

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840081

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いた組織形態形成におけるshootin1の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of shootin1 during zebrafish tissue morphogenesis

研究代表者

浦崎 明宏(Urasaki, Akihiro)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：40550083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：shootin1に加え、新たなshootinファミリーメンバーとしてshootin2とshootin3を見出した。3つのshootin遺伝子すべてがゼブラフィッシュ胚で発現していた。特に、shootin1とshootin3は母性発現しており、発生過程においては側線原基で発現していた。変異体解析により、shootin3がゼブラフィッシュの初期発生に関与していること、shootin1とshootin3は水流を感知する器官である側線の形成に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In addition to shootin1, we found two novel shootin family members (shootin 2 and shootin 3). All three shootin genes were expressed in zebrafish embryos. In particular, shootin 1 and shootin 3 were expressed maternally and were expressed in the lateral line primordia in developing zebrafish embryos. Mutant analysis suggests that shootin 3 is involved in the early embryonic development and that shootin 1 and shootin 3 are involved in the formation of lateral lines, which are organs that sense water flow.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：shootin1 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

我々のグループでは、神経軸索に濃縮している分子 shootin1 を同定し (Toriyama et al., 2006)、shootin1 が重合・脱重合をしている動的なアクチン線維と細胞接着分子を連結することにより、軸索伸長のための駆動力を生み出すことを見出していた (Shimada et al., 2008; Toriyama et al., 2013)。

しかしながら、shootin1 とは異なるファミリーメンバーが存在するのか、組織形態形成における shootin 遺伝子の機能は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、(1) shootin1 とは異なるファミリーメンバーが存在、(2) shootin 遺伝子のゼブラフィッシュにおける発現、(3) 組織形態形成における shootin 遺伝子の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュの shootin 遺伝子の同定

哺乳類の shootin1 のアミノ酸配列を用いて、ゼブラフィッシュの shootin 遺伝子をデータベース検索する。

実際にゼブラフィッシュの shootin 遺伝子がゼブラフィッシュ胚で発現しているかを RT-PCR で確認し、cDNA をクローニングする。

(2) shootin 遺伝子の進化的保存性

様々な生物種の shootin タンパク質のマルチプルアラインメントを行い、進化的に保存されているドメインを明らかにする。

系統樹を作成し、shootin 遺伝子がどのような生物種に存在するかを明らかにする。

shootin 遺伝子周辺の遺伝子の並び (synteny) を解析し、どの shootin 遺伝子がヒトやマウスの shootin1 遺伝子に相当するのを明らかにする。

(3) shootin 遺伝子のゼブラフィッシュにおける発現

発生しているゼブラフィッシュ胚で shootin 遺伝子が発現しているかを調べるために、RT-PCR 行う。

発生しているゼブラフィッシュ胚のいつどこで shootin 遺伝子が発現しているかを調べるために、whole mount in situ hybridization を行う。

(4) 初期発生過程における shootin 遺伝子の機能解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて、shootin1 変異体および shootin3 変異体を作製する。

変異体を用いて初期発生過程における shootin 遺伝子の機能を明らかにする。

(5) 側線形成における shootin 遺伝子の機能解析

変異体を用いて側線形成における shootin 遺伝子の機能を明らかにする。

(6) 脳形成における shootin 遺伝子の機能解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて、shootin2 変異体を作製する。

変異体を用いて脳形成における shootin 遺伝子の機能を明らかにする。

(7) アクチンダイナミクスと shootin タンパク質の関係

細胞内 1 分子イメージング法を用いて、shootin タンパク質とアクチン線維の挙動の関係を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュの shootin 遺伝子の同定

哺乳類の shootin1 のアミノ酸配列を用いて、ホモロジー検索を行った。ゼブラフィッシュの shootin1 遺伝子に加えて、shootin1 によく似た予想されたアミノ酸配列が 2 つ見出された。これらがゼブラフィッシュ胚で実際に発現しているかを調べるために、RT-PCR を行い、コーディング領域全長の cDNA をクローニングした。それら遺伝子は 544 アミノ酸、561 アミノ酸、655 アミノ酸をコードしており、それらをそれぞれ shootin1, shootin2, shootin3 と名付けて、解析を行った。

(2) shootin 遺伝子の進化的保存性

shootin 遺伝子の進化的な保存性を調べるために、様々な脊椎動物に存在する shootin 遺伝子のアミノ酸配列を用いて、マルチプルアラインメントを行い、系統樹を作成した。マルチプルアラインメントの結果、shootin タンパク質には進化的に保存されている 4 つのドメインがあることが分かった。系統樹を作製したところ、shootin1, shootin2, shootin3 は異なる 3 つグループに分けられた。shootin1 は魚類から哺乳類まで広く存在していた。shootin2 は魚、両生類、有袋類に属する哺乳類に存在していたが、胎盤を有するヒトやマウスなどの哺乳類には見つからなかった。shootin3 は魚類にのみ存在していた。Shootin 遺伝子周辺の遺伝子の並びを解析 (Synteny 解析) したところ、ゼブラフィッシュの shootin1 がヒトやマウスの shootin1 に相当すること、shootin2 と shootin3 は新たな shootin ファamilyメンバーであることが示唆された。

(3) shootin 遺伝子のゼブラフィッシュにおける発現

発生しているゼブラフィッシュ胚で shootin 遺伝子が発現しているかを調べるために、RT-PCR を行った。受精後 24 時間および 36 時間で、3 つの shootin 遺伝子が発現

していることが分かった。1細胞期には特に shootin1 と shootin3 が優位に発現していることが明らかになった。

発生しているゼブラフィッシュ胚のいつどこで shootin 遺伝子が発現しているかを調べるために、whole mount in situ hybridization を行った。Shootin1 と shootin3 は、1細胞期に発現しており、発生過程では水流を感知する器官の形成に必要な側線原基で発現していた。さらに、shootin1, shootin2, shootin3 は脳で発現していることが分かった。

(4) 初期発生過程における shootin 遺伝子の機能解析

shootin1 と shootin3 が母性発現することが分かったので、shootin1 と shootin3 が初期発生に関わっているかを明らかにすることにした。CRISPR/Cas9 システムを用いて、shootin1 変異体および shootin3 変異体を作製した。受精後最初に起こる細胞移動過程に異常が見られるかを調べた。shootin1 ホモ変異体胚は正常に発生し、初期発生で特に異常は見られなかった。一方、shootin3 ホモ変異体胚は、初期発生の細胞移動過程に遅れが生じることが分かった。このことから、shootin3 が初期発生過程の細胞移動に関与することが示唆された。

(5) 側線形成における shootin 遺伝子の機能解析

shootin1 と shootin3 が側線原基で発現することが分かったので、shootin1 と shootin3 が側線形成に関わっているかを明らかにすることにした。側線形成の過程で、側線原基細胞群が尾の方に集団細胞移動し、一部の細胞は移動を停止し、水流を感知する感丘(ニューロマスト)と呼ばれる器官を形成する。まず、shootin1 および shootin3 が感丘形成に関与するかを調べた。shootin1 単独変異体および shootin3 単独変異体では、感丘の数に異常は見られなかった。一方、shootin1 と shootin3 の2重変異体では、感丘の数が野生型に比べて減少していた。このことから、shootin1 と shootin3 は感丘の形成に関与することが示唆された。

(6) 脳形成における shootin 遺伝子の機能解析

shootin1, shootin2, shootin3 が脳で発現することが分かったので、これら shootin 遺伝子が脳形成に関わっているかを明らかにすることを目指した。shootin1 単独変異体、shootin3 単独変異体、shootin1 と shootin3 の2重変異体では、大きな異常は見られなかった。そこで、shootin1 と shootin3 の変異体に続き、CRISPR/Cas9 システムを用いて shootin2 変異体を作製した。shootin2 変異体の樹立には成功したが、まだ3重変異体の表現型解析には至っていない。今後、

shootin1, shootin2, shootin3 の3重変異体の表現型を観察し、これら shootin 遺伝子が脳形成に関与しているかを明らかにしたい。

(7) アクチンダイナミクスと shootin タンパク質の関係

活発に動いている細胞では、フィロポディアやラメリポディアが形成されることが多い。その先端でアクチンが重合し、中心部で脱重合することにより、アクチンの逆行性移動が起こることが知られている。そのようなアクチンのダイナミクスを観察できる系として、アフリカツメガエル由来の XTC 細胞を用いた細胞内1分子イメージング法が知られている。蛍光ラベルした shootin1 とアクチンを XTC 細胞に共発現させ、それら分子の挙動を観察した。shootin1 はアクチンと共に逆行性移動することが分かった。shootin2 と shootin3 も同様な挙動を示した。このことは、3つの shootin 遺伝子が、重合・脱重合しているアクチン線維と相互作用し、クラッチ分子として働く能力を持っていることを示唆している。

本研究では、shootin1 に加えて、新たな shootin ファミリーメンバーとして shootin2 と shootin3 を見出した。3つの shootin 遺伝子が発生過程のゼブラフィッシュで発現していることを明らかにした。shootin3 は初期発生に関与すること、shootin1 と shootin3 は感丘形成に関与することが示唆された。

組織形態形成におけるクラッチ分子 shootin1 遺伝子の関与は他の生物においても報告されていない。shootin の機能はこれまで神経細胞で調べられてきたが、本研究により神経以外の細胞での shootin 遺伝子の機能を明らかにすることが出来た。本研究の成果は、shootin 遺伝子の我々の理解を広げると共に、神経以外の細胞での shootin 遺伝子の機能に示唆を与えるものであると考える。

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)

Higashiguchi Y., Katsuta K., Minegishi T., Yonemura S., Urasaki A., Inagaki N. Identification of a shootin1 isoform expressed in peripheral tissues. Cell Tissue Res. 査読有、366 巻、2016、75-87. DOI: 10.1007/s00441-016-2415-9.

Hermkens, DM., van Impel A., Urasaki A., Bussmann J., Duckers HJ., Schulte-Merker S. Sox7 controls arterial specification in conjunction with hey2 and efnb2 function. Development. 査読有、142 巻、2015、1695-1704.

DOI: 10.1242/dev.117275.

馬場健太郎、浦崎明宏、稲垣直之、ラージゲルプロテオミクスを基盤とした神経細胞の軸索形成とガイダンスの解析、生物物理化学、査読無、58巻、2014、49-52
DOI: 10.2198/sbk.58.49.

〔学会発表〕(計 3 件)

高野拓郎、中澤瞳、Manning CF., Trimer JS., 河野憲二、浦崎明宏、稲垣直之、神経回路形成における Singar の役割の解析、第 39 回日本神経科学大会、2016 年 7 月 20-22 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Urasaki A., Matsui T., Kawakami K., Bessho N., Inagaki N., Role of shootin1 during embryonic development in zebrafish. The 2014 ASCB meeting, 2014 年 12 月 6-10 日, Philadelphia (USA)

浦崎明宏、渡瀬恵美子、松井貴輝、川上浩一、別所康全、稲垣直之、ゼブラフィッシュを用いた脳形成における Shootin1 の役割の解析、ポスター発表、第 66 回日本細胞生物学会、2014 年 6 月 11-13 日、奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦崎 明宏 (URASAKI Akihiro)
奈良先端科学技術大学院大学、バイオサイ

エンス研究科・助教

研究者番号：40550083

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()