

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22127002

研究課題名（和文）組織が創るマクロでロバストなコンパートメントの成立・維持のロジック

研究課題名（英文）Logic for the establishment and maintenance of macro-level robust gene expression in organs

研究代表者

武田 洋幸（TAKEDA, Hiroyuki）

東京大学・理学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：80179647

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 123,800,000 円

研究成果の概要（和文）：生物の発生においてコンパートメントを単位としたモジュール的発生は特徴の一つである。本研究ではメダカ体幹部の体節組織で発見された $zic1/zic4$ を発現する背側コンパートメントの背腹境界の成立と長期間にわたって維持される機構の解明を試みた。体節内の特殊な細胞（境界細胞と命名）がコンパートメント境界へ移動することで境界が形成され、さらにこの細胞が水平筋中隔へ分化することで背側と腹側の長期間にわたるコンパートメントの維持がされていることが判明した。

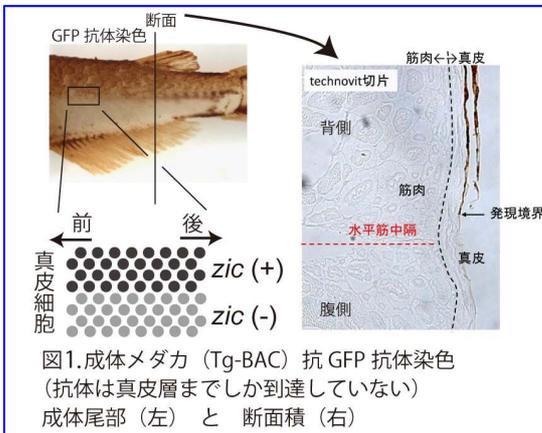
研究成果の概要（英文）：Compartment-based modularity is one of the important features in the development of multi-cellular organisms. We examined the mechanisms underlying the establishment and maintenance of the dorsal compartment in the somite, characterized by the expression of  $zic1/zic4$  genes in the trunk region of medaka fish. We demonstrated that the dorsoventral boundary of this compartment is established by a special group of cells, called "boundary cells". They are born in the region near the notochord and migrate out to the presumptive boundary. We also found that boundary cells finally differentiate into the horizontal myoseptum which mechanically divides the dorsal and ventral compartment of the somite. At later stages, the horizontal myoseptum could play an essential role in the maintenance of the compartment boundary.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：器官形成 メダカ 体軸形成 転写因子 境界形成

### 1. 研究開始当初の背景

多くの動物は初期発生で基本体制が成立した後に、ほぼ相似形を保ちながら、さらに数倍～数十倍大きくなる。これは、構成要素である細胞が常にターンオーバーしていることや生物自身が内包するノイズを考えれば、驚くべきことである。最近我々は、メダカ体節の背腹パターンを制御する転写因子 *zic1/zic4* が、成体でも、体節に由来する器官（椎骨、筋節、真皮）の背側領域で発現し続けていることを発見した（図1）。発現の境界は胚期から成体まで維持され、見事に直線を保つ。しかも不思議なことに、それぞれの器官は、体節から分化後、独立に発生するにも関わらず、境界は器官を越えてからただの中でほぼ同じレベルで維持されていた。このからだの内部から表層を貫く「器官を超えた」背腹境界の存在は今までに報告されておらず、また、これほどの時間的・空間的にマクロなスケールで境界を形成・維持できるようなロバスト性を持つメカニズムは現在知られていない。



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、体幹部の背腹を分ける *zic1/zic4* 発現境界の成立と長期間にわたって維持される機構を実験生物学・数理生物学的アプローチと細胞の力学的特性の実測を融合することにより解明することにある。特に 2 次元の解析が可能な真皮層に着目する。より具体的には、(1) 境界付近の *zic1/zic4* 発現・非発現細胞の一細胞レベルの動態解析および損傷による回復過程の解析、(2) 境界形成に用いられる位置情報の分子の実態の解明、(3) 境界周辺の細胞の特性、(4) 得られた情報を元にした数理モデルの構築と *in vivo* 実験による双方向解析、を実施する。これにより胚期から成体におけるコンパートメント (区画) の成立・維持のロジックを解明する。このようなマクロなレベルで一生を通して維持される細胞集団の境界は、これまでに報告・解析例がなく、本研究の成果は初期発生に偏りがちな発生学の新たな展開の端緒となる。

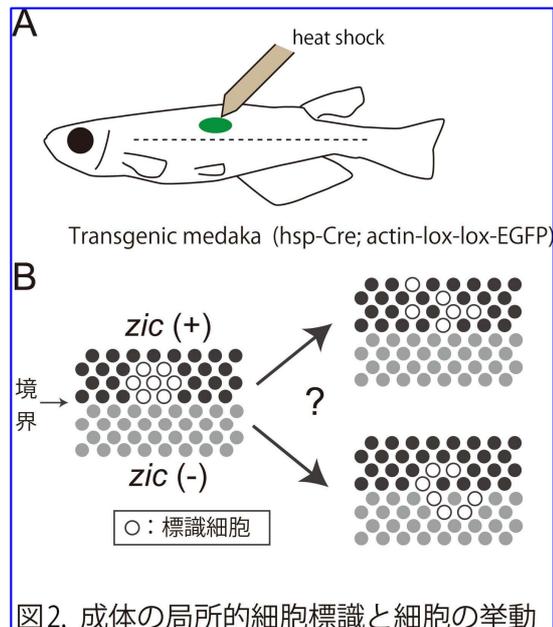
### 3. 研究の方法

#### (1) 発現境界の成立のメカニズム

明瞭な形態的境界が存在しない状態で、特定の遺伝子発現の境界が成立するには、位置情報が外から供給されている可能性が高い。一方、維持については、細胞の力学的性質の変化、および自律的遺伝子発現が関与する可能性がある。これらの可能性を、体節組織の移植、培養、*zic1/zic4* 遺伝子座のエピジェネティック変化を中心に解析する。

#### (2) 境界における細胞動態 (移動、分裂、極性など)

本研究では成体の真皮層 (表皮直下) への局所的細胞標識法を確立する必要がある。具体的には熱ショック (heat-shock; hsp) プロモーターの下流に Cre-recombinase (Cre)、恒常的な actin promoter の下流に Cre 認識配列 (loxP) および EGFP を導入されたトランスジェニックメダカを用いる。即ち熱ショックがかかった細胞では Cre により、恒常的に EGFP を発現するようになる。この原理を応用して、真皮に対して局所的に熱ショックを与える。このため計画班員松本と連携して装置開発を行う。また損傷などを与えた場合の修復過程を細胞標識法と組み合わせる (図2)。



#### (3) 水平筋中隔の役割

本研究の過程で水平筋中隔が重要であることが判明し、研究期間の後半では、水平筋中隔が皮筋節 (真皮) 細胞の移動を制限するメカニズムを集中的に研究した。水平筋中隔は体節形成期に muscle pioneer (MP) 細胞から分化するとされており、MP と皮筋節細胞の挙動を詳細に調べた。MP 細胞は脊索の誘導を受けて *engrailed (eng)* を特異的に発現する。抗 Eng 抗体を用いて実験に加えて、live imaging で動的な相互作用を解析する目的

で、MP 細胞を GFP or RFP で標識するトランスジェニックメダカ (eng-Tg) を作成した。また正常発生過程で MP 細胞と皮筋節細胞の位置関係、接触の有無などを光学および電子顕微鏡で詳細に調べた。具体的には、MP 細胞の特異的除去の影響、水平筋中隔への寄与度、皮筋節細胞の細胞系譜の追跡などを主に共焦点顕微鏡を用いて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 発現境界成立のメカニズム

zic1/zic4 の体節背側での発現制御を調べるために、体節エンハンサー領域の特定、組織移植法による自律性の検証、および zic1/zic4 遺伝子座におけるエピジェネティック修飾を詳細に調べた。

まず zic1/zic4 の発現が背側特異的に低下するメダカ Da 変異体における変異を探索した。その結果、Da では巨大な新規 DNA 型トランスポゾンが zic4 の下流 8.6kb の位置に挿入されていることが明らかとなった。これを "Albatross" と名付けた。さらに、zic1/zic4 のシス制御領域 (エンハンサー) の解析結果から、Albatross 挿入点より下流に中胚葉エンハンサーが存在することが示唆された (Moriyama et al., 2012)。

体節における zic1/zic4 の発現の自律性を検証するため、組織移植法を小型魚類で初めて開発し、体節由来細胞の細胞系譜をまず明らかにした (Shimada et al., 2013)。次に zic1:GFP/zic4:DsRed トランスジェニック胚を用いた体節移植実験および体節単離培養実験を行った。その結果、体節形成期における体節での zic1/zic4 の発現は、周囲の組織による誘導を受けているものの、体節形成完了期以降においては周囲の組織に非依存的に発現が維持されていることが示された。zic1/zic4 の自律的な発現制御により、zic1/zic4 発現細胞が体幹背側領域全体へ移動して発生初期の背腹軸情報が散逸した後も、zic1/zic4 が継続して背側外部形態を制御することを可能にしていると考えられる (Kawanishi et al., 2013)。

さらに、zic1/zic4 の発現制御にエピジェネティックなメカニズムが関与している可能性を検証するため、体節由来組織である筋節における zic1/zic4 遺伝子座周辺の H3K4me2 (ヒストン H3 のリジン 4 のジメチル化)、H3K27me3 (ヒストン H3 のリジン 27 のトリメチル化) および DNA メチル化のパターンを背と腹で比較した。一般に H3K4me2 は通常遺伝子のプロモーターにおいて高頻度で起こり、クロマチンの構造を開くことで特定の転写因子を DNA に結合させ転写を促進させるのに対し、H3K27me3 はクロマチンを閉じることで転写を抑制することが知られている。また DNA メチル化はプロモーター領域では転写を抑制することも知られて

いる。解析の結果、長い DNA 低メチル化領域に存在する zic1/zic4 遺伝子は、発現誘導の際に H3K4me2 上昇と H3K27me3 の低下が起こり、さらに発現の自律性獲得の時期以降には、DNA メチル化領域の短縮 (non-promoter DNA メチル化の上昇) が観察された (Nakamura et al., 2014) (図 3)。

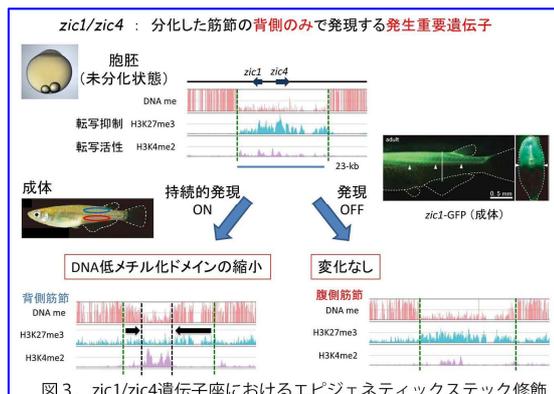


図 3. zic1/zic4 遺伝子座におけるエピジェネティックスタック修飾

今回の結果は孵化期以前と成魚で zic1/zic4 が異なるメカニズムによって制御されていることも示唆している。即ち、孵化期以前では zic1/zic4 は体節外部の組織からのシグナルに体節エンハンサーが応答して H3K27me3 レベルが変化し、プロモーターにおける H3K4me2 レベルを介して発現の ON/OFF が切り替わる可能性がある。一方、成魚ではからだ初期胚よりも大きく複雑に成長しているため、発生初期と同じようなモルフォゲンでは制御できないことが考えられる。代わりに、DNA のメチル化が背側のみで起こることで背側における H3K27me3 レベルを抑え、H3K4me2 レベルを維持するが、腹側では高レベルの H3K27me3 が持続されることで H3K4me2 レベルが抑えられると考えられる。このように、成魚では DNA メチル化によって背側という位置情報が細胞に記憶され、zic1/zic4 の発現が細胞系譜で長期間維持される可能性が考えられる。

なお、体節背側で発現する zic1/zic4 は神経管背側で発現する Wnt によって誘導されることも我々の実験でわかっている。

##### (2) 境界における細胞動態

境界付近の細胞動態の解析のため、cre-lox と熱ショック (IR-LEGO) を組み合わせた標識法を確立した (図 4A)。次に真皮 (皮筋節) において、境界を挟んでの細胞の混ざり、境界内での細胞の行動を解析した。その結果、zic1 発現細胞と非発現細胞は混ざり合わないことが判明し、二種類の細胞群は背腹を分けるコンパートメントを形成していることがわかった (図 4B)。

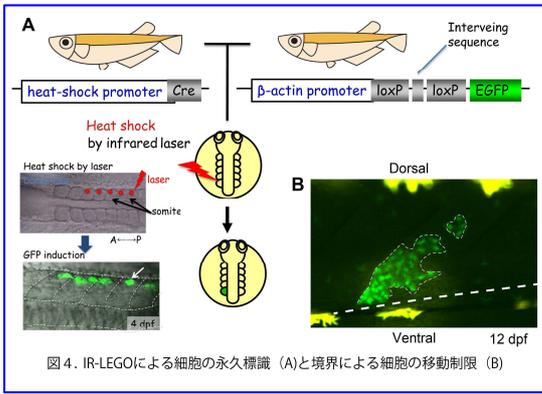


図4. IR-LEGOによる細胞の永久標識 (A)と境界による細胞の移動制限 (B)

### (3) 水平筋中隔の役割

一般にコンパートメントの維持には、接着性などの細胞自立的なメカニズムと、境界に特殊な細胞が存在して細胞の混合を妨げる機械的メカニズムの2つがある。上記のクローン解析の過程で、発生・成長期を通して、真皮から脊索を横断する水平筋中隔が、*zic1/zic4* 発現境界に常に一致していることに気が付いた。これは水平筋中隔が境界形成・維持に重要な役割を担っていることを示唆する(図5)。

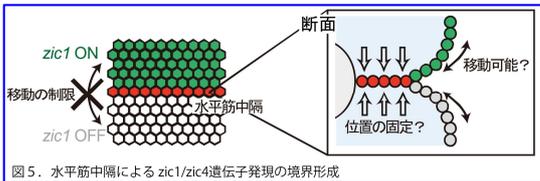


図5. 水平筋中隔による *zic1/zic4* 遺伝子発現の境界形成

この可能性を検証するために、水平筋中隔の発生を阻害する実験を行った。水平筋中隔の発生は hedgehog シグナルに依存していることが知られているため、その阻害剤である cyclopamine でメダカ初期胚を処理して、*zic1/zic4* 発現境界への影響を調べた。

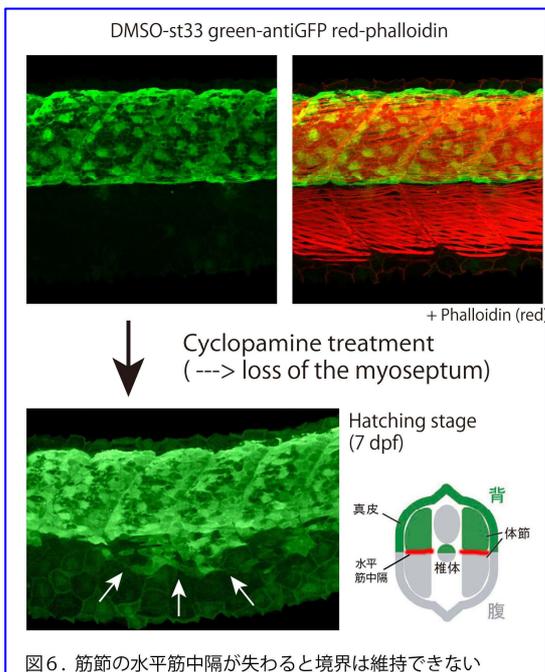


図6. 筋節の水平筋中隔が失われると境界は維持できない

その結果、cyclopamine 処理胚で *zic1/zic4* 発現境界が乱れ、*zic1/zic4* の発現が腹側へ拡大する胚が観察された(図6)。この結果は、水平筋中隔が *zic1/zic4* 発現境界の形成に重要な役割を持つことを示唆している。また細胞自律的なメカニズムでは、周囲の特別な組織が境界形成に重要であることを示唆している。

詳細な細胞系譜解析と共焦点顕微鏡によるライブイメージング観察の結果、*zic1/zic4* 発現境界の形成には、体節深部で hedgehog シグナル依存的に発生する特殊な細胞群が関与することが判明した。この細胞は、最終的に体節表面の将来の *zic1/zic4* 発現境界付近に移動し、境界形成および水平筋中隔の形成に寄与する。我々はこの細胞を境界細胞 (boundary cell) と命名した。

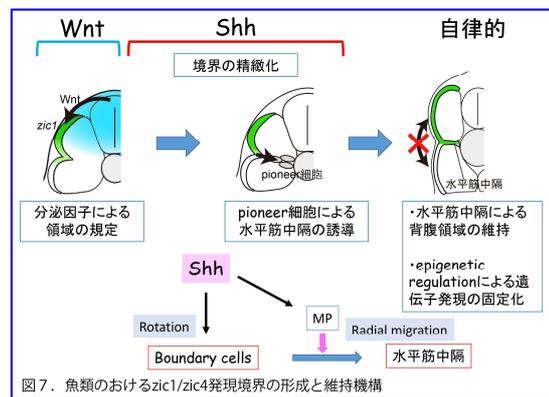


図7. 魚類における *zic1/zic4* 発現境界の形成と維持機構

以上の結果をまとめると、魚類体節内で発生し、維持されるマクロ境界は、その形成時には Wnt、hedgehog シグナルが制御する複雑な現象で、新規の境界細胞とその移動によって境界が成立し、その維持については水平筋中隔による機械的分離と *zic1/zic4* 発現のエピジェネティック修飾による固定化が重要であることが判明した。5年間の研究で、境界細胞、水平筋中隔による *zic1/zic4* 発現境界形成のプロセスをほぼ明らかにすることができた。一方、特殊な細胞による機械的分離が主に起こっていたことから、数理的解析や細胞の力学的性質の解析を導入する意義は見出せなかった。現在境界細胞による *zic1/zic4* 発現境界形成機構の論文を作成中である。

### 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 5件) 全て査読有

Yamamoto T, Tsukahara T, Ishiguro T, Hagiwara H, Taira M, Takeda H. The medaka *dhc2* mutant reveals conserved and distinct mechanisms of Hedgehog signaling in teleosts. *BMC Dev Biol.* 2015 3:15:9.

DOI: 10.1186/s12861-015-0057-x.

Nakamura R, Tsukahara T, Qu W, Ichikawa K, Otsuka T, Ogoshi K, Saito TL, Matsushima K, Sugano S, Hashimoto S, Suzuki Y, Morishita S, Takeda H. Large hypomethylated domains serve as strong repressive machinery for key developmental genes in vertebrates. *Development*. 2014 141(13):2568-80. DOI: 10.1242/dev.108548.

Nanishi T, Kaneko T, Moriyama Y, Kinoshita M, Yokoi H, Suzuki T, Shimada A, Takeda H. Modular development of the teleost trunk along the dorsoventral axis and *zic1/zic4* as selector genes in the dorsal module. *Development*. 2013 140(7):1486-96. DOI: 10.1242/dev.088567.

Shimada A, Kawanishi T, Kaneko T, Yoshihara H, Yano T, Inohaya K, Kinoshita M, Kamei Y, Tamura K, Takeda H. Trunk exoskeleton in teleosts is mesodermal in origin. *Nat Commun*. 2013;4:1639. DOI: 10.1038/ncomms2643.

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*. 2012 Apr 10;22(7):601-7. DOI: 10.1016/j.cub.2012.01.063.

〔学会発表〕(計 5 件)

Takeda, H. Establishment of robust DV compartments in fish somites, Seminar "Cell- and tissue communication in organogenesis" 2015 年 9 月 23 日, Tourtour(France)

Takeda, H. Prepatterning of Developmental Gene Expression in Vertebrates-interplay between genetic and epigenetic mechanisms, UT-NTU Joint Symposium-Frontier of Biological Sciences, 2015 年 3 月 9 日, 台北 (台湾)

武田洋幸, Establishment of robust compartments in fish somites along the dorsoventral axis, FORCE IN DEVELOPMENT, 2014 年 11 月 18 日, 岡崎カンファレンスセンター (愛知県岡崎市)

Takeda, H. Novel Developmental and evolutionary insights from a peculiar medaka mutant, Da, The inaugural E.S.Morse lecturer to the Functional Morphology and Ecology of Marine Fishes course at Friday Harbor Laboratories 2012 年 6 月 21 日, Friday Harbor(U.S.A)

Takeda, H. Casting Genetic Light on

Morphological Diversity in the Fish Body Shape, 22nd Pacific Science Congress 2011 年 6 月 16 日, Kuala Lumpur(Malaysia)

〔図書〕(計 0 件)  
なし

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 0 件)  
なし

〔その他〕  
<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/hassei/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

武田 洋幸 (TAKEDA, Hiroyuki)  
東京大学・大学院理学系研究科・教授  
研究者番号 : 80179647