

体軸形成研究チーム

Laboratory for Vertebrate Axis Formation

チームリーダー 日比正彦
HIBI, Masahiko

1 個の受精卵から複雑な細胞集団が形成される過程で、背腹・前後・左右軸といった体軸形成は、細胞の特異性・組織形成の基本となる現象である。当研究チームでは、ゼブラフィッシュを用いて初期体軸形成および、体軸の位置情報に基づいて起こる神経領域化・神経細胞形成の分子機構の解析を行って来た。本年度は、体軸形成に関して、初期背腹軸形成に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の解析、左右軸形成に関与する新規遺伝子 *charon* の機能解析、Wnt シグナルによる前後軸特に体尾側部形成における役割を解析した。また、神経発生に関しては、ゼブラフィッシュ原始神経の形成領域のパターニングの分子機構、前脳・嗅神経特異的 zinc finger 遺伝子 *Fez*, *Fez-like* のマウスにおける役割を解析した。

1. 初期体軸形成機構の解明

(1) 母性遺伝子効果腹側化型変異体 *tokkaebi* の解析 (野嶋, 清水, 深江, 秋山, 日比)

魚類・両生類では、受精卵植物極に存在する背側決定因子が、微小管束に乗って胚背側に移動し、背側胚細胞において Wnt 細胞内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と考えられている。Wnt 細胞内シグナルを活性化するまでの過程は、卵細胞に蓄積された母性遺伝子産物によって制御されていると考えられている。当研究チームでは、この過程の異常によって、腹側化表現型を示すゼブラフィッシュ遺伝子変異 *tokkaebi*(*tkk*) の単離・解析を行った。*tkk* ホモ接合体雌魚から生まれた胚の 5~100%に、胚背側組織全体を欠損する強い腹側化表現型を認めた。*tkk* 変異胚においては、Wnt シグナルの活性化の指標である β -catenin の背側細胞核での蓄積が起こらず、背側特異的遺伝子の発現の減弱・消失を認めた。*tkk* 変異胚の表現型は、活性化 β -catenin, ドミナントネガティブ方 Axin・GSK3 β , 野生型 Dvl3・GBP の発現により回復・腹側化されるが、Wnt, Frizzled による背側化に影響を認めた。以上の結果から、*tkk* 遺伝子産物は、最初期背側軸形成に重要な役割を果たしており、Wnt シグナルにおいて β -catenin を制御する分子複合体より上流あるいは平行して機能する、あるいは Wnt シグナルを制御する分子の背側輸送に関与している可能性が考えられた。連鎖解析の結果、*tkk* 遺伝子座は第 16 番染色体上にあることを見いだした。現在 *tkk* 責任遺伝子のポジショナルクローニングを行っている。

(2) 左右軸形成に関与する新規遺伝子 *charon* の機能解析 (村岡, 日比)

charon は、Cerberus/Dan ファミリーに属する液性因子をコードする新規遺伝子である。*charon* は、マウスで左右軸形成に関与すると考えられている結節腔のゼブラフィッシュ相同組織 Kupffer 胞に面する細胞に、初期体節期より発現していた。Charon タンパクは、Nodal 関連タンパク Southpaw と結合し、その機能を抑制することを見いだした。モルフォリーノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を用いて作成した Charon 機能阻害胚では、心臓の左右軸がランダムになること、左特異的遺伝子の発現が両側に

なることを見いだした。以上のことは、Charon は、最初期の左右軸形成において、左軸形成に関与する Southpaw を阻害することで、左右の区別化に関与していると考えられた。

(3) Wnt シグナルによる体尾側部形成の分子機構の解析 (清水, 村岡, Bae*¹, 日比)

発現クローニング法で単離したゼブラフィッシュ *wnt3a* 遺伝子の発現を検討したところ、原腸期より、*wnt3a* は、*wnt8* と重複した領域すなわち胚盤周縁部 (後に尾芽) に発現していた。MO を用いて作成した Wnt3a 阻害胚は、明らかな表現型を示さなかったが、Wnt8 と Wnt3a を両方阻害することにより、Wnt8 単独阻害胚に比較して強く、前部中枢神経の拡大・背側オーガナイザーを含む中軸中内胚葉の拡大・体尾部の欠損を示した。このことから、Wnt3a と Wnt8 が、神経系の後方化・中軸組織の形成阻害・尾部形成に関して重複的に機能していると考えられた。さらに、中軸組織の形成阻害には、ホメオボックス遺伝子 *vox*, *vent*, *ved* が関与していること、尾部形成には Wnt シグナルの標的としてホメオボックス遺伝子 *cdx1a*, *cdx4* が関与していることを見いだした。*cdx1a*, *cdx4* に関しては、Wnt シグナルに加えて FGF のシグナルによっても制御されていること、Cdx1a, Cdx4 の下流で尾側特異的 *hox* 遺伝子が制御されており、Cdx1a/Cdx4 依存性の *hox* 遺伝子制御には FGF シグナルが必要であることを見いだした。Wnt3a/Wnt8 阻害および Cdx1a/Cdx4 阻害胚においては、前部体節は発生するが、体節中期より体節形成が阻害されることが明らかとなった。以上のことから、Wnt-Cdx システムが体尾側部形成に必須の役割を果たしていると考えられた。

2. 神経領域化・神経細胞形成機構の解明

(1) 原始神経形成領域 (プロニューロナルドメイン) のパターニング機構 (Bae*¹, 清水, 勝山, 日比)

魚類・両生類は、2 種類の神経細胞—原始神経・2 次神経—を有している。原始神経は、神経発生初期に形成される神経細胞で、孵化後の運動に係り、原始運動・原始介在・原始感覚神経の 3 つから構成される。神経板において、原始神経は、プロニューラル遺伝子によって規定さ

れる原始神経形成領域（プロニューロナルドメイン）から形成されると考えられている。3つ（運動・介在・感覚）のプロニューロナルドメインは、発生初期には神経の形成されないインタープロニューロナルドメインによって、隔てられている。当研究チームは、インタープロニューロナルドメインに発現する遺伝子として *hairy/enhancer of split* 関連遺伝子 *her3*, *her9* を見だし、その発現制御・機能解析を行った。多くの Her 関連遺伝子は、Notch シグナルによって制御されていることが知られているが、*her3*, *her9* のインタープロニューロナルドメインでの発現は、Notch シグナルによって制御されているのではなく、Bmp シグナルの関与する背腹軸位置情報によって制御されることを見いだした。また、Her3, Her9 阻害胚では神経板全体にごましお状の原始神経の発生が起き、Her3, Her9 および Notch シグナルを両方阻害した胚では、神経板全体に均一に神経発生が起きることを見いだした。以上のことは、Her3/Her9 は、Notch シグナルの関与する側方抑制とは異なり、インタープロニューロナルドメインでの神経発生を抑制していることを示している。すなわち、*her3*, *her9* は、位置情報と神経形成をつなげるプレパターン遺伝子として機能すると考えられる。

(2) 前脳・嗅神経特異的 zinc finger 遺伝子 *Fez*, *Fez-like* の機能解析 (平田, 中沢 *2, 深江, 勝山, 日比)

Fez, *Fez-like* は、zinc finger を 6 個と Eh1 転写抑制モチーフを有する転写抑制因子をコードする前脳・嗅神経特異的遺伝子である。マウス胚発生において、*Fez* は胎生 8.0 日より、*Fez-like* は胎生 8.5 日より予定前脳領域、胎生中期より前脳の重複した領域と嗅神経で発現を認めた。*Fez-like* 遺伝子欠損マウスは、ゼブラフィッシュ *fez-like* 変異体 *too few* とは異なり、視床下部のモノアミン作動性神経の形成には異常を認めなかったが、過剰行動性を示した。組織学的解析から *Fez-like* 欠損マウスは、海馬采・脳弓システムの欠損、視床皮質路の形成異常を示すことを明らかにした。さらに、*Fez-like* 欠損マウスは、大脳皮質形成期に存在する subplate 神経が減少しており、subplate 神経からのパイオニア神経の形成異常により、それによって導かれる皮質視床路の形成不全に至ると考えられた。*Fez* 欠損マウスは、嗅神経が嗅球まで到達できず、また嗅球において介在神経減少・僧帽細胞層の異常を示した。*Fez;Fez-like* ダブル欠損マウスでは、嗅球の欠損・大脳皮質の縮小・層構造の乱れ、海馬の消失・前視床の消失・視床の縮小を認めた。このことは、*Fez*, *Fez-like* が、大脳形成において重複的に機能していることを示している。

*1 基礎科学特別研究員, *2 研修生

During early vertebrate development, the embryonic axes, consisting of dorso-ventral (DV), anterior-posterior (AP), and left-right (LR) axes, are established through a series of inductive signals that are followed by the concerted cell movements and differentiation of a group of cells. We have been studying the mechanisms by which the body axes are established (axis formation). We also investigate neural patterning and neurogenesis as a model of cell fate determination that is linked to axis formation.

1. Molecular basis of axis formation during early vertebrate embryogenesis

We isolated a zebrafish novel maternal-effect recessive mutation, *tokkaebi* (*tkk*), which affects the formation of the dorsal axis. Severely ventralized phenotypes, including a lack of dorso-anterior structures, were seen in the embryos obtained from *tkk* homozygous females. *tkk* embryos displayed defects in the nuclear accumulation of β -catenin on the dorsal side, and a reduced or complete lack of expression of dorsal-specific genes. We found that the *tkk* gene product functions upstream of or parallel to the β -catenin-degradation machinery to control the stability of β -catenin. Positional cloning of *tkk* is under way.

We studied the function of a novel gene, *charon*, which encodes a member of the Cerberus/Dan family of secreted factors. In zebrafish, *charon* is expressed in regions embracing Kupffer's vesicle, which is considered to be the fish equivalent to the region of mouse definitive node, which is required for left-right patterning. *Charon* physically interacts with the Nodal-related protein Southpaw, and thereby inhibits its activity. Inhibition of *Charon*'s function by anti-sense morpholino oligonucleotide (MO) led to a loss of left/right polarity, and elicited bilateral expression of left side-specific genes. Our data indicate that the antagonistic interaction between *Charon* and *Southpaw* plays an important role in left/right patterning.

We studied the mechanisms by which Wnts control the individual processes of body patterning. In zebrafish, *wnt3a* and *wnt8* are expressed in overlapping domains during early embryogenesis. The combined inhibition of *Wnt3a* and *Wnt8* by MOs led to anteriorization of the neuroectoderm, expansion of the dorsal organizer, and loss of the posterior body structure—a more severe phenotype than with inhibition of each Wnt alone—indicating a redundant role for *Wnt3a* and *Wnt8*. We found that the ventrally expressed homeobox genes *vox*, *vent*, and *ved* mediate *Wnt3a/Wnt8* signaling to restrict the organizer domain, and that the caudal-related *cdx1a* and *cdx4* mediate Wnt-dependent posterior body formation.

2. Neural patterning and neurogenesis

In teleost and amphibians, the proneuronal domains, which give rise to primary-motor, primary-inter and primary-sensory neurons, are established at the beginning of neurogenesis as three longitudinal stripes along the anterior-posterior axis in the dorsal ectoderm. The proneuronal domains are prefigured by the expression of the proneuronal genes, and separated by domains (inter-proneuronal domains) that do not express the proneuronal genes. We found that the zebrafish *hairy*- and *enhancer of split*-related (Her) genes *her3* and *her9* are expressed in the inter-proneuronal domains, and are required for their formation. Our data indicate that *her3* and *her9* function as prepattern genes that link the positional dorsoventral polarity information in the posterior neuroectoderm to the spatial regulation of neurogenesis.

We previously isolated the zebrafish forebrain-specific zinc finger gene *fez-like*, which displays sequence similarity to *Xenopus fez*. We isolated mouse *Fez* and *Fez-like* cDNAs, and investigated their expression and functions. By investigating the phenotypes of *Fez*-, *Fez-like*-, and *Fez;Fez-like*-deficient mice, we found that *Fez-like* plays an important role in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons, and the formation of fimbria/fornix system; *Fez* is required for the axon formation of the olfactory sensory neurons and the proper formation of the olfactory bulb; and *Fez* and *Fez-like* redundantly

function in the formation of the olfactory bulb, neocortex, hippocampus, prethalamus, and thalamus.

Staff

Team Leader

Dr. Masahiko HIBI

Research Scientists

Dr. Osamu MURAOKA

Dr. Takashi SHIMIZU

Dr. Tsutomu HIRATA

Dr. Hideaki NOJIMA

Special Postdoctoral Researchers

Dr. Young-Ki BAE

Technical Staff

Ms. Chiho HIRATA-FUKAE

Ms. Hanae AKIYAMA

Ms. Aya KATSUYAMA

Trainees

Mr. Masato NAKAZAWA (Grad. Sch. Med., Kobe Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Hirata T., Suda Y., Nakao K., Narimatsu M., Hirano T., and Hibi M.: "Zinc finger gene *fez-like* functions in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons", *Dev. Dyn.* **230**, 546–556 (2004). *

Hashimoto H., Rebagliati M., Ahmad N., Muraoka O., Kurokawa T., Hibi M., and Suzuki T.: "The Cerberus/Dan-family protein Charon is a negative regulator of Nodal signaling during left-right patterning in zebrafish", *Development* **131**, 1741–1753 (2004). *

Bae Y., Shimizu T., Muraoka O., Yabe T., Hirata T., Nojima H., Hirano T., and Hibi M.: "Expression of *sax1/nkx1.2* and *sax2/nkx1.1* in zebrafish", *Gene Exp. Pat.* **4**, 481–486 (2004). *

Nojima H., Shimizu T., Kim C., Yabe T., Bae Y., Muraoka O., Hirata T., Chitnis A., Hirano T., and Hibi M.: "Genetic evidence for involvement of maternally derived Wnt canonical signaling in dorsal determination in zebrafish", *Mech. Dev.* **121**, 371–386 (2004). *

Yamamoto A., Nagano T., Takehara S., Hibi M., and Aizawa S.: "Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF", *Cell* **120**, 223–235 (2005). *

Shimizu T., Bae Y., Muraoka O., and Hibi M.: "Interaction of Wnt and *caudal*-related genes in zebrafish posterior body formation", *Dev. Biol.* **279**, 125–141 (2005). *