

令和元年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07364

研究課題名(和文)メダカ体幹部で一生涯口バストに維持されるzic1発現境界形成メカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms for the establishment of the zic1 expression boundary in the teleost trunk

研究代表者

島田 敦子 (Shimada, Atsuko)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・客員共同研究員

研究者番号：20376552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：メダカ体幹部では背側全体でzic1が発現し、筋肉の形態や色素パターンなどの背側特異的な特徴を生み出す。zic1は背腹中心に明瞭で直線的な発現境界をもち一生涯維持される。このような口バストな遺伝子発現境界の形成メカニズムを調べた結果、体節形成期において背腹中心に位置する脊索付近に特殊な細胞群(Horizontal boundary cells: HBCs)が出現し、これが体節の中を水平に移動して背腹を分断しつつ、zic1上流のWntを阻害する因子hhpを発現することでzic1を背側に局限させて発現境界を作ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、メダカ体節の背腹中心部に出現する新規細胞群Boundary cellsを同定し、この細胞群が背腹を分断しつつzic1発現境界を形成することで体幹部を背腹のコンパートメントに分けることを示した。従来わかっていたコンパートメント形成メカニズムは、区画間の細胞同士の相互作用に着目したものであり(接着性の違い等)、本研究が提唱する特殊な細胞による遺伝子発現境界形成は新規なコンパートメント形成メカニズムである。このようなメカニズムは、大型のからだを有する脊椎動物のかたちを口バストに維持するための普遍的な戦略である可能性があり学術的に意義がある。

研究成果の概要(英文)：Establishment of gene expression boundary is crucial for creating elaborate morphology during development. We examined the establishment of zic1/zic4-expression boundary demarcating dorsoventral boundary of the entire trunk of medaka fish (*Oryzias latipes*), and identified a subgroup of dermomyotomal cells, called horizontal boundary cells (HBCs) as crucial players for the boundary formation. Embryological and genetic analyses demonstrated that HBCs play crucial roles in the two major events of the process, i.e. refinement and maintenance. In the refinement, HBCs could serve as a chemical barrier against Wnts from the neural tube by expressing Hhip. At later stages, HBCs participate in the maintenance of the boundary by differentiating into the horizontal myoseptum physically inhibiting cell mixing across the boundary. These findings reveal the mechanisms underlying the dorsoventral boundary in the teleost trunk by specialized boundary cells.

研究分野：発生学

キーワード：遺伝子発現境界 体節 zic1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、魚類体幹部の背と腹がコンパートメント化していることがメダカにおいて明らかとなった。体幹部の背側形態を制御する因子である *zic1* 及び *zic4* (*zic1/zic4*) の発現の有無によって背腹コンパートメントが特徴付けられ、背と腹は明瞭な *zic1/zic4* の発現境界によって仕切られる (図1; Kawanishi et al, Development 2013)。発生の過程で、この遺伝子発現境界は体節において形成され、体節から分化した体幹部を構成する脊椎・筋肉・真皮いずれの組織でも、境界は一生涯正確に維持されていた。このように体の背腹を一生涯分断するような大規模かつロバストなコンパートメント境界はこれまで報告がなく、*zic1* 発現境界の形成は背と腹をロバストに形成・維持する上で重要な機構であると考えられる。

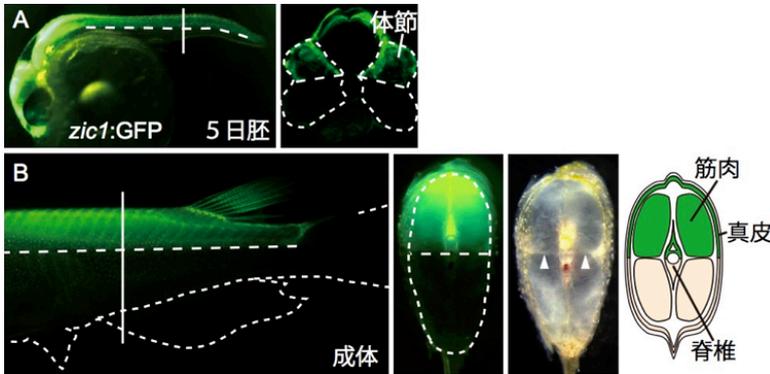


図1 メダカ体節の背腹コンパートメント

zic1:GFP (A) 5日胚とその横断切片、(B) 成体及びその横断切片と模式図. *zic1* の発現の有無で定義される背腹コンパートメントは明瞭な境界を持ち一生涯維持される。

2. 研究の目的

本研究は一生涯維持されるロバストな *zic1/zic4* 発現境界の形成メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

体節における *zic1* と *zic4* の発現パターン及び機能は同一であることがわかっているため、本研究では *zic1* のみに着目して解析を行った。 *zic1* 発現境界の形成過程の観察は、 *zic1* の発現を可視化したトランスジェニックメダカ (*zic1:GFP*) を用いて行った。発現境界に位置する Boundary cells の由来は、胎胚期で b-actin:DsRed トランスジェニック胚から細胞を移植してキメラ胚を作成し、逆トラッキング法によって同定した。また、画像解析ソフト Imaris によって細胞膜の3次元再構成を行うことで Boundary cells の挙動を解析した。さらに、Boundary cell が発現する *hhp1* の機能は、CRISPR/Cas9 システムを用いた *hhp1* ノックアウトメダカの作成、およびカノニカル Wntz 分子と直接結合することを共免疫沈降法によって確かめた上で *hhp1* を発現させた培養細胞と Wnt レポーター細胞の共培養によって調べた。

4. 研究成果

(1) まず、 *zic1* の発現を可視化したトランスジェニックメダカ (*zic1:GFP*) を用いて *zic1* 発現境界の形成過程を調べた。形成直後の体節では *zic1* 発現境界はまだ明瞭ではなく発現が腹側に拡大していたが、体節が成熟するにつれて徐々に発現境界が精緻化されていった。また、精緻化とともに *zic1* 発現境界付近に出現する、強い GFP シグナルを持ち体節の内側に伸長する細胞群が見出された (図2)。この細胞群が将来の *zic1* 発現境界に位置しており、さらに、出現時期が境界の精緻化の時期とほぼ一致することから、これを Boundary cells と名付け、この細胞群に着目して解析を進めた。Boundary cells は Pax3/7 を発現していたため、体節の内側に入り込む Pax3/7 発現細胞と定義した。

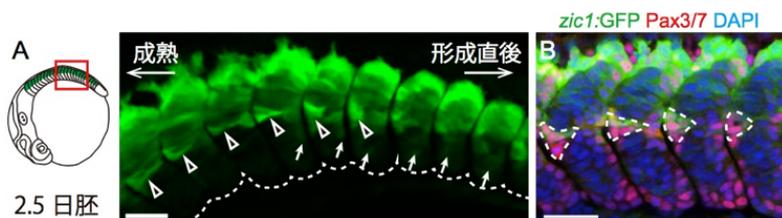


図 2 新規細胞群 Boundary cells

(A) *zic1* 発現境界の精緻化過程.若い体節では発現が腹側にも拡大している (矢印).精緻化とともに Boundary cells が出現する (矢尻). (B) Boundary cells (点線) は Pax3/7 を発現する. bar=30 μ m

(2) Boundary cells の性質を知るために、その挙動を解析した。まず、Boundary cells の由来を知るために、キメラ胚作成による細胞系譜解析を行った。その結果、Boundary cells は体の中心に位置する脊索付近に由来し、体側まで水平的に移動することがわかった。さらに、発生後期以降、*zic1* 発現境界の位置が水平筋中隔(魚類体幹部の背腹を分断するシート状の構造)の位置と一致することから、Boundary cells は水平筋中隔の形成に関わることが予想された。従来、Muscle pioneer cells (MPCs) が水平筋中隔へ直接分化するとされていたため、Boundary cells 及び MPCs 両細胞群の挙動を解析した。その結果、Boundary cells は体節が成熟するにつれて、数を増やしながら水平的に拡大し、シート状の構造を形成することが明らかとなった。さらに、Boundary cells は MPCs の間を通過することによってからだの中心、脊索付近まで到達することがわかった(図 3)。以上の結果から、少なくとも Boundary cells の一部は水平筋中隔に分化することが示された。魚類の水平筋中隔の由来を示したのは本研究が初めてである。

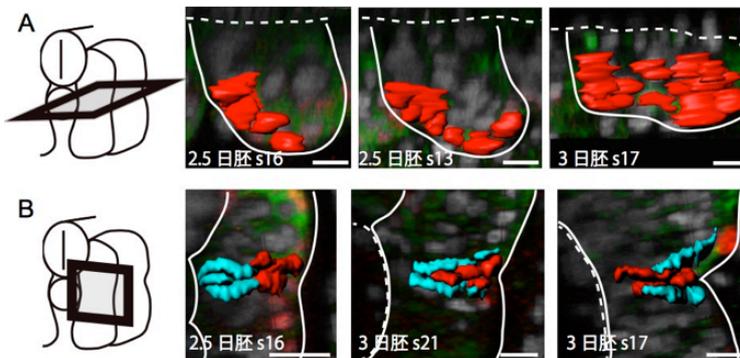


図 3 Boundary cells による水平筋中隔形成

(A) 水平断面図. Boundary cells (赤) はシート構造を作る (B) 垂直断面図. Boundary cells は MPCs (青) の間を通り脊索まで到達する. bar=10 μ m

(3) Boundary cells と明瞭な *zic1* 発現境界形成との関係を調べた。Boundary cells が脊索付近に由来することから、Boundary cells の分化は脊索シグナルであるヘッジホッグシグナルによって誘導されると予想した。そこでヘッジホッグシグナルの阻害剤であるサイクロパミンを用いて阻害実験を行った結果、処理胚では Boundary cells の体節内部への伸長が抑制されることがわかった。そして、このとき *zic1* 発現境界が正常に形成されず、一部体節では *zic1* の発現が腹側に拡大した。さらに、Boundary cells の移動の阻害を試みた。魚類体節細胞の水平移動に関わることが示唆されている SDF1/CXCR4 シグナルを CXCR4 のアンタゴニストである AMD3100 で阻害した結果、Boundary cells の深部から外側への移動が遅れ、同時に *zic1* 発現境界が乱れた。以上の結果から、Boundary cells は明瞭な *zic1* 発現境界の形成に関与することが示唆された。

(4) 最後に、Boundary cells による *zic1* 発現境界精緻化の分子メカニズムを解析した。先行研究で神経管背側から分泌される Wnts が *zic1* の発現を誘導することが示唆されていたため、Wnt シグナルの抑制因子で、体節で発現する遺伝子を探索し *hhip* に着目した。*hhip* は Shh の受容体と結合してシグナルを抑制する因子として広く知られていたが、ゼノパスで Wnt8 の影響を抑制することも示唆されていた。一方、メダカにおける *hhip* の発現パターンの解析から、*hhip* は Boundary cells で強く発現することがわかった。そこで *hhip* が *zic1* 発現境界を精緻化しているのではないかと考え、*hhip* の機能を調べるために、CRISPR/Cas9 システムを用いて *hhip* ノックアウトメダカを作成した。その結果、*hhip* ノックアウトメダカでは Boundary cells は形成されるにもかかわらず、*zic1* 発現境界の精緻化が異常になることが

わかった。また、*hhip* 分子がカノニカル Wntz 分子と直接結合することを共免疫沈降法によって確かめ、さらに *hhip* を発現させた培養細胞を Wnt レポーター細胞と共培養させると、Wnt シグナル活性が低下したことから、*hhip* が古典的 Wnt シグナル経路を直接抑制することがわかった。以上から、Boundary cells で発現する *hhip* は *zic1* 発現境界の精緻化に必要な因子の一つであることが示された。

本研究は、新規細胞群 Boundary cells を同定し、この細胞群が背腹を分断する *zic1* 発現境界の形成において重要な役割を果たすことを示した(図 4)。Boundary cells が発現する Wnt シグナル阻害因子 *hhip* が *zic1* 発現境界精緻化に必要であり、Boundary cells は最終的に背腹を分断する物理的な構造である水平筋中隔へ分化する。したがって、Boundary cells は背腹を仕切る化学的かつ物理的なバリアとして機能している可能性が考えられる。

脊椎動物では後脳においてコンパートメント境界に仕切り構造が形成されることが知られている。本研究から、コンパートメント境界に物理的な構造を形成することは、大型のからだを有する脊椎動物においてコンパートメントをロバストに維持するための普遍的な戦略であることが示唆された。

さらに、従来わかってきたコンパートメント形成メカニズムは区画間の細胞同士の相互作用に着目したものであり(接着性の違い等)、本研究が提唱する、境界に出現する特殊な細胞による発現境界形成は新規なコンパートメント形成メカニズムである。

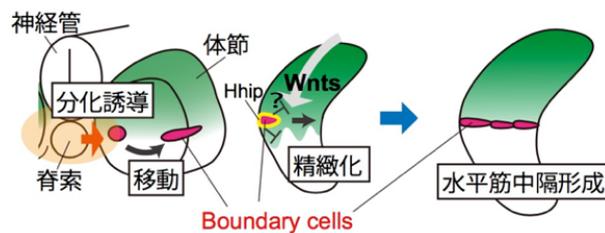


図 4 Boundary cells による *zic1* 発現境界形成メカニズム (緑 : *zic1*, 黄 : *Hhip*)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kota Abe, Atsuko Shimada, Sayaka Tayama, Hotaka Nishikawa, Takuya Kaneko, Sachiko Tsuda, Akari Karaiwa, Takaaki Matsui, Tohru Ishitani, and Hiroyuki Takeda Horizontal boundary cells, a special group of somitic cells, play crucial roles in the formation of dorsoventral compartments in teleost somite, *Cell Reports*, 27, 928-939, 2019. 査読有り. DOI: [org/10.1016/j.celrep.2019.03.068](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.068)

〔学会発表〕(計 3 件)

Kota Abe, Atsuko Shimada, Hiroyuki Takeda Cellular and molecular mechanisms for the establishment of the dorsal and ventral compartments in the teleost somite. 50th annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2017

Kota Abe, Atsuko Shimada, Hiroyuki Takeda Cellular and molecular mechanisms for the establishment of the lifelong dorsoventral compartment boundary in the teleost trunk. 18th International Congress of Developmental Biology, 2017.

Atsuko Shimada, Kota Abe, Hiroyuki Takeda. Development of the *zic1*-expressing dorsal compartment in fish and its implications for evolution of the vertebrate trunk morphology. 第 22 回国際動物学会、2016.

〔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 :

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。