジョウバエの胚の消化管は、大きく分けて、前腸、中腸、後腸の3つの領域から構成されており、それぞれが一定の左右非対

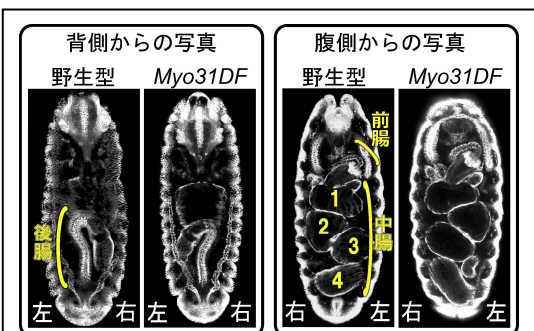


図1 ショウジョウバエ消化管は、前腸、中腸、後腸から構成されており、一定の左右非対称性を示す（野生型）。一方、*Myo31DF* 突然変異体では、後腸と中腸の左右非対称性が 80%以上の頻度で逆転する。

称性を示す（図1）。この左右非対称性を指標に、左右性が異常になる遺伝子を網羅的に探索した結果、中腸と後腸の左右性が 80%以上の頻度で逆転する *Myo31DF* 突然変異体を同定している（図1）。この突然変異体の表現型は、ショウジョウバエの左右性は逆転した状態がデフォルトであり、*Myo31DF* が、デフォルトの逆位をさらに逆転させていることを示している。*Myo31DF* は、アクチンフィラメントのプラス端方向に移動するモータータンパク質であることが知られていることから、アクチン細胞骨格の左右非対称性の形成への関与が考えられた。野生型の胚において、Moesin のアクチン結合ドメインを強制的に後腸で発現させると、後腸の左右非対称性がランダム化した。同様の実験を、*Myo31DF* 突然変異体胚において行ったところ、*Myo31DF* 突然変異体胚においても、左右非対称性がランダム化することがわかった。強制発現させたアクチン結合ドメインがアクチン細胞骨格の正常な機能を阻害していると考えられ、これらの結果から、アクチン細胞骨格とミオシンモータータンパク質に依存した左右非対称性の形成機構の存在が示された。

一般的に、ミオシンモータータンパク質は、アクチン細胞骨格に結合する頭部領域、挙動の制御に関与する首部領域、積荷を結合する尾部領域から構成されている。このことから、*Myo31DF* の首部領域に結合している因子が *Myo31DF* の機能を制御している可能性や、尾部領域に積荷として結合している因子が、細胞内で左右非対称に分布することで、各細胞に左右の位置情報を与えている可能性を推測した。そこで、本研究課題では、*Myo31DF* と結合する因子を、生化学的手法と質量分析計を用いて同定し、左右非対称性の形成における機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Myo31DF 遺伝子は、アクチン細胞骨格に結合する非定型ミオシンファミリーIに属するミオシンモータータンパク質をコードしている。このことから、この *Myo31DF* が運んでいる積荷、および *Myo31DF* の挙動を制御する因子を同定することで、左右非対称性の形成における *Myo31DF* の機能を明らかにできると推測した。結合因子の同定方法として、二段階精製法である TAP (Tandem Affinity Purification)法と質量分析法を用いた。本研究では、ショウジョウバエの組織抽出液を用いてアフィニティー精製をするために改良された新しい TAP タグ(FLAG タグと His タグから構成)を用いた。この TAP タグ

を用いることで、通常の TAP タグを用いた場合よりも、高効率・高純度で精製可能なことが報告されている (Yang et al., *Proteomics*, vol.6, 929-935, 2006)。

Myo31DF の cDNA から、尾部領域のみ、首部領域と尾部領域の合わせた領域、および全長領域を PCR 法を用いて増幅し、それぞれ TAP タグの DNA 断片とともに、ヒートショックプロモーターの制御下で発現誘導が可能な形質転換用ベクターにサブクローニングした。これらの形質転換用ベクターをシウジョウバエの胚にインジェクションし、トランスジェニックシウジョウバエを作成した。作成したトランスジェニックバエにヒートショックをかけることで、TAP タグを融合した *Myo31DF* タンパク質を発現させ、タンパク質抽出を行った。得られたタンパク質抽出液は、1 段階目に抗 FLAG 抗体が結合したビーズを用いて精製を行い、2 段階目に His タグ精製レジンを用いた精製を行った。最終精製物は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりタンパク質を分離し、銀染色法で検出を行った。ネガティブコントロールのタンパク質抽出液として、野生型のバエを用いた。TAP タグを融合した *Myo31DF* のサンプルに特異的に検出されるバンドを切り出し、MALDI-TOF-MS を用いた質量分析によりタンパク質を同定した。

すると考えられるタンパク質も含まれていた。いずれのタンパク質も、これまでに左右非対称性の形成機構に関与していることは報告されていない。現在のところ、これらの同定された分子と *Myo31DF* が複合体を形成するかどうかを、免疫沈降法により検証している。また、これらの遺伝子の突然変異体における、左右非対称性の形成への影響を調べている。今後、これらの解析が進むことにより、ノード流以外の左右非対称性の形成機構を明らかにできる可能性があると考えている。

4. 研究成果

上記の方法を用い、*Myo31DF* と複合体を形成する可能性のあるタンパク質のバンドを複数検出することができた (図 2)。これまでに、5 つのタンパク質の同定に成功している。同定されたタンパク質のうち 2 つは、アクチン細胞骨格の制御に関わっていることが示唆されている分子であり、左右非対称性の形成に機能している可能性があると考えている。また、同定されたタンパク質うち、ミオシンモータータンパク質の挙動を制御

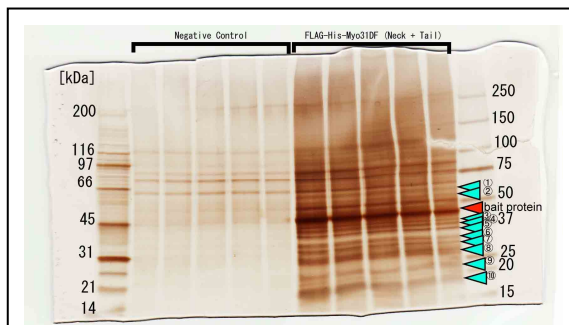


図 2 TAP 法により精製された、*Myo31DF* の尾部領域や首部領域と複合体を形成するタンパク質 (青矢頭)。赤矢頭；TAP タグ融合 *Myo31DF* タンパク質 (尾部・首部領域)

5 . 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Hozumi, S., Maeda, R., Taniguchi-Kanai, M., Okumura, T., Taniguchi, K., Kawakatsu, Y., Nakazawa, N., Hatori, R., and Matsuno, K. Head region of unconventional myosin I family members is responsible for the organ-specificity of their roles in left-right polarity in *Drosophila*. *Developmental Dynamics*, vol.237, 3528-3537(2008)
2. Taniguchi, K., Hozumi, S., Maeda, R., Okumura, T., and Matsuno, K. Roles of type I Myosins in *Drosophila* handedness. *Fly*, vol.1, 287-290 (2007)
3. 前田 礼男、穂積 俊矢、谷口 喜一郎、奥村 高志、松野 健治
ショウジョウバエにおける左右非対称性形成の遺伝学的解析
生化学, 79, 1131-1134 (2007)

[学会発表](計5件)

- 1 . Reo Maeda, Doctor no and Ken and Barbie are involved in the left-right asymmetrical development of the *Drosophila* embryonic gut, The 50th Annual Drosophila Research Conference, 平成21年3月4日から8日, シカゴ(アメリカ合衆国)
- 2 . 前田 礼男, Doctor no and Ken and Barbie are involved in the left-right asymmetrical development of the *Drosophila* embryonic gut, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学大会 合同大会, 平成20年12月9日から12日, 兵庫県神戸ポートピアアイランド
- 3 . 前田 礼男, Doctor no and Ken and Barbie are involved in the left-right asymmetrical development of the *Drosophila* embryonic gut, 日本発生生物学会第41回大会, 平成20年5月27日から30日, 徳島県郷土文化会館

4 . Reo Maeda, Doctor no and Ken and Barbie are involved in the left-right asymmetrical development of the *Drosophila* embryonic gut, The 49th Annual Drosophila Research Conference, 平成20年4月2日から5日, サンディエゴ(アメリカ合衆国)

5 . 前田 礼男, Roles of *single-minded* in the left-right asymmetric development of the *Drosophila* embryonic gut, 第30回日本分子生物学会年会, 平成19年12月11日から15日, パシフィコ横浜

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織
(1)研究代表者
前田 礼男(MAEDA REO)
東京理科大学・基礎工学部生物工学科・助教
研究者番号: 40453831