

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 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22687016

研究課題名（和文） セロトニンの体軸形成過程における役割

研究課題名（英文） roles of serotonin in the body axis formation

研究代表者

前川 真吾（MAEGAWA SHINGO）

京都大学・大学院情報学研究科・助教

研究者番号：30467401

研究成果の概要（和文）：

セロトニンはヒトを含めた動物の情動や行動に関わると考えられている神経伝達物質である。本研究ではセロトニン合成酵素 Tphd2 が脊椎動物の発生を特徴付ける「形成体」に特異的に発現することを明らかとした。また、原腸胚期にセロトニンが発現すること、その発現は形成体に依存することが明らかとなった。Tphd2 の機能を知るために、アンチセンスを用いて機能阻害すると、体軸の短縮が認められた。さらに Tphd2 の機能阻害は細胞の背側への移動を阻害することが明らかとなった。以上の結果は、セロトニンが初期発生過程のごく初期、形態形成に関わることを示している。

研究成果の概要（英文）：

Serotonin is a well-known neurotransmitter involved in sociality and/or behavior of animal. In the present study, we revealed that Tphd2, a serotonin synthesis enzyme, is expressed in the organizer in zebrafish. In addition, serotonin itself is expressed during gastrulation depending on the organizer. Inhibition of Tphd2 by antisense resulted in shortened body axis. Molecular and developmental studies demonstrated that Tphd2 is required for migration of cells toward to the dorsal region during morphogenesis. Finally, the results clearly indicate that serotonin is involved in early body patterning in zebrafish development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2012 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：形成体・セロトニン

1. 研究開始当初の背景

受精から始まる初期発生過程において背腹軸、左右軸が形成される。脊椎動物において、この形成過程に重要な役割をはたすのが

「形成体（オーガナイザー）」である。これまでオーガナイザーの機能に関して解析され、様々な転写因子や分泌因子が単離同定されてきた。しかしながら、形成体の機能の完

全な理解は到達していなかった。私はゼブラフィッシュの形成体を欠く突然変異体 *ichabod* の解析の過程で、予備的ながら形成体特異的に発現するセロトニン合成酵素 *tphd2* 遺伝子を単離した。このことはこれまでの解析とは異なり、代謝酵素のような今まで知られていない遺伝子産物が形成体の機能に重要であることを示唆していた。

2. 研究の目的

初期発生過程では転写因子や分泌因子によって、ゲノム情報の時間的、空間的な発現が絶妙に調節されることが明らかとなってきた。一方、ゲノムに存在する遺伝子の多くは様々な活性を示す代謝酵素をコードしている。しかし、初期発生過程を制御する代謝産物や代謝酵素はレチノイン酸の例を除いてはほとんど知られてない。申請者は神経伝達物質セロトニンが体軸形成に関わることを示唆する結果を得た。そこで本研究では『セロトニンの体軸形成過程での機能の解明』を目的とした。さらに、これまで見落とされてきた発生過程での代謝産物の機能の考察を試みた。

3. 研究の方法

本研究では以下の方法を行った。

(1) オーガナイザーでセロトニンが実際に産生されているか？

質量分析法および免疫学的手法により、原腸胚期におけるトリプトファン代謝産物の定性的、定量的解析を行った。

(2) 細胞移動におけるセロトニンまたはセロトニン化 Rho の機能は何か？

アンチセンスモルフォリノを用いて *Tphd2* 機能阻害を起こした胚における遺伝子発現の解析および細胞の移動の追跡を行った。

(3) セロトニン化を担うと考えられるトランスグルタミナーゼ *tgm2b* 遺伝子の単離と特異抗体の作成

ゼブラフィッシュの原腸胚期に発現するトランスグルタミナーゼ遺伝子として *tgm2b* 遺伝子に着目し、全長の単離および特異抗体の作成を行った。

上記解析から、『セロトニンの体軸形成過程での機能の解明』を試みた。

4. 研究成果

(1) オーガナイザーでセロトニンが実際に産生されているか？

オーガナイザーでのセロトニンの発現の有無を調べるために、抗セロトニン抗体を持ち免疫染色を行った。受精後約6時間（原腸胚期中期）の野生型胚および *ichabod* 胚を用いて免疫染色を行った結果を図1に示す。

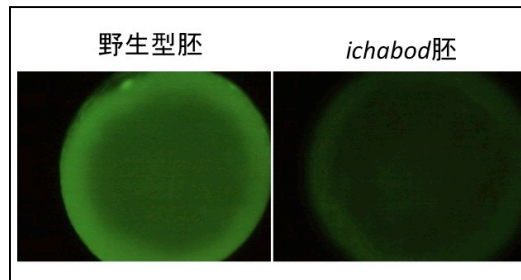


図1 セロトニンはオーガナイザーに依存して発現する。
左) 野生型胚の結果 右) *ichabod* 胚の結果。原腸胚中期の動物極側の像

野生型では胚全体にセロトニンの存在が確認できた（図1左）。オーガナイザーの形成不全を示す *ichabod* 変異胚では、野生型胚で認められたセロトニンのシグナルが劇的に現長していることが明らかとなった（図1右）。同様の発現が質量分析法によっても確認された。この結果は、ゼブラフィッシュ初期胚において、原腸胚期にセロトニンが存在すること、セロトニンの発現はオーガナイザーの存在に依存することを示している。以上から、セロトニンは実際に原腸胚期に発現し、オーガナイザーによって賛成されていることが明らかとなった。

(2) 細胞移動におけるセロトニンまたはセロトニン化 Rho の機能は何か？

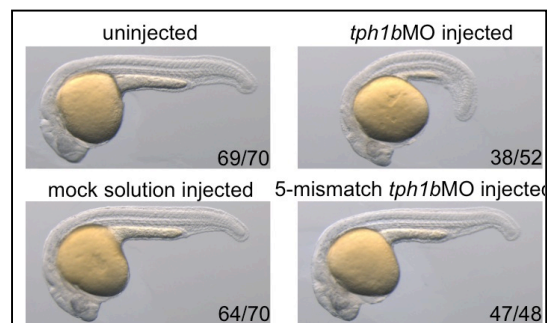


図2 *Tphd2* の阻害は体幹部の短縮を引き起こす。

セロトニンの機能を理解する第一歩として、オーガナイザー特異的に発現するセロトニン合成酵素 *Tphd2* の機能阻害実験を行った。モルフォリノオリゴを頭微注入された胚は体軸の短縮という特徴的な表現型を示した（図2）。

この体幹部の縮小は原腸胚期に特異的な背側への細胞移動に異常を示す突然変異体でも認められる表現型である。そこで、細胞移動の研究でよく用いられている分子マーカーである *d1x3* を用いてその発現を解析した。

その結果を図3に示す。

Tphd2 阻害胚 (PCPA 処理胚) では *dlx3* で

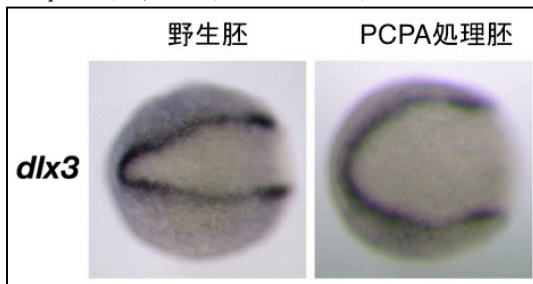


図3 Tphd2 の阻害は神経板の拡大を引き起こす

標識される神経板領域の拡大が見られた。この結果は、先の細胞移動とセロトニンの関係を示唆している。そこで、直接細胞の移動を解析するために、細胞を標識し、追跡する実験を行った。具体的には原腸胚中期に数個の細胞を蛍光で染色し、その細胞を追跡した(図4)。

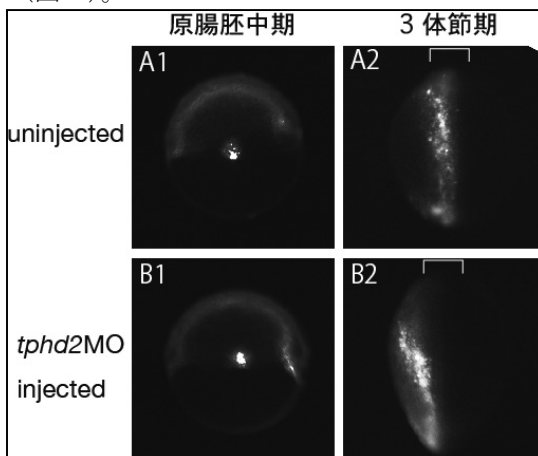


図4 Tphd2 の阻害は背側への細胞の移動に異常を引き起こす

その結果、未処理の野生型胚では三体節期に細胞が背側へ移動し、体軸に取り込まれている様子が観察できるが、*tphd2* アンチセンスモルフォリノをインジェクションした胚では標識された細胞は背側体軸から排除されていることが明らかとなった。この結果は、これまでのすべての結果と矛盾なく、セロトニン合成酵素の機能阻害は細胞の移動に異常を引き起こすことが明らかとなった。

これまでの初期発生過程において、アミノ酸由来の代謝産物が形態形成に関わる例は現時点では報告されていない。本研究では世界に先駆けて新規な因子として、セロトニンを同定することに成功した。

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5件)

(1) Jun Takahashi, Masaya Takagi, Yumiko Okihana, Kei Takeo, Takahisa Ueda, Ken Touhata, Shingo Maegawa, and Haruhiko Toyohara

A novel silk-like shell matrix gene is expressed in the mantle edge of the Pacific oyster prior to shell regeneration. *Gene*, 査読有, 499, 130-134, 2012, doi:10.1016/j.gene.2011.11.057

(2) Máté Varga, Shingo Maegawa, and Eric S. Weinberg

Correct anteroposterior patterning of the zebrafish neurectoderm in the absence of the early dorsal Organizer. *BMC Dev. Biol.*, 査読有, 11:26, 2011, doi:10.1186/1471-213X-11-26

(3) Shunsuke Hayashi, Mako Yoshida, Toshinobu Fujiwara, Shingo Maegawa, and Eiichiro Fukusaki

Single-Embryo Metabolomics and Systematic Prediction of Developmental Stage in Zebrafish. *Z. Naturforsch. 66 c.*, 査読有, 191 - 198, 2011

(4) Koji Tajino, Hiroshi Hosokawa, Shingo Maegawa, Kiyoshi Matsumura, Ajay Dhaka, and Shigeo Kobayashi

Cooling-sensitive TRPM8 is thermostat of skin temperature against cooling. *PLoS One*, 査読有, 6(3):e17504, 2011, doi:10.1371/journal.pone.0017504

(5) Carlos Cruz, Shingo Maegawa, Eric Weinberg, Stephen Wilson, Igor Dawid, and Tetsuhiro Kudoh

Induction and patterning of trunk and tail neural ectoderm by the homeobox gene *evel* in zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 査読有 107(8), 3564-3569, 2010, doi:10.1073/pnas.1000389107

[学会発表] (計2件)

(1) Yudai Tokumasu et al., Serotonin is involved in embryogenesis in zebrafish,

2010 the American Society for Cell Biology
50th Annual meeting,
2010年12月13日,
Philadelphia, USA

(2) Shunji Fujioka et al.,
Visualization of serotonergic neurons in
living zebrafish,
2010 the American Society for Cell Biology
50th Annual meeting,
2010年12月13日,
Philadelphia, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 真吾 (MAEGAWA SHINGO)
京都大学・大学院情報学研究科・助教
研究者番号：30467401

(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

藤岡 俊治 (FUJIOKA SHUNJI)
京都大学・大学院情報学研究科・修士学生

徳増 雄大 (TOKUMASU YUDAI)
京都大学・総合人間学部・学部生