

## 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 25年 6月 6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570219

研究課題名（和文） 脊椎動物の発生後期における背腹パターン形成機構の解明

研究課題名（英文） Dorsoventral patterning mechanism in vertebrate late development

研究代表者 島田 敦子（SHIMADA ATSUKO）

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：20376552

研究成果の概要（和文）：発生後期に作られる器官の背腹パターンが初期胚における BMP などの濃度勾配情報とどのように結びつくのかは不明だった。我々は発生後期にのみ背腹パターンに異常が見られるメダカ *Da* 変異体を利用して解析したところ、初期の背腹軸を受けて、体節形成期に *zic1/zic4* が発現しはじめ、これが背側の体節由来組織全体で一生涯発現ドメインを形成することによって、表層の色素パターンやヒレ形態などを制御することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Vertebrates exhibit remarkable dorsoventral (DV) asymmetries in coloration and body shape. A medaka mutant *Da* exhibits a unique ventralized phenotype of the overall trunk morphology from late to adult stages and provides a good experimental model to investigate these late mechanisms. We show by tissue transplantation that somite-derived tissues patterned by *zic1/zic4* determine the external characteristics (morphology and coloration) through long-term epithelial-mesenchymal interaction and that *zic1/zic4* expression persists to the adult stage and unveils a novel dorsal domain, suggesting a continuous requirement of these genes for the maintenance of dorsal identities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：メダカ、*Da*、背腹パターン、*zic*、後期発生

## 1. 研究開始当初の背景

一般に脊椎動物は、背と腹で非対称な外見をしている。例えば、スムーズな遊泳や歩行のために、背と腹に構造上の差異があることが不可欠であるし、ディスプレイのために、目につきやすい背側に複雑な色素模様を作るなど、背と腹にはそれぞれ別々のアイデンティ

ティがあるように見える。

脊椎動物は、発生初期に BMP シグナルの勾配によって背腹軸を確立する。このメカニズムについては詳細に研究されている。しかし、初期胚で形成された背腹軸の勾配情報が、後期胚から幼生期においてどのように背腹のアイデンティティに変換され、実際の形態と

して背腹パターンが形成されるかについてはほとんど理解が進んでいない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、初期胚で形成された背腹軸の勾配情報が、後期胚から幼生期においてどのように背腹のアイデンティティに変換されるか、実際の形態として背腹パターンが形成されるかこの機構を明らかにすることである。そのために、主に発生後期に作られるヒレや色素パターンの背腹パターンに注目する (図 1)。

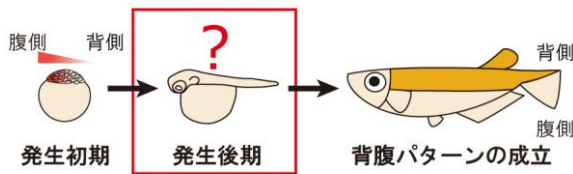


図 1 発生過程後期における背腹形成プロセスが未解明

## 3. 研究の方法

発生後期における背腹パターン形成機構を研究するためには、メダカ *Double anal fin (Da)* 自然突然変異体が優れた材料となる。*Da* は頭部や神経管・消化管などは正常であるにもかかわらず、体幹部背側の外形や色素パターンが全体として腹側化する (図 2)。実際、*Da* は体の背側部分のヒレ、側線、鱗、色素細胞など、すべての表層部の組織が腹側に形質転換している。しかし、このような表現型が現れるのは体節形成期以降であり、初期発生は正常に進む。このことから、*Da* は発生後期でのみ背腹パターン形成が異常になる変異体であり、本研究の目的にとって極めて有用な材料であるといえる。

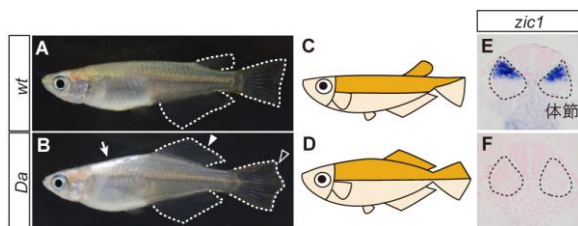


図 2 *Da* のユニークな腹側化表現型と原因遺伝子の発現パターン

## 4. 研究成果

### (1) *Da* の原因遺伝子の確定

当研究室と共同研究で行われた大塚等の研究により (Ohtsuka, et al., Mech. Dev. 2004)、遺伝学的に *Da* 責任領域が 174kb に絞り込まれ、その中には *zic1* と *zic4* (以下 *zic1/zic4*

と表記する) の二つの遺伝子が存在していた。*zic1/zic4* はゲノム中に近接する転写因子で、ショウジョウバエのペアルール遺伝子 *odd-paired* のホモログである。いずれも体節形成期に神経管と体節の背側領域で同じ部位に発現する。*Da* ではアミノ酸をコードする領域には変異はみられなかったが、両遺伝子とも体節背側で発現が消失しており、*Da* は *zic1/zic4* 共通の発現調節領域の変異体であることが示唆されていた。

まず *Da* 変異体での *zic1/zic4* ゲノム領域の詳細な解析により、*zic1/zic4* の体節での発現を制御するエンハンサーの近傍に 80kb 以上のトランスポゾン様の DNA 断片が挿入されていることを突き止めた。そこで挿入部位より遠位約 100kb の配列を GFP につなぎ、トランスジェニック系統を作成したところ体節で強い蛍光を認め、この領域に体節エンハンサーがあることが示唆された。次に、*zic1/zic4* 近傍ゲノム領域約 140kb を *Da* 胚にインジェクションしたところ、色素パターンやヒレの形などが野生型に回復した。これらの結果から、*Da* 変異体は *zic1/zic4* の体節エンハンサーの変異体であることを確定した (Moriyama et al., 2012 に発表)。

(2) 体節は *zic1/zic4* 遺伝子を介して体表器官の背側形態を誘導する

*Da* における背腹パターン異常の原因が体節における *zic1/zic4* の発現低下によるものであることを特定するため、メダカにおける組織移植技術を確認し、体節移植実験を行った。その結果、野生型由来の体節を *Da* に移植することにより、孵化期の変異体における背側の色素パターンや鱗の形態が、局所的に野生型へと回復した (図 3)。また、さらに 3 週間後、第二次性徴として現れる色素パターンや鱗形態も同様に回復した。以上から、体節由来組織は *zic1/zic4* を介して色素細胞や表皮といった外胚葉組織と相互作用し、背側形態を誘導していることが明らかとなった。

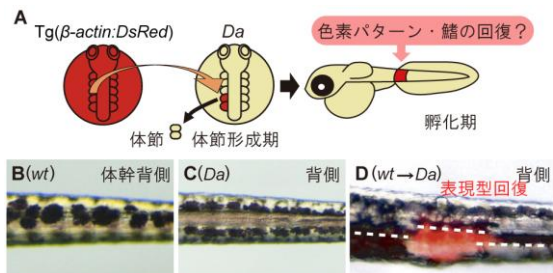


図 3 野生型体節の移植により *Da* 色素パターンが表現型回復する

(3) *zic1/zic4* は生涯にわたり背側ドメインを形成する

体節移植の効果が長期にわたり持続したことから、*zic1/zic4* が長期にわたって発現している可能性が考えられた。そこで *zic1/zic4* の発現パターンを精査するため、BAC トランスジェニック系統 Tg(*zic1:GFP/zic4:DsRed*) を作出した。すると、興味深いことに体節形成期以降成魚に至るまで、生涯継続して背側領域全体で明確な boundary を持って発現していることが判明した (図4)。さらに、その発現は、筋節、真皮、椎骨、鱗および鱗条という、体節由来の組織全体に及んでいた。このことから、体節が *zic1/zic4* の発現によって新規の「背側ドメイン」を形成していることがわかった (図4 GFP 領域)。このような複数の組織にまたがる大きな遺伝子発現ドメインは、脊椎動物で初めての発見であった。

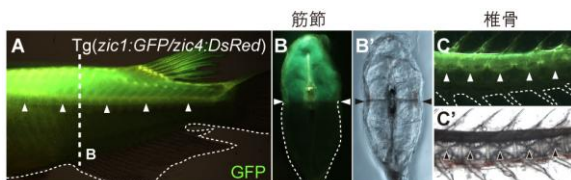


図4 *zic1/zic4* は成魚においても背側領域全体で発現し続ける

(4) *zic1/zic4* に対する発現制御は発生とともに変化する

次に、*zic1/zic4* の発現がどのように長期制御されるのかを調べた。*zic1:GFP/zic4:DsRed* トランスジェニック胚における形成直後の体節をランダムな向きで移植しても、5日後にはすべての移植胚の背側部分で蛍光がみられた。さらに、*zic1:GFP/zic4:DsRed* トランスジェニック胚の分節直後の体節を単離培養したところ、培養開始1日後に蛍光が失われていた。つまり、体節における *zic1/zic4* の発現は、周囲の組織による誘導を受けていることが示された。ところが、体節形成後3日(受精後5日)の体節についても同様の単離培養を行ったところ、2週間以上継続して蛍光が観察された (図5)。以上から、*zic1/zic4* の背側ドメインは、周囲の組織に非依存的であり、自律的に発現制御されていることが示唆された。その後これがエピジェネティックな制御によるものであることも判明した。

(5) 外部形態の制御メカニズムは、魚類で共通している

*zic1/zic4* による背腹パターン制御メカニズムはメダカ以外にも見られるのだろうか。ベタという熱帯魚には、背鰭や側線パターンなどの外部形態が、*Da* と同様に腹側化している品種 Double tail がいる。そこで、Double tail と野生型系統のベタ胚について、*zic1/zic4* の遺伝子発現パターンを調べたところ、*Da* と同じく体節においてのみ発現が低下していた (図6)。したがって、本メカニズムは少なくとも魚類において広く保存されていることが示唆された。(Kawanishi et al., 2013, Shimada et al., 2013 に発表)

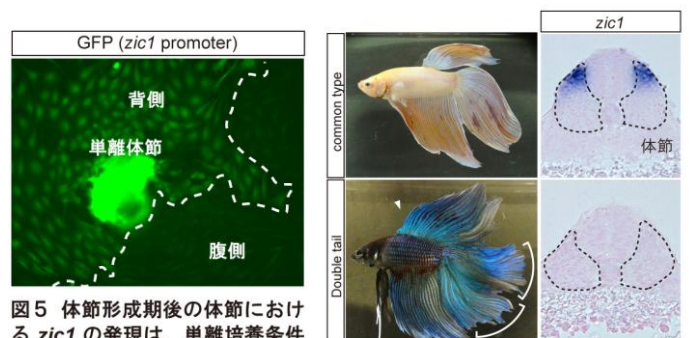


図5 体節形成期後の体節における *zic1* の発現は、単離培養条件下でも自律的に維持される

図6 ベタ (*Betta splendens*) Double tail 品種における体節での *zic1* の発現は低下する

#### 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4件)

1. Toru Kawanishi, Takuya Kaneko, Yuuta Moriyama, Masato Kinoshita, Hayato Yokoi, Tohru Suzuki, Atsuko Shimada and Hiroyuki Takeda Modular Development of the Teleost Trunk Along the Dorsoventral Axis and *zic1/zic4* as selector genes in the dorsal module. *Development*, 査読有、140, 1486-1496 (2013) doi:10.1242/dev.088567
2. Atsuko Shimada, Toru Kawanishi, Takuya Kaneko, Hiroki Yoshihara, Tohru Yano, Keiji Inohaya, Masato Kinoshita, Yasuhiro Kamei, Koji Tamura & Hiroyuki Takeda Trunk Exoskeleton in teleosts is mesodermal in origin. *Nature Communications*, 査読有、Mar 27, (2013), DOI: 10.1038/ncomms2643
3. 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. *Curr.Biol.*, 査読有、22, 601-617 (2012), DOI 10.1016/j.cub.2012.01.063  
4. Takeda, H., Shimada, A. (2010) The art of medaka genetics and genomics: what makes them so unique? *Annual Review of Genetics* 査読有、44, 217-41

〔学会発表〕 (計 14 件)

1. 島田敦子、河西通、守山裕大、武田洋幸 “発生後期における *zic1/zic4* を介した背腹パターン決定機構” 第 84 回日本生化学会大会 (招待講演)、京都 (2011 年 9 月 22 日)  
2. Shimada, A., Kawanishi, T., Kaneko, T., Yoshihara, H., Yano, T., Inohaya, K., Kamei, Y., Kinoshita, M., Tamura, K., Takeda, H. “Mesodermal origin of scales and fins of fish - Insight into origin and evolution of mineralized skeleton in vertebrates” 第 4 4 回日本発生生物学学会大会、宜野湾 (2011 年 5 月 18 日～21 日)  
3. Kawanishi, T. Moriyama, Y., Shimada, A., Takeda, H. “*zic1* and *zic4* in late embryogenesis mediate patterning for adult dorsoventral trunk structures” 第 4 4 回日本発生生物学学会大会、宜野湾 (2011 年 5 月 18 日～21 日)  
4. 河西通 “メダカ変異体 *Da* を用いた体幹部背腹パターン形成メカニズムの解析” BMB2010、神戸 (2010 年 12 月 7～10 日)  
5. 島田敦子、猪早敬二、伊藤麻紀子、河西通、武田洋幸 “メダカ外骨格 (鱗、正中鰭) の骨形成細胞の細胞系譜解析” 日本動物学会第 81 回年会、目黒 (2010 年 9 月 23～25 日)  
6. 兼子拓也、河西通、守山裕大、木下政人、田中実、塚原達也、島田敦子、越田澄人、武田洋幸 “*zic* 遺伝子の発現解析で明らかとなったメダカ体幹部の新しい背側アイデンティティ” 日本動物学会第 81 回年会、目黒 (2010 年 9 月 23～25 日)  
7. 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 SFBD and JSDB, Paris, France, May 26-28,

2010.  
8. 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.  
9. 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.  
10. Moriyama, Y., Shimada, A., Naruse, K., Fujiyama, A., Toyoda, A., Takeda, H. “Analysis of mechanisms underlying the development of the external morphology using the medaka mutant, *Double anal fin (Da)* - Analysis of the somite-specific enhancer of the *zic* genes in medaka: toward understanding of the evolution of the the external morphology in vertebrates” 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜 (2009 年 12 月 9 日～12 日)  
11. 河西通、守山裕大、島田敦子、武田洋幸 “メダカ *Da* 変異体を用いた体節移植から明らかになった体幹部背腹パターン形成メカニズム” 日本動物学会第 80 回大会、静岡 (2009 年 9 月 17 日～20 日)  
12. 島田敦子、河西通、武田洋幸 “メダカ鱗および鰭条における骨形成細胞の細胞系譜解析” 日本動物学会第 80 回大会、静岡 (2009 年 9 月 17 日～20 日)  
13. Kawanishi, T., Shimada, A., Takeda, H. “The loss of *zic1/zic4* expression in the somite is responsible for the ventralizing phenotype in the medaka mutant *Da*” 第 4 2 回日本発生生物学学会、新潟 (2009 年 5 月 28 日～31 日)  
14. Moriyama, Y., Shimada, A., Naruse, K., Fujiyama, A., Toyoda, A., Takeda, H. “Analysis of the somite-specific enhancer of the *zic* genes in medaka: toward understanding of the evolution of the the external morphology in vertebrates” 第 4 2 回日本発生生物学学会、新潟 (2009 年 5 月 28 日～31 日)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/hassei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 敦子 (SHIMADA ATSUKO)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：20376552