

平成 21年 6月 2日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2009

課題番号：19570200

研究課題名（和文） 円口類 *Otx* 遺伝子群の発現調節の解析研究課題名（英文） Analysis of *Otx* genes expression and its regulation in cyclostome.

研究代表者

黒川 大輔（KUROKAWA DAISUKE）

東京大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：30251408

研究成果の概要：日本産ヤツメウナギ (*Lethenteron japonicum*) より得られた3つの *Otx* 関連遺伝子 (*OtxA*, *OtxB*, *OtxC*) の全長 cDNA 配列を決定し、これまで明らかになっていなかった初期胚内での発現パターンを whole mount in situ ハイブリダイゼーション法により記載した。明らかになった発現パターンを与える発現調節領域の同定を行う為にヤツメウナギ BAC (大腸菌人工染色体) ライブラリーより、各遺伝子を含む BAC クローンの単離を試み、*OtxA* 遺伝子座を含むクローンの単離に成功し、ショットガンシーケンス法によりドラフト配列を得る事に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：進化発生

- 研究開始当初の背景 研究開始当初、有顎脊椎動物からは *Otx1*, *Otx2*, *Otx5/Crx* の3つの *Otx* パラログを持つ事が報告されていたのに対して、顎を持たない円口類では、日本産ヤツメウナギ (*Lethenteron japonicum*) から *LjOtxA*, *OtxB* の2種、北米産の *Petromyzon marinus* からは *PmOtx* という遺伝子が一つだけ報告されており、ヤツメウナギは基本的に一つの *Otx* 遺伝子しか持たず、*L. japonicum* で系統特異的な *Otx* 遺伝子

の重複が生じていると考えられていた。申請者らは *L. japonicum* と *P. marinus* 両種のゲノム DNA より degenerative プライマーを用いた PCR により *Otx* 遺伝子数の再検討を行った所、*L. japonicum* のゲノム中に *PmOtx* と相同な遺伝子が存在する事を見出し、この遺伝子を *LjOtxC* と名付けた。対して *P. marinus* のゲノム中にも *PmOtx* の他に *LjOtxA*, *LjOtxB* と相同な遺伝子が存在している事を見出した。以上の事から、ヤツメウナギのゲ

ノム中には *OtxA*, *OtxB*, *OtxC* の三種の遺伝子が存在する事が示唆された。しかし、*OtxC* はゲノムからの PCR ではぶつぶん配列しか得られず、実際に mRNA として胚内で発現しているかは明らかでなかった。また、これら 3 種と有顎脊椎動物の *Otx1*, *Otx2*, *Otx5/Crx* とがオーソログな関係に有るかは明らかになっていない。ヤツメウナギ *Otx* 遺伝子群は咽頭胚期以降の胚を使った発現領域の解析は報告されていたが、原腸胚、神経胚期といった初期胚においてどのような発現パターンを示すのかは明らかになっていなかった。また申請者はマウス *Otx2* 遺伝子の転写調節領域を実験的に同定し、それらが他の有顎脊椎動物の *Otx2* 遺伝子近傍の非翻訳領域に保存されており、転写調節活性を持つ事を示していたが、ヤツメウナギ *Otx* 遺伝子近傍のゲノム配列は明らかにされておらず、有顎脊椎動物に保存された *Otx2* 転写調節領域がヤツメウナギでも保存されているかは明らかでなかった。

2. 研究の目的

(1) 日本産ヤツメウナギより全長配列が決定されていない *OtxC* の全長 cDNA 配列を決定する。

(2) ヤツメウナギ *Otx* 遺伝子群の発現パターンを、全く解析されていなかった初期胚における発現を中心に記載し、他の脊椎動物の発現パターンと比較する事により、脊椎動物の頭部発生の進化における *Otx* 遺伝子群の役割を類推する。

(3) ヤツメウナギの各 *Otx* 遺伝子座の非翻訳領域の塩基配列を決定し、他の脊椎動物と保存性を示す領域があるか検討する。保存領域が見つかった場合、その領域が転写調節活性を持つかを検討し、脊椎動物の *Otx* 遺伝子の転写調節ネットワークの進化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 5'-, 3'-RACE 法を用いて *L. japonicum* 咽頭胚期 cDNA より *LjOtxC* のクローニングを行い、全長配列を決定した。

(2) (1) で得た *LjOtxC*、および既に全長配列が決定されている *LjOtxA*, *LjOtxB* の cDNA より Digoxigenin ラベルされたアンチセンス RNA プローブを作成し、発生中の *L. japonicum* 胚の各発生ステージにおける発現パターンを whole mount in situ ハイブリダ

イズーション法によって解析した。

(3) ヤツメウナギ BAC ライブラリーより各 *Otx* 遺伝子座を含む BAC クローンを PCR 法によりスクリーニングした。尚、使用した BAC ライブラリーは BENAROYA Research institute (米国 バージニア州) の Chirs Amemiya 博士より提供を受けた。

(4) (3) 項に示す方法により得られた *OtxA* 遺伝子座を含む BAC クローンを大量調製し、超音波破碎により 2 kb 程度に断片化した後、プラスミドベクターに連結し、形質転換により大腸菌に導入する事によりミニライブラリーを作成した。このライブラリーよりランダムに選抜したクローンをを用いてショットガンシーケンスを行い BAC クローンのドラフト配列の決定を行った。

(5) (4) で得られたドラフト配列の非翻訳領域を、公開されている各種脊椎動物の *Otx* 遺伝子座と VISTA plot, BLAST プログラム等を用いて保存配列の決定を行った。

(6) 転写調節領域を含むと思われる *OtxA* 遺伝子座近傍の非翻訳領域を EGFP 遺伝子に連結したレポーター遺伝子に連結したレポーター遺伝子を作成した。

4. 研究成果

(1) 発生中の日本産ヤツメウナギ (*L. japonicum*) よりコーディング領域全長を含む *OtxC* 遺伝子 cDNA のクローニングに成功し、その塩基配列を決定した。得られた塩基配列から予想されるアミノ酸配列は北米産ヤツメウナギ (*P. marinus*) で報告されていた *PmOtx* と 100% 相同であった。この結果から、これまでヤツメウナギは 1~2 種類しか *Otx* 遺伝子を持っていないとされていたが、有顎脊椎動物と同じく 3 種類の *Otx* 関連遺伝子を持つ事が明らかとなった。

(2) 日本産ヤツメウナギから得られた *OtxA*, *OtxB*, *OtxC* 遺伝子の胚発生に置ける時空間的な発現パターンを記載した。新規にクローニングした *OtxC* 遺伝子については全発生ステージにわたって解析を行った。合わせて *OtxA*, *OtxB* 遺伝子でこれまで解析されていなかった胞胚期~原腸胚期について解析を行い、いずれの遺伝子も原口背側部のオーガナイザーと思われる領域に発現している事、*OtxC* に関しては後期発生において北米産のヤツメウナギで報告されているパターンと類似する発現を示す事を明らかにした。

(3) ヤツメウナギ BAC ライブラリーより OtxA 遺伝子座を含む約 110kb の BAC クローン を単離する事に成功し、その全長ドラフト配列を得た。得られた配列をゲノム情報が公開されている各種有顎脊椎動物の Otx パラログの近傍配列と比較したが、高い保存性を示す非翻訳領域は存在しておらず、ヤツメウナギと有顎脊椎動物では Otx 遺伝子の転写調節領域は大きく変化している事が示唆された。

(4) 非翻訳領域に他の脊椎動物と保存性を示す領域は存在しなかったため、実験的に転写調節領域を決定する為に緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子を OtxA 翻訳開始点にレポーター遺伝子として挿入した BAC の作成を行った。

今後は (4) 項で得たレポーター遺伝子をヤツメウナギ胚に導入する事により転写調節領域を明らかにし、結合する転写因子を有顎脊椎動物のそれと比較する事により、脊椎動物の頭部進化における Otx 遺伝子を中心とした転写ネットワークの果たした役割について考察を行う予定である。

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 1 件)

Evolution of *Otx* paralogue usages in early patterning of the vertebrate head.
Yoko Suda*, Daisuke Kurokokawa*, Masaki Takeuchi, Shigeru Kuratani, Chris Amemiya, Shinichi Aizawa .

(*These two authors contributed equally to this work.) *Developmental Biology*, 325, 282-295. (2009) 査読有

[学会発表](計 5 件)

黒川大輔 須田容子 大村朋美 荻野肇 Chris Amemiya 相澤慎一

Otx2 cis-sequences evolution for head development in vertebrate.

The Eight NIBB-EMBL Joint meeting

11月21日

岡崎

黒川大輔 須田容子 大村朋美 荻野肇 Chris Amemiya 相澤慎一

Cis-sequence conservation for Otx2 expression in head organizers in jawed vertebrate.

Joint meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology.

2008年9月15日

フランス ジアン

須田容子 黒川大輔 竹内雅貴 相澤慎一

Lineage-specific usage of Otx paralogues in vertebrate head development.

Joint meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology.

2008年9月14日

フランス ジアン

黒川大輔 須田容子 相澤慎一

脊椎動物の頭部形成過程における系統依存的 Otx パラログ発現

日本動物学会第79回大会

2008年9月6日

福岡

黒川大輔

Evolution of Vertebrate Otx2 enhancers -from skate to mouse -

日本発生生物学会第41回大会

2008年5月27日

徳島

[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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 大輔 (KUROKAWA DAISUKE)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：30251408

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者