

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770218

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ胚発生における尾部未分節中胚葉の形成機構に関する研究

研究課題名(英文)The study on molecular mechanism regulating tail paraxial mesoderm differentiation in zebrafish

研究代表者

矢部 泰二郎(YABE, Taijiro)

基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・助教

研究者番号：30470074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュの発生時において尾部沿軸中胚葉は尾芽表層に位置する未分化中胚葉から転写因子spt、msgn1依存的に形成される。本研究ではこのような尾部沿軸中胚葉形成機構を理解するため、msgn1の発現制御機構の解明を試みた。内在性のmsgn1の発現を再現するのに十分な遺伝子発現制御領域を同定し、培養細胞を用いてそのプロモーター活性を検討した結果、これらのプロモーターはwntシグナルとT-box型転写因子ntlにより正に制御される事が明らかになった。この事から、msgn1は尾芽表層では未同定の転写抑制機構により発現が抑制されており、その抑制の解除が尾部沿軸中胚葉分化の引き金になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In zebrafish development, tail paraxial mesoderm is sequentially generated from mesodermal progenitor cells locate at the surface of tailbud. We previously showed two transcriptional factors, spt and ntl, had important roles in these process. In this study we tried to identify the molecular mechanisms regulating expression of msgn1 during tail paraxial mesoderm differentiation.

First we identified msgn1 promoter region which is enough to recapture the endogenous msgn1 expression in zebrafish embryo. Reporter assay using cultured cells revealed this promoter activity was positively regulated by Wnt signaling and transcriptional factor, Ntl, which were activated at mesodermal progenitor cells, suggesting msgn1 expression was repressed at the tailbud region by the unidentified molecular mechanism and derepression of such repression triggered the differentiation of tail paraxial mesoderm.

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：ゼブラフィッシュ 細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

ゼブラフィッシュの初期発生において体幹部の沿軸中胚葉は原腸陥入に伴う形態形成運動により形成される。一方尾部の沿軸中胚葉は原腸陥入により体幹部の組織が形成された後、体軸最後部に形成される尾芽が体幹部の後方に新たな沿軸中胚葉を付け足すことにより形成される。この時に未分化中胚葉細胞 (mesodermal progenitor cells; MPCs) は尾芽の先端部表層に位置する poerior wall と呼ばれる領域に存在し、その一部が一定の割合で沿軸中胚葉へと分化し体幹部の沿軸中胚葉の後方に新たな沿軸中胚葉を付け足す仕組みで尾部の沿軸中胚葉は形成される。それまでの報告では MPCs が尾芽深部の maturation zone へと移動し Ntl などの未分化性の遺伝子発現を維持しつつも spadetail/tbx16 (spt) や mesogenin1 (msgn1) といった未分節中胚葉 (Presomatic mesoderm; PSM) のマーカーの発現を開始し、やがてこれらの細胞では wnt、ntl といった未分化性の維持に関する遺伝子の発現が低下し PSM へと分化する事が知られていた。また研究代表者はさらに MPCs から尾部沿軸中胚葉の分化には spt/tbx16 と msgn1 の冗長的な機能が必須である事を見いだしていた。

## 2. 研究の目的

前述のようにゼブラフィッシュの尾部形成においては MPCs の未分化性の維持と分化誘導が緻密に制御されている。これまでの研究において、未分化性の維持機構については Wnt-Ntl のポジティブフィードバックを中心に比較的良く理解されていた。一方分化誘導機能については Spt、Msgn1 が必須である事以外ほとんど明らかにされていなかった。本研究においては、ゼブラフィッシュ尾部沿軸中胚葉の分化誘導の分子機構を明らかにするため、msgn1 の発現制御機構に着目して研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) msgn1 プロモーターの単離

ゼブラフィッシュゲノムから msgn1 遺伝子上流領域を単離し、その下流に蛍光タンパク質 GFP を結合したコンストラクトをゼブラフィッシュ胚に顕微注入しトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、内在性の msgn1 の発現を再現するのに十分である領域を同定した。

### (2) msgn1 プロモーター活性の解析

前述のプロモーターの下流に luciferase を結合したコンストラクトをほ乳類由来培養細胞 (HEK293 細胞) に導入し、そのプロモーター活性を制御する因子を同定した。

### (3) ゼブラフィッシュ胚を用いた msgn1 発現制御機構の検証

トランスジェニックを用いた過剰発現系を用いて、上述の実験により同定された msgn1 発現制御因子の機能をゼブラフィッシュ胚において検証した。

## 4. 研究成果

### (1) msgn1 プロモーターの単離

msgn1 遺伝子の転写開始点上流約 3kb の領域に GFP を結合した DNA を導入したトランスジェニック胚において、尾芽領域での msgn1 の発現を再現できることが明らかになった。

### (2) msgn1 プロモーター活性の解析

上述の msgn1 プロモーター下流に luciferase 遺伝子を導入したプラスミドを作成し HEK 293 細胞に導入したところ、msgn1 プロモーターは WNT および Ntl により活性化される事が明らかになった。しかしながらこれらの因子は本来未分化な MPCs で活性化している事が知られていることから、MPCs ではすでに msgn1 の発現が開始する条件が整っているにも拘らず、さらにそれを抑制する機能が存在し、maturation zone においてその抑制が解除する事によって msgn1 の発現が開始し、尾

部沿軸中胚葉が分化すると考えられた。この可能性を検討するため、MPCs において msgn1 プロモーターを抑制する因子の探索を試みた。その結果、ホメオボックス型転写抑制因子の一つである vox および vent は MPCs 特異的に発現しており、HEK293 細胞において Wnt および Nt1 依存的な msgn1 プロモーターの活性化を抑制する事が明らかになった。

### (3) ゼブラフィッシュ胚を用いた msgn1 発現制御機構の検証

vox、vent の二重機能阻害胚は原腸陥入期の背腹軸形成に異常を示し、尾部形成の解析をする事が困難である事から、hsp プロモーター制御下で vox の発現を誘導できるトランスジェニックフィッシュを作成し、尾部形成時における vox の機能の解析を試みた。しかしながら、尾部形成期に vox を過剰発現した胚においても msgn1 の発現および尾部沿軸中胚葉形成に明確な異常は観察されず、実際のゼブラフィッシュ胚発生において vox/vent が尾部沿軸中胚葉の分化に関与することは確認できなかった。

#### 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 2 件)

Kimura T, Nagao Y, Hashimoto H, Yamamoto-Shiraishi Y, Yamamoto S, Yabe T, Takada S, Kinoshita M, Kuroiwa A, Naruse K. Leucophores are similar to xanthophores in their specification and differentiation processes in medaka. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 May 20;111(20):7343-8. (査読あり)

Yabe T, Takada S.

Mesogenin causes embryonic mesoderm progenitors to differentiate during development of zebrafish tail somites. Dev Biol.

2012 Oct 15;370(2):213-22.

(査読あり)

[学会発表](計 2 件)

Taijiro Yabe, and Shinji Takada,

“The role of *mesogenin1* in tail PSM differentiation”

10<sup>th</sup> international conference zebrafish development and genetics,

Madison (U.S.A.)

June 23, 2012.

矢部泰二郎、高田慎治

“The role of mesogenin1 in zebrafish tail presomatic mesoderm differentiation.”

Joint meeting of JSCB 45<sup>th</sup> and JSDB 64<sup>th</sup>. 兵庫県 神戸市 神戸国際会議場、

2012年5月30日

[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

<http://www.nibb.ac.jp/cib2/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

矢部泰二郎 ( YABE, Taijiro )

基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・

助教

研究者番号：30470074