

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20770183

研究課題名（和文）ホヤにおける時間的に制御可能な遺伝子誘導発現系の構築

研究課題名（英文）Development of a temporally regulable gene expression system in ascidian embryos

研究代表者

和田 修一（WADA SHUICHI）

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・講師

研究者番号：20378607

研究成果の概要（和文）：

発生生物学研究のモデル生物であるカタユレイボヤで利用可能な誘導発現系はこれまでになかった。そこで本研究では、熱ショック応答遺伝子（*Ci-HSPA1/6/7-like*）の転写制御領域を利用して遺伝子誘導発現系を構築した。この系により、任意のタイミングで目的遺伝子を働かせる実験が可能となった。また、*Ci-HSPA1/6/7-like*の熱ショック応答が熱ショック転写因子を介したものであることを示した。

研究成果の概要（英文）：

So far there was no inducible gene expression system in the ascidian *Ciona intestinalis*. We developed a heat shock-inducible gene expression system based on the cis-regulatory region of the *Ciona* HSP70 family gene *Ci-HSPA1/6/7-like*. This system allowed temporally controlled induction of gene expression in ascidian embryos. We also showed that heat shock response of *Ci-HSPA1/6/7-like* is mediated by the heat shock transcription factor.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：遺伝子発現調節・熱ショック応答・転写制御領域・誘導発現系

## 1. 研究開始当初の背景

脊索動物門尾索動物亜門に属するホヤは発生の際に幼生を生じる。この幼生は少数の細胞からなるものの、脊椎動物胚に類似した体制を持つ。そのためホヤ胚は脊椎動物の発

生メカニズムを解析するためのシンプルなモデルとして活用されている。さらに、幼生はしばらく後に変態を行い、成体特有の形態を持つ幼若体となる。この過程は、変態のメカニズムを解析するためのモデルとして利

用されている。こうしたホヤの発生メカニズムの理解を目指して、最も研究が進んでいるカタユレイボヤでは、ゲノムプロジェクトや cDNA プロジェクトを通して発生に関係する多くの遺伝子が同定され、主に幼生までの初期発生で働く多数の遺伝子の機能が調べられている。

現在、カタユレイボヤ胚における遺伝子機能解析の手段としては、目的遺伝子の合成 mRNA の卵への顕微注入による過剰発現実験、組織特異的遺伝子の転写制御領域の制御下に目的遺伝子の cDNA を置いた発現コンストラクトの卵への導入による過剰発現実験、目的遺伝子に対するモルフォリノオリゴヌクレオチドの卵への導入による翻訳阻害実験、などがある。しかし、mRNA の顕微注入実験では、過剰発現の影響が注入後すぐに現れることが多く、変態過程などの発生後期に働く遺伝子の解析には不向きである。また目的遺伝子が発生段階により異なる複数の機能を持っている場合、最初の発生段階における機能についての情報しか得られないことがある。翻訳阻害実験についても同様の欠点が当てはまる。一方、転写制御領域を用いた発現系の場合は、発生後期に働く転写制御領域を利用することでこれらの問題は理論上解消可能だが、実験の目的に合致した転写制御領域を探すことが難しいため、実際には発生初期に働く少数の転写制御領域を利用した例しか報告がない。従って、これら既存的手法では発生後期（幼生期や幼若体期）における遺伝子機能の解析や、複数の機能を持った遺伝子の解析は困難な状況である。

誘導性のプロモーターを利用した遺伝子誘導発現系は、こうした問題を解消し、任意の時期における遺伝子機能の解析を可能にする有用なツールであり、多くのモデル生物で活用されてきたが、ホヤでは利用されたことがない。ホヤで利用できる誘導発現系が確立すれば、既存の方法では解析が困難であった発生後期における遺伝子の機能を調べることが可能となり、ホヤの発生のさらなる理解に寄与することが期待できる。

## 2. 研究の目的

既存の遺伝子誘導発現系の代表的なものに、HSP70 スーパーファミリーに属する遺伝子の熱ショック誘導性のプロモーターを利用した系がある。この系は、発現を誘導するために薬剤等を使う必要がない点や、誘導に働く転写調節因子を外から供給する必要がない点で優れている。そこで本研究では、カタユレイボヤにおける HSP70 スーパーファ

ミリーの遺伝子 *Ci-HSPA1/6/7-like* の転写制御領域を用い、ホヤにおいて最適化された熱ショック誘導発現系を確立することを目指す。

遺伝子機能解析の実験系としては、系の性質についての情報が豊富であり、使用条件の最適化がされていることや、系のメカニズムが詳細に解明されており、実験結果に想定外の要素が影響しないことが望まれる。本研究ではこれらの条件を満たすために、誘導発現系の開発と同時に、その性質やメカニズムについて解析する。具体的には、(1) *Ci-HSPA1/6/7-like* の転写制御領域の制御下で熱ショックに依存した目的遺伝子の誘導が可能な誘導発現系を開発する。次に(2) 開発した系における誘導の条件を検討するとともに、誘導される遺伝子の発現パターンを調べる。さらに、(3) 開発した系の有効性を実証するために、機能が既知の遺伝子について誘導実験を行う。また、(4) 熱ショックが胚発生に与える影響を知るために、主要な発生関連遺伝子のストレス応答性を解析する。最後に、(5) 誘導のメカニズムを解明するために、*Ci-HSPA1/6/7-like* の転写制御領域について解析を行う。特に *Ci-HSF* (カタユレイボヤの熱ショック転写因子相同遺伝子であり、他の生物での知見から、*Ci-HSPA1/6/7-like* の転写調節因子の有力な候補である) による *Ci-HSPA1/6/7-like* の転写制御の可能性に注目する。

以上の結果とともに誘導発現系を公開し、広く利用可能とすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 熱ショック誘導発現系の構築

*Ci-HSPA1/6/7-like* の転写制御領域 (翻訳開始点から上流 2Kbp) の下流に目的遺伝子のクローニング部位を置いたベクターを作成した。このベクターに目的遺伝子を組み込み、それを導入した胚に熱ショックをかけることで目的遺伝子の誘導発現を試みた。ベクター構築には、目的遺伝子のクローニングに Invitrogen 社の Gateway システムを採用した (多くのカタユレイボヤの遺伝子について Gateway 対応の cDNA クローンが作成されているため、これによりベクターの利便性が向上する)。

### (2) 誘導条件の検討と誘導される遺伝子の発現の解析

上記の誘導発現系に目的遺伝子としてレポーター遺伝子である *LacZ* を組込んだレポーターコンストラクトを用いて、熱ショックによる誘導実験を行った。レポーターの発現をレポーターアッセイにより解析した。解析の結果、胚に熱ショックを与える時期によ

てレポーターの空間的発現パターンが異なることがわかったため、その性質について詳しく解析した。

#### (3) 機能既知の遺伝子を用いた検証実験

*Ci-HSPA1/6/7-like* の転写制御領域を用いた誘導発現系の有効性を実証するため、目的遺伝子として脊索特異的転写調節因子をコードする *Ci-Bra* 遺伝子を選び、誘導実験を行った。

#### (4) 発生関連遺伝子のストレス応答の解析

熱ショックがホヤの胚発生に与える影響を調べるため、胚期に発現する代表的な発生関連遺伝子約 64 種類 (転写調節因子とシグナル伝達経路の構成要素をコードする遺伝子で、機能解析がされているもの) の発現に対する熱ショックの影響をリアルタイム RT-PCR 法で調べた。

#### (5) *Ci-HSPA1/6/7-like* の転写調節メカニズムの解析

*Ci-HSPA1/6/7-like* の転写制御領域について様々な変異体を作成し、レポーターアッセイを行って熱ショック誘導に関与する領域を特定した。次に、*Ci-HSF* の過剰発現実験および翻訳阻害実験を行い、*Ci-HSPA1/6/7-like* の熱ショック応答に与える影響を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 熱ショック誘導発現系の構築

*Ci-HSPA1/6/7-like* の転写制御領域 (翻訳開始点から上流 2Kbp) をクローニングし、その下流に目的遺伝子を組み込める Gateway 対応ベクターを作成した。このベクターに目的遺伝子として *LacZ* 遺伝子を組み込み、胚に導入したところ、熱ショック依存的な *LacZ* 遺伝子の発現が見られたため、このベクターを以下の誘導発現実験に用いることとした。なお当初の計画では、この系の他に、熱ショック誘導系を GAL4/UAS システムや組織特異的エンハンサーと組み合わせた発展形の発現系の構築を目指していたが、次に述べる *Ci-HSPA1/6/7-like* の転写制御領域の性質の解析に予想以上の時間がかかったために、発展形の発現系を完成させることは出来なかった。

### (2) 誘導条件の検討と誘導される遺伝子の発現の解析

上記の誘導発現系に目的遺伝子としてレポーター遺伝子である *LacZ* を組込んだレポーターコンストラクトを用いて、熱ショックによる誘導実験を行い、レポーターの発現を解析した。解析の結果、18 から 28 への温度上昇を 10~60 分間行うことでレポーターの発現を誘導できることがわかった。

この実験を行う過程で、胚に熱ショックを与える時期によってレポーターの空間的発

現パターンが異なることがわかったため、その性質について次のように詳しく解析した。レポーターコンストラクトを受精卵に導入し、32 細胞期、原腸胚中期、神経胚中期、尾芽胚初期、尾芽胚中期、尾芽胚後期まで胚を飼育した後 28 ± 1 時間の熱ショックを与え、すぐにレポーターの発現を解析した。その結果、32 細胞期から神経胚中期までの間に熱ショックを加えた場合には、胚の全ての組織でレポーターの発現が検出された (全ての組織について、発現頻度は 70%以上)。ところが、表皮については、尾芽胚初期に熱ショックを加えた場合にレポーターの発現頻度が約 30% に減少し、尾芽胚中期と後期に熱ショックを与えた場合にはこれが約 10% になった。さらに、内胚葉と間充織についても、尾芽胚後期に熱ショックを加えた場合にレポーターの発現頻度が 20%~30% に低下した。筋肉、脊索、神経管ではそうしたことは見られなかった。

熱ショック依存的なレポーターの発現が組織ごとに異なる理由について知るため、熱ショック処理胚における内在性の *Ci-HSPA1/6/7-like* の発現を *in situ* hybridization 法で調べた。その結果、熱ショック応答能力は 16 細胞期以降に獲得されることと、熱ショックにより誘導された *Ci-HSPA1/6/7-like* の発現は尾芽胚後期であっても胚の全ての細胞で検出されることがわかった。すなわち、尾芽胚初期以降にはレポーターの発現が内在性の *Ci-HSPA1/6/7-like* の発現を再現していないことがわかった。さらに、こうしたレポーターの発現と内在性遺伝子の発現の間の齟齬は、ベクターの種類を変えても起こり、ベクターに組み込む転写制御領域の長さを変えても起こり、用いる熱ショック応答遺伝子の種類を変えても起こることがわかった。現時点では、この齟齬の原因は不明である。結論としては、卵割期から神経胚期までの間に胚に熱ショックを与えた場合は胚の全ての種類の細胞でレポーターの発現が誘導される。すなわち、この発生段階までに胚に熱ショックを与えることで、この系で目的遺伝子を全身に発現させることが可能であることがわかった。一方、神経胚期以降の時期では目的遺伝子を発現させることができる組織の種類が筋肉、脊索、神経管に限定されるものの、これらの組織を対象にした実験には利用可能であることがわかった。

### (3) 機能既知の遺伝子を用いた検証実験

*Ci-HSPA1/6/7-like* の転写制御領域を用いた誘導発現系の有効性を実証するため、目的遺伝子として *Ci-Bra* 遺伝子を選び、誘導実験を行った。この遺伝子は、脊索特異的転写調節因子をコードし、脊索の形成に必要な十分であることが報告されている。

ホヤの脊索形成過程においては、32 細胞期

に内胚葉前駆割球から分泌される FGF 様因子が予定脊索割球に働きかけ、MAPK カスケードを介して *Ci-Bra* の発現を誘導する。そこで、MAPK カスケードの阻害剤を用いて脊索の形成を阻害した胚に対して外来性 *Ci-Bra* の発現を熱ショックにより誘導する実験を行った。この場合、*Ci-Bra* の誘導が成功した場合にのみ脊索形成が起こることになる。実験の結果、32 細胞期から熱ショックを与えた場合に脊索形成の回復が見られた。この結果は、胚発生に関係する遺伝子の機能解析を行う実験系として、本誘導発現系が有用であることを実証した。

#### (4) 発生関連遺伝子のストレス応答の解析

熱ショックがホヤの胚発生に与える影響を調べるため、胚期に発現する代表的な発生関連遺伝子 64 種類の発現に対する熱ショックの影響をリアルタイム RT-PCR 法で調べた。その結果、1 つの遺伝子 (*Ci-SMYD1*) について発現の誘導が見られた。熱ショック処理を行っても外見上は胚に顕著な異常が現れないので、*Ci-SMYD1* の発現の誘導が発生異常を引き起こしているようには思われませんが、この遺伝子が関係する研究に本誘導発現系を利用する場合には十分な配慮が必要であることが示唆された。

#### (5) *Ci-HSPA1/6/7-like* の転写調節メカニズムの解析

*Ci-HSPA1/6/7-like* の転写制御領域について様々な変異体を作成し、レポーターアッセイを行って熱ショック誘導に關与する領域を特定した。具体的には、*Ci-HSPA1/6/7-like* の上流 2Kbp、1500bp、1Kbp、500bp、360bp、260bp、160bp の領域を含むレポーターコンストラクトを用意し、それぞれをカタユレイボヤ受精卵に導入し、後期尾芽胚で熱ショック処理を行い、レポーターの発現を調べた。その結果、上流 160bp を持つもの以外のコンストラクトで、熱ショック依存的なレポーターの発現が見られた。このことから、熱ショック依存的なレポーターの発現には 160bp よりも上流の領域が必要であることが示された。

一般に、熱ショックによる分子シャペロン遺伝子の発現誘導には、HSF (熱ショック転写因子) と呼ばれる転写調節因子が關与することが知られている。HSF の結合コンセンサス配列を HSE (熱ショックエレメント) と呼ぶ。*Ci-HSPA1/6/7-like* の上流 160bp から 260bp の間の領域には 3 つの HSE が存在している。これらの HSE の役割を調べるため、上流 2 Kbp を含むコンストラクトを元に、この領域を様々に欠損させた 6 種類の変異型コンストラクトを作成した。これらの変異型コンストラクトを受精卵に導入し、後期尾芽胚で熱ショック処理を行い、レポーターの発現を調べた。その結果、3 つの HSE 全てを失う

ように欠損を入れたコンストラクトでは発現がほとんど見られなくなることがわかった。さらに、翻訳開始点に近い 2 つの HSE を同時に失うように欠損を入れたコンストラクトでも、発現する胚の割合が元のコンストラクトに比べて大きく減少することがわかった。以上の結果は、HSE を認識する HSF が他の動物同様にホヤにおいても熱ショックによる遺伝子発現誘導に關与している可能性を強く示唆している。

この可能性を直接的に検証するため、カタユレイボヤの HSF をコードする *Ci-HSF* の過剰発現実験とモルフォリノオリゴヌクレオチドを用いた翻訳阻害実験を現在行っている。まだ結果は得ていないが、この実験により *Ci-HSPA1/6/7-like* の熱ショック誘導のメカニズムをさらに明らかにすることが重要である。

本研究により、発生生物学研究のモデル生物であるカタユレイボヤで利用可能な誘導発現系を初めて構築することができた。この系は、任意のタイミングで目的遺伝子を働かせる実験を可能とするものであり、ホヤにおける遺伝子機能解析に有用なツールである。既に我々は開発したベクターを複数の研究グループに対して配布しており、今後この誘導発現系を利用した研究が成果を挙げることを期待される。

## 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 1 件)

Tetsuya Fujikawa, Takeo Munakata, Shin-ichi Kondo, Nori Satoh and Shuichi Wada. Stress response in the ascidian *Ciona intestinalis*: transcriptional profiling of genes for the heat shock protein 70 chaperone system under heat stress and endoplasmic reticulum stress. Cell Stress and Chaperones. 15, 193 ~ 204. (2010) 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 修一 (WADA SHUICHI)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・講師

研究者番号：20378607