

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 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370103

研究課題名（和文）

脊椎動物の初期背側決定機構の解析

研究課題名（英文）

Dorsal determination in vertebrate embryogenesis

研究代表者

日比 正彦 (HIBI MASAHIKO)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：40273627

研究成果の概要（和文）：ゼブラフィッシュにおいては、受精卵植物極に存在する背側決定因子が、微小管束に乗って背側に移動し、背側胚盤細胞で Wnt/ β -catenin 経路を活性化することで背側特異的遺伝子の発現を誘導し、背側軸を形成すると考えられてきた。これまで、微小管依存性モータータンパク質 Kinesin I のリンカー分子 Syntabulin が、初期背側決定に重要な役割を果たしていることを見出してきた。本研究では、植物極微小管は予定背側領域に向かってプラス端を伸長すること、Syntabulin は Grip2 (Glutamate receptor interacting protein2) と会合することを見出した。これらの結果は、Kinesin/Syntabulin/Grip2 の複合体が背側決定因子を植物極から予定背側領域に運搬することで、背側を決定していることを示している。

研究成果の概要（英文）：In zebrafish embryos, dorsal determinants are believed to be initially localized to the vegetal pole and then transported to the prospective dorsal side of the embryos through a microtubule array. The dorsal determinants activate the canonical Wnt pathway and thereby promote the expression of genes that induce the dorsal organizer. We previously demonstrated that Syntabulin, a linker protein of kinesin I motor protein, is required for the dorsal organizer. We have found that the parallel microtubule array form at the cortical surface of the vegetal pole around 20 minutes after fertilization; the plus end of microtubules is to the prospective dorsal side. We have also found that Syntabulin can interact with Grip2 (glutamate receptor interacting protein 2). Our findings suggest that a complex of Syntabulin and Grip2 is involved in the microtubule-dependent transport of dorsal determinants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：胚葉形成・原腸形成・体節形成、体軸形成

1. 研究開始当初の背景

1924年、Hans Spemann と Hilde Mangold は両生類を用いた解析から、胚の背側組織の一部が神経・筋肉など背側組織を正確に誘導

する活性を有することを示した。この部分は、背側オーガナイザーと呼ばれ、長年発生学者の興味を惹きつけてきた。近年の分子生物学的解析から、背側オーガナイザーで発現し、

背側オーガナイザーの機能に關与する分子が多く同定されてきた。しかし、背側オーガナイザー形成を引き起こす最初のステップは良く分かっていなかった。

両生類においては、受精を引き金とし、精子陥入点と反対側に卵皮質が回転する(cortical rotation)。Cortical rotationに伴い微小管束が背側に向かって形成され、微小管に沿って細胞小器官を含む色々な物質が背側に運ばれることが示されている。魚類(ゼブラフィッシュ等)においては、精子は動物極に陥入するが、受精後 20 分後に、植物極に一方方向性の微小管束が形成されることが知られている。ゼブラフィッシュの初期胚において、32 細胞期までに微小管形成を阻害した場合、また 1 細胞期に植物極卵黄を物理的に除去した場合、背側構造を全く持たない胚が形成される。これらのデータは、魚類・両生類の初期発生の過程において、受精卵植物極に存在する何らかの分子(背側決定因子)が、微小管束に乗って背側に移動し背側を決定していることを示している。アフリカツメガエル・ゼブラフィッシュ胚における、Wnt/ β -catenin シグナルの阻害・活性化実験から、背側決定因子は Wnt シグナルを活性化し、背側胚盤細胞核での β -catenin の蓄積を誘導し、 β -catenin が共因子 Tcf/Lef と共に背側特異的遺伝子を誘導し、背側特異的遺伝子が背側オーガナイザーを誘導する、と考えられていた(図 1)。

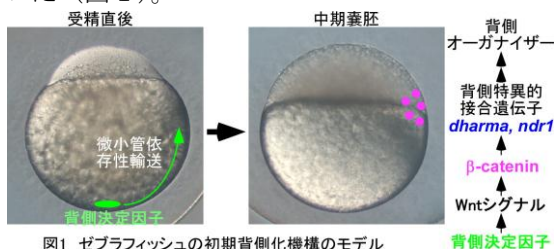


図1 ゼブラフィッシュの初期背側化機構のモデル

2. 研究の目的

我々はこれまで、背側組織の形成不全を示すゼブラフィッシュ母性遺伝子効果変異体 *tokkaebi* を同定した。*tokkaebi* ホモ接合体雌魚から産まれた胚(*tokkaebi* 胚)は、腹側化表現型を示す。典型的な場合、背側組織を全く有しない状態となる。

tokkaebi 胚では、背側特異的遺伝子の発現は誘導されず、また背側胚盤での β -catenin の核への蓄積が認められなかった。さらに、Dvl3 (Dishevelled homolog 3)・活性型 β -catenin・ドミナントネガティブ Gsk3 β や Axin1 を過剰発現させ Wnt シグナルを活性化することで、*tkk* 胚での背側特異的遺伝子の発現が回復することから、*tokkaebi* 遺伝子座がコードする蛋白は β -catenin に至る Wnt シグナルを制御する分子であるか、これら分子の活性・局在を制御している可能性が示唆されていた。

我々は、ポジショナルクローニング法によって *tokkaebi* 遺伝子座を同定した。*tokkaebi* 遺伝子座は、哺乳動物の神経において微小管依存性の輸送に關与することが報告されている Syntabulin をコードしていた。Syntabulin は、微小管上プラス側に物質を輸送するモーター蛋白 Kinesin I と貨物(シナプス小胞前駆体等)を結合させるリンカー蛋白として機能していることが報告されていた。我々は、(1) *tokkaebi* 胚においては *syntabulin* 遺伝子の発現が極めて減少していること、(2) *tokkaebi* 変異染色体上では、*syntabulin* 遺伝子のプロモーターに異常な DNA 断片の挿入があること、(3) *syntabulin* を卵細胞に強制発現することで *tokkaebi* 胚の表現型が回復されること、(4) 初期卵割胚において *syntabulin* の RNA が卵黄植物極に局在していること、を見出してきた。以上のこと考え合わせると、Syntabulin は背側決定因子の輸送に關与していることが示唆されていた。

本研究では、(1) 微小管依存性に Syntabulin が植物極から背側に輸送される実態を明らかにする、(2) 受精後植物極に形成される微小管の動態を明らかにするとともに、微小管形成を制御する分子機構を明らかにする、(3) Syntabulin が運ぶ物質を同定することで初期背側決定機構を解明する、ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Syntabulin・微小管形成の動態の解析
免疫染色: 作製済みの Syntabulin のモノクローナル・ポリクローナル抗体および β -Tubulin の抗体を用いて、発生初期に植物極に形成される微小管および Syntabulin の局在を観察した。Syntabulin の移動が微小管依存性であるかを、nocodazol や colchicine 等による微小管形成阻害した胚で観察した。

ライブイメージング: 卵細胞特異的遺伝子 (*zpc: zona pellucida*) のプロモーターを用いて、微小管プラス端結合因子 EB1 あるいは α -Tubulin の EGFP 融合タンパク質を卵で発現するトランスジェニックフィッシュを作製し、これを用いて受精 20 分後の微小管形成の動態を共焦点顕微鏡で観察する。

微小管形成因子の探索: 卵黄植物極に発現する遺伝子を探索することで微小管形成に關与する分子を探索する。

(2) Syntabulin 結合タンパク質の同定

Yeast two hybrid 法: Syntabulin の全長を bait として、ゼブラフィッシュの母性 cDNA およ原腸胚、成魚の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、Syntabulin 結合タンパク質の同定を行った。

抗体を用いた Syntabulin 会合蛋白の同定: 未受精卵から、蛋白抽出液を作製した。ポリクローナル及びモノクローナル抗体を用いて

免疫沈降し、沈降してきた蛋白を、SDS-PAGE、銀染色にて解析する。共沈降してきた蛋白を LC-MS 質量分析装置を用いて同定した。

Tandem Affinity Purification (TAP 法)を用いた Syntabulin 会合蛋白の同定：Syntabulin に Calmodulin 結合蛋白と Streptoavidin 結合蛋白をタグとして結合させた蛋白(Syntabulin-CTAP)を発現するトランスジェニックを作製し、Calmodulin と Streptoavidin のカラムで順次精製することで Syntabulin に会合する蛋白の精製を試みた。

Wnt シグナルおよび背側形成に関与する分子との会合：tokkaebi 同様に背側が形成されない母性遺伝子効果変異体 hecate の責任遺伝子 Grip2 (glutamate receptor interacting protein 2)は、ショウジョウバエでは Wnt の受容体 Frizzled と会合することが知られている。また、Wnt の分泌および輸送に関与する Wntless (GPR177)が知られている。これらにタグ (HA, Flag) の付いた発現プラスミドを作製し、タグ(Myc, EGFP)付き Syntabulin と培養細胞で発現させ、共免疫沈降法にてタンパク質相互作用を解析した。

4. 研究成果

(1) Syntabulin は微小管依存性に輸送される
免疫組織染色の結果から、Syntabulin タンパク質は最初植物極に局在するが、微小管の形成される受精後 20 分より、一方向に移動することが明らかとなった。しかし、胚盤細胞までは移動することなく、2 細胞期に入るころには (受精後 60 分) 免疫組織においても Western blotting によっても検出されなくなった (図 2)。また、Syntabulin の一方向性の移動は、微小管形成阻害薬である nocodazole や colchicine によって阻害されることから、Syntabulin は微小管依存性に移動するものと考えられた。

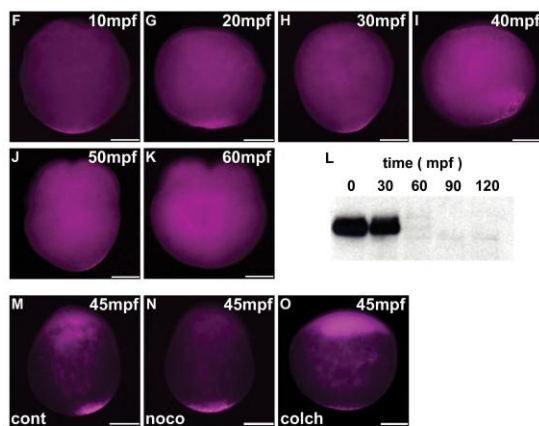


図 2 Syntabulin の局在 (F-K) およびタンパク質の安定性 (L) Syntabulin の一方向への移動は nocodazole (N) あるいは colchicine (M) 処理により抑制される。論文 12 より。

(2) 植物極の微小管形成の動態およびその制御メカニズム

EB1-GFP トランスジェニックフィッシュの受精卵を用いて微小管の伸長方向を検索した。受精後 20 分および 35 分頃より、EB1-GFP の動態を共焦点顕微鏡で経時的に観察を行い (図 3 A)、その後同じ胚で背側オーガナイザー (胚盾) ができる向きを決定し (図 3 B)、EB1 の移動方向と予定背側法方向とを比較した (図 3 C, D)。その結果、受精後 20 分頃に形成される微小管は予定背側方向にプラス端を伸長していた。しかし、35 分頃からは一方向性の微小管形成は検出できなくなりランダムになった。また、一方向性の微小管形成は Tubulin-EGFP のトランスジェニックフィッシュにおいても観察された。これらの結果は、受精後 20 分からの約 10 分間の短い期間において、一方向性の微小管が形成され、これが背側決定に重要な役割を果たしているものと考えられた。

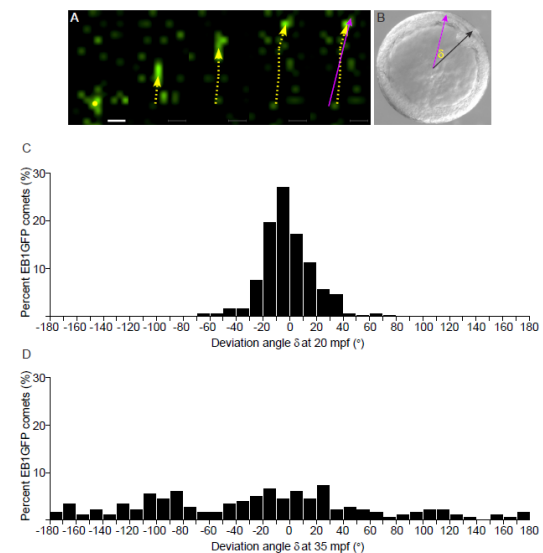


図 3 EB1-GFP を用いた微小管形成の動態解析

(3) 微小管形成を制御する分子の探索
卵黄植物極には体軸形成に関与する遺伝子の mRNA のいくつかが局在することが知られている。アフリカツメガエルで報告されている植物局在遺伝子として、calmodulin kinase 2g (*camk2g1*), *grip2*, *trim36* 等が知られている。ゼブラフィッシュ初期胚においても、これらの遺伝子の mRNA は 1 細胞期胚の卵黄植物極に局在することを確認した。神経組織の軸索伸長において Camk は微小管形成に関与していることから、*camk2g1* が受精によって引き起こされる Ca²⁺シグナルに反応し、植物極の一方向性の微小管形成を制御している可能性が示唆された。

(4) Syntabulin に会合する分子の同定
Yeast two hybrid 法を用いた解析：Syntabulin を bait として Yeast two hybrid スクリーニングを行ったところ、dynein light chain

(LC8-type2)が得られた。Dynein は微小管マイナス端への移動に関与するモータータンパク質であり、Kinesin で Syntabulin が微小管プラス端に運ばれた後、マイナス側に戻す役割があることが想定された。

抗体を用いた Syntabulin 会合蛋白の同定：卵から Syntabulin と共免疫沈降したタンパク質を LC-MS 質量分析を行ったところ、多数のタンパク質を同定した (表 1)。これらの中には、微小管輸送に関与する Kinesin, Dynein, Syntaxin 等が含まれた。

cytoskeletal molecules	Spectrins	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha
		Spectrin beta chain, putative-like
		spectrin repeat containing, nuclear envelope 1-like
		spectrin, beta, erythrocytic
		spectrin beta chain, brain 1
motor proteins	Myosin	myosin-7
		myosin light chain kinase 2-like
		myosin-10-like
		myosin light chain kinase 3
		myosin-1c
	vertebrate myosin VA (heavy polypeptide 12, myosin)	
	Kinesin	kinesin family member 21A-like
		kinesin family member 5B, b
		vertebrate kinesin-like family member protein
		kinesin-like protein KIF11
Dynein	dynein, axonemal, heavy chain 7	
	dynein, axonemal, heavy chain 3-like	
	dynein light chain 1, cytoplasmic	
		cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1
signaling molecules		DEP domain containing 5 isoform 1 (predicted)-like
vesicular transport molecules	syntaxin	syntabulin
		syntaxin 1B-like
		syntaxin-6
	semaphorin	semaphorin-6A
		semaphorin-3ab precursor
		plexin A2
		neuropilin- and tolloid-like protein 1-like
		similar to MARVEL domain containing 2
transcription factors	FYVE domain containing	FYVE domain containing 9 (ZFVE9)
		Rabenosyn-5
	bHLH	E4 binding protein 4-2
		bHLH transcription factor beta3-like
	BTB domain-containing	zinc finger and BTB domain containing 22 isoform 1
		Zinc finger and BTB domain containing 2b
		kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11-like
		BTB/POZ domain-containing protein KCTD10
kinases		phosphorylase kinase, alpha 1 (muscle)
?	WD repeat containing	MAWD binding protein like
		WD repeat-containing protein 48
		uc:ion006: no significant homology

表 1 ゼブラフィッシュ卵から Syntabulin と共免疫沈降してきたタンパク質

Tandem Affinity Purification (TAP 法)を用いた Syntabulin 会合蛋白の同定：タグ付きの Syntabulin を発現するトランスジェニックは完成したが、これを用いた会合タンパク質の同定はまだ行っていない (TAP 法を用いた解析は現在進行中である)。

Wnt シグナルおよび背側形成に関与する分子との会合：HEK293T 細胞に、Myc-Syntabulin あるいは Syntabulin-EGFP と、Grip2-HA, Frizzled8a-Flag, Wntless-Flag を共発現させ、免疫共沈降法でタンパク質相互を検討した。少なくとも培養細胞では、Syntabulin と Grip2、Syntabulin と Wntless が会合することが示された。Wntless は Wnt タンパク質の分泌・輸送に関与していること、Wnt8a の mRNA が植物極に存在し背側決定に重要な役割を果たしていることが示されている。以上を考えると、Syntabulin と Grip2 の複合体が、Wntless を介して Wnt8a タンパク質を含む小

胞を、微小管上で植物極から背側に移動させる役割を持っていることが想定された。

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 12 件)

1. Hashimoto, M. and Hibi, M. (2012) Development and evolution of cerebellar neural circuits. Dev. Growth Differ. 54, 373-389
DOI: 10.1111/j.1440-169X.2012.01348.x.
2. Kuscha, V., Fraser, S.L., Dias, T.B., Hibi, M., Becker, T., and Becker, C.G. (2012) Lesion-induced generation of interneuron cell types in specific dorso-ventral domains in the spinal cord of adult zebrafish. J. Comp. Neurol.
DOI:10.1002/cne.23115
3. Moriyama, Y., Kawanishi, T., Nakamura, R., Tsukahara, T., Sumiyama, K., Suster, M.L., 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., and Takeda, H. (2012) The Medaka zic1/zic4 Mutant Provides Molecular Insights into Teleost Caudal Fin Evolution. Curr. Biol. 22, 601-601.
DOI:10.1016/j.cub.2012.01.063
4. Imai, H., Oomiya, Y., Kikkawa, S., Shoji, W., Hibi, M., Terashima, T., and Katsuyama, Y. (2012) Dynamic changes in the gene expression of zebrafish Reelin receptors during embryogenesis and hatching period. Dev. Growth Differ. 54, 253-263.
DOI: 10.1111/j.1440-169X.2012.01327.x.
5. Hibi, M. and Shimizu T. (2012) Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. Dev. Neurobiol.72, 282-301.
DOI:10.1002/dneu.20875
6. Takano, A., Zochi, R., Hibi, M., Terashima, T., and Katsuyama, Y. (2011) Function of strawberry notch family genes in the zebrafish brain development. Kobe. J. Med. Sci. 56, E220-E230.
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/journal/contents/56/E220.pdf>
7. Tanabe, K., Kani, S., Shimizu, T., Bae, Y.-K., Abe, T., and Hibi, M. (2010) Atypical PKC regulates primary dendrite specification of cerebellar Purkinje cells by localizing Golgi apparatus. J. Neurosci. 30, 16983-16992.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.3352-10.2010

8. Nagao, Y., Cheng, J., Kamura, K., Seki, R., Maeda, A., Nihei, D., Koshida, S., Wakamatsu, Y., Fujimoto, T., Hibi, M., and Hashimoto, H. (2010) Dynein axonemal intermediate chain 2 is required for formation of the left-right body axis and kidney in medaka. *Dev. Biol.* 347, 53-61.
DOI:10.1016/j.ydbio.2010.08.001
9. Takano, A., Zochi, R., Hibi, M., Terashima, T., and Katsuyama, Y. (2010) Expression of strawberry notch family genes during zebrafish embryogenesis. *Dev. Dyn.* 239, 1789-1796.
DOI: 10.1002/dvdy.22287
10. Kani, S., Bae, Y.-K., Shimizu, T., Tanabe, K., Satou, C., Parsons, M.J. Scott, E., Higashijima, S.-I., and Hibi, M. (2010) Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum. *Dev. Biol.* 343, 1-17.
DOI:10.1016/j.ydbio.2010.03.024
11. Shimizu, T., Nakazawa, M., Kani, S., Bae, Y.-K., Shimizu, T., Kageyama, R., Hibi, M. (2010) Zinc finger genes *Fezf1* and *Fezf2* control neuronal differentiation by repressing *Hes5* expression in forebrain. *Development* 137, 1875-1885.
DOI:10.1242/dev.047167
12. Nojima, H., Rothhämel, S., Shimizu, T., Kim, C.H., Yonemura, S., Marlow, F.L., Hibi, M. (2010) Syntabulin, a motor protein linker, controls dorsal determination. *Development* 137, 923-933.
DOI:10.1242/dev.046425

[学会発表] (計 5 件)

1. Hino, H. Microtubule-Dependent Dorsal Determination in Zebrafish. 第 17 回小型魚類研究会. 2011.9. (三島) (ポスター発表)
2. Hibi, M. Microtubule-depedent dorsal determination in zebrafish. 第 44 回日本発生生物学会年会. 2011.5.20 (沖縄) (ポスター発表)
3. Hibi, M. Syntabulin, a Motor Protein Linker, Controls Dorsal Determination. 8th International Conference on Zebrafish Development and Genetics; 2010.6.18 (Madison, USA) (ポスター発表)
4. Nojima, H. Role of Tokkaebi/Syntabulin-mediated transport in zebrafish dorsal determination. 第 42 回日本発生生物学会年会 2009.5.29. (新潟) (ポスター発表)
5. 野嶋 秀明 Syntabulin, a linker of the motor protein, controls dorsal determination in zebrafish embryos. 第 15 回小型魚類研究会、2009.9.12. (名古屋) (口頭)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比 正彦 (HIBI MASAHIKO)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号 : 40273627

(2) 研究分担者

野島 秀明 (NOJIMA HIDEAKI) 2009 年度

独立行政法人理化学研究所・体軸形成研究チーム・研究員

研究者番号 : 00392069

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :