

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：20770188
 研究課題名 (和文) 咽頭弓内胚葉由来の器官形成における新規転写抑制共役因子の機能解析
 研究課題名 (英文) Functional analysis of a novel transcriptional co-repressor in the development of pharyngeal arch derived organs
 研究代表者
 大久保 直 (OKUBO TADASHI)
 大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設) 岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教
 研究者番号：10450719

研究成果の概要 (和文)：脊椎動物の発生過程で一過的に現れる咽頭弓は、ダイナミックな分節構造を持つ組織で、そこから様々な器官や組織が派生する。本研究で、新規遺伝子 *Ripply3* が、マウス胎生期の咽頭弓に強く発現することを見いだした。また *Ripply3* は、咽頭弓で発現する転写因子 *Tbx1* の転写活性を抑制することがわかった。*Ripply3* ノックアウトマウス胚では、第 3、4 咽頭弓が形成不全となり、そこから派生する内胚葉性器官である胸腺、副甲状腺、鰓後体の異常、および大動脈弓や心臓流出路の形成異常が観察された。これらの結果から、*Ripply3* が咽頭弓とその派生器官の形成に必須であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The pharyngeal arches (PAs) are transient segmental structures appear in the vertebrate embryos, which are important for the development of particular organs. In this study, I found a novel gene, *Ripply3* is strongly expressed in the PAs, and represses the transcriptional activity of *Tbx1*. Analysis of *Ripply3* knock-out mouse revealed that *Ripply3* is essential for the development of PAs, the derivative organs such as thymus, parathyroid gland, and cardiovascular system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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・生物科学 細目：発生生物学

キーワード：咽頭弓、転写制御、*Tbx1*、*Ripply3*、胸腺、副甲状腺、心血管系、

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の体には、様々な分節構造がみられる。そのうち、最も顕著なものが、脊椎骨で、この構造は胎児期に形成される体節の繰り返し構造に由来する。体節の数は、種によって異なり、ゼブラフィッシュでは約30個、マウスでは約60個、ヒトでは約40個分節が形成される。体節は、尾部に存在する未分節中胚葉が、周期的にくびれ切れることで、その分節境界が形成される。

我々の研究室において、以前ゼブラフィッシュを用いた *in situ* スクリーニングにより新規遺伝子ファミリー **Ripply** が発見された (Kawamura et al. 2005)。そのうち、**Ripply1** および **2** は、ゼブラフィッシュやマウスの未分節中胚葉に発現し、体節の適切な分節化や前後極性の維持に関与していることが明らかになってきた (Kawamura et al. 2005, 2008, Morimoto et al. 2007, Takahashi et al. 2010)。

脊椎動物には他にも胎児期に一過的に現れる分節構造が存在する。それが咽頭弓で、種によって異なるが、前側から順に5-7対形成される。魚類では、咽頭弓はその後、鰓裂へと分化するが、他の脊椎動物では、咽頭分節は発生過程でその分節構造は消え、様々な器官へと分化を遂げる。驚いたことに、我々の予備的な実験から、**Ripply** ファミリーのなかで、**Ripply3** がマウス胚の咽頭弓で強く発現していることを見出した。**Ripply3** 遺伝子は、すでにヒトで **Down Syndrome Critical Region 6 (DSCR6)** という遺伝子として報告されていたが (Shibuya et al. 2000)、その時点では、詳細な発現部位や生体における機能に関しては全く分かっていなかった。我々の予備実験から、**Ripply3(DSCR6)** が咽頭弓の形成に関与するのではないかということが示唆された。

また、**Ripply** ファミリー遺伝子の重要な機能として、**Tbox** 型転写因子の転写活性を抑制する働きをもつ転写共役因子であることが示唆されている (Kawamura et al. 2008)。実際、ゼブラフィッシュ **Ripply1** は **Tbx24** の標的遺伝子である **Mesp-b** の転写活性を **Groucho** を介して量依存的に抑制することが分かっている。従って、**Ripply3** についても咽頭弓の発生過程で何らかの転写共役抑制因子としての機能があると予想された。

2. 研究の目的

そこで本研究では、まずマウス胚における **Ripply3** の発現パターンを詳細に把握する。**Ripply3** と共発現する **Tbox** 型転写因子を同定する。その **Tbox** 因子の転写活性に及ぼす

Ripply3 の影響を調べる。**Ripply3** の生体内での機能を明らかにするためノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析する。**Ripply3** によって制御される下流遺伝子を同定する。その下流遺伝子のプロモーター領域の解析を行う。

3. 研究の方法

Ripply3 及び他のマーカー遺伝子の発現を *in situ* hybridization 法や免疫染色により調べた。

Ripply3 の生体内での機能を知るため、遺伝子欠損マウスを作製した **Ripply3** 遺伝子座に **IRES-LacZ-PGK-Neo** カセットを挿入した。ターゲティングした **ES** 細胞を樹立し、そこからキメラマウスを作製し、**germline transmission** を確認した。**Ripply3^{+/-}** マウスは正常に発生し、通常の性職能力を有した。ヘテロ同士を掛け合わせ、**Ripply3^{-/-}** マウスを作出した。各遺伝子型は **PCR** により確認した。子孫の遺伝子型はメンデル比に従った。

Ripply3 の **Tbx1** に対する転写活性の影響をルシフェラーゼアッセイにより調べた。レポーターとして2つの **Tbox** 認識配列を **pGL3-promoter** に挿入したベクターを用いた。**pcDNA3.1 (+)** 発現ベクターのマルチクローニングサイトに **mTbx1 cDNA**, **mRipply3 cDNA** をそれぞれ挿入したものを用いた。

4. 研究成果

マウス胚において、**Ripply3** は **E8.0** 日ころの第1咽頭弓予定領域の外胚葉で発現が開始された。そして、その後、**Ripply3** の発現は、徐々に後方へシフトし、新しく形成されつつある咽頭弓の咽頭嚢 (内胚葉性の上皮) とそれに隣接する外胚葉上皮で発現が強くなることがわかった (**E9.0-10.0** 日)、そして、**E10.5-11.0** 日には、第4咽頭弓の咽頭嚢に発現が局在し、その後発現は急激に低下することが明らかとなった。

咽頭弓領域で発現する **Tbox** 型転写因子として、**Tbx1** が挙げられる。**Tbx1** は、咽頭弓において、神経堤細胞を除くほぼ全ての細胞系譜で発現が見られるが、特に内胚葉と外胚葉で **Ripply3** と **Tbx1** の発現が重なることが分かった。

Ripply3 が **Tbx1** の転写活性にどのような影響を及ぼすか調べるために、培養細胞 (**COS7**) を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。レポーターとして2つの **Tbox** 認識配列と最小プロモーターの後ろにルシフェラーゼをつないだ **2xTbox** レポータープラスミドを使用した。その結果、**Ripply3** は **Tbx1** の転写活性を量依存的に抑制すること

が分かった。また、Ripply3のN末端側に存在するWRPWモチーフを欠損させた場合、その抑制活性が顕著に弱くなった。従って、Ripply3のWRPWモチーフはTbx1の転写活性を効率的に抑制するのに必須であることが分かった。WRPWは、他のRipply遺伝子にも共通して存在し、転写抑制因子Groucho/TLEとの結合に必要なモチーフだと考えられる。次に、Tbx1とRipply3が相互作用するかどうか調べるため、COS7に共発現させ、その後免疫沈降実験を行ったところ、両者は直接的に相互作用することが示唆された。

Ripply3が生体内でどのような役割を果たしているか知るために、Ripply3^{-/-}マウスの解析を行った。Ripply3^{-/-}マウスは生後すぐにチアノーゼにより致死となることがわかった。次に、Ripply3^{-/-}マウスの詳細な表現型を観察するため、各発生段階の胚体を形態学的に調べた。その結果、E9.0-10.0日頃に第3, 4咽頭弓の形成不全がみられた。第1, 2, 6咽頭弓は正常に発生していた。

通常、後方の第3, 4咽頭嚢からは胸腺や副甲状腺、鰓後体(Ca恒常性に関わる器官)が派生する。その発生プロセスは独特で、各咽頭嚢で生じた胸腺や副甲状腺、鰓後体の原器は、その後内胚葉上皮から切り離されて、成長しながら後方へ移動し、それぞれ適切な場所へ定着し成熟する。しかしRipply3^{-/-}変異体では、それら臓器自体は形成されるものの、後方へは移動せず、異所的に咽頭部に残ってしまうことが分かった。この結果は、Ripply3が臓器の内胚葉上皮からの切り離しに何らかに関与することを示唆している。これまで内胚葉上皮からの臓器分離メカニズムは全く分かっていないので、Ripply3^{-/-}胚のさらなる解析は、胸腺や副甲状腺の形成機構の解明につながると考えられる。

また、第3, 4咽頭弓は心臓血管系の形成に重要である。実際第3, 4咽頭弓は咽頭動脈が走行し、将来的に頸動脈や鎖骨下動脈を形成する。また心臓流出路の形成を担う心臓神経堤細胞の遊走にも関与する重要な場である。そこで、心臓血管系の形成過程について詳細に解析した。インク色素の注入や血管マーカー、神経堤細胞のマーカーで染めると、Ripply3^{-/-}胚では第3, 4咽頭動脈の走行と心臓神経堤細胞の遊走が完全に遮断されていた。その後、Ripply3^{-/-}胚では、背側大動脈と心臓流出路を結ぶ咽頭動脈のリモデリングが正常に起こらず、適切な大動脈弓が形成されなかった。また心臓流出路を形成する心臓神経堤細胞が十分遊走していないことから、心臓血管系に重篤な異常が観察された。特に、大動脈の流出路は極めて細く、心室中隔壁欠損も伴っていた。従って、それらが複合要因となってRipply3^{-/-}新生仔はチアノー

ゼにより致死となると予想された。

Tbx1とRipply3の遺伝学的相互作用や上下関係を理解する目的で、Tbx1/Ripply3両遺伝子のダブルノックアウト(DKO)胚を作製し、その表現型を観察した。その結果、DKO胚は、Tbx1単独ノックアウトと同様の表現型を示したことから、Tbx1はRipply3に対して、上位に作用することが分かった。

さらに、Tbx1とRipply3によって制御される下流遺伝子の探索を行った。これまで、Tbx1変異体を用いてTbx1遺伝子の下流遺伝子の候補が報告されている(Ivins et al. 2005)。そのうち、Ripply3^{-/-}胚において、発現が変化している(特に発現が上昇している)遺伝子をin situ hybridizationによりスクリーニングした。少なくとも、これまで知られているTbx1の下流遺伝子Fgf8やFgf3はその発現に大きな差は見られなかった。一方、咽頭弓内胚葉で発現するPax9が、Ripply3^{-/-}胚の咽頭弓で顕著に上昇していることがわかった。そこで、マウスPax9のプロモーター領域を含む約3.7kbのDNA断片をpGL3-basicレポーターベクターに挿入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、Pax9プロモーターはTbx1によって転写が活性化された。また、そこにTbx1とRipply3を共発現させると、Pax9プロモーターの活性は顕著に抑制された。この抑制活性は、Ripply3のWRPWモチーフに依存することも確認された。

以上の結果から、Ripply3は、マウスの咽頭弓の内胚葉と外胚葉に発現し、特に後方の第3, 4咽頭弓の形成に必須であることが示唆された。また、Ripply3は、咽頭弓から派生する胸腺や副甲状腺の発生を制御するとともに、間接的に咽頭動脈の走行や心臓神経堤細胞の遊走を制御することが示唆された。さらに、咽頭弓内胚葉で発現するPax9はTbx1の新たな下流遺伝子として同定され、そのプロモーターに対するTbx1の転写活性をRipply3は抑制することによって、Pax9の適切な発現レベル調節に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計2件)

① Tadashi Okubo, Akinori Kawamura, Jun Takahashi, Shinji Takada
Ripply3, A Negative Regulator of Tbx1, is Required for the Development of Pharyngeal Apparatus and Cardiovascular System.

RIKEN CDB Symposium, Frontiers in organogenesis. ポスター発表、
2010年3月23日 神戸

② Tadashi Okubo, Hisato Yagi, Akinori Kawamura, Jun Takahashi, Masae Morishima, Kunitaka Joo, Yoshiki Mori, Kazuo Momma, Toshio Nakanishi, Rumiko Matsuoka, Shinji Takada

Ripply3-mediated restricted modulation of Tbx1 activity in the development of pharyngeal arches, thymus, parathyroid gland, and cardiovascular system.

第32回 日本分子生物学会年会 ワークショップ・心臓大血管形成における器官形成メカニズムの普遍性と独自性、 口頭発表、
2009年12月9日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大久保 直 (OKUBO TADASHI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構

(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイ

イエンスセンター・助教

研究者番号：10450719