

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2008～2010

課題番号：20579002

研究課題名（和文）ゼノパス・トロピカリスにおける遺伝子トラップ法を用いた
発生制御遺伝子の探索研究課題名（英文）The search for new developmental genes using a gene trap approach
in *Xenopus tropicalis*

研究代表者

荻野 肇 (OGINO HAJIME)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任准教授

研究者番号：10273856

研究成果の概要（和文）：本研究では、研究代表者が開発した高効率トランスジェニック技術を用いて、ネットイツメガエル（学名ゼノパス・トロピカリス）において遺伝子トラップ法による新規発生制御遺伝子の探索を試みた。ツメガエル用の遺伝子トラップベクターを新たに開発し、トランスジェニック実験によりそのベクターをゲノム中にランダムに導入したところ、アルビノの表現型を示すミュータントを同定することに成功した。以上の成果により、ネットイツメガエルにおいて挿入ミュータジェネシスが可能なことを実証した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted a gene trap mutagenesis in *Xenopus tropicalis* to identify new developmental regulatory genes, using a high-throughput transgenesis technique that we developed recently. The random insertion of a newly designed gene trap vector into the *Xenopus* genome resulted in generation of an albino mutant, which showed that insertional mutagenesis is actually feasible in *Xenopus tropicalis*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	0	1,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	540,000	3,940,000

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：遺伝学、発生・分化、ゲノム、遺伝子、進化

1. 研究開始当初の背景

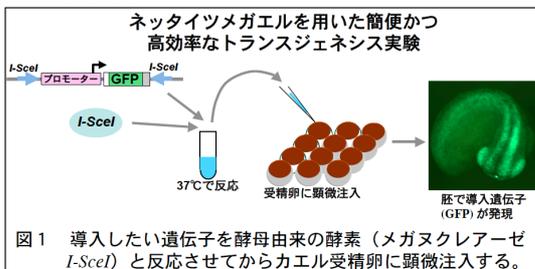
近年ゲノムプロジェクトの爆発的な進展によって、ハエからヒトに至るまで様々な生物種のゲノム配列の全貌が明らかにされつつある。ポストゲノム時代には、ゲノム上の遺伝子の機能を種間で比較して生物の多様性を生み出すしくみを解明することこそが、発生生物学の重要課題となることに疑いの余地はない。しかしゲノム研究の広がりにも

かかわらず、遺伝子の機能解析に必要不可欠な遺伝学的実験系は極めて限られたままである。脊椎動物においてはマウスとサカナが用いられているが、それだけでは生物の多様性について比較解析するには甚だ不十分である。またマウスの発生は母体内で進行するため、体軸の形成や神経誘導など発生初期の現象に関わる遺伝子のミュータントを同定解析することは容易ではない。サカナはゲノ

ム構造がサカナ特有の重複と再編成によって哺乳類と大きく異なるため、相同遺伝子（オーソログ）の機能を哺乳類と直接比較するのは難しい。これらに対して、進化的にサカナと哺乳類の間に位置するカエルは、卵生のため初期発生の観察が容易であり、ゲノム構造も哺乳類にきわめて近い。カエルの中でも、ネッタイツメガエルは小さな2倍体のゲノムを持ち（サイズはヒトゲノムの約半分）、世代時間も3-4ヶ月と短いなど、遺伝学研究に適した全ての条件を備えている。ネッタイツメガエル研究の最大の問題は遺伝子導入の難しさにあったが、このような状況において、研究代表者はネッタイツメガエルのための高効率トランスジェニック技術（メガヌクレアーゼ法）の開発に成功した(Ogino, H. et al., *Mech Dev.* 123: 103-113, 2006; Ogino, H. et al., *Nature Protocol.* 1: 1703-1710, 2006)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この新しいトランスジェニック技術を用いて、ネッタイツメガエルにおける挿入ミュータジェネシスの実験系を確立することである。この方法は酵母由来のメガヌクレアーゼ *I-SceI* とその認識配列を付加した遺伝子とを一緒に受精卵に顕微注入するもので、トランスジェニック胚を1日に約500個体作製することができる(図1)。研究代表者は、メガヌクレアーゼ法を用いれば1個体あたり染色体上の1-2箇所にそれぞれおよそ1-5コピーの遺伝子が挿入されること、その挿入箇所はほぼランダムなこと、導入した遺伝子は生殖細胞に組み込まれて子孫に受け継がれることを既に確認している。このトランスジェニック技術を用いて、遺伝子トラップベクターをネッタイツメガエルのゲノム中に挿入してミュータントを作製し、破壊された内在遺伝子を探索する。これにより、マウスやサカナに次ぐ、脊椎動物における発生遺伝学の第3のモデル系として、ネッタイツメガエル研究を発展させることを目指す。



3. 研究の方法

具体的には(1)ツメガエル用遺伝子トラップベクターを開発し、(2)トランスジェ

ニック実験によりこの遺伝子トラップベクターをゲノム中に挿入した個体を多数作製し、その結果表現型に異常を示すミュータントが得られるかどうか検討した。

(1)については、当初はマウスのES細胞でおこなわれている遺伝子トラップ実験に倣って、マーカー遺伝子(GFP)にEn遺伝子のスプライシングアクセプター配列を連結したものをを用いる予定であった。スプライシングアクセプターがその機能通りに働けば、ベクターが内在遺伝子のイントロン領域に挿入されたときのみ、GFPが発現するはずである。しかし予備実験の結果から、このスプライシング型ベクターは、挿入先によらずしばしば強いバックグラウンド発現を示すことが明らかになった。そこで、サカナでおこなわれている遺伝子トラップ実験と同様に、基本プロモーターをGFPに連結したエンハンサートラップベクターを代わりに用いることを考え、新たにネッタイツメガエル用にそのベクターの構築をおこなった。また、エンハンサーからプロモーターへの転写促進作用を遮断するインシュレータ配列を用いた挿入ミュータジェネシスについても検討した。

(2)については、まず上記のトラップベクターをトランスジェニック実験によってネッタイツメガエル胚に導入後、GFPの発現を指標にファウンダーを同定した。次にファウンダーが性成熟したら野生型と交配してF1個体を作製した。F1個体のうち、GFPを発現するヘテロ接合体だけを選択して育て、性成熟したら兄妹交配をおこなってホモ接合体のF2を作製し、その表現型を検討した。

4. 研究成果

(1)ツメガエル用遺伝子トラップベクターの開発

エンハンサートラップスクリーニングを効率良くおこなうには、バックグラウンド活性が低く、且つ挿入先の遺伝子のエンハンサーに感度良く応答する基本プロモーターをベクターに用いることが重要である。そこで、ツメガエルの様々な遺伝子(*EF-1α*, *cska*, *Pax6*, *FoxE3*, *hsp70*)の基本プロモーターや、ニワトリの β -actin, β -globin, 単純ヘルペスウイルスの *tk*, マウスの *hsp68* プロモーターのそれぞれをGFP遺伝子に連結してネッタイツメガエルのトランスジェニック個体を作製し、そのバックグラウンド活性を調べた。その結果、*EF-1α*, *cska*, β -actinについては、ほとんどバックグラウンド活性がみられず、 β -globinや *tk*, *Pax6*, *FoxE3*では中枢神経系に、*hsp68*, *hsp70*では全身に弱い活性がみられた。

次にバックグラウンド活性の低かった *EF-1α*, *cska*, β -actin プロモーターのそれぞれ

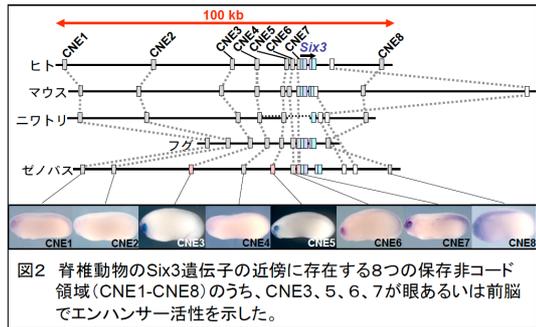
れを、*Six3* 遺伝子の前脳エンハンサーや *FoxE3* の水晶体エンハンサー等と連結してトランスジェニック解析をおこない、エンハンサーに対する応答能について検討した。いずれのプロモーターもエンハンサー依存的に GFP を活性化したが、その発現レベルは *in situ* ハイブリダイゼーションで検出するには十分であっても、胚を生かしたまま蛍光観察で検出するには極めて弱かった。

そこで、先に全身で弱い活性を示した *hsp70* プロモーター (-0.6~+1.0kb) について、5' 上流から転写開始点近傍まで少しずつ欠失させたものを GFP に連結してトランスジェニック解析をおこない、バックグラウンド活性が低く、且つエンハンサーに良く応答するプロモーター領域を同定できるかどうか検討した。-0.2kb まで欠失させると、GFP の蛍光で観察する限り、ほぼバックグラウンド発現が消失し、且つ *Six3* の前脳エンハンサーを連結したときには生きた胚の前脳で GFP の蛍光を観察することができた。以上の結果から、*hsp70* の -0.2kb 領域を GFP 遺伝子に連結したものを、エンハンサートラップベクターとして用いることにした。

一方、ゲノム上においては、遺伝子のコード領域よりも非コード領域の方が圧倒的に長い。それゆえ、エンハンサートラップベクターがコード領域に挿入されてミュータントが得られる確率は、必ずしも高くはないと考えられる。この問題を解決するため、上記のエンハンサートラップベクターにおいて GFP の下流にニワトリ β -globin のインシュレータ配列を付加したベクターを作製した。このベクターが内在遺伝子のエンハンサーとプロモーターの間に挿入されると、そのプロモーターからのエンハンサーに依存した転写が阻害されると共に、トラップベクターの GFP がエンハンサーからの作用を受けて発現すると期待される。エンハンサーはしばしばプロモーターから 10~1000kb 離れた位置に存在することが知られているので、ゲノム全体においてエンハンサーとプロモーターの間の距離は、コード領域よりもずっと長いと考えられる。したがって、それら全ての領域をミュータジェネシスの標的とする本方法は、遺伝学研究において画期的な技術になる可能性がある。

また本研究から、 β -actin プロモーターは、レポーター GFP の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションによって検出する限りにおいては、そのバックグラウンド活性の低さと、エンハンサーの種類に依存しない応答能から、エンハンサー解析のツールとして非常に有用であることが明らかとなった。この発見の過程でおこなった、*Six3* の前脳エンハンサー (図 2)、*Six1* のプラコード外胚葉エンハンサー、*Otx2* のオーガナイザーエンハンサー

の解析、及び *hsp* プロモーターの解析については、その一部を学術論文として発表した (下記の雑誌論文①~④)。



(2) 遺伝子トラップ法によるミュータントの探索

まず、前述した *hsp70* プロモーターをもつエンハンサートラップベクター (インシュレータ無し) を用いてトランスジェネシスをおこない、尾芽胚期あるいはオタマジャクシ期に GFP を組織特異的に発現するファウンダーのスクリーニングをおこなった。トラップベクターを導入した胚から、およそ 1/500~1/1000 ぐらいの確率で、GFP を発現するファウンダーを同定することができた。しかしながら、その多くは GFP を胚全体で弱く発現しており、眼や脳などの組織で特異的に GFP を発現するものは最終的に 58 個体得られた (図 3)。

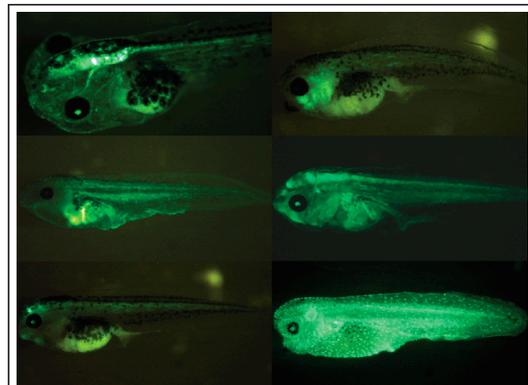


図3 エンハンサートラップスクリーニングで得られたファウンダーの例

これらのファウンダーについて飼育を続けたところ、37 個体が性成熟に達したので、それぞれを野生型と交配することにより F1 世代を作製した。F1 世代におけるヘテロ接合体 (GFP を発現する個体) の割合は各系統ごとに異なり、50%のものあれば、25%や 12.5%、また一部ではあるが全く GFP の発現が見られないものもあった。先に研究代表者は、メガヌクレアーゼ法によるトランスジェネシスでは、ゲノム中への遺伝子挿入が 1 細胞期だけではなく 2 細胞期以降にも起こる場合が

あることを明らかにしている (Ogino, H. et al., *Mech Dev.* 123: 103-113, 2006)。それゆえ、F1 世代で GFP を発現する個体の割合が 50%であった系統は、ファウンダーが 1 細胞期前半のときにゲノム中へトラップベクターの挿入が起きたと考えられ、25%以下の系統はおそらく 1 細胞期後半から 2 細胞期以降にトラップベクターの挿入がおきたと考えられる。しかしながら、いずれの場合も F1 世代の GFP の発現パターンは、それぞれ系統ごとにファウンダーの GFP の発現パターンをほぼ再現していた。

なお、ファウンダーを飼育する過程で、体色が白くなる、いわゆるアルビノの表現型を示すものを発見した (図 4)。この個体は胚発生時には脳で GFP を発現していたことから、表皮における色素細胞形成の異常ではなく、色素細胞刺激ホルモンの分泌を担う脳下垂体あるいはその関連組織に異常をもつと予想された。ファウンダーで表現型がみられたことから、トラップベクターの挿入による優勢変異と期待されたが、残念ながらこの個体からは F1 世代が得られず、破壊された遺伝子の同定等、続けて解析をおこなうことはできなかった。



図4 エンハンサートラップスクリーニングで得られたアルビノ個体

次にこれら F1 世代のヘテロ接合体を性成熟に至るまで飼育し、各系統ごとに兄妹交配をおこなった。21 系統について調べたところ、いずれの系統においても、F2 世代のうち、GFP を強く発現する個体がおおよそ 25%、やや弱く発現する個体が 50%、GFP を発現しない個体が 25%の割合であった。GFP を強く発現する個体がトラップベクターの挿入についてのホモ接合体と考えられるので、その発生過程を神経胚期から尾芽胚期にかけて観察したが、いずれの系統についても少なくとも外見からは何ら発生異常は見られなかった。

以上の結果から、本研究でおこなった遺伝子トラップスクリーニングでは、トラップベクターがゲノム上で発生制御遺伝子のコード領域の外に挿入され、その近傍に位置するエンハンサーの影響下で発現したか、あるいはトラップベクターが発生には直接関与しない遺伝子あるいはその周辺に挿入された

と考えられる。このスクリーニングに用いたベクターの代わりに、前述のインシュレータ付きエンハンサートラップベクターを試験的に導入すると、発生異常を示すファウンダーが多数観察された。このことから、特に前者の可能性が高いと考えられるので、今後はインシュレータ付きベクターを用いることで、より効率良く新たな発生制御遺伝子の探索をおこなう予定である。

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 4 件)

- ① Sato, S., Ikeda, K., Shioi, G., Ochi, H., Ogino, H., Yajima, H., Kawakami, K. Conserved expression of mouse *Six1* in the pre-placodal region (PPR) and identification of an enhancer for the rostral PPR. *Dev. Biol.* 344: 158-171, 2010, 査読有
- ② Hellsten, U., Harland, R. M., Gilchrist, M. J., Hendrix, D., Jurka, J., Kapitonov, V., Ovcharenko, I., Putnam, N. H., Shu, S., Taher, L., Blitz, I. L., Blumberg, B., Dichmann, D. S., Dubchak, I., Amaya, E., Fletcher, R., Gerhard, D., Goodstein, D., Graves, T., Grigoriev, I. V., Grimwood, J., Kawashima, T., Lindquist, E., Mead, P. E., Mitros, T., Ogino, H., Ohta, Y., Poliakov, A. V., Pollet, N., Robert, J., Salamov, S., Sater, A. K., Schmutz, J., Terry, S., Vize, P. D., Warren, W. C., Wells, D., Wills, A., Zimmerman, L. B., Zorn, A. M., Grainger, R., Grammer, T., Khokha, M. K., Richardson, P. M. and Rokhsar, D. S. The genome of the western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science* 328: 633-636, 2010, 査読有
- ③ Kurokawa, D., Ohmura, T., Ogino, H., Takeuchi, M., Inoue, A., Inoue, F., Suda, Y. and Aizawa, S. Evolutionary origin of the *Otx2* enhancer for its expression in visceral endoderm. *Dev. Biol.* 342: 110-120, 2010, 査読有
- ④ Ogino, H. and Ochi, Y. Resources and transgenesis techniques for functional genomics in *Xenopus*. *Dev. Growth Differ.* 51: 387-401, 2009, 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ① Ochi, H., Uchiyama, C., Kawaguchi, A. and Ogino, H. Evolutionary divergence and conservation of cis-regulatory elements in paralog formation (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大

- 会、2010.12.9、神戸)
- ② Ogino, H., Ochi, H. and Uchiyama, C. Conservation and neofunctionalization of cis-regulatory elements in paralog evolution (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010.12.9、神戸)
 - ③ Ochi, H., Uchiyama, C., Kawaguchi, K. and Ogino, H. Evolution of a fail-safe regulatory system for kidney development (The 16th International Conference of the International Society of Differentiation, 2010.11.15、奈良)
 - ④ Ochi, H., Uchiyama, C., Kawaguchi, A., Tamai, T. and Ogino, H. Evolution of a fail-safe regulatory system after genome duplications in chordates (NAIST Global COE International Symposium 2010 "Plasticity in Development and Evolution", 2010.11.11、奈良)
 - ⑤ 横山 仁、丸岡玉枝、越智陽城、有賀章郎、大湖史、荻野 肇、田村宏治 幼生期と成体期の *Xenopus* でみられる四肢再生における異なる開始機構(平成22年度動物学会東北支部大会、2010.8.7、福島)
 - ⑥ Yajima, H., Suzuki, M., Ochi, H., Ikeda, K., Sato, S., Ogino, H., Ueno, N. and Kawakami, K. Six1 acts as a molecular switch of primary sensory systems from Rohon-beard cells to DRG neurons. (11th Asian and Oceanian Conference on transcription, 2010.6.4、沖縄県今帰仁村)
 - ⑦ 荻野 肇、越智陽城、パラログ形成にともなうシス調節機構の進化(第 12 回日本進化学会大会、2010.8.5、東京)
 - ⑧ Yajima, H., Suzuki, M., Ochi, H., Ikeda, K., Sato, S., Ogino, H., Ueno, N. and Kawakami, K. Developmental switch from Rohon-Beard cells to dorsal root ganglia in *Xenopus*. (第 4 3 回日本発生生物学会大会、2010.6.21、京都)
 - ⑨ Ochi, H. and Ogino, H. A fail-safe regulatory system generated by genome duplications for kidney development (第 4 3 回日本発生生物学会大会、2010.6.21、京都)
 - ⑩ Ochi, H. and Ogino, H. Evolution of cis-regulatory mechanisms in paralog formation (第 4 3 回日本発生生物学会大会、2010.6.21、京都)
 - ⑪ Yokoyama, H., Ohgo, S., Aruga, A., Muraoka, T., Ochi, H., Ogino, H. and Tamura, K. Different mechanisms in inhibition of limb regeneration between larval and adult *Xenopus* (第 4 3 回日本発生生物学会大会、2010.6.20、京都)
 - ⑫ Okano, M., Kawaguchi, A., Ochi, H. and Ogino, H. Expression and functional analysis of epigenetic regulators, *Eed*, *Ezh2*, *Jmjd3* and *Utx*, in *Xenopus* embryonic development (第 3 2 回日本分子生物学会年会、2009.12.11、横浜)
 - ⑬ 横山 仁、越智陽城、荻野 肇、田村宏治、*Xenopus* を用いた四肢再生の開始機構に関する研究(第 3 回日本ツメガエル研究集会、2009.9.19、広島県廿日市市)
 - ⑭ 横山 仁、越智陽城、荻野 肇、田村宏治、Wnt シグナリングは四肢再生に対して幼生期と成体期で異なる関与をする(日本動物学会第 80 回大会、2009.9.19、静岡)
 - ⑮ 荻野 肇、越智陽城、カエルの高効率トランスジェニックシステムを用いた機能ゲノム学的研究の展開(日本動物学会第 80 回大会、2009.9.19、静岡)
 - ⑯ 大湖史朗、横山 仁、越智陽城、荻野肇、田村宏治、アフリカツメガエル四肢発生・再生過程におけるレチノイン酸のはたらき(日本動物学会東北支部大会、2009.8.1、仙台)
 - ⑰ Yokoyama, H., Ochi, H., Ogino, H. and Tamura, K. Different involvement of Wnt/b-catenin signaling in limb regeneration of larval and adult *Xenopus* (日本発生生物学会第 42 回大会、2009.5.29、新潟)
 - ⑱ Sato, S., Ikeda, K., Hayashibara, Y., Nakao, K., Aizawa, S., Ochi, H., Ogino, H. and Kawakami, K. Cis-regulatory mechanisms controlling *Six1* expression in the preplacodal region and sensory placodes (日本発生生物学会第 42 回大会、2009.5.29、新潟)
 - ⑲ 荻野 肇、Genome-wide analysis of vertebrate cis-regulatory elements in *Xenopus* (The 16th CDB Meeting, Cis-sequence regulation and evolution, 2008.9.29、神戸)
 - ⑳ 荻野 肇、*Xenopus tropicalis* を用いた研究の現在の状況と将来の方向性について(日本発生生物学会第 41 回大会、2008.5.27、徳島)
- [その他]
- (1) ホームページ等
<http://bsgcoe.naist.jp/special-grp03.html>
 - (2) 雑誌論文② (*Science* 誌に発表したツメガエルゲノム解読プロジェクトの成果) について、その意義と応募者の貢献を伝えた新聞報道記事等
2010.4.3 産経新聞 朝刊、産経新聞(関東

版) 朝刊、朝日新聞 夕刊、読売新聞
朝刊、奈良新聞 朝刊、日刊工業新聞 朝
刊、日経産業新聞 朝刊、日本経済新聞
朝刊、毎日新聞 朝刊

2010.5.3 奈良新聞 朝刊

2010.5.7 化学工業日報 朝刊

2010.5.14 科学新聞 朝刊

2010.7.8 Nature Japan 特集記事「両生類と
してはじめてとなる、カエルゲノムを解
読!」

<http://www.natureasia.com/japan/jobs/tokushu/detail.php?id=220>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻野 肇 (OGINO HAJIME)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・特任准教授

研究者番号：10273856

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

越智 陽城 (OCHI HARUKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・特任助教

研究者番号：00505787