

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 14日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770208

研究課題名（和文）

脊椎動物の体幹部に前後軸の特異性をもたらす分子機構の解析
（英文）

Molecular analysis of specification along anteroposterior axis in body of vertebrates

研究代表者

川村 哲規 （KAWAMURA AKINORI）

埼玉大学・大学院理工学研究科・講師

研究者番号：10466691

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物の体幹部は、発生初期に前後軸に沿って繰り返し構造である体節が形成され、その後特異性が確立される。脊椎動物の胚発生において、*Hox* 遺伝子群が前後軸に沿った特異性の決定において中心的な役割を果たすことが知られているが、この秩序だった発現パターンの形成機構に関しては殆ど分かっていない。本研究では、ゼブラフィッシュの突然変異体に着目し、その原因遺伝子の探索を行い、原因遺伝子の候補を絞り込んだ。さらに、前後軸に沿った繰り返し構造を示す体節の形成過程に重要な役割を担う *hairy* 相同遺伝子に着目し、その遺伝子発現を制御するエンハンサー領域を探索した結果、*hairy* 相同遺伝子座の下流領域に内在の発現領域に発現誘導活性をもつ DNA 領域を同定した。現在、この配列についてさらなる解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：

During embryogenesis of vertebrates, the repeated and segmental structure, somites, are formed, and subsequently specification along the anteroposterior axis is established in vertebrates, *Hox* genes have been known to play roles in the specification of identity along the anteroposterior axis. However, the molecular mechanisms underlying this ordered expression patterns of *Hox* genes remains poorly understood. In this study, we analyzed the zebrafish mutant and identified candidate genes by genetic analyses. In addition, we analyzed the transcriptional regulation of *hairy*-related gene, which play important roles in the somite patterning. The DNA region downstream of *hairy*-related gene shows enhancer activity, consistent with the endogenous gene expression. At present, we further proceed to analyze this DNA region.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
2011年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
2012年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
年度			
年度			
総計	3,300,000 円	990,000 円	4,290,000 円

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：初期発生、突然変異体、転写制御機構、ゼブラフィッシュ、エンハンサー、脊椎動物、体節形成、前後軸形成

1. 研究開始当初の背景

肋骨や四肢などに代表されるように、脊椎動物のからだには前後軸に沿った特徴的な形態が観察される。このような前後軸の位置による形態の違いは、発生過程において確立される特異性（アイデンティティ）によってもたらされ、ショウジョウバエの遺伝学的解析を端緒とした研究から *Hox* 遺伝子群がこの過程において重要な役割を担っていることが知られている。この機構はショウジョウバエおよび脊椎動物において同様に保存され、*Hox* 遺伝子群の発現が染色体上の位置と対応してそれらの前方発現境界が整然と並んでいる。ショウジョウバエおよび脊椎動物における *Hox* 遺伝子群がこのようなパターンを形成し前後軸に沿ったアイデンティティを決めていることはこれまでの多くの研究結果から支持されている。しかしながら、この秩序だった発現パターンがどのようにして形成されるのかに関しては、ショウジョウバエと脊椎動物では大きく異なると考えられる。実際、ショウジョウバエに関してはこれまで最もよく遺伝子レベルで理解された発生現象のひとつであるのに対して、脊椎動物の体幹部に関して *Hox* 遺伝子群の秩序だった発現パターンが如何にして形成されるのかについては未だほとんど理解されていない。

また、脊椎動物の体幹部にみられる大きな特徴として、脊骨などに代表されるように反復構造をみることができ、このような繰り返し構造は、発生初期に形成される体節の分節性に由来し、体節は未分節中胚葉の最前部が周期的にくびれきれることで形成される。これまでに分節時計と呼ばれるユニークな機構が存在し、bHLH 型の転写因子である *hairy* が振動子として機能することが分かっている。しかしながら、その分子メカニズムに関しては未だ不明な点が多く、分子メカニズムのさらなる解明が大きな課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、発生生物学研究において様々な利点を有するゼブラフィッシュ胚を用い

て、脊椎動物の前後軸に沿って繰り返し構造を呈する体節が生じる分子メカニズムと、その後に *Hox* 遺伝子群によって前後軸の特異性がもたらされる分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 突然変異体を用いた解析

これまでに行ってきたゼブラフィッシュ胚を用いた突然変異体スクリーニングにより単離された突然変異体を解析する。具体的には、SSLP(Simple Sequence Length Polymorphysm)マーカーを用いた連鎖解析による責任遺伝子の同定と、Whole-mount *in situ* hybridization 法を用いた遺伝子発現パターンの解析を行うことで、突然変異体の解析を行った。

(2) *hairy* 相同遺伝子のエンハンサー領域の解析

hairy 相同遺伝子座を含む BAC クローンを SW102 大腸菌に導入し、相同組み換え法により *hairy* 相同遺伝子とレポーター遺伝子の GFP を置き換えた。改変した BAC クローンを受精直後のゼブラフィッシュ胚に導入し、発生を進め、受精後約 15 時間胚での GFP シグナルを指標にエンハンサーの候補領域を絞り込んだ。また、10kb 以下の DNA 配列の場合には、その DNA 断片を GFP レポーター遺伝子に直接、つなげたものを作製し、それを用いた。

4. 研究成果

(1) 突然変異体を用いた解析

ENU を用いた突然変異誘発スクリーニングにより単離された興味深い表現形を示す *sud360* 突然変異体に着目し、解析を行った。前後軸に沿って、短縮した表現形を示し、36 時間胚においては頭部が野生型と比較して、小さくさらに眼の形成においても異常を示す (図 1)。このような表現形を遺伝子レベルで調べるために、whole-mount *in situ* hybridization 法により解析した結果、

幾つかのマーカー遺伝子において顕著な発現パターンの違いが検出された。Sud360 突然変異体の責任遺伝子を明らかにするために、SSLP マーカーを用いた連鎖解析を行った。その結果、責任遺伝子と連鎖する領域は第 20 番染色体上に存在し、約 1cM の遺伝学的な距離に存在する SSLP マーカーを同定した。この領域に位置する幾つかの遺伝子を候補遺伝子として、突然変異部位の同定に向けて、解析を行っている。

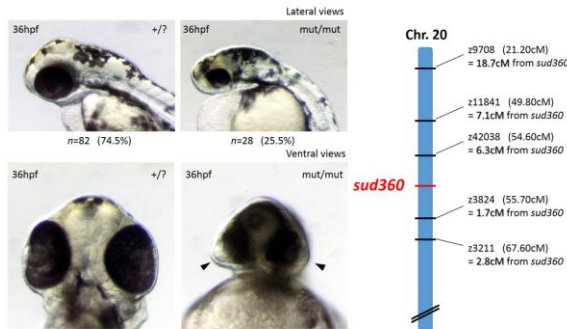


図1. sud360突然変異体の表現形とその連鎖解析の結果

(2) hairy 相同遺伝子のエンハンサー領域の解析

ゼブラフィッシュ hairy 相同遺伝子座を含む BAC を用いて、hairy 相同遺伝子のコード領域をレポーター遺伝子 GFP に置換したものを recombinase を加温誘導できる SW102 大腸菌内で相同組換え法により作製した。改変した BAC を受精直後のゼブラフィッシュ胚に注入し、体節形成期における GFP シグナルを観察することにより、hairy 相同遺伝子のエンハンサー候補領域を探索した。まず始めに hairy 相同遺伝子座を含む 106 kb の改変 BAC を導入した結果、内在の hairy 相同遺伝子の発現領域である未分節中胚葉と尾芽に GFP の蛍光シグナルがみられ、この BAC 領域内に hairy 相同遺伝子のエンハンサーが存在することが示唆された (図 2)。その後、改変した様々な BAC をゼブラフィッシュ胚にインジェクションした結果、hairy 相同遺伝子座の下流領域にその候補を絞り込んだ。さらに hairy 相同遺伝子下流領域を細分化し、レポーター遺伝子と共導入実験を行った結果、hairy 相同遺伝子座の下流に存在する約 150bp の DNA 領域に、hairy 相同遺伝子の発現領域である未分節中胚葉および尾芽への発現を誘導する活性が見出された。

そこで活性をみられた約 150bp の領域に結合可能な転写因子をデータベースで検索した結果、FGF シグナルの下流で働く Ets 転写因子の結合配列が 3 つと、T-box 型転写

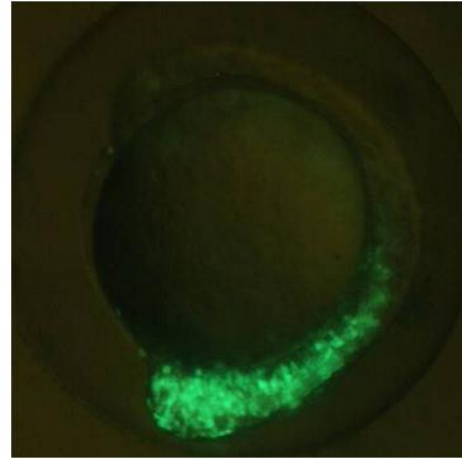


図2. 改変したBACを注入したゼブラフィッシュ胚。13体節期、側面図。GFPシグナルが未分節中胚葉および尾芽で確認された。

因子の結合配列が 2 つ近接して向き合う形で存在することが見出された。このような領域が、他の脊椎動物においても存在するかをゲノムデータベースを検索した結果、興味深いことに hairy 相同遺伝子の発現が未分節中胚葉と尾芽でみられるメダカ、アメリカカメレオンにおいてはゼブラフィッシュと同様に、2 つの T-box 型転写因子の結合配列が近接して向き合い、その周辺に Ets 転写因子の結合配列が複数存在する構造が見出されるのに対して、hairy 相同遺伝子の発現が未分節中胚葉で検出されないマウスでは、そのような配列は見出されることが分かった。以上の結果から、hairy 相同遺伝子座下流に存在する、2 つの T-box 型転写因子の結合配列が近接して向き合い、その周辺に Ets 転写因子の結合配列が複数存在する構造の有無が、脊椎動物種間での hairy 相同遺伝子の未分節中胚葉と尾芽における発現の差に寄与する可能性が予想された。予想された結合配列に置換した結果、そのエンハンサー活性が有意に減少することから、その結合因子および結合配列が、このエンハンサー活性に重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、この領域に予想された転写因子が結合するかを Electrophoretic Mobility Shift Assay により調べた結果、in vitro の条件下で特異的に結

合することが確かめられた。現在、この領域に結合する転写因子とその作用機構についてさらなる解析を行っている。

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4件)

① Khan, A., Nakamoto, A., Okamoto, S., Tai, M., Nakayama, Y., Kobayashi, K., Kawamura, A., Takeda, H., Yamasu, K. Pou2, a class V POU-type transcription factor in zebrafish, regulates dorsoventral patterning and convergent extension movement at different blastula stages. *Mechanisms of Development* 129, 219-235 (2012)

② Khan, A., Nakamoto, A., Tai, M., Saito S., Nakayama, Y., Kawamura, A., Takeda, H., Yamasu, K. Mesendoderm specification depends on the function of Pou2, the class V POU-type transcription factor, during zebrafish embryogenesis. *Development, Growth and Differentiation* 54(7): 686-701 (2012)

③ Okubo, T., Kawamura, A., Takahashi, J., Yagi, H., Morishima, M., Matsuoka, R., Takada S. Ripply3, a Tbx1 repressor, is required for development of pharyngeal apparatus and its derivatives in mice. *Development* 138: 339-348 (2011)

④ Ota, S., Tonou-Fujimori, N., Nakayama, Y., Ito, Y., Kawamura, A., Yamasu, K. FGF receptor gene expression and its regulation by FGF signaling during early zebrafish development. *Genesis* 48: 707-716 (2010)

[学会発表] (計1件)

① 大久保直, 八木寿人, 川村哲規, 高橋潤, 森島正恵, 松岡瑠美子, 高田慎治
Tbx1 の抑制因子 Ripply3 は Pax9 の転写を抑制し咽頭弓の発生を制御する. 日本分子生物学会年会, 神戸, 2010/12/14

[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]

ホームページ等

埼玉大学大学院生体制御学コース HP:
<http://seitai.saitama-u.ac.jp/index.html>

生体制御学コース発生生物学研究室 HP:
<http://devbiol.seitai.saitama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川村 哲規 (KAWAMURA AKINORI)
埼玉大学・大学院理工学研究科・講師
研究者番号: 10466691