

## 自己評価報告書

平成 23 年 4 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2008~2011

課題番号：20247030

研究課題名 (和文) メダカ遺伝学を用いた脊椎動物体軸形成機構の解析

研究課題名 (英文) GENETIC ANALYSIS OF AXIS FORMATION IN VERTEBRATES USING MEDAKA

## 研究代表者

武田 洋幸 (TAKEDA HIROYUKI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：80179647

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：器官形成、左右軸、背腹軸、メダカ、突然変異体

## 1. 研究計画の概要

(1) 左右軸変異体 *ktu* の原因遺伝子の機能解析を行う。これまでの表現型の解析から *Ktu* は繊毛・鞭毛のダイニンアーム形成に必須な新規タンパク質であり、その分布は細胞質中だけにみられる。特に繊毛研究のツールが少ないメダカを離れて、主にマウスとクラミドモナスを用いてさらなる機能解析を実施する。

*ktu* 変異体は、ヒトにおいて高頻度 (1:1000 live birth) 発症し、治療法がない多発性嚢胞腎 (PKD) を必ず発症する。この発症過程を、メダカの透明な特性を生かして、*ktu* 変異を導入した透明メダカ + GFP トランスジェニック個体 (腎臓が特異的に GFP を発現する系統は樹立済み) のライブイメージングで解析する。並行して、画像解析ソフトを用いた組織学的解析も行う。

(2) 左右軸変異体 *abc* の原因遺伝子も機能未知のタンパク質をコードしていることが判明している。ドメイン構造からイオンチャンネルに関係した膜タンパク質であると予想されている。本研究では、左右軸変異体 *abc* の原因遺伝子の機能を解析し、左右軸形成メカニズムに迫る。

(3) メダカ *Da* 変異体は *Zic* 遺伝子の調節領域の異常により、体節背側での発現が消失して、その結果体幹部の背腹軸異常がおこると考えられている。本研究では、体節エンハンサーの特定と *Da* 変異の確定を目指し、後期発生における背腹軸形成にメカニズムを解明する。具体的には、体節細胞の移植実験を野生型と変異体間で実施し、体節が体型と色素細胞の変化の直接の原因かどうか特定する。また、*medaka microarray* を用いて、野生型と *Da* 胚体節間で網羅的な遺伝子発現

プロフィールを比較する。

## 2. 研究の進捗状況

(1) *ktu* 変異体は繊毛の運動性が喪失するもので、研究の過程でヒト遺伝病である繊毛病の新しい原因遺伝子が判明した。*ktu* がコードするタンパク質はダイニン複合体の細胞質内での形成に必須なもので、生物界に広く存在する運動性細胞小器官、繊毛・鞭毛の複雑な形成過程の一端が明らかになった。この成果を論文発表した (Omran et al., Nature 2008)。

(2) *abc* の原因遺伝子である *pkd111* は、様々なセンサーとして働く PKD family の 1 つと考えられた。我々は、免疫沈降と免疫染色により、*Pkd111* が *Pkd2* と複合体を作り、KV 上の繊毛に共局在することを示した。従って、*Pkd111/Pkd2* 複合体が KV の動く繊毛にある nodal flow 直下のセンサーであることが示唆された。我々は、KV の繊毛は、nodal flow によって KV 内にモルフォゲンの濃度勾配を作り出すと共に、*Pkd111/Pkd2* を介してそれを感知するという 2 つの役割を担っていると結論付けた (Kamura et al., Development 2011)。

(3) *Da* 変異体において、遺伝学的に絞り込まれた原因領域にトランスポゾン様の巨大な DNA 断片が挿入され、そのため *zic1/4* (*Zinc-finger* 型転写因子をコードする) の発現が体節背側で特異的に消失していることを突き止めた。さらにこの領域に体節エンハンサーが存在していることも解明した。

体節組織が原因であることを確かめるため、正常胚と *Da* の体節交換移植実験を行った。その結果、体節が表皮の色素やヒレのパターンを初期胚から成体にわたって制御し

ていることが判明した。これらの成果は現在論文にまとめている。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

### 4. 今後の研究の推進方策

以下の研究を最終年度に実施する予定である

(1) Ktu タンパク質が細胞質中でどのようにダイニンと相互作用しているか、また Ktu 類似タンパク質との役割の違いを解析する。また、*ktu* 変異体での嚢胞腎の発生過程と細胞自律性も検討する

(2) *Abc/Pkd111* が感知するシグナルの実態に迫るべく、機能ドメインの同定を試みる。

(3) *Zic 1/Zic4* の下流標的遺伝子群をマイクロアレイを用いて同定し、*Zic* を中心として背側決定の遺伝子ネットワークを明らかにする。

### 5. 代表的な研究成果

(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6件)

- ① Kamura, K., Kobayashi, D., Uehara, U., Koshida, S., Iijima, N., Kudo, A., Yokoyama T. & Takeda, H. Pkd111 complexes with Pkd2 on motile cilia and functions to establish the left-right axis. *Development* 138: 1121-9 (2011) 査読有
- ② Takeda H. & Shimada, A. The art of medaka genetics and genomics: what makes them so unique? *Ann Rev Genet* 44: 217 - 241. (2010) 査読有
- ③ Sato, A., Koshida, S. & Takeda, H. Single-cell analysis of somatotopic map formation in the zebrafish lateral line system. *Dev Dyn* 239, 2058-65. (2010) 査読有
- ④ Ishimatsu, K., Takamatsu, A. & Takeda, H. Emergence of traveling wave in the zebrafish segmentation clock. *Development* 137, 1595-9. (2010) 査読有
- ⑤ Tsuda, S., Kitagawa, T., Takashima, S., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Shima, A., Tsutsumi, M., Hori, H., Naruse, K., Ishikawa, Y. & Takeda, H. FAK-mediated extracellular signals are essential for interkinetic nuclear migration and planar divisions in the neuroepithelium. *J Cell Sci* 123, 484-96. (2010) 査読有
- ⑥ Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N. T., Hagiwara,

H., Zhang, Q., Leblond, G., Toole, E. O', Hara, C., Mizuno, H., Kawano, H., Fliegauf, M., Yagi, T., Koshida, S., Miyawaki, A., Zentgraf, H., Seithe, H., Reinhardt, R., Watanabe, Y., Kamiya, R., Mitchell, D. R., Takeda, H. Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature*, 456, 611-616, (2008) 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① Moriyama, Y., Nakamura, R., Kawanishi, T., Shimada, A., Takeda, H. "The zic genes as master regulators in dorsoventral patterning of the fish trunk structures" 2nd Joint Meeting of the SFB and JSDB, Paris, France, May 26-28, 2010
- ② Sato, A., Koshida, S., Takeda, H. "Single-Cell Analysis of Somatotopic Map Formation in the Zebrafish Lateral Line System" 2nd Joint Meeting of the SFB and JSDB, Paris, France, May 26-28, 2010
- ③ Shimada, A., Kawanishi, T., Inohaya, K., Takeda, H. "Embryonic origin of osteoblasts in scales and fins of medaka fish" 2010 SDB-JSDB Joint Meeting, Albuquerque, U.S.A. August 5-9, 2010
- ④ Kawanishi, T., Moriyama, Y., Nakamura, R., Shimada, A., Takeda, H. "zic1 and zic4 expression in the somite regulates dorsalization of the fish trunk structures" 2010 SDB-JSDB Joint Meeting, Albuquerque, U.S.A. August 5-9, 2010
- ⑤ Takeda, H. "Mesodermal origin of scales and fins of the medaka - Insight into origin and evolution of mineralized skeleton in vertebrates" JSDB-GFE Joint Meeting of Developmental Biology, Dresden, Germany, March 23-26, 2011