

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657152

研究課題名(和文) 微小管依存性の脊椎動物背側決定機構の解明

研究課題名(英文) Microtubule-dependent 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：魚類・両生類の背側軸決定は一細胞期に起こる。背側決定因子が微小管依存性に予定背側に運搬され、Wntシグナルを活性化することが最初のステップであると考えられてきた。GFP-TubulinおよびEB1-GFP発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを用いた解析から、一細胞期胚の植物極に一方向性の微小管が形成されること、微小管は予定背側方向にプラス端を向けて伸長しながら移動すること、微小管依存性に小胞が背側に運搬されることを見出した。さらに、背側決定に必要な分子であるSyntabulinが、Grip2aおよびWntlessと会合し、微小管依存性のWnt小胞の運搬に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In amphibian and teleost embryos, dorsal determinants are initially localized to the vegetal pole and then transported to the dorsal side of the embryo along a microtubule array. The dorsal determinants activate the canonical Wnt pathway that is required for the formation of dorsal tissues. Using transgenic zebrafish lines expressing GFP-Tubulin and EB1-GFP, we found that a parallel microtubule array formed at the vegetal pole. The plus end of microtubule array was directed to the future dorsal side. The microtubules themselves moved to the future dorsal side and the vesicles moved along with vegetal microtubules. We found that Syntabulin, which is required for dorsal determination, surrounded vesicles and moved along with them to the dorsal side. Syntabulin interacted with Grip2a and Wntless. Our data suggest that Syntabulin interacts with Grip2a and Wntless to recruit the vesicles containing the dorsal determinants onto the microtubules to transport them to the dorsal side.

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：体軸形成 ゼブラフィッシュ 胚発生 遺伝学 微小管

1. 研究開始当初の背景

Spemann と Mangold によるイモリの移植実験から始まる長い発生学の研究から、背側オーガナイザーが、背側組織を誘導する必須の役割を果たすことが示されている。背側オーガナイザーを介した背側軸形成機構は分かりつつあるものの、背側オーガナイザー形成に関わるプログラム、特に、受精直後の最初のステップに関しては、いまだ不明な部分が多い。

ゼブラフィッシュにおいては、精子が卵動物極から侵入して受精が起き、20 分後、受精卵 (胚) 植物極に一方向性の微小管が形成されることが知られている。ゼブラフィッシュ一細胞期の微小管形成を阻害した場合、また一細胞期胚の植物極を除去した場合、背側構造を持たない胚が形成される。これらのデータは、胚の植物極に存在する背側決定因子が、微小管上を将来の背側方向に移動し、背側を決定していることを示している。背側決定因子は、背側胚盤細胞に取り込まれ、Wnt/ β -catenin シグナルを活性化し、背側特異的遺伝子の発現を誘導する。その働きにより、背側オーガナイザーが形成されることが明らかとなっている。最初に背側の方向性を規定するのが微小管の極性であるにも関わらず、一方向性の微小管が形成される分子機構は分かっていない。また、背側決定因子がどのように微小管依存性に輸送されるかは不明であった。

2. 研究の目的

我々はこれまで、ゼブラフィッシュの遺伝学を用いて背側決定の最初のステップを研究してきた。背側構造を形成できない母性遺伝子効果体 *tokkaebi* を単離し、その責任因子 *syntabulin* を同定した。Syntabulin は微小管モータータンパク質 Kinesin I と会合するタンパク質で、一細胞期に微小管依存性に一方向に移動することを見出した。このことから、Syntabulin が微小管依存性の背側決定因子の輸送に関与する可能性が示唆された。これらの知見をふまえ、

(1) 一方向性の微小管が、一細胞期胚の植物極に形成されるメカニズムを解明する、
(2) 微小管依存性に背側決定因子が輸送され、背側が決定されるメカニズムを解明する、ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 植物極一方向性の微小管形成

イメージング

母性遺伝子 *zp3b* プロモーターを用いて GFP- α Tubulin および EB1-GFP (EB1 は微小管プラス端結合タンパク質) を卵で発現するゼブラフィッシュトランスジェニック系統を用いる。これら系統の卵と野生型の精子を用いて人工授精を行い、受精後の微小管形成、および形成される微小管の極性を、共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。受精卵を Ca^{2+}

シグナルの阻害剤である Thapsigargin で処理し、微小管形成に与える影響を検討する。

微小管形成を制御する候補分子の検索

ゼブラフィッシュまたはアフリカツメガエルの卵の植物極に mRNA が局在する遺伝子を検索することで、微小管形成制御因子を探索する。

(2) 微小管依存性の背側決定因子輸送機構の解明

Syntabulin タンパク質の局在・移動

Syntabulin および β Tubulin に対する抗体を用いて、一細胞期胚の植物極における微小管と Syntabulin の関係を免疫組織染色にて解明する。Syntabulin-GFP の mRNA を、未受精卵に注入し、成熟後人工授精を行い、一細胞期の Syntabulin-GFP の動態を共焦点顕微鏡で観察する。

輸送に関わる分子の探索

tokkaebi (Syntabulin) 変異体と同様に、背側構造が出来ない母性遺伝子効果変異体の一つ *hecate* がミシガン大学の Pelegri 博士によって単離され、その責任遺伝子が PDZ ドメインを有するアダプター分子 Grip2a (Glutamate receptor interacting protein2a) をコードする遺伝子であることが見出されている。さらに、ゼブラフィッシュの背側決定因子の有力候補として、Wnt8a が上げられており、*wnt8a* mRNA は植物極に存在している。また、小胞に含まれる Wnt タンパク質の輸送に関与する分子として、膜タンパク質である Wntless (GPR177) が報告されている。これらの分子が、Syntabulin 依存性の背側決定因子の輸送に関与する可能性を検証する。

輸送タンパク質相互作用の検討

タグ付きの Syntabulin (Myc-Syntabulin)、Grip2a (Grip2a-HA)、Wntless (Flag-Wntless) の発現プラスミドを、HEK293T 細胞に発現させた後、免疫沈降を行い、共免疫沈降できるかどうかで会合状態を検討する。これら遺伝子を COS 細胞に発現する、または mRNA 注入により原腸胚に発現し、これらタンパク質の局在をタグ抗体を用いた免疫組織染色を行い観察する。タグ付きタンパクが内在性のタンパクと同様の局在をするかどうかを、内在性のタンパク質に対する抗体を用いて免疫組織染色にて確認する。

輸送タンパク質のライブイメージング

Wnt8a および Wntless のタグ付きおよび蛍光タンパク質の融合タンパク質 (Flag-Wnt8a, Flag-mCherry-Wnt8a, Wntless-mCherry) 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、(1) と同様、人工授精後のこれらタンパク質の移動を観察し、微小管や Syntabulin と比較することで、これらタンパク質が微小管依存性輸送に関与するかどうか

かを検討する。

4. 研究成果

(1) 植物極一方向性の微小管形成

GFP-Tubulin トランスジェニック胚を用いた解析から、受精後 20 分後頃から、植物極に一方向性の微小管が形成されることが見出された。微小管は受精後 30 分ころより徐々に崩壊することが見出された。EB1-GFP トランスジェニックを用いた解析から、一方向の微小管は、プラス端を予定背側方向（将来の背側オーナイズーである胚盾の方向）に向けて伸長していることを見出した。また FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) 解析から、微小管自体も背側方向に移動していることを見出した。また、Thapsigargin 処理により、植物極微小管は形成されないことから、微小管形成には Ca^{2+} シグナルが必要であることを見出した。

植物極微小管形成に関与する候補分子として Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase 2g1 (camk2g1) を見出した。camk2g1 の mRNA は、卵植物極に局在していることを確認した。

(2) 微小管依存性の背側決定因子輸送機構の解明

Syntabulin タンパク質の局在・移動

一方向性の微小管は表層に形成されるが、Syntabulin タンパク質は少し内側の層に多く存在し、微小管に結合した状態のもと小胞に結合した状態の Syntabulin が観察された。Syntabulin-GFP のライブイメージングから、受精後 20 分頃に、Syntabulin は小胞を取り囲んだ状態で予定背側方向に移動することを見出した。

輸送に関わる分子

少なくとも HEK293T 細胞に発現させて Syntabulin と Grip2a、Syntabulin と Wntless、Grip2a と Wntless は共免疫沈降できることから、Syntabulin-Grip2a-Wntless は複合体を形成している可能性が示唆された。

Syntabulin を COS 細胞または原腸胚で発現させた場合、Syntabulin は微小管上に局在する。一方、Grip2a は単独で発現させた場合は、微小管上に局在せず細胞質に一樣に存在する。しかし、Syntabulin と Grip2a を一緒に発現させた場合は、Grip2a も微小管上に局在するようになる。このことから、微小管上の Syntabulin が Grip2a を微小管上にリクルートしてくるものと考えられた。また、内在性の Syntabulin と Grip2a は、一細胞期胚植物極において共局在することを見出した。

輸送タンパク質のライブイメージング

Wntless-mCherry を卵で発現するとランスジェニックフィッシュの作製に成功した。Wntless-mCherry は、Syntabulin-GFP と同様

に、小胞を囲んでおり、受精後 20 分頃より予定背側方向に向かって移動することを見出した。

以上の結果を総合すると、受精を引き金として Ca^{2+} シグナルが活性化され、受精後 20 分後に、 Ca^{2+} シグナル依存性に、プラス端を予定背側に向けた微小管が形成され、移動する。Syntabulin は、Grip2a および Wntless と会合し、微小管と小胞を結合させている。この小胞には背側決定因子が含まれており、微小管の移動とともに背側に運搬され、最終的に背側胚盤細胞に運ばれ Wnt/ β -catenin シグナルを活性化し、背側オーガナイザーの形成、その後の背側組織の誘導に繋がるものと考えられる。

今後は、微小管形成に関しては、候補タンパク質である Camk2g1 の役割を解析する。Wnt8a および輸送タンパク質の詳細なライブイメージングを行う。Wnt8a、Wntless に関しては母性遺伝子効果変異体を作製し表現型を解析することで、我々の背側決定機構のモデルが正しいかどうかを検証することが必要であると考えられる。

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)

1. Nagao Y, Suzuki T, Shimizu A, Kimura T, Seki R, Adachi T, Inoue C, Omae Y, Kamei Y, Hara I, Taniguchi Y, Naruse K, Wakamatsu Y, Kelsh RN, Hibi M, Hashimoto H. (2014) Sox5 functions as a fate switch in medaka pigment cell development. PLoS Genetics. 査読有 10, e1004246.
2. Kwon HB, Fukuhara S, Asakawa K, Ando K, Kashiwada T, Kawakami K, Hibi M, Kwon YG, Kim KW, Alitalo K, Mochizuki, N. (2013) The parallel growth of motoneuron axons with the dorsal aorta depends on Vegfc/Vegfr3 signaling in zebrafish. Development 査読有 140, 4081-4090.
3. Yanicostas C, Barbieri E, Hibi M, Brice A, Stevanin G, Soussi-Yanicostas N. (2012) Requirement of zebrafish ataxin-7 in differentiation of photoreceptors and cerebellar neurons. PLoS One 査読有 7, e250705.
4. Tran LD, Hino H, Quach H, Lim S, Shindo A, Mimori-Kiyosue Y, Mione M, Ueno N, Winkler C, Hibi M, Sampath K. (2012) Dynamic microtubules are the vegetal cortex predict the embryonic axis in zebrafish. Development 査読有 139, 3644-3652.
5. Kuscha V, Fraser SL, Dias TB, Hibi M, Becker T, Becker CG. (2012) Lesion-induced generation of interneuron cell types in

specific dorso-ventral domains in the spinal cord of adult zebrafish. J. Comp. Neurol. 査読有 530, 3604-3616.

〔学会発表〕(計7件)

1. Hibi M, Hino H, Seki R, Shimizu T, Pelegri F. Microtubule-mediated dorsal determination. 6th Asia Oceania Zebrafish Meeting (招待講演) 2014年1月21日 香港、中国
2. Hino H, Seki R, Shimizu T, Pelegri F, Hibi M. Moving microtubule-mediated dorsal determination. 第19回小型魚類研究会 2013年9月20日 仙台
3. Hino H, Seki R, Shimizu T, Long TD, Sampath K, Hibi M. Involvement of microtubule-dependent transport of Wnt signaling components in zebrafish dorsal determination. 第46回日本発生生物学会大会 2013年5月29日-5月31日 松江
4. Hibi M. Microtubule-Dependent Dorsal Determination in Zebrafish. CDB Symposium 2013(招待講演) 2013年3月5日 理化学研究所 神戸
5. Hino H, Seki R, Long TD, Sampath K, Shimizu T, Hibi M. Microtubule-dependent dorsal determination in zebrafish. 第45回日本発生生物学会合同大会. 2012年5月28日-5月31日 神戸
6. Seki R, Hino H, Takeda S, Pelegri F, Hibi M. Syntabulin-mediated transport of Wnt signaling machinery in zebrafish dorsal determination. 第18回小型魚類研究会 2012年9月22日-9月23日 京都
7. Hino H, Seki R, Long TD, Sampath K, Hibi M. Formation of microtubule array for dorsal determination in zebrafish. 第18回小型魚類研究会 2012年9月22日-9月23日 京都

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔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

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：