

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18370091
 研究課題名（和文） 非筋ミオシンとアクチン細胞骨格によるショウジョウバエ左右非対称性形成機構の研究
 研究課題名（英文） Studies on the mechanisms of left-right asymmetric development involving actin cytoskeleton and unconventional myosins in *Drosophila*
 研究代表者
 松野 健治（MATSUNO KENJI）
 東京理科大学・基礎工学部・教授
 研究者番号：60318227

研究成果の概要：

動物のからだは左右非対称になる機構は、進化的に多様であり、脊椎動物の一部を除いて、ほとんど理解されていない。

本研究では、遺伝学的解析手段が駆使できるショウジョウバエの消化管にみられるステレオタイプな左右非対称性に着目した。胚消化管の左右性に異常を示す突然変異体を網羅的に検索し、得られた遺伝子の機能を解析した。その結果、*Myosin31DF*が、*DE-cadherin*の機能を介して、消化管上皮細胞の形態を左右非対称にしていることがわかった。コンピュータ・シミュレーションによって、この左右非対称な形状が、左右非対称性形成に十分であることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,800,000	0	4,800,000
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	2,640,000	16,240,000

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：左右非対称性、消化管、上皮細胞、ミオシン、アクチン、E-カドヘリン、ショウジョウバエ、シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

からだの左右非対称性は、動物形態の基本的属性の一つである。左右軸は、前後軸や背腹軸とともに、体軸の要素として、胚発生の基礎となっている。したがって、左右非対称性の形成機構は、個体発生や臓器形成を理解するための中心的な課題の一つである。

脊椎動物では、左右軸が形成される機構がよく理解されている。たとえば、マウスや魚類では、結節（ノード）に存在する単繊毛の

運動によってできる胚体外液の左方向への流れ（ノード流）が、左右極性を決定する。しかし、他の脊椎動物では、ノード流以前にも左右情報が存在することが示されている。また、動物界を見わたすとき、脊椎動物以外の多くの動物門では、ノード流とは異なる機構で左右非対称性が形成されることが示唆されている。したがって、左右対称性が破られる機構は進化的に多様であると考えられる。しかし、これまでに分子レベルの機構が

明らかになっているのは、ノード流モデルのみである。

2. 研究の目的

これらの知見に基づき、研究代表者のグループは、未知の左右性形成機構が存在すると考え、ショウジョウバエの左右非対称性形成に関する研究を行ってきた。ショウジョウバエ胚の消化管は、大きく分けて、前腸、中腸、後腸から成り、おのおのが、明瞭でステレオ



図1 ショウジョウバエの野生型胚の後腸は、右方向に屈曲している。非定型ミオシンI・ファミリー遺伝子である *Myo31DF* の突然変異体では、この屈曲が反転する。

タイプな左右非対称性を示す。研究代表者のグループのこれまでの成果によって、I型ミオシン/アクチン細胞骨格に依存する新たな左右非対称性形成機構が存在することを明らかになった。図1に示すように、*Myosin31DF* (*Myo31DF*) の突然変異ホモ接合体胚では、消化管の左右性が逆転（鏡像化）する。しかし、この機構の実体については、ほんの一端を明らかにできたのみである。そこで、本研究では、アクチン細胞骨格と非筋ミオシンに依存するショウジョウバエの左右非対称性形成機能を、分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生化学的アプローチによって、*Myo31DF* に特異的に結合する因子を同定する。

Myo31DF の左右非対称性形成における機能を理解するためには、これらとともに機能する因子の同定が必要であると考えた。*Myo31DF* の全長タンパク質にTAP-タグを付加した融合タンパク質を合成する胚を得る。TAP-タグを用いて、*Myo31DF* と複合体を形成するタンパク質をアフィニティー精製し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動法で回収する。回収した各タンパク質の同定は、MALDI-TOF MSを用いたPMF分析によって行った。

(2) 遺伝的スクリーニングによって、*Myo31DF* の機能に必須な遺伝子を同定する。

これまでの研究において、第二染色体（全ゲノム遺伝子の約40%を含む）についての飽和突然変異誘発を用いたスクリーンを完了している。第三染色体（全ゲノム遺伝子の約

40%を含む）に関して、同様のスクリーニングを行ない、全ゲノム遺伝子に対する網羅的検索を完了させる。具体的には、EMS (ethyl methanesulfonate) を用いて突然変異を誘発し、これを系統化した。樹立した各系統について、ホモ接合体胚での消化管の左右性の異常を、微分干渉顕微鏡を用いて観察した。得られた突然変異体については、責任遺伝子を定法にしたがって同定する。

(3) 後腸上皮におけるアクチン細胞骨格の左右非対称な平面極性を、*in vivo* イメージングで検証する。

左右非対称なからだや内臓の形態は、これらを形成する細胞群が、左右情報に対して、連携した細胞応答を示すことで形成されると考えられる。ショウジョウバエ胚消化管の上皮組織が、左右非対称な形態をとるさいの上皮細胞の挙動を、コンピュータ・シミュレーションとライブイメージングを用いて解析する。

4. 研究成果

(1) 生化学的アプローチによって、*Myo31DF* に特異的に結合する因子を同定する。

Myo31DF と複合体を形成する3種類のタンパク質を質量分析法で同定できた。しかし、*in vitro* での免疫共沈殿法では、*Myo31DF* とこれらのタンパク質の間の結合を確認することができなかった。したがって、現在のところ、これらの結合が機能的に意味のあるものかどうかは不明である。

(2) 遺伝的スクリーニングによって、*Myo31DF* の機能に必須な遺伝子を同定する。

研究代表者のグループは、ショウジョウバエ胚の消化管の左右性に異常を示す突然変異体を網羅的に検索した。これまでに、全ゲノムの約80%の遺伝子を網羅していると予測できる、約8,000の突然変異系統についての検索を終了した。その結果、左右性に異常を示す25の突然変異体を得た。これらのうちの10の突然変異体については、責任遺伝子の同定に成功した。

責任遺伝子が同定できた突然変異体のなかでも、*Myo31DF* の突然変異体では、消化管の大部分が鏡像化することを明らかにしている（図1）。左右非対称性の形成における *Myo31DF* の機能は、アクチン細胞骨格に依存していた（図）。また、同定した突然変異には、E-カドヘリンのショウジョウバエ相同遺伝子である *DE-cadherin* (*DE-cad*) の突然変異体も含まれており、*DE-cad* ホモ接合体では、消化管の大部分の左右性がランダム化した。

消化管の左右非対称な形態が正常に形成されるためには、後腸上皮における *Myo31DF* と *DE-cad* の機能が必要であったことから、

これら2つの遺伝子の後腸上皮における機能的関係を調べた。その結果、DE-cadの分布は、これらの細胞の前後方向の接触面にかたよった、平面極性を示すことがわかった。さら

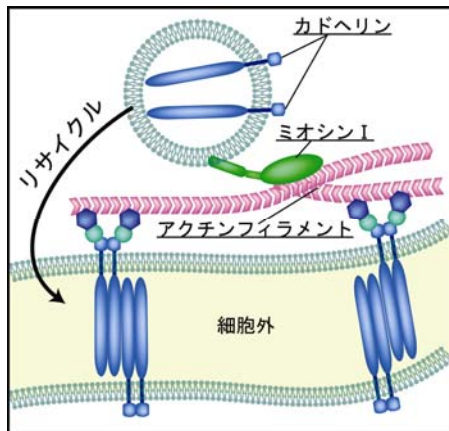


図2 I型ミオシンは、カドヘリンのリサイクルで機能し、カドヘリンの分布に平面極性を与えている。これは、左右非対称性の形成に必要であると考えられた。

に、Myo31DFは、DE-cadのリサイクルを介して、DE-cadを平面極性にしたがって分布させていることを示した(図2)。

次に、後腸上皮細胞の形態を詳細に解析した結果、細胞の形状に左右極性が認められた。そこで、この細胞形状の左右極性が、後腸の左右非対称な形態形成ではたしている役割を、コンピュータ・シミュレーションを用いて検討した。その結果、上皮細胞の形状の左右極性によって、後腸の左右非対称な形態形成が説明できることが示唆された。このような機構は、これまでに報告されていない、ユニークなものである。

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15件)

- (1) Okumura, T., Utsuno, H., Kuroda, J., Gittenberger, E., Asami, T., and Matsuno, K. The development and evolution of left-right asymmetry in invertebrates: lessons from *Drosophila* and snails. *Dev. Dyn.* 237, 3497-3515 (2008).
- (2) Hozumi, S., Maeda, R., Taniguchi-Kanai, M., Okumura, T., Taniguchi, K., Kawakatsu, Y., Nakazawa, N., Hatori, R., and Matsuno, K. The head region of unconventional Myosin I family members is responsible for the organ-specificity of their roles in left-right polarity in *Drosophila*. *Dev. Dyn.* 237, 3528-3537 (2008).
- (3) Wilkin, M. B., Tongngok, P., Gensch, N., Clemence, S., Motoki, M., Yamada, K., Hori, K., Taniguchi-Kanai, M., Franklin, E., Matsuno, K., and Baron, M. *Drosophila* HOPS and AP-3 complex genes are required for a Deltex-regulated activation of Notch in the endosomal trafficking pathway. *Dev. Cell* 15, 762-772 (2008).
- (4) Kagesawa, T., Nakamura, Y., Nishikawa, M., Akiyama, Y., Kajiwara, M., and Matsuno, K. Distinct activation patterns of EGF receptor signaling in the homoplastic evolution of eggshell morphology in genus *Drosophila*. *Mech. Dev.* 125, 1020-1032 (2008).
- (5) The *O*-fucosyltransferase *O*-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in *Drosophila*. Sasamura, T., Ishikawa, H. O., Sasaki, N., Higashi, S., Kanai, M., Nakao, S., Ayukawa, T., Aigaki, T., Noda, K., Miyoshi, E., Taniguchi, N., and Matsuno, K. *Development* 134, 1347-1356 (2007).
- (6) Soma-dependent modulations contribute to divergence of rhomboid expression during evolution of *Drosophila* eggshell morphology. Nakamura, Y., Kagesawa, T., Nishikawa, M., Hayashi, Y., Kobayashi, S., Niimi, T., and Matsuno, K. *Development* 134, 1529-1537 (2007).
- (7) Roles of type I Myosins in *Drosophila* handedness. Taniguchi, K., Hozumi, S., Maeda, R., Okumura, T., and Matsuno, K. *Fly* 1, 287-290 (2007).
- (8) *D*-JNK signaling in visceral muscle cells controls the laterality of the *Drosophila* gut. Taniguchi, K., Hozumi, S., Maeda, R., Ooike, M., Sasamura, T., Aigaki, T., and Matsuno, K. *Dev. Biol.* 311, 251-263 (2007).
- (9) Mastermind-1 is required for Notch signal-dependent steps in lymphocyte development in vivo. Oyama, T., Harigaya, K., Muradil, A., Hozumi, K., Habu, S., Oguro, H., Iwama, A., Matsuno, K., Sakamoto, R., Sato M., Yoshida, N., and Kitagawa, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 9764-9769 (2007).
- (10) The novel cargo Alcadein induces vesicle association of kinesin-1

motor components and activates axonal transport. Araki, Y., Kawano, T., Taru, H., Saito, Y., Wada, S., Miyamoto, K., Kobayashi, H., Ishikawa, H. O., Ohsugi, Y., Yamamoto, T., Matsuno, K., Kinjo, M., and Suzuki, T. *EMBO J* 26, 1475-1486 (2007).

- (11) Roles of single-minded in the left-right asymmetric development and tissue specifications of the *Drosophila* embryonic gut. Maeda, R., Hozumi, S., Taniguchi, K., Sasamura, T., Murakami, R., and Matsuno, K. *Mech. Dev.* 124, 204-217 (2007).
- (12) Polarized exocytosis and transcytosis of Notch during its apical localization in *Drosophila* epithelial cells. Sasaki N., Sasamura, T., Ishikawa, H. O., Kanai, M., Ueda, R., Saigo, K., Aigaki, T., and Matsuno K. *Genes to Cells* 12, 89-103 (2007).
- (13) ショウジョウバエにおける左右非対称性形成の遺伝学的解析 前田礼男, 穂積俊矢, 谷口喜一郎, 奥村高志, 松野健治 *生化学* 6 (12), 1131-1134 (2007).
- (14) Fuwa, T. J., Hori, K., Sasamura, T., Higgs, J., Baron, M. and Matsuno, K. The first *deltex* null mutant indicates tissue-specific *deltex*-dependent Notch signaling in *Drosophila*. *Mol. Genet. and Genom.* 275, 251-263 (2006).
- (15) Hozumi, S., Maeda, R., Taniguchi, K., Sasamura, T., Spéder, P., Noselli, S., Aigaki, T., Murakami, R. and Matsuno, K. A *Drosophila* unconventional myosin reverses the default handedness in visceral organs. *Nature* 440, 798-802 (2006).

[学会発表] (計22件)

- (1) Reo Maeda, Shunya Hozumi, Kiichiro Taniguchi, Takeshi Sasamura, Toshiro Aigaki, Ryutaro Murakami, Kenji Matsuno Doctor no and Ken and Barbie are involved in the left-right asymmetrical development of the *Drosophila* embryonic gut., 49th Annual *Drosophila* Resarch Conference, 2008年4月3日, サンディエゴ
- (2) Takashi Okumura, Hiroo Fujiwara, Kiichiro Taniguchi, Reo Maeda, Syunya Hozumi, Kenji Matsuno Nonmuscle Myosin II heavy chain Zipper is required for the left-right asymmetric morphology of the proventriculus and midgut in

Drosophila embryo., 49th Annual *Drosophila* Resarch Conference, 2008年4月3日, サンディエゴ

- (3) Takashi Okumura, Hiroo Fujiwara, Kiichiro Taniguchi, Reo Maeda, Syunya Hozumi,, Naotaka Nakazawa, Mitsutoshi Nakamura, Haruka Yamamoto, Kenji Matsuno Nonmuscle Myosin II heavy chain Zipper is required for the left-right asymmetric morphology of the anterior midgut in *Drosophila* embryo., 第41回日本発生物学会大会, 2008年5月28日, 徳島
- (4) Naotaka Nakazawa, Kiichiro Taniguchi, Takashi Okumura, Reo Maeda, Syunya Hozumi, Mitsutoshi Nakamura, Haruka Yamamoto, Takeshi Kusama, Ryo Hatori, kenji Matsuno ショウジョウバエ胚の消化管における左右非対称な発生に関わる遺伝子のスクリーニング, 第41回日本発生物学会大会, 2008年5月28, 29日, 徳島
- (5) Kiichiro Taniguchi, Tadashi Ando, Takashi Okumura, Reo Maeda, Naotaka Nakazawa, syunya Hozumi, Kenji Matsuno Δ E-Cadherin-and MyosinID-dependent cell shape changes were involved in the laterality of the *Drosophila* embryonic gut., 第41回日本発生物学会大会, 2008年5月28, 29日, 徳島
- (6) Reo Maeda, Shunya Hozumi, Kiichiro Taniguchi, Takeshi Sasamura, Toshiro Aiaki, Kenji Matsuno Doctor no and Ken and Barbie are involved in the Left-right asymmetrical development of the *Drosophila embryonic* gut., 第41回日本発生物学会大会, 2008年5月28, 29日, 徳島
- (7) 松野健治, ショウジョウバエにおける左右非対称性の形成機構 - 遺伝学とコンピュータ・シミュレーションによるアプローチ, 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月12日, 神戸
- (8) Kiichiro Taniguchi, Tadashi Ando, Takashi Okumura, Maiko Taniguchi-Kanai, Naotaka Nakazawa, Reo Maeda, Mitsutoshi Nakamura, Syunya Hozumi, Kenji Matsuno Δ E-Cadherin-and MyosinID-dependent cell shape changes were involved in the laterality of the *Drosophila* embryonic gut., 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会

- 合同大会, 2008年12月10日, 神戸
- (9) Takashi Okumura, Hiroo Fujiwara, Kiichiro Taniguchi, Reo Maeda, Hozuki Syunya, Naotaka Nakazawa, Mitutoshi Nakamura, Haruka Yamamoto, Kenji Mstsunno A nonmuscle Myosin II heavy chain, Zipper, is required for the left-right asymmetric morphogenesis of the anterior midgut in *Drosophila* embryo., 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月10日, 神戸
- (10) 黒田純平, 吉田匡, 山本遙, 奥村高志, 前田礼男, 谷口喜一郎, 川勝康弘, 中澤直高, 中村充利, 石尾彬, 尾崎あゆみ, 羽鳥僚, 松野健治 Wnt シグナル構成因子である LDL 受容体をコードするショウジョウバエ arrow の消化管の左右非対称性形成における機能., 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月10日, 神戸
- (11) Reo Maeda, Shunya Hozumi, Kiichiro Taniguchi, Takeshi Sasamura, Toshiro Aigaki, Kenji Matsuno Doctor no and Ken and Barbie are involved in the left-right asymmetrical development of the *Drosophila* embryonic gut., 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月10日, 神戸
- (12) Yasuhiro Kawakatsu, Takasi Okumura, Reo Maeda, Kiichiro Taniguchi, Naotaka Nakazawa, Kenji Matsuno Septate junctions are required for left-right asymmetric development of the embryonic gut in *Drosophila melanogaster*., 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月11日, 神戸
- (13) Reo Maeda, Shunya Hozumi, Kiichiro Taniguchi, Takeshi Sasamura, Ryutaro Murakami, Kenji Matsuno Roles of *single-minded* in the left-right asymmetric development and tissue specifications of the *Drosophila* embryonic gut., 48th Annual Drosophila Resarch Conference, 2007年3月8日, フィラデルフィア
- (14) Kiichiro Taniguchi, Shunya Hozumi, Reo Maeda, Shuichi Shirakabe, Hiroo Fujiwara, Takeshi Sasamura, Aigaki Toshiro, Kenji Matsuno The rearrangement of circular visceral musculature cells controlled by JNK signaling is involved in the left-right asymmetric looping of the anterior-midgut in *Drosophila*., 48th Annual Drosophila Resarch Conference, 2007年3月8日, フィラデルフィア
- (15) 谷口喜一郎, 穂積俊矢, 前田礼男, 大池雅, 笹村剛司, 相垣敏郎, 松野健治 JNK シグナルにより制御される内臓筋細胞の編成はショウジョウバエ中腸前部の左右非対称的な屈曲に必要である., 第40回日本発生生物学会 第59回日本細胞生物学会 合同大会, 2007年5月28日, 福岡
- (16) 前田礼男, 穂積俊矢, 谷口喜一郎, 笹村剛司, 村上柳太郎, 松野健治 ショウジョウバエ胚消化管の左右非対称性形成における *single-minded* 遺伝子の役割., 第40回日本発生生物学会 第59回日本細胞生物学会 合同大会, 2007年5月29, 30日, 福岡
- (17) 前田礼男, 穂積俊矢, 谷口喜一郎, 笹村剛司, 村上柳太郎, 松野健治 ショウジョウバエ胚消化管の左右非対称性形成における *single-minded* 遺伝子の役割., 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会, 2007年12月13日, 横浜
- (18) 吉田匡, 前田礼男, 谷口喜一郎, 奥村高志, 黒田純平, 中澤直高, 中村充利, 山本遙, 草間岳史, 松野健治 A genetics screen to indentify genes involved in the left-right asymmetric development of the embryonic gut in *Drosophila*., 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会, 2007年12月13日, 横浜
- (19) 奥村高志, 藤原普夫, 谷口喜一郎, 前田礼男, 穂積俊矢, 吉田匡, 中澤尚高, 中村充利, 草間岳史, 山本遙, 松野健治 ショウジョウバエ定型非筋ミオシンII重鎖 Zipper は前胃の左右非対称な屈曲に必要である., 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会, 横浜
- (20) Shunya Hozumi, Reo Maeda, Kiichiro Taniguchi, Maiko Kanai, Syuichi Shirakabe, Takeshi Sasamura, Toshiro Aigaki, Ryutaro Murakami, Kenji Matsuno A *Drosophila* unconventional myosins regulate handedness in visceral organs., 日本発生生物学会 第39回大会, 2006年6月3日, 広島
- (21) Kiichiro Taniguchi, Shunya Hozumi, Reo Maeda, Shuichi Shirakabe, Hiroo Fujiwara Takeshi Sasamura, Toshiro Aigaki, Kenji Matsuno The rearrangement of visceral musculature cells controlled by JNK

signaling is involved in the left-right asymmetric looping of the anterior-midgut in *Drosophila*. , 日本発生生物学会 第 39 回大会, 2006 年 6 月 1 日, 広島

- (22) Reo Maeda, Shunya Hozumi, Kiichiro Taniguchi, Syuichi Shirakabe, Hiroo Fujikawa Takeshi Sasamutra, Toshiro Aigaki, Ryutaro Nurakami, Kenji Matsuno A genetic screen to identify genes required for left-right asymmetry in *Drosophila melanogaster*. , 日本発生生物学会 第 39 回大会, 2006 年 6 月 1 日, 広島

[図書] (計 6 件)

- (1) 奥村高志, 川勝康弘, 谷口喜一郎, 松野健治, 秀潤社, 細胞工学, 2008, 553-557.
- (2) Ayukawa, T. and Matsuno K., Springer Verlag, Tokyo, Glycoscience Lab Manual, 2008, 295-298.
- (3) 穂積俊矢, 前田礼男, 谷口喜一郎, 松野健治, 共立出版, 蛋白質核酸酵素, 2007, 227-235.
- (4) 中越英樹, 松野健治, 共立出版, 蛋白質核酸酵素, 2007, 119-125.
- (5) 穂積俊矢, 前田礼男, 谷口喜一郎, 松野健治, 秀潤社, 細胞工学, 2006, 642-643.
- (6) 前田礼男, 穂積俊矢, 谷口喜一郎, 松野健治, オーム社, Bionics, 2006, 70-71.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://matsuno-lab.homeip.net/frame.htm>
1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 健治 (MATSUNO KENJI)
東京理科大学・基礎工学部・教授
研究者番号: 6 0 3 1 8 2 2 7

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

前田 礼男 (MAEDA REO)
東京理科大学・基礎工学部・助教
研究者番号: 4 0 4 5 3 8 3 1

奥村 高志

東京理科大学・基礎工学部・特別研究員

研究者番号: 2 0 4 4 9 2 3 4