

時系列生命現象研究領域

(分子発生)

高田慎治 (教授)

1) 専門領域：発生生物学、分子生物学

2) 研究課題：

- a) 脊椎動物の体節形成機構に関する研究
- b) 脊椎動物の発生過程における細胞間シグナルの機能に関する研究

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 脊椎動物の体節は頭部側から尾部側にかけて逐次、周期的に形成される。個々の体節ユニットが時間経過とともに一定の時間周期で形成されていく仕組みは、すでにその理解が進んでいる多くの発生現象には認められていない独特なものである。体節形成の時間周期が、体節前駆体である未分節中胚葉の後端で働く分子時計により決められることが明らかになっているのに対し、体節が括れ切れる位置（分節位置）がいかに決められるかという問題は、体節の分節機構を理解する上で残されている大きな問題の一つであるものの、その詳細な分子機構は未だに十分には解明されていない。

我々は、ゼブラフィッシュとマウスを用いて、体節形成に関わるさまざまな問題について研究を行っている。今年度は特に、ゼブラフィッシュを用いて分節位置の決定機構についての研究を進めた。体節の文節位置の形成に関わることが知られている転写調節因子 **tbx6** に着目し、独自に調整した抗ゼブラフィッシュ **tbx6** 抗体を用いて免疫組織化学による解析を行ったところ、**tbx6** タンパク質の頭部側発現境界が将来の分節位置に対応することを明らかにした。これはマウスを用いた先行研究で明らかにされている結果と基本的には同じであり、分節位置決定のしくみの少なくとも一部が種を超えて保存されていることを示している。**tbx6** タンパク質の頭部側発現境界は、**tbx6** タンパク質の分解により決定されることが示唆されているため、その分子機構を明らかにする目的で、分解に関わる因子の検討を行った。**tbx6** の分解には、遺伝学的解析からすでに **Mesp** と **Ripply** という2つの因子が必要であることが示されているが、それらによりどのように**tbx6**の分解が起きるのかについては明らかにされていない。そこで、ゼブラフィッシュの受精卵を用いてマウスとゼブラフィッシュの**tbx6**に対する**Mesp**と**Ripply**の効果を検討したところ、**Ripply**によって**tbx6**タンパク質の分解が引き起こされることが明らかとなった。この分解には、**Ripply**と**tbx6**の直接の結合が必要であることから、**Ripply**が直接的に**tbx6**タンパク質の分解に関わることが強く示唆された。

一方、最近のゲノム編集技術の革命により、ゼブラフィッシュにおいて任意の遺伝子の変異体を人為的に作出できるようになった。そこでこの技術を利用し、体節の発生に関与することが示唆されるものの遺伝学的解析が行われて来なかったいくつかの遺伝子の変異体の作出を開始した。具体的にはTALEN(Transcription Activator-Like Effector Nuclease)法による変異体作出を試み、すでに10以上の遺伝子において変異導入を確認することに成功している。

b)形態形成が正しく進行するためには、分泌性シグナルタンパク質の分泌や拡散が厳密に制御される必要

がある。我々は、分泌性シグナルタンパク質である Wnt タンパク質に特殊な不飽和脂肪酸が付加していることを見だし、この脂肪酸付加が Wnt の分泌には必要であることを明らかにした。このような成果をふまえ、分泌された Wnt タンパク質の実体の解析を進めるとともに、細胞外に分泌された Wnt タンパク質のイメージングやゼブラフィッシュを用いた脂肪酸付加酵素の役割について研究を進めている。

今年度は、上皮培養細胞を用いて、Wnt の分泌と細胞極性の関係について解析した。上皮細胞である MDCK 細胞を用いて、Wnt3a を発現させたところ、頭頂側(apical 側)および基底側(basal 側)からの分泌が観察されたが、Wnt の分泌形態として近年注目を集めているエクソソーム様の分泌は基底側からのみ認められた。また、このエクソソーム様の分泌には不飽和脂肪酸の付加が必要であった。このことは、Wnt の分泌様式に多様性があり、それが細胞の極性により制御されていることを示唆している。

一方、組織内での Wnt タンパク質の時空間的動態を理解するために、マウスの神経管、胸腺、アフリカツメガエル胚上皮をモデル系にして、Wnt タンパク質の空間局在を免疫組織化学やライブイメージングにより解析している。

#### 4) 学術論文

**Hisano Y, Ota S, Takada S, Kawahara A.** “Functional cooperation of spns2 and fibronectin in cardiac and lower jaw development.” *Biol Open.* 2, 789-794, 2012

**Takahashi Y, Yasuhiko Y, Takahashi J, Takada S, Johnson RL, Saga Y, Kanno J.** “Metameric pattern of intervertebral disc/vertebral body is generated independently of Mesp2/Ripply-mediated rostro-caudal patterning of somites in the mouse embryo.” *Dev Biol.* 380, 172-184, 2012

#### 6) 国際会議発表リスト

**Takada S. and Yabe T.** “Mesogenin causes embryonic mesoderm progenitors to differentiate during development of zebrafish tail somites.” 5th Strategic Conference of Zebrafish Investigators, Pacific Grove, USA, January 19-23, 2013

**Takuma Shinozuka and Shinji Takada** “Spatial distribution of Wnt proteins in the developing spinal cord” EMBO Workshop: Morphogen gradient Oxford, UK, June 26-29, 2013

**Yusuke Mii, Kenichi Nakazato, Chan-Gi Park, Yasushi Sako, Atsushi Mochizuki, Shinji Takada, and Masanori Taira** “Heparan sulfate nanostructures regulate distribution and signal reception of secreted proteins” EMBO Workshop: Morphogen gradient Oxford, UK, June 26-29, 2013

**Chen Q.H., Takada R., and Takada S.** “Polarized secretion of Wnt3a via exosome requires lipid modification.” Wnt symposium 2013, Heidelberg, Germany, July 15th, 2013

#### 7) 招待講演

高田慎治「Wnt 分泌経路における脂肪酸修飾」：第 36 回日本分子生物学会(神戸、2013 年 12 月)

#### 8) 学会および社会的活動

トレーニングコース「人工ヌクレアーゼによる小型魚類の遺伝子破壊法（TALEN講習会）」オーガナイザー（高田、矢部）、第47回日本発生生物学会大会準備委員（高田）、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ゼブラフィッシュ」運営委員（高田）、ナショナルバイオリソースプロジェクト「メダカ」運営委員（高田）など