

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770174

研究課題名 (和文) ゲノム情報選択の分子機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the molecular mechanism regulating target gene selection

研究代表者

越田 澄人 (KOSHIDA SUMITO)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：40342638

研究成果の概要 (和文)：脊椎動物の発生過程では、同一のシグナルが時間的・空間的に異なる領域の細胞に対して異なる遺伝子発現制御を引き起こすことがしばしば観察される。これはシグナルに対する異なる応答性によって生み出されていると考えられている。本研究では、シグナル依存的に異所的な遺伝子発現を示すゼブラフィッシュ突然変異体の表現型解析および原因遺伝子の同定を行い、遺伝情報の読み出しを制限する「応答性」の分子機構の解明を目指している。

研究成果の概要 (英文)：During vertebrate development, the same signaling molecule is often expressed repeatedly and plays an important role in each time and place. This means the same signal can differently regulate the expression of genes in each case. This differential control of gene expression is probably caused by differential competence of the cells in response to signals. In this research, we will analyze the phenotype of zebrafish mutants which are defective for the differential control of gene expression and identify their responsible genes, and try to understand the molecular mechanism underlying the differential competence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：遺伝子発現調節

1. 研究開始当初の背景

細胞は、シグナルを受け取るとゲノムに保存された遺伝子情報を選別し、発現制御するこ

とで生命活動に必須な様々な機能を果たしている。発現制御する遺伝子の決定には、シグナルの種類だけではなく、そのシグナルを

受け取る細胞の「応答性」も重要な要素である。同一のシグナルが時間的・空間的に異なる領域の細胞に対して異なる遺伝子発現制御を引き起こすことは、これまでに多数の報告がある。例えば、多くの転写制御因子や分泌タンパク質が、脊椎動物の初期発生過程でゲノムに対するシグナルとして時間的・空間的に異なる領域で繰り返し発現し、それぞれの領域で異なる生命現象（遺伝子発現制御）を引き起こすことが観察されている。「同一のシグナルであるにもかかわらず、受け取った細胞によって、どうして異なる遺伝子発現が起こるのか？」という問題は遺伝情報の読み出し方の多様性を明らかにしていく上で極めて重要である。しかし、これまでに行なわれてきている多くの研究は、「応答性が異なる」という現象の記載がほとんどであり、その分子機構にあまり踏み込めていない。

応答性制御の分子機構を明らかにするためのモデル系のひとつとして、脊椎動物の初期発生で見られる中胚葉誘導が注目されている (PRINCIPLES OF DEVELOPMENT, Lewis Wolpert)。シグナル分子である FGF は発生過程の様々な時期・領域で発現しているが、胞胚期の予定外胚葉領域の細胞に対してのみ中胚葉特異的遺伝子の発現を誘導することが出来る。その後、原腸期になると FGF は予定中枢神経系の一部で発現して、神経発生に関与する遺伝子の発現を調節しているが、ここで中胚葉特異的遺伝子の発現が活性化されることはない。両生類を用いた研究では、この中胚葉誘導における応答性の変化にヒストン H1 が関与しており、クロマチンの高次構造の変化が重要であることが示唆されている (Steinbach et al, Nature, 1997)。しかし、この研究はそれ以来あまり進展が見られておらず、分子機構の理解は未だ不十分である。

2. 研究の目的

中胚葉誘導シグナルに対する予定外胚葉細胞の応答性の変化は、両生類を用いた研究によって明らかにされてきていたが、我々は同様の現象が魚類であるゼブラフィッシュにおいても観察されることを見出し、この機構が脊椎動物において保存されていることを発見した。さらに、この応答性の変化に関わる遺伝子を同定するために、FGF シグナルに対する応答性に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体をスクリーニングした。単離された突然変異体の表現型解析によって、予定中脳・後脳境界周辺で本来発現しないはずの中胚葉特異的遺伝子 *ntl* (*T/Brachyury* のゼブラフィッシュ相同遺伝子) が異所的に発現していることが明らかになった。そこで本研究では、遺伝学的解析を含めた研究を多角的かつ迅速に行えるゼブラフィッシュを用

いて、シグナルによる遺伝情報の読み出しを制限する応答性制御の分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュ突然変異体の詳細な表現型解析。

我々が単離した FGF に対する応答性異常の突然変異体は、予定中脳・後脳境界付近において *ntl* 遺伝子を異所的に発現しているが、このような突然変異体の外見上の発生異常や変異の遺伝的性質について詳細に観察する。得られた結果を元にして、原因遺伝子が関与する遺伝子選択の機構を推測していく。さらに、異なる系統の変異体間での表現型についても比較解析を行うことで、この現象に関与する遺伝子間の相互作用についての知見を得る。

(2) ゼブラフィッシュ突然変異体の原因遺伝子の同定。

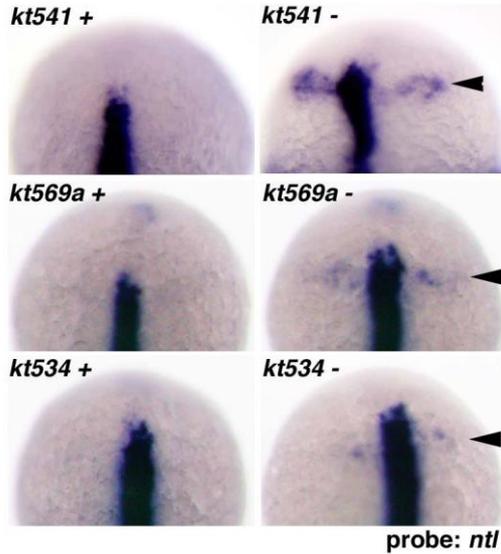
単離された変異体は、化学変異剤 ENU を用いて作製された。ENU 処理は頻度が高い反面、導入される変異が点突然変異であるために原因遺伝子の同定が比較的難しいという欠点を持つ。ポジショナルクローニングを行うために、まず得られている複数の変異体を表現型の類似性によって分類し、グループ内で相補性テストを行うことで変異の生じている遺伝子座が同一かあるいは異なるかを検定する。次に目的とする変異を遺伝学的にマッピングするために、密接に連鎖する DNA マーカーの同定を行う。連鎖解析には SSLP (Simple Sequence-Length Polymorphism) 法を用いた。この方法はゲノム DNA を特定のプライマーセットで PCR し、増幅してくる断片の長さを電気泳動によって調べるというもので、他の手法と比べて操作が単純・簡便でまた安価である。1 種類の変異のマッピングには数百から千匹程度の胚から得たゲノムについて PCR を行なう必要があり、再現性が高いことも SSLP 法の長所である。

このような原因遺伝子の探索に加えて、既に報告されている遺伝子の中から突然変異体の原因遺伝子の候補となりうるものを検索した。我々が同定した突然変異体の原因遺伝子は、広い範囲の細胞に対して抑制性の転写制御をしている可能性が高く、ポリコム遺伝子群などのクロマチン関連因子のうち発現パターンがこれまでの知見に合致するものが候補となる。このような候補遺伝子について、アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドを用いた機能阻害実験を行った。この結果から得られた胚の表現型から突然変異体の原因遺伝子を推測する。

4. 研究成果

(1) 突然変異体の表現型解析

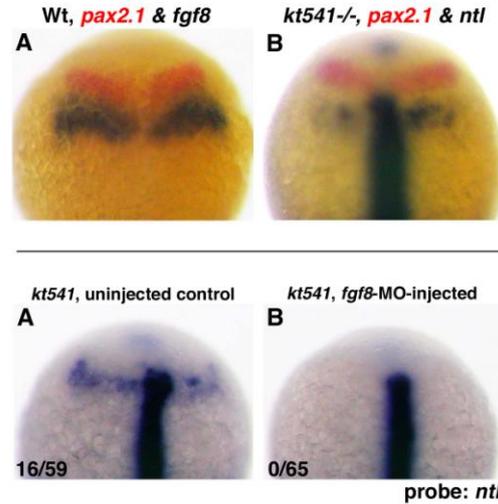
ntl の発現パターンを指標に突然変異体 11 系統を比較したところ、予定中脳・後脳境界 (MHB) 付近で見られる *ntl* の異所的発現の強さは、系統によって異なっていた (図)。



異所的発現が最も強くみられた *kt541* では、原腸胚期に覆いかぶせ運動 (epiboly) の停止または著しい遅延が観察された。*polster* が正常に形成されていることから、中軸中胚葉の陥入および convergent & extension は正常に起こっていると思われる。通常、卵黄を 80% 程度包み込んだところで epiboly が停止し、そのまま 2-3 体節期まで進むが、表現型の強い個体は 60-70% のところで停止する。その後数時間のうちに胚は死亡する。さらに詳細な解析を行ったところ、*kt541* は母性優性かつ温度依存性の表現型を示すことが明らかになった。

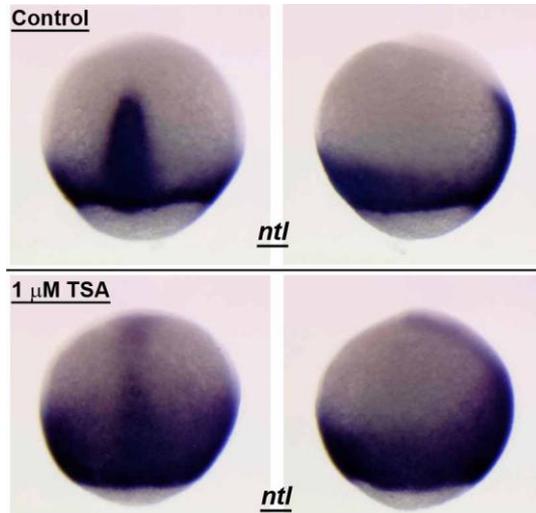
さらに *kt541* でみられる *ntl* の異所的発現部位を正確に知るために、MHB の前方領域で発現する *pax2.1* および後方領域で発現する *fgf8* と発現領域を比較した。その結果、*ntl* の異所的発現は *pax2.1* の発現領域よりも後方の *fgf8* が発現している MHB の後方領域であることが明らかになった (図上段)。

MHB 後方領域での *ntl* の異所的発現を誘導しているシグナルが、同じ領域で発現している *fgf8* であるか検討するために、*fgf8* に対するアンチセンスモルフォリノオリゴ (*fgf8*-MO) を用いた機能阻害実験を行った。*fgf8*-MO を顕微注入された胚では、*ntl* の異所的発現は見られなくなった (図下段)。この結果から、*kt541* における *ntl* の異所的発現は *fgf8* を必要とすることが明らかになった。



(2) ヒストンアセチル化と *ntl* 発現制御の関連

脊椎動物初期胚の中胚葉特異的遺伝子発現の応答性に、クロマチンの高次構造が関与している可能性を検討するために、クロマチン構造に影響を及ぼすヒストンのアセチル化状態を改変する実験を行った。ヒストン脱アセチル化を阻害する Trichostatin A (TSA) で処理された胚では、中胚葉特異的遺伝子 *ntl* の発現が後期原腸胚の胚盤周縁部で拡大し、また本来発現しない脊索前板で弱い発現が観察された (図)。



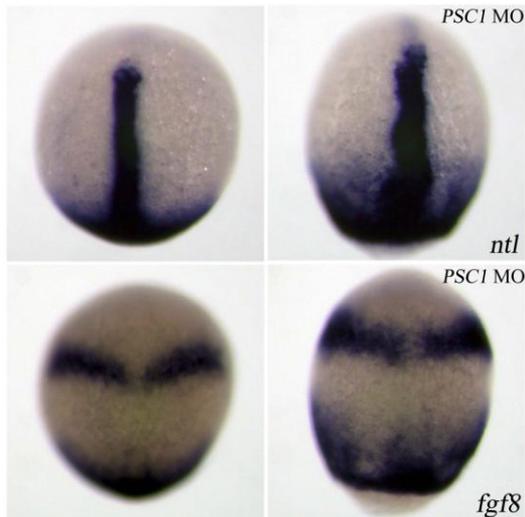
これらのことは、ヒストンの脱アセチル化によるクロマチン構造の変化が *ntl* 遺伝子の転写を抑制することが、正常な発現パターンの実現に必須であることを示唆している。一方で、*ntl* と同様に胚盤周縁部で発現する *fgf8* や *wnt8* では、発現領域の拡大はみられなかったことから、アセチル化状態による発現領域制御には遺伝子選択性がみられることも明らかとなった。今後、*ntl* 遺伝子をコ

ードするゲノム領域でヒストンの脱アセチル化を引き起こす分子機構の解明を行っていく。

(3) ポリコーム遺伝子群による *ntl* 発現制御

クロマチンの高次構造が *ntl* の発現選択に関与している可能性についてさらに検討するために、ポリコーム遺伝子群 (PcG) の *Ez2* および *PSC1* についてアンチセンスモルフォリノオリゴを用いた機能阻害実験を行った。PcG の遺伝子は、ヒストンの脱アセチル化やメチル化を制御し、遺伝子発現を抑制することが知られている。

Ez2 MO をインジェクションされた胚は、5 体節期くらいから頭部から後方の神経系にかけて細胞死が見られたが、尾芽胚期での *ntl*, *fgf8* の発現パターンに変化は見られなかった。一方で、*PSC1* MO をインジェクションした胚では、*epiboly* 異常が見られた。尾芽胚期において *ntl*, *fgf8* の胚盤周縁部での発現が拡大していた (図) が、MHB での異所的発現は見られなかった。



以上の結果から、クロマチンの高次構造が *ntl* の選択的な発現制御に関与している可能性が示唆された。中胚葉特異的遺伝子の時空間的に特異的な発現制御におけるクロマチン関連因子の役割が新たに明らかになった。

(4) *kt541* 変異体の原因遺伝子の同定

kt541 変異体は温度感受性と優性の母性効果を示すことから、その原因遺伝子の同定は比較的困難であった。*kt541* 変異体と多くの多型を持つ別系統のゼブラフィッシュとを数世代にわたって交配し、変異部位近傍以外が別系統に組み変わった集団を確立し、変異部位の遺伝学的マッピングを行なった。その結果、第 25 番染色体の連鎖マーカー *z15205* から *z1213* の 16.9cM に位置することが強く

示唆された。今後、さらに詳細なマッピングを行うことによって候補遺伝子が絞り込まれていくことが期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越田 澄人 (KOSHIDA SUMITO)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号: 40342638

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: