

## 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24年5月21日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20247030

研究課題名（和文）メダカ遺伝学を用いた脊椎動物体軸形成機構の解析

研究課題名（英文） GENETIC ANALYSIS OF AXIS FORMATION IN VERTEBRATES USING MEDAKA

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

研究成果の概要（和文）：本研究ではメダカ変異体を用いて、(1) 左右軸形成および(2) 後期の背腹軸形成メカニズムを解析した。(1) については、新規タンパク質 Ktu がシャペロンとともに細胞質で軸系ダイニン複合体の形成に必須であること、Pkd111 という膜タンパク質がノード領域の運動性繊毛でノード流の感知に必須であることを明らかにした。(2) については、*zic1/zic4* 遺伝子が中胚葉性組織を通して、体幹部の背腹軸形成および尾部形態に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The study has demonstrated the novel mechanisms of left-right axis formation and late dorsoventral patterning using medaka developmental mutants. First, medaka left-right mutants have identified the novel cytoplasmic protein, Ktu required for axonemal dynein assembly together with molecular chaperons. Furthermore, the un-characterized membrane protein Pkd111 was found to serve as a flow sensor on motile cilia in the node region at an initial step of left-right determination. Finally, *zic1/zic4* have crucial roles in dorsoventral patterning of the trunk region and in tail morphogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	19,300,000	5,790,000	25,090,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
総計	34,000,000	10,200,000	44,200,000

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：左右軸、背腹軸、メダカ、突然変異体

## 1. 研究開始当初の背景

実験発生学、遺伝学そしてゲノム科学の分野で優れたモデル生物である小型魚類メダカを用いて、左右軸形成と後期の背腹軸形成のメカニズムを解明する。これらの知見は基礎発生学だけでなく、疾病の原因解明や疾患モデル系の確立など広く生命科学の分野に貢

献するものである。具体的には、(1) 順遺伝学からの左右軸形成機構へのアプローチ、(2) ユニークなメダカ *Da* 変異体を用いた胚、成体の背腹パターン形成を制御するメカニズムの解明、の2点に絞った研究を実施する。

## 2. 研究の目的

(1-1) 左右軸変異体 *ktu* の原因遺伝子の機能解析を行う。*ktu* がコードするタンパク質は新規で細胞質中に存在し、軸糸ダイニンの形成に必須であることがわかってきた。作用機序についてさらなる機能解析が必要である。

一方、*ktu* 変異体は、ヒトにおいて高頻度に (1:1000 live birth) 発症し、治療法がない多発性嚢胞腎 (PKD) を必ず発症する。この発症過程を詳細に解析する。

(1-2) 左右軸変異体 *abc* の原因遺伝子も機能未知のタンパク質をコードしていることが判明している。ドメイン構造からイオンチャンネルに関係した膜タンパク質であると予想されている。本研究では、左右軸変異体 *abc* の原因遺伝子の機能を解析し、左右軸形成メカニズムに迫る。

(2) メダカ *Da* 変異体は *Zic* 遺伝子の調節領域の異常により、体節背側での発現が消失して、その結果体幹部の背腹軸異常がおこると考えられている。本研究では、体節エンハンサーの特定と *Da* 変異の確定を目指し、後期発生における背腹軸形成のメカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

(1-1) *Ktu* の機能解析はメダカだけでなくマウスとクラミドモナスを用いて実施する。またノックアウトマウスの表現型も詳細に調べる。

PKD 発症過程の観察では、メダカの透明な特性を生かして、*ktu* 変異を導入した透明メダカ+GFP トランスジェニック個体 (腎臓が特異的に GFP を発現する系統は樹立済み) のライブイメージングを、最近開発された顕微鏡 DSLM (基生研・亀井保博研究室と共同) を用いて解析する。並行して、画像解析ソフトを用いた組織学的解析も行う。

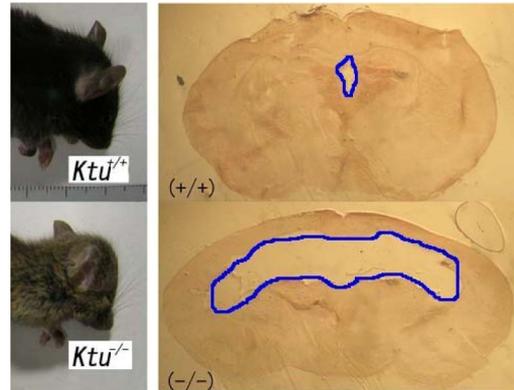
(1-2) *abc* 変異体の原因遺伝子の機能解析を分子生物学的手法を用いて実施する。

(2) *Da* 変異体の解析では、体節細胞の移植実験を野生型と変異体間で実施し、体節が体型と色素細胞の変化の直接の原因かどうか特定する。また、*medaka microarray* を用いて、野生型と *Da* 胚体節間で網羅的な遺伝子発現プロフィールを比較する。

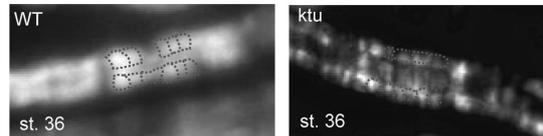
### 4. 研究成果

(1-1) *Ktu* および関連タンパク質の機能：*Ktu* 欠失時における哺乳類の表現型の解析を行うため、ノックアウトマウスを国立遺伝学研究所・相賀裕美子研究室と共同で作製したところ、頭部脳室の拡大 (水頭症) など繊毛の運動異常によって生じる様々な表現型を示した (下図)。また、免疫組織染色の結果から、*Ktu* は細胞質中に存在すること、および *Ktu* 依存的にダイニン重鎖やシャペロン

タンパクの局在が変化することが示され、分子シャペロンとともに細胞質内におけるダイニンの組み立てのプロセスに関わる可能性が示唆された。



一方 PKD を発症する突然変異体 *ktu* と前腎を可視化したトランスジェニック系統を用いて、正常の前腎形成過程及び *ktu* における PKD 発症過程のライブイメージングを試みた。その結果、*ktu* における管拡張は特定の時期 (受精後 4 日) に前腎前端で起こり、その後前腎全体に拡張領域が拡大していくことが明らかになった。また、細胞の扁平化は前腎管拡張よりも遅い時期 (受精後 6 日) に起こることが明らかになった。このことは細胞増殖と扁平化は別の原因であることを示唆している (下図)。



以上の結果については、一部は論文発表済み (Omran et al., 2008) で、他は現在投稿準備中である。

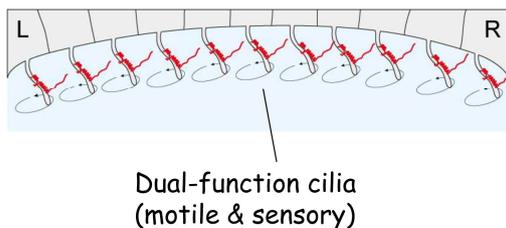
(1-2) *abc* 変異体の positional cloning の結果、*pkd111* が原因遺伝子であることが判明した。*pkd111* とは、11 回膜貫通型のタンパク質 (2742 aa) をコードする機能未知の遺伝子である。in situ hybridization の結果、*pkd111* は左右軸を決めるノード流が発生する Kupffer vesicle (KV; ノード相同器官) 上皮特異的に発現していた。

*Pkd111* は *Pkd1* ファミリーの 1 つである。そこで、*Pkd1* からその機能を類推した。PKD (Polycystic Kidney Disease) は腎臓が肥大する病気であり、腎臓では尿細管液の流れを繊毛で感知している。*Pkd1* は繊毛上でメカノセンサーとして働いており、*Pkd1* が尿細管液の流れを感知すると、複合体を形成する *Pkd2* ( $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル) を通して細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入する。マウスやゼブラフィッシュでは *Pkd2* の機能欠損により内臓逆位を生じるこ

とが報告されており、また、マウスの *node* の繊毛に *Pkd2* が局在することも知られていた。一方、*Pkd1* のノックアウトマウスでは内臓逆位は生じず、*node* の繊毛にも局在していない。そのため、左右性形成における *Pkd2* のパートナーは今まで不明であった。以上の事実から、KV 内でも左右性形成において腎臓と類似の現象が生じていると仮定すると、*Pkd111* が *Pkd2* と複合体を形成することにより *nodal flow* のセンサーとして働いていると考えられる。*in situ hybridization* とモルフォリノアンチセンスオリゴ阻害実験の結果から、メダカにおいても *pkd2* は KV に発現し、左右性形成に関わっていることが示された。また、免疫共沈降実験の結果、*Pkd111* と *Pkd2* の相互作用が検出された。さらに、免疫染色の結果から、*Pkd111* と *Pkd2* は相互に依存して KV の繊毛に局在していることがわかった。

以上の結果より、*Pkd111* と *Pkd2* は KV の繊毛上で複合体を形成して、*nodal flow* のセンサーとして働いていることが示唆された。また、それらの繊毛は全て動く繊毛であることも示された。これらの結果は今までの“two-cilia model”にはあてはまらず、本論文では新たなモデル“dual-function cilia model”が提示された(下図)。それは、KV の繊毛は 1 種類であり、同時に以下の 2 つの役割を担っている、というものである。すなわち、KV の繊毛は①回転運動によって *nodal flow* を作ると同時に、②繊毛上の *Pkd111* と *Pkd2* を介して *nodal flow* を感知していると考えられる。

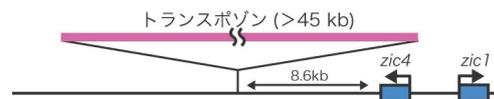
#### Dual function cilia model



これらの成果は、Kamura et al. (2011)の論文で発表済みである。

(2) *Da* 変異体の原因については、*zic1*, *zic4* 周辺領域における変異を探索し、*Da* では >45 kb の新規トランスポゾン(Albatross と命名)が *zic4* の下流 8.6kb の位置に挿入されていることが明らかになった(下図)。さらに、改変した BAC を用いたレポーターアッセイにより、*zic1*, *zic4* の体節特異的エンハンサーが *zic4* の下流に存在することが示された。以上から、*Da* では大きな DNA 断片の挿入により *zic1*, *zic4* の体節エンハンサー活性が特異的

に阻害され、外部形態が変化していることが示された。

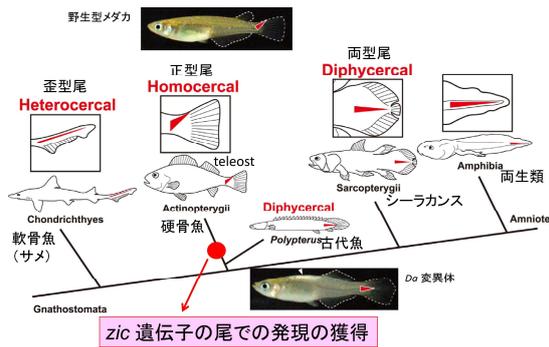


次に体節移植によって、体節での *zic1/zic4* の発現が外部形態の背側化を制御することを証明し、「体節背側における *zic1/zic4* の発現が体幹部背側のアイデンティティを付与する」という新規の背腹パターン形成メカニズムを明らかにした。

標的遺伝子同定では、マイクロアレイ解析および詳細な発現解析により、*Zic1/Zic4* の下流遺伝子として *fhl2a*, *lfng*, *slit1a* を同定した。さらに、Notch シグナルの標的遺伝子である *her6a* および *Slit1a* のレセプターである *robo1a* の発現解析から、*Zic1/Zic4* が体節背側における Notch シグナルの活性化および *robo1a* 発現細胞の移動という 2 つの経路を介して背側形態を制御することが示唆された。*Slit-Robo* 経路は神経軸索の伸長・投射に重要なシグナル経路として知られている。一方、Notch 経路は隣接する細胞間で違った運命へ分化するように作用する側方抑制の機能が有名である。今後、皮筋節や筋節マーカーを用いて、各種阻害実験により、これら二つの経路が背側形態形成に寄与する分子機構について解析を行う必要がある。

最後に尾部形態の進化と *zic* 遺伝子の役割について、*Da* 変異体の表現型を中心に解析した。現在、魚類の中で最も繁栄している硬骨魚類の尾部は尾端が背側に屈曲する正型尾となっている(下図)。正型尾は真骨魚類に特有の形態であり、水中環境での遊泳に最も適した形態であると考えられている。外見上は背腹対称な形態であるが、内部構造は極端に背腹非対称な形態となっている。尾部骨と呼ばれる脊椎後端部が背側に屈曲し、下尾骨と呼ばれる特殊化した腹側の骨要素が尾鰭を支える形となっている。正型尾は真骨魚類の進化における最も重要な新規形質の一つであると考えられている。野生型メダカは典型的な正型尾を持つが、*Da* 変異体の尾ひれは尾端が屈曲せず、古代魚や四足動物へつながる肉鰭類(シーラカンスなど)の尾の形態(両型尾)に類似している。*Da* 変異体とその原因遺伝子 *zic1*, *zic4* を手掛かりとし、条鰭類・真骨魚類における正型尾形成機構を明らかにした。野生型および *Da* 変異体の尾部形態の発生と *zic* の発現の詳細な解析により、硬骨魚類の系譜で尾端の背側間充織で *zic* が特異的に発現し、その結果背側で骨形成と細胞増殖が抑制されることを見出した。即ち、*zic* の尾部背側での発現の獲得が硬骨魚類の祖先で起こり、その繁栄に重要なイベントで

あることが示された。



これらの結果の一部は、Moriyama et al. (2012)の論文で発表済みで、他は現在投稿準備中である。

#### 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 8 件)

(1)Moriyama, Y., Kawanishi, T., Nakamura, R., Tsukahara, T. et al “The Medaka *zic1/zic4* Mutant Provides Molecular Insights into Teleost Caudal Fin Evolution” *Curr Biol*, 査読有, 22, 601-7 (2012) DOI:10.1016/j.cub.2012.01.063

(2)Kamura, K., Kobayashi, D., Uehara, Y., Koshida, S. et al “Pkd11l complexes with Pkd2 on motile cilia and functions to establish the left-right axis” *Development*, 査読有, 138, 1121-9(2011) DOI:10.1242/dev.058271

(3)Takeda, H., Shimada, A. “The art of medaka genetics and genomics: what makes them so unique?” *Annu Rev Genet*, 査読有, 44, 217-41(2010) DOI:10.1146/annurev-genet-051710-151001

(4)Sato, A., Koshida, S. & Takeda, H. “Single-cell analysis of somatotopic map formation in the zebrafish lateral line system” *Dev Dyn*, 査読有, 239, 2058-65 (2010) DOI:10.1002/dvdy.22324

(5)Ishimatsu, K., Takamatsu, A., Takeda, H. “Emergence of traveling wave in the zebrafish segmentation clock” *Development* 査読有, 137, 1595-9(2010) DOI:dev.046888 [pii]10.1242/dev.046888

(6)Tsuda, S., Kitagawa, T., Takashima, S. et al “FAK-mediated extracellular signals are essential for interkinetic nuclear migration and planar divisions in the neuroepithelium” *J Cell Sci*, 査読有, 123, 484-96(2010) DOI:jcs.057851 [pii] 10.1242/Jcs.057851

(7)Sano, S., Takashima, S., Niwa, H. et al “Characterization of teleost *Mdgal* using a gene-trap approach in medaka (*Oryzias latipes*)” *Genesis*, 査読有, 47, 505-13 (2009) DOI:10.1002/dvg.20528

(8) Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N. T., Hagiwara, H., Zhang, Q., Leblond, G., Toole, E. O', Hara, C., Mizuno, H., Kawano, H., Fliegau, M., Yagi, T., Koshida, S., Miyawaki, A., Zentgraf, H., Seithe, H., Reinhardt, R., Watanabe, Y., Kamiya, R., Mitchell, D. R., Takeda, H. “Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins” *Nature*, 査読有, 456, 611-6(2008) DOI:nature07471 [pii]10.1038/nature07471

[学会発表] (計 14 件)

(1) Takeda, H. “Epigenetic regulation of key developmental genes - genome wide approaches in medaka fish”, The first bilateral India-Japan Developmental Biology Workshop, 2012/1/8, バンガロール

(2) 島田 敦子 “発生後期における *zic1/zic4* を介した背腹パターン決定機構”, 第 84 回日本生化学会大会, 2011/9/22, 京都

- (3) 守山 裕大 “*zic1/4* は真骨魚類における正型尾形成に必須である”, 日本動物学会第 82 回旭川大会, 2011/9/21, 旭川
- (4) 武田 洋幸 “Mesodermal origin of scales and fins of the medaka - Insight into origin and evolution of mineralized skeleton in vertebrates”, JSDB-GFE Joint Meeting of Developmental Biology, 2011/3/24, ドレスデン
- (5) 松尾 萌 “Analyses of the cytoplasmic protein Ktu function in axonemaldynein formation during motile ciliogenesis”, 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010/12/9, 神戸
- (6) 加村 啓一郎 “Pkd111/Pkd2 as nodal flow sensor to regulate left-right asymmetry”, 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010/12/9, 神戸
- (7) 島田 敦子 “Embryonic origin of osteoblasts in scales and fins of medaka fish”, 2010 SDB-JSDB Joint Meeting, 2010/8/5, アルバカーキ
- (8) 河西 通 “*zic1* and *zic4* expression in the somite regulates dorsalization of the fish trunk structures”, 2010 SDB-JSDB Joint Meeting, 2010/8/5, アルバカーキ
- (9) 守山 裕大 “The *zic* genes as master regulators in dorsoventral patterning of the fish trunk structures”, 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the SFBD and JSDB 2010, 2010/5/27, パリ
- (10) 佐藤 朗 “Single-Cell Analysis of Somatotopic Map Formation in the Zebrafish Lateral Line System”, 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the SFBD and JSDB 2010, 2010/5/27, パリ
- (11) 武田 洋幸 “The *zic* genes as master regulators in dorsoventral patterning of the fish trunk structures”, CDB シンポジウム, 2010/3/24, 神戸
- (12) 加村 啓一郎 “Left-right mutant medaka identifies a candidate sensor of leftward flow”, 16<sup>th</sup> ISDB 2009, 2009/9/6, スコットランド
- (13) 武田 洋幸 “左右軸から繊毛形成まで - メダカ変異体を用いた遺伝学的解析”, 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, 2008/12/9, 神戸
- (14) 守山 裕大 “Analysis of the somite-specific Enhancer of the *zic* Genes in Medaka: Toward Understanding of the Evolution of the Body Shape in Teleosts”, The 16<sup>th</sup> CDB Meeting, 2008/9/28, 神戸

## 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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし