

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 25 日現在

機関番号：32606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770243

研究課題名(和文) 非筋定型ミオシン II による内臓器官の左右非対称な形態形成機構に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of non-muscle myosin II in left-right asymmetric morphogenesis of internal organ

研究代表者

奥村 高志 (OKUMURA TAKASHI)

学習院大学・理学部・PD 共同研究員

研究者番号：20449234

研究成果の概要(和文)：

多細胞動物の内臓器官の配置や形は、多くの場合、遺伝的に決定された左右非対称性を示す。これまでの遺伝学的解析により、ショウジョウバエ中腸の左右非対称な形態形成において、非筋定型ミオシン II の活性化が必要であることを明らかとしていた。本研究では、非筋定型ミオシン II の活性化に左右バイアスがあるか検証を試みた。その結果、明確な左右バイアスを見出すには至らなかったが、中腸の形態形成時に生じる左右方向へ細胞運動に、必須なことが確かめられた。

研究成果の概要(英文)：

Many animals exhibit stereotypical left-right (LR) asymmetry in their internal organs. From our genetic analysis, activation of non-muscle myosin II has been suggested to be required for LR asymmetric morphogenesis of the *Drosophila* embryonic midgut. In this study, we try to ask whether activation of non-muscle myosin II show LR bias in the LR morphogenesis. As a result, we could not clearly confirm its LR-biased activation, but we demonstrated that LR asymmetric cell movement of the midgut depended on non-muscle myosin II activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生物学

キーワード：左右非対称性、ショウジョウバエ、非筋定型ミオシン II、消化管、形態形成、Zipper

1. 研究開始当初の背景

外部形態が左右相称な動物においても、内臓器官の配置や形は、多くの場合、遺伝的に

決定された左右非対称を示す。脊椎動物を用いた研究から、左右軸の決定機構に関しては、すでに多くの知見が得られていた。例えば、

一部の脊椎動物では、単繊毛による胚外液の左向きへの流れ（ノード流）が左右極性を決定していることが明らかにされている。また、ノード流以外にも、異なる左右非対称性形成機構が存在することが知られており、 H^+/K^+ -ATPase による左右軸の形成に関する研究が進んでいる。しかし、左右軸情報に基づいて、どのような分子機構が細胞の移動や空間的配置をコントロールし、左右非対称な内臓器官の形態が形成されるかについては、脊椎動物を含めて、ほとんど明らかにされていない。

研究代表者らは、遺伝学的手法の駆使できるショウジョウバエを用いて、明瞭な左右非対称性を示す胚の消化管に着目し、その形態形成に異常を示す突然変異体の網羅的な検索を行ってきた。その結果、中腸前方部の左右非対称な形態形成が全く起きない *zipper* (*zip*) の突然変異体を得た。*zip* は、非筋定型ミオシン重鎖をコードしており、細胞質分裂、細胞移動、細胞形の変化などに関与して、様々な器官の発生に働く。*Zip* は、ミオシン軽鎖の Spaghetti squash (*Sqh*) がリン酸化されることにより活性化されるが、*sqh* や *Sqh* のリン酸化に働くキナーゼをコードする *Rho kinase* (*rok*) の突然変異体胚においても同様の左右性異常が観察された。更に、組織特異的救済実験により、中腸上皮を覆っている環状内臓筋の *zip* 機能が必要であることが分かっていた。加えて、正常胚で起きる環状内臓筋細胞の右方向へ移動が、*zip* 突然変異体胚においては見られなかった。このような事実から、環状内臓筋における左右非対称な *Zip* 活性化の有無やその機構を明らかとすることで、これまでほとんど理解されていない、左右非対称性形成過程における細胞移動の役割やその制御機構を明らかにできる可能性が期待された。

2. 研究の目的

申請者は、*Zip* が左右軸情報に基づいて力学的な力を生じ、中腸の環状内臓筋細胞の右方向への移動を引き起こす実行部隊として働くと推測した。そこで本研究では、環状内臓筋における *Zip* の活性化に左右バイアスがあるか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ミオシン軽鎖 *Sqh* のリン酸化型を認識する抗体を用いた左右非対称な *Zip* 活性化パターンの検討

Zip はミオシン軽鎖である *Sqh* と複合体を形成し、そのリン酸化によって活性化される。そこで、リン酸化型 *Sqh* を認識する抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による撮影後、環状内臓筋細胞における *Zip* の活性化パターンに左右バイアスがあるか解析を行った。

(2) *Sqh*-GFP 融合タンパク質を用いた左右非対称な *Zip* 活性化パターンの検討

発生ステージの進行に伴い、環状内臓筋細胞における *Sqh* タンパク質の細胞内分布がダイナミックに変化する可能性が考えられた。そこで、ライブイメージングによる *Sqh* タンパク質局在の解析を計画した。そのために、*GAL4* タンパク質依存的に GFP 融合型 *Sqh* タンパク質 (*Sqh*-GFP) を発現するトランスジェニック系統を作成した。同時に、環状内臓筋細胞で特異的に *GAL4* タンパク質を発現する系統を探索した。その後、両系統の成虫を交配し、環状内臓筋細胞で特異的に *Sqh*-GFP を発現する胚を用意し、免疫染色によって、環状内臓筋細胞における *Sqh*-GFP 発現を確認した。そして、共焦点レーザー顕微鏡を用いてタイムラプス撮影を行い、継時的な *Sqh*-GFP 局在の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) ミオシン軽鎖 Sqh のリン酸化型を認識する抗体を用いた左右非対称な Zip 活性化パターンの検討

中腸前方部の左右非対称な形態形成が起きるステージの胚を多数集め、リン酸化型 Sqh を認識する抗体を用いて免疫染色を行った。この時、環状内臓筋も他の抗体を用いて同時にマークした。その結果、環状内臓筋において、リン酸化型 Sqh の存在を確かめることができた(図1)。しかし、リン酸化型 Sqh の局在に明確な左右バイアスを見出すことはできなかった(図1)。

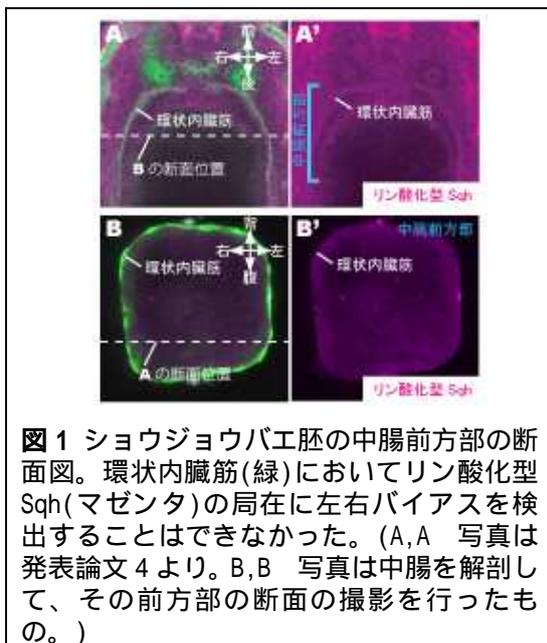


図1 ショウジョウバエ胚の中腸前方部の断面図。環状内臓筋(緑)においてリン酸化型 Sqh(マゼンタ)の局在に左右バイアスを検出することはできなかった。(A,A'写真は発表論文4より。B,B'写真は中腸を解剖して、その前方部の断面の撮影を行ったもの。)

(2) Sqh-GFP 融合タンパク質を用いた左右非対称な Zip 活性化パターンの検討

本研究では、GAL4/UAS システムにより環状内臓筋細胞で特異的に Sqh-GFP を発現させる計画を立てた。そのため、新たに Sqh-GFP を発現する UAS システムを作成した。また、環状内臓筋特異的な GAL4 システムとして NP1522 を見つけた。更に、hand 遺伝子のエンハンサーに GAL4 遺伝子をつないだ新規 GAL4 システム(研究代表者の所属する研究室で作成, Kuroda et al.,

2011)も内臓筋特異的な系統として解析に使用した。

以上の UAS と GAL4 システムの成虫を交配し、環状内臓筋で特異的に Sqh-GFP を発現する胚を準備した。まず、その胚に対して、GFP 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、Sqh-GFP を環状内臓筋細胞で特異的に検出することができた(図2)。しかし、免疫染色による解析では、Sqh-GFP の局在に左右バイアスを見出すことはできなかった(図2)。そこで、当初の計画通り、共焦点レーザー顕微鏡により Sqh-GFP のタイムラプス撮影を試みた。しかし、十分な強度のシグナルを得ることが難しく、Sqh-GFP の局在に左右バイアスがあるか判断するには至らなかった。今後、検出感度上げるため技術的改良が必要とされた。

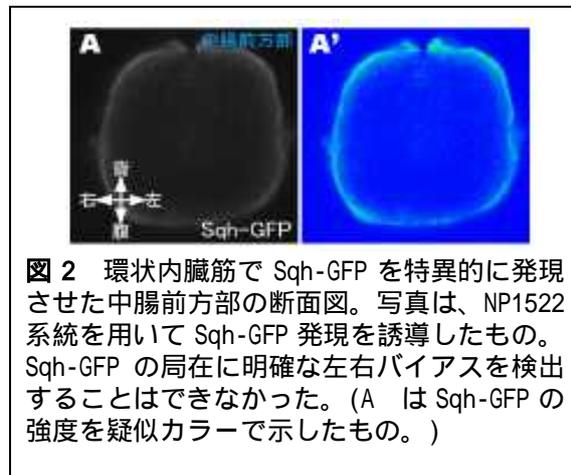


図2 環状内臓筋で Sqh-GFP を特異的に発現させた中腸前方部の断面図。写真は、NP1522 システムを用いて Sqh-GFP 発現を誘導したものの。Sqh-GFP の局在に明確な左右バイアスを検出することはできなかった。(A は Sqh-GFP の強度を疑似カラーで示したもの。)

(1)、(2)のアプローチにおいて Zip 活性化に明確な左右バイアスの存在を検出することはできなかった。しかし、本研究期間中に、環状内臓筋細胞やその内側にある中腸上皮細胞の前後軸と左右軸の両方向への動きに Zip 活性が必要なことが定量的な解析により示された(Okumura et al., 2010)、その事実から、左右方向の細胞運動は前後方向の細胞運動依存しており、Zip 活性化は前後方向の運動に必須である。そのため、Zip 活性化

は左右非対称形成に必須であるが、左右バイアスはない。 Zip 活性の左右バイアスが極小のため本研究では検出できなかった、ことが示唆された。

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4件)

1. Naotaka Nakazawa, Kiichiro Taniguchi, Takashi Okumura, Reo Maeda, Kenji Matsuno.
A novel Cre/loxP system for mosaic gene expression in the *Drosophila* embryo.
Developmental Dynamics. 241(5), 965-974, 2012
2. Junpei Kuroda, Mitsutoshi Nakamura, Masashi Yoshida, Haruka Yamamoto, Takayoshi Maeda, Kichiro Taniguchi, Naotaka Nakazawa, Ryo Hatori, Akira Ishio, Ayumi Ozaki, Shunsuke Shimaoka, Tamiko Ito, Hironao Iida, Takashi Okumura, Reo Maeda, Kenji Matsuno.
Canonical Wnt signaling in the visceral muscle is required for left-right asymmetric development of the *Drosophila* midgut.
Mechanism of Development. 128 (11-12), 625-639, 2011
3. Kiichiro Taniguchi, Reo Maeda, Tadashi Ando, Takashi Okumura, Naotaka Nakazawa, Ryo Hatori, Mitsutoshi Nakamura, Shunya Hozumi, Hiroo Fujiwara, Kenji Matsuno
Chirality in planar cell shape contributes to left-right asymmetric epithelial morphogenesis.
Science 333, 339-341, 2011
4. Takashi Okumura, Hiroo Fujiwara, Kichiro Taniguchi, Junpei Kuroda, Naotaka Nakazawa, Mitsutoshi Nakamura, Ryo Hatori, Akira Ishio, Reo Maeda, Kenji Matsuno.
Left-right asymmetric morphogenesis of the anterior midgut depends on the activation of a non-muscle myosin II in *Drosophila*.
Developmental biology 344, 693-706, 2010

〔学会発表〕(計4件)

1. Takashi Okumura and Takashi Adachi-Yamada
A *Drosophila* GATA transcription factor gene, *GATAe*, is required for maintaining adult intestinal stem cells
1st Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference (APDRC)
2011年5月22日~25日, 台北(台湾)
2. Takashi Okumura and Takashi Adachi-Yamada
A *Drosophila* GATA transcription factor gene, *GATAe*, is required for maintaining adult intestinal stem cells
日本発生生物学会 第44回大会
May 18-21, 2011年5月18日~21日、
沖縄県 沖縄コンベンションセンター
3. Takashi Okumura, Shunya Hozumi, Kiichiro Taniguchi, Reo Maeda, Kenji Matsuno
Functional analysis of three class I myosin genes in *Drosophila* development
第9回日本ショウジョウバエ研究会
2009年7月6日~8日,
静岡県 ヤマハリゾート つま恋
4. Takashi Okumura, Shunya Hozumi, Kiichiro Taniguchi, Reo Maeda, Kenji Matsuno
Three class I myosin genes have redundant and distinct function in *Drosophila* development
日本発生生物学会 第42回大会
2009年5月28日~31日
新潟県 朱鷺メッセ

〔その他〕
ホームページ等

- 6 . 研究組織
(1)研究代表者
奥村 高志 (OKUMURA TAKASHI)
学習院大学・理学部・生命科学科・
PD 共同研究員
研究者番号 : 20449234