

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370091

研究課題名(和文) ショウジョウバエ胚における左右極性の形成機構に関する研究

研究課題名(英文) Analyses of left-right symmetry breaking process in *Drosophila*

研究代表者

松野 健治 (Matsuno, Kenji)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60318227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：動物の左右非対称性の形成機構は、進化的に多様であり、未知の機構の存在が予測される。ショウジョウバエでは、胚消化管などの多くの器官が左右非対称性を示すが、その形成過程で最初の左右極性ができる機構は不明である。本研究の目的は、ショウジョウバエの左右非対称性形成の初期段階を解析し、左右極性の実体を明らかにすることを目的とする。

胚消化管の左右非対称な変形に先だって、内臓筋の核が、Wntシグナルによる制御を受けて左右非対称に移動することを示した。消化管の左右非対称性の形成で機能する初期の遺伝的経路では、extra macrochaetaeがdaughterlessを抑制していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Animals often show left-right (LR) asymmetry in their body structures. In some vertebrates, the mechanisms underlying LR symmetry breaking and the subsequent signals responsible for LR asymmetric development are well understood. However, in invertebrates, the molecular bases of these processes are largely unknown. Therefore, we have been studying the genetic pathway of LR asymmetric development in *Drosophila*. We especially focused on the embryonic gut that is the first organ developing directional LR asymmetry.

In this study, we attempted to understand LR symmetry breaking process in *Drosophila*. We found that the Wnt signaling is required for LR asymmetric development of the embryonic gut before its LR asymmetric morphogenesis. We also found that the early stage of LR asymmetric development of the embryonic gut depend on the function of genetic pathway involving extra macrochaetae-daughterless cascade.

研究分野：発生生物学

キーワード：左右非対称性 左右軸 器官形成 形態形成 Wntシグナル ショウジョウバエ 核移動 内臓筋

1. 研究開始当初の背景

からだの左右非対称性は、左右相称動物の形態の基本的属性の一つであり、正常な左右非対称性形成は、これらの動物の発生に必須な要素である。したがって、個体発生や臓器形成の機構を理解するためには、左右非対称性が形成される仕組みを明らかにすることが必要となる。また、からだや器官の左右非対称が正常に形成されない場合、それらの機能に不全が起こるため、左右非対称の形成機構は医学的にも重要な課題である。

一般的に、からだや器官の左右非対称性は、胚の左右極性にもとづいて形成される。脊椎動物で左右極性が形成される機構は、浜田博教授や廣川信隆教授らの日本人研究者によるブレークスルーを発端として提唱された、ノード流モデルによって明瞭に説明されていた。しかし、ノード流モデルは哺乳類や小型魚類には適用できるが、脊椎動物のなかでも両生類や鳥類では、ノード流とは異なった機構で左右極性が形成されることがわかっていった。さらに、巻貝や線虫などの無脊椎動物の左右非対称性は、卵割のごく初期に、細胞極性に依存して形成される。これらの知見は、胚の左右極性の形成機構が進化的に多様であることを示している。したがって、まだ理解されていない左右極性の形成機構が存在するものと考えられていた。

研究代表者は、遺伝学、発生学のモデル動物であるショウジョウバエの左右非対称性に関する研究を、世界に先駆けて行ってきた。ショウジョウバエでは、消化管などの多くの器官で、ステレオタイプな左右非対称性が観察される。発生の過程で最初に左右非対称な形態をとるのが胚の消化管で、その全体にわたって、明瞭な左右非対称性を示す(図1)。

研究を開始する時点において、研究代表者は、ショウジョウバエ胚の消化管の左右非対称性に異常を示す突然変異の網羅的な探索

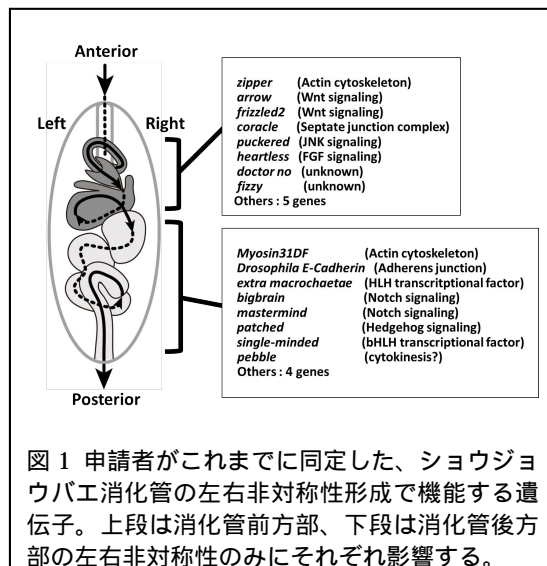


図1 申請者がこれまでに同定した、ショウジョウバエ消化管の左右非対称性形成で機能する遺伝子。上段は消化管前方部、下段は消化管後方の左右非対称性のみそれぞれ影響する。

をほぼ終了していた。全ゲノムの約80%に相

当する遺伝子を網羅していると予測できる、約8,000の突然変異系統について、胚消化管の左右非対称性に異常が認められるかどうかを調べた。その結果、25の陽性突然変異を得ることができた。これらのうちの16の突然変異については、これまでの研究で責任遺伝子の同定に成功している(図1)。

これまでに同定した25の陽性突然変異は、その表現型から2つのグループに分けられた。第一のグループは、胚消化管の前半分(図1、上)の左右非対称性だけを異常にする突然変異を含み、第二のグループは、胚消化管の後半分(図1、下)の左右非対称性だけを異常にする突然変異を含む。これらの結果は、ショウジョウバエの左右非対称性が、胚の前半分と後半分で、異なった機構によって形成されていることを示唆していた。

第一グループの突然変異の責任遺伝子の機能を解析した結果、消化管前半部の左右非対称性の形成には、古典的 Wnt シグナルの活性化、JNK シグナルの抑制が必要であることがわかっていった。

消化管後半部には、構造が単純で、細胞レベルでの解析が容易な後腸が含まれており、これに焦点をしばって研究を進めてきた。研究代表者は、後腸の左右非対称性が鏡像化する突然変異として、I型ミオシン(MyosinID)をコードする Myosin31DF を同定した。

後腸の左右非対称な形態は、後腸上皮の管が後方から見て反時計回りに90度捻転することで形成される。この捻転が起る過程の上皮細胞の形態変化を観察、計測したところ、左ネジ捻転の前に、上皮細胞の頂端面(消化管の内面側)の形態が、消化管の軸に対して決まった方向に傾くことがわかった。後腸上皮細胞が頂底極性をもつことを考慮すると、これらの細胞はキラリティ(鏡像がもとの像と重ならない性質)を示すことになる。この新規な細胞極性を、細胞キラリティと名付けた。上皮細胞頂端面のコンピュータ・シミュレーションを、パーテックスモデルを応用して行った結果、細胞キラリティによって、後腸上皮の管の捻転が説明できることを明らかにしていた。

しかし、これらの成果は、左右非対称な形態変化が起こる過程を説明するものがほとんどであり、最初に左右極性が形成される機能については、消化管前半部と後半部のいずれにおいても不明であった。後腸が管状構造をとる以前にあたる、後腸原基の状態においても、陥入した上皮組織の形態に左右非対称性が認められることがわかっていった。しかし、どのような細胞レベルの変化が、後腸原基の左右非対称な形態の要因になっているのは不明であった。

2. 研究の目的

これまでの研究代表者の研究成果によって、器官の左右非対称な形態変化のメカニズムの一部を説明できるようになった。しかし、

左右非対称な組織変形に先だって、胚全体、器官、細胞のレベルで何らかの左右極性が形成されているものと考えられる。これらの極性情報にもとづいて、消化管などの器官の変形が誘発されると考えるのが自然である。実際に、脊椎動物においては、最初に、胚全体の左右軸が形成され、それにもとづいて器官の左右非対称性が形成される。しかし、ショウジョウバエにおいて、最初に形成される左右極性の実体は依然として未解明のままであった。そこで、本研究計画では、異なる機構で左右非対称性が形成されていると考えられる消化管前半部、消化管後半部のそれぞれにおいて、最初の左右極性がどのように形成されるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胚発生初期に機能している左右極性の形成に必要な遺伝子の探索・同定

他のグループの研究から、ショウジョウバエ胚の左右極性は、母体内ではなく、胚発生初期に形成されることがわかっていた。左右極性が形成されると予測される胚発生初期には、母体から供給される mRNA (母性 mRNA) が機能している。このため、突然変異の初期胚における左右非対称性への影響は、母性 mRNA によって救済される場合(母性効果)が想定される。研究代表者がこれまでに行ってきた、左右非対称性に関する遺伝子の探索では、ホモ接合体の左右非対称性の異常を指標としてきた。このため、母性効果による救済が原因となって、左右極性の形成で機能する遺伝子が同定できていない可能性がある。そこで、母性効果を除いた突然変異ホモ接合体を作出し、胚消化管の左右非対称性に異常を示すものを探索する。この方法によって、発生初期において左右非対称性の形成に必要なとされる遺伝子の同定を試みた。

(2) 消化管前半部の左右非対称性形成の初期段階の解明

これまでの研究から、消化管前半部の形態が左右非対称化する直前に、胚の腹側、右側の中腸内臓筋の核の位置が再編成されることがわかっていたが、この過程で内臓筋細胞に何が起きているのかは不明であった。そこで、内臓筋細胞特異的に *UAS-RedStinger* と *UAS-LifAct* を発現させ、細胞核とアクチン細胞骨格を蛍光タンパク質で可視する。この胚をライトシート顕微鏡を用いてタイムラプス観察し、内臓筋細胞とその核の左右非対称な動きを解析する。

これまで解析から、消化管前半部の正常な左右非対称性の形成には、古典的 Wnt シグナルの活性化、JNK シグナルの抑制が必要であることがわかっていた。研究代表者の行った遺伝的スクリーニングによって同定された、消化管前半部の左右非対称性に影響を与える突然変異のうちには、まだ責任遺伝子が

明らかになっていないものがある。これらの責任遺伝子を同定し、その機能を解析することで、消化管前半部の左右非対称形成で機能している細胞シグナル経路をさらに上流にさかのぼって明らかにできる可能性がある。(3) 消化管後半部の左右非対称性形成の初期段階の解明

消化管後半部の左右非対称性が最初に観察されるのは、肛門陥から後腸原基が形成される時期である。この時期の後腸原基の細胞の形態における左右差を詳細に解析することで、最初に左右極性が形成される過程を解析する。

研究代表者の行った遺伝的スクリーニングによって同定された、後腸の左右非対称性に影響を与える突然変異のうち、責任遺伝子が明らかになっていないものについて解析を進める。同定した責任遺伝子の機能を調べることで、消化管後半部の左右非対称性の形成機構を、その初期のステップにさかのぼって明らかにできる可能性がある。

4. 研究成果

(1) 胚発生初期に機能している左右極性の形成に必要な遺伝子の探索・同定

左右極性の形成で機能している可能性のある遺伝子を同定するために、突然変異ホモ接合体から母性効果を除いた際に左右非対称性の異常を示す突然変異を網羅的に探索した。ショウジョウバエ・ゲノムの約 20% を含む第二染色体左腕に存在する遺伝子の突然変異系統を樹立した。これらのうちの 387 系統を調べた。結果、突然変異ホモ接合体において、その母性効果を除いた場合にのみ消化管の左右非対称性の異常を示すものを 1 系統同定することができたが、その消化管は左右非対称性以外の形態異常も示した。結果的に、初期胚の消化管の左右非対称性形成において、何らかの特異性をもって機能している遺伝子の同定には至らなかった。この研究で探索したゲノム領域が不十分であった可能性もあるが、このスクリーニングは労力と時間を要するため、これ以上継続することは非効率的であると考えられた。

(2) 消化管前半部の左右非対称性形成の初期段階の解明

消化管前半部が左右非対称な形態をとる以前の中腸内臓筋の形態や、核の位置を、ライトシート顕微鏡を用いてライブ観察した。三次元によるタイムラプス解析によって、腹側の内臓筋の核の移動方向に左右非対称性が認められることがわかった。中腸内臓筋細胞は、正中線をはさんで両体側に存在する。背側の内臓筋の核は、両体側とも、正中線方向に移動した。これに対して、腹側の中腸内臓筋の核は、右側は右方向(正中線と反対)に、左側は正中線方向に移動した(未発表)。この時、背側、腹側とも、中腸内臓筋細胞自体は、正中線方向に移動した。この結果は、消化管前半部がまだ左右対称な時期に、腹側

の中腸内臓筋の核が左右非対称な移動を開始していることを示している。現在のところ、この現象が、消化管前半部で見られる最初の左右非対称性である。

消化管前半部の左右非対称性をランダム化する突然変異のうち、これまで責任遺伝子の不明であったものについて、その同定を試み、これに成功した。この遺伝子は、Wnt シグナルの構成因子であるグリピカンのコア・タンパク質をコードしている *dally-like* であった(未発表)。研究代表者のこれまでの研究から、消化管前半部の左右非対称性形成には Wnt シグナルが重要な機能をはたしていることが明らかになっている。したがって、この成果は、これまでの知見を支持するものである。*dally-like* 突然変異体では、中腸内臓筋の核の左右非対称な移動が起こらないか、ランダム化していた(未発表)。このことは、Wnt シグナルが、中腸内臓筋の核の左右非対称な移動を制御している可能性を示唆している。また、内臓筋核の左右非対称な移動が、消化管前半部の左右非対称な形態変化を誘発している可能性も考えられた。最近、細胞内の核の移動が、細胞内圧力を非対称化することが報告されており、これによって左右非対称な消化管前方部の形態変化を説明することができるかもしれない。しかし、現在のところ、左右非対称な核の移動を引き起こす分子レベルの機構は不明である。このような核の移動の左右非対称性は、これまでに報告されていないため、この機構を理解することで新規な概念を提唱することができるかもしれない。

(3) 消化管後半部の左右非対称性形成の初期段階の解明

透明化処理した胚を用いて、後腸原基や、それを形成する上皮細胞の形態を、三次元イメージを取得することで解析した。その結果、後腸原基の全体的な形態に左右非対称性が認められた。しかし、個々の上皮細胞の形態レベルでは、左右非対称性を定量的に検出することができなかった。後腸原基の形態は袋状であるが、上皮組織の曲率が連続的に変化するため、形態を定量的に扱うことは、現在の技術では困難であることがわかった。

後腸の左右非対称性に影響を与える突然変異の責任遺伝子が *extra macrochaetae* (*emc*) であることを明らかにした(未発表)。*emc* 突然変異体では、後腸の逆位が 20% 程度の頻度で見られた。*emc* の突然変異体の後腸では、上皮細胞の境界が波打つ(ジグザグ化する)表現型が認められた。*Emc* はヘリックスループヘリックス型の転写抑制因子である。後腸の左右非対称性が正常に形成されるためには、*Emc* がヘリックスループヘリックス型の転写促進因子 *Daughterless* を抑制する必要があることがわかった(未発表)。しかしながら、現在のところ、*Daughterless* の標的となっている遺伝子は不明である。この遺伝子を同定できれば、後腸の左右非対称

性形成で機能している遺伝的な経路の解明につながると考えられた。また、上皮細胞の境界が波打つ現象は、タイトジャンクションの形成が阻害された場合に起こることが知られているが、それが組織の機能に与える影響は不明であった。本研究の成果が、この現象と上皮組織の機能の関連を示した最初のものである。今後、上皮細胞の境界が波打つ現象が、どのような機能で後腸の捻転に影響を与えるかを理解することで、この現象と上皮組織の機能との関連を明らかにすることができるかと期待できた。

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 9 件)

Okumura, T., Sasamura, T., Inatomi, M., Hozumi, S., Nakamura, M., Hatori, R., Taniguchi, K., Nakazawa, N., Suzuki, E., Maeda, R., Yamakawa, T., and Matsuno, K. Class I myosins have overlapping and specialized functions in left-right asymmetric development in *Drosophila*. *Genetics* 199 (4) 1183-1199 (2015). doi: 10.1534/genetics.115.174698.

Ishio, A., Sasamura, T., Ayukawa, T., Kuroda, J., Ishikawa, H. O., Aoyama, N., Matsumoto, K., Gushiken, T., Okajima, T., Yamakawa, T., and Matsuno, K. *O*-fucose monosaccharide of *Drosophila* Notch has a temperature-sensitive function and cooperates with *O*-glucose glycan in Notch transport and Notch signaling activation. *J. Biol. Chem.* 290, 505-519 (2015). doi: 10.1074/jbc.M114.616847.

Hatori, R., Ando, T., Sasamura, T., Nakazawa, N., Nakamura, M., Taniguchi, K., Hozumi, S., Kikuta, J., Ishii, M., and Matsuno, K. Left-right asymmetry is formed in individual cells by intrinsic cell chirality. *Mech. Dev.* 133, 146-162 (2014). doi: 10.1016/j.mod.2014.04.002.

Aoyama, N., Yamakawa, T., Sasamura, T., Yoshida, Y., Otori, M., Okubo, H., Iida, E., Sasaki, N., Ueda, R., and Matsuno, K. Loss- and gain-of-function analyses of vacuolar protein sorting 2 in Notch signaling of *Drosophila melanogaster*. *Genes Genet. Syst.* 88, 45-57 (2013). doi: 10.1266/ggs.88.45

Nakamura, M., Matsumoto, M., Iwamoto, Y., Muguruma, T., Nakazawa, N., Hatori, R., Taniguchi, K., Maeda, R., and Matsuno, K. Reduced cell number in the hindgut epithelium disrupts hindgut left-right asymmetry in a mutant of *pebble*, encoding a RhoGEF, in *Drosophila* embryos. *Mech. Dev.* 130 (2-3), 169-180 (2013). doi: 10.1016/j.mod.2012.09.007.

Ayukawa, T., Matsumoto, K., Ishikawa, H. O., Ishio, A., Yamakawa, T., Aoyama, N., Suzuki, T., and Matsuno, K. Rescue of Notch signaling in cells incapable of GDP-L-fucose synthesis by

gap junction transfer of GDP-L-fucose in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109 (38) 15318-15323 (September 18, 2012). doi: 10.1073/pnas.1202369109.

Nakazawa, N., Taniguchi, K., Okumura, T., Maeda, R., and Matsuno, K. A novel Cre/loxP system for mosaic gene expression in the *Drosophila* embryo. Dev. Dyn. 241, 965-974 (2012). doi: 10.1002/dvdy.23784.

Kuroda, J., Nakamura, M., Yoshida, M., Yamamoto, H., Maeda, T., Taniguchi, K., Nakazawa, N., Hatori, R., Ishio, A., Ozaki, A., Shimaoka, S., Ito, T., Iida, H., Okumura, T., Maeda, R., and Matsuno, K. Canonical Wnt signaling in the visceral muscle is required for left-right asymmetric development of the *Drosophila* midgut. Mech. Dev. 128 (11-12), 625-629 (2012). doi: 10.1016/j.mod.2011.12.002.

Yamakawa, T., Yamada, K., Sasamura, T., Nakazawa, N., Kanai, M., Suzuki, E., Fortini, M.E., and Matsuno, K. Deficient Notch signaling associated with neurogenic pecanex is compensated for by the unfolded protein response in *Drosophila*. Development 139, 558-567 (2012). doi: 10.1242/dev.073858.

〔学会発表〕(計 2 3 件)

松野健治、グリピカンはショウジョウバエの左右非対称性の形成に必要である、第 33 回日本糖質学会、2014 年 8 月 11 日、愛知県・名古屋

Iwamoto, Y., Nakamura, M., Adachi, M., Hatori, R., Matsuno, K. Functions of *Drosophila* Fizzy in the left-right asymmetric development of the embryonic gut. 第 36 回日本分子生物学会年回、2013 年 8 月 5 日、兵庫県・神戸

Kuroda, J., Maeda, R., Matsuno, K Wnt signal plays an essential role in the left-right asymmetric development of the embryonic gut in *Drosophila*. 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会、2012 年 5 月 29 日、兵庫県・神戸

〔図書〕(計 5 件)

羽鳥僚、松野健治 “ねじれる 細胞のキラリテの普遍性と機能” 実験医学 33 (3),423-428 (2015).

羽鳥僚、松野健治 細胞のキラリテが誘発する組織のねじれ 日本数理生物学会ニュースレター 73, 20-21 (2014).

黒田純平、中村充利、松野健治 ”生物のからだはどのように左右非対称になるのか？” 生産と技術 生産技術振興協会 61 (3), 99-102 (2013).

松野健治 “個々の細胞の形の左右の歪みが合さって臓器の形を左右非対称に変える” 科研費 NEWS 2012 vol.2 (2012).

中澤直高、前田礼男、谷口喜一郎、安藤格士、松野健治 “上皮細胞の平面内細胞形状

のキラリテによる左右非対称な組織形態形成の新たな機構” 実験医学 30 (1), 75-78 (2012).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/dbs01/re-paper-temp.php?id=81>

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/matsuno/index.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

松野 健治 (MATSUNO Kenji)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：60318227

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：