

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 31日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870008

研究課題名（和文） 後期発生における背腹パターン形成機構の普遍性と分子メカニズム

研究課題名（英文） the molecular mechanism of dorso-ventral patterning in late stages of development

研究代表者

塚原 達也 (TSUKAHARA TATSUYA)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：90586413

研究成果の概要（和文）：

我々は、脊椎動物の後期発生において背腹での細胞・組織のパターンを形成する普遍的制御機構を分子レベルで解明することを目的とし、体節および体節由来組織の背側で発現することで外部形態の背腹パターンを制御する転写因子 *Zic1/Zic4* の分子機能を解析した。我々は、*Zic1/Zic4* の体節における発現が特異的に消失したメダカ変異体 *Da* を用いた網羅的遺伝子発現解析により *Zic1/4* の下流遺伝子を同定し、*Zic1/Zic4* が背腹で Notch シグナルの活性レベルを変化させることで背側特異的形態形成に関わる可能性を見出した。さらに、*Zic1/4* の保存された機能および発現制御を明らかにするためマウスを用いた解析も行った。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the molecular function of transcription factors *Zic1/Zic4*, which express in dorsal somites and regulate dorso-ventral patterning of body trunk. We performed transcriptome analyses using *Da* mutants, which lost the expression of *Zic1/Zic4* specifically in somites and identified several downstream genes of *Zic1/Zic4*. We found that the modulator of Notch signaling, lunatic fringe, is one of the downstream target of *Zic1/Zic4*, suggesting that *Zic1/Zic4* contribute the dorsal trunk morphology by regulating the activity of Notch signaling. We generated and analyzed several mouse lines to understand the conserved function and expression of *Zic1/Zic4*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

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：後期発生・背腹パターン・*Zic1/Zic4*

1. 研究開始当初の背景

一般に、脊椎動物は背側と腹側で非対称な外形・構造をしている。例えば、スムーズな運動のために背腹で異なる構造をとっており、他個体へのアピールのために目につきやすい背側に複雑な色素模様を作るなど、背腹の構造的違いは個体の生存にとって重要な役割を果たす。このような背腹パターンは発生過程においてどのように形成されるのだろうか。体全体の背腹パターンを決定する機構については、これまで初期胚における BMP およびそのアンタゴニスト (Chordin など) の拮抗関係による背腹軸の形成機構に焦点が当てられてきた。初期の背腹軸形成に異常が生じると神経管や体節などが正常に形成されないため、初期発生における背腹軸の勾配情報は体の基本構造の形成に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、初期発生における情報が後期発生における実際の組織や形態の形成にどのように変換されるのか、あるいは後期発生における背腹パターンがどのように形成されるのか、についてはほとんど知見がない。その大きな理由としては、初期発生における背腹軸形成に異常が生じると胚全体の発生に異常が生じて多くの場合致死となってしまい後期発生における影響を解析できないこと、後期発生における背腹パターンに特異的な異常を生じるような変異体がほとんど存在しないことなどが考えられる。

2. 研究の目的

生物のからだは正常に機能するためには、個々の細胞・組織が正しく機能することに加え、それらが正しい空間的配置 (パターン) をとることが重要である。従って、発生過程においてパターンを形成し、そのパターンを維持していく基本原理を理解することは基礎生物学 (発生生物学) のみならず医学的な観点からも極めて重要であると考えられる。しかし、初期胚において形成された大まかなボディプランの情報が後期発生において実際の細胞・組織パターンに変換される機構は全く知られていない。そこで、申請者は、脊椎動物の後期発生において背腹での細胞および組織のパターンを形成する新規の普遍的制御機構を分子レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

脊椎動物の後期発生における背腹パターンの形成機構を解明するためには、背側体節における *Zic1/Zic4* の分子機能を知ることが重要な手掛かりとなる。*Zic1/Zic4* は転写因子であるため、標的遺伝子の同定を試みた。そのために我々は、*Zic1/Zic4* の体節における発現が特異的に消失したメダカ変異体 *Da* を利用

した。具体的には、野生型および *Da* 変異体から体節 (16 体節期) を単離し、RNA を抽出した後種類別のトランスクリプトーム解析を行った (マイクロアレイおよび RNA seq)。野生型と *Da* 変異体で発現レベルに大きな差のあった遺伝子についてさらに詳細な解析を行うことで、*Zic1/Zic4* による背側形態の形成機構を明らかにする。また、*Zic1/Zic4* の機能や発現制御機構の保存性を明らかにするため、体節特異的ノックアウトマウスや、*zic1* 遺伝子を H2B-EGFP に置換したノックインマウスなどを作製する (一部のマウスについてはすでに作製済み)。これらの変異マウスの解析により、脊椎動物の背腹パターンを制御する分子機構の普遍性についても明らかにする。

4. 研究成果

Zic1/Zic4 の下流遺伝子を同定するために、我々はマイクロアレイ解析および RNA seq 解析により野生型および *Da* 変異体の体節におけるゲノムワイドでの遺伝子発現プロファイルを明らかにした。*Da* 変異体における発現レベルが野生型の 1/2 以下、あるいは 2 倍以上の遺伝子はそれぞれ 2000、あるいは 1800 程度存在していた。それらの遺伝子のうち whole mount in situ hybridization (WISH) による検出限界以上であると考えられる遺伝子のうち、ハウスキーピング遺伝子および未知の遺伝子を除く 30 の遺伝子について、定量的 RT-PCR および WISH により詳細な発現解析を行った。その結果、*lunatic fringe (lfng)*、*four and a half LIM domain 2 (fhl2)*、*slit1a* という 3 遺伝子を下流遺伝子の候補として同定した。*Da* 変異体に *zic1/zic4* 遺伝子およびその制御領域を含む BAC を導入したトランスジェニック系統においてこれらの遺伝子の発現レベルは野生型と同等に回復していたことから、これらの遺伝子が *Zic1/Zic4* の下流遺伝子であることが明らかとなった。

Lfng は Notch レセプターの糖修飾酵素であり、シグナルの活性レベルを制御する

ことが知られている。今回我々は 16 体節期以降の皮筋節領域において *lfng* が腹側特異的に発現していること、*Da* 変異体においてその発現が顕著に上昇しており、背側に発現が検出されることを見出した (図 1)。したがって、*Zic1/Zic4* が *Lfng* の発現を抑制することで Notch シグナルの活性に背腹での差を生

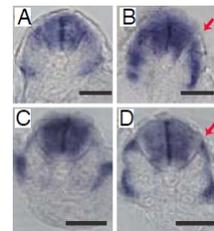


図 1. *lfng* の発現 (体幹部の切片像)
A: wt (16 体節期)
B: *Da* (16 体節期)
C: wt (24 体節期)
D: *Da* (24 体節期)
Scale bar: 130μm

じさせ、背腹パターン形成を制御していることが示唆された。

Fhl2 は転写制御因子として知られ、骨密度の上昇に寄与するという報告があるものの、その発生中の機能についてはほとんど知られていない。我々は、Fhl2 が遅筋前駆細胞で発現しており、その発現が *Da* 変異体で顕著に減少していることを見出した (図 2)。さらに、遅筋の誘導に寄与する転写因子である *prdm1* の発現も *Da* 変異体で減少しており、*Da* 変異体の成魚において遅筋組織の顕著な減少が検出されたことから、*Zic1/Zic4* が Fhl2 の発現を介して遅筋組織の誘導を制御していることが示唆された。

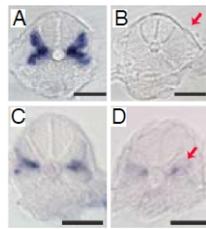


図 2. *fhl2* の発現 (体幹部の切片像)
A: wt (16 体節期)
B: *Da* (16 体節期)
C: wt (24 体節期)
D: *Da* (24 体節期)
Scale bar: 130µm

Slit1a は分泌性のシグナル分子であり、レセプター *Robo1* と相互作用することで細胞の運動などを制御していることが知られている。我々は、*Slit1a* が皮筋節領域で発現しており、*Da* 変異体においてはその発現が減少していることを見出した (図 3)。さらに、*Robo1* の発現を解析したところ、野生型では体節形成期後期において発現領域が体節全域から皮筋節領域へと限局すること、*Da* 変異体においてはそのような限局が観察されないことを明らかにした。したがって、*Zic1/Zic4* は *Slit1a* の発現を介して *Robo1* 発現細胞の移動を制御していることが示唆された。

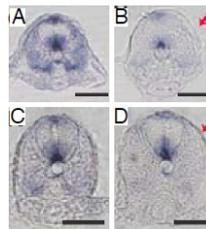


図 3. *slit1a* の発現 (体幹部の切片像)
A: wt (16 体節期)
B: *Da* (16 体節期)
C: wt (24 体節期)
D: *Da* (24 体節期)
Scale bar: 130µm

これらの結果から、*Zic1/Zic4* による体幹部の背腹パターン形成の分子機構として、Notch シグナルや *Slit-Robo* シグナルなどを介した制御や、Fhl2 などの転写因子を介した制御が寄与する可能性が示唆された。現在、特に Notch シグナルの寄与に着目し、体節背腹における Notch シグナルの活性の差や、Notch のリガンドである *Delta* および *Jagged* の発現、Notch シグナルの阻害剤の背腹パターン形成への影響などを解析している。

これらのメダカを用いた解析に加え、我々はマウスを用いた解析も行っている。マウスの体節における *Zic1/Zic4* の機能を明らかにするため、体節特異的に *zic1/zic4* 両遺伝子を

ノックアウトするマウス、およびメダカの解析から明らかになった体節エンハンサーを含む領域のマウスにおける相同領域 (約 400kb) をノックアウトするマウスを現在作製中である。また、エンハンサー領域の保存性を検討するため、すでにメダカの体節エンハンサーを含むゲノム領域 (約 40kb) に heat shock promoter および EGFP を付加したコンストラクトを導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作製している。Tg マウスでは体節背側における EGFP の発現が観察されたことから、メダカとマウスで共通の発現制御機構が存在することが示唆された。さらに、*zic1* を H2B-EGFP で置換したノックインマウスも作製しており、そのマウスにおいて出生後まもなくの背側および腹側真皮 (体節由来組織) を単離・培養したところ、背側における GFP の発現が一ヶ月以上にわたり維持されることが明らかとなった (図 4)。この結果は、*zic1* の発現が出生後細胞自律的に維持されることを示唆している。メダカにおける解析から、胚期においては *zic1* の発現は外部からのシグナルにより細胞非自律的に制御される一方、孵化後においてはエピジェネティックな制御により発現が細胞自律的に維持されることを示唆する結果が得られている。現在、マウスにおける胚期の発現制御機構についても解析しており、胚期から成体まで長期間にわたり発現し続ける *zic1* の普遍的な発現制御機構を明らかにできる可能性がある。

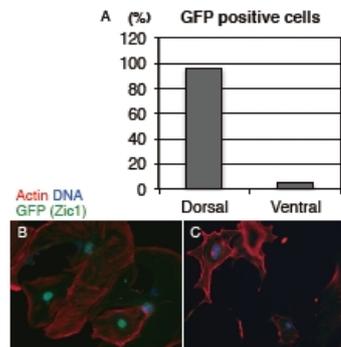


図 4. ノックインマウスの真皮細胞

A: 細胞単離 1 週間後の GFP

陽性細胞の割合 (N > 130)

B, C: 単離 1 ヶ月後の真皮細胞

B: 背側、C: 腹側

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1件)

① Moriyama Y, Kawanishi T, Nakamura R, Tsukahara T, Sumiyama K, Suster ML, Kawakami K, Toyoda A, Fujiyama A, Yasuoka Y, Nagao Y, Sawatari E, Shimizu A, Wakamatsu Y, Hibi M, Taira M, Okabe M, Naruse K, Hashimoto H, Shimada A, Takeda H, “The Medaka *zic1/zic4* Mutant Provides Molecular Insights into Teleost Caudal Fin Evolution”, *Current biology* (published on line at 3/1 2012), vol. 22, 601-607, 2012,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.063>

〔学会発表〕(計2件)

① Yoshikawa K, Nishimura T, Tanaka M, Shigenobu S, Saito TL, Yoshimura J, Morishita S, Tsukahara T and Takeda H, “The identification of the downstream genes of *Zic1/Zic4*, key regulators of dorso-ventral patterning”, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13～16日

② 塚原達也, “*Zic1/Zic4*による背腹パターン形成機構の普遍性と分子メカニズム” 新学術領域(秩序形成ロジック) 第一回班会議、2010年10月10～13日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚原 達也 (TSUKAHARA TATSUYA)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：90586413

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし