

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770268

研究課題名(和文) 咽頭弓分節化に伴い周期的に発現変動する遺伝子の分子計時機構解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of the periodic expression of Ripply3 during pharyngeal arch segmentation

研究代表者

大久保 直 (Okubo, Tadashi)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：10450719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の胎児期に現れる咽頭弓は、発生に伴い頭側から尾部側へ順次分節が進行する。マウスのRipply3遺伝子は、まず咽頭弓の分節化予定域で強く発現し、分節化が完了すると減弱し、次の分節化予定域で再び発現が強まるという特徴的な周期性を示す。本研究は、咽頭弓分節にともなうRipply3の周期的発現変化を生み出す分子機構の解明を試みた。In vivo及びin vitro解析の結果、Ripply3遺伝子のプロモーター活性はTbx1により活性化し、逆にRipply3により抑制された。これらの結果は、Ripply3の周期的な発現が自身のネガティブフィードバックにより調節されている可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Pharyngeal arch (PA) is a transient segmental structure appears in the anterior part of vertebrate embryos. Appropriate PA segmentation is required for the normal organogenesis such as heart, thymus, and others at later stages. We recently identified the Ripply3 gene that is highly expressed in the developing PA. Interestingly, the prominent expression emerges in the unsegmented PA region first, and then it decreases as PA segmentation proceeds. Thus, Ripply3 expression shifts periodically from anterior to posterior. To elucidate the molecular mechanism of the unique expression of Ripply3 during PA segmentation, we generated the EGFP reporter transgenic mouse driven by Ripply3 promoter. The EGFP expression recapitulated the endogenous expression pattern of Ripply3. Furthermore, the promoter is activated by Tbx1, and repressed by Ripply3 itself in vitro. These studies revealed that Tbx1 and Ripply3 have important roles for the periodic expression of Ripply3.

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：咽頭弓分節 転写制御 Tbx1 Ripply3

1. 研究開始当初の背景

咽頭弓は、脊椎動物の胎児期に一時的に咽頭部に現れる分節構造で、その分節パターンが適時正常に形成されることが、頭頸部や心大血管系や胸腺など様々な器官形成に重要であると考えられている。

マウスの咽頭弓は前側から順に5対分節し、第1～3咽頭弓は主に顎や舌を形成する。また、各咽頭弓には、鰓弓動脈が走行するだけでなく、神経堤細胞の移動ルートにもなっている。ところが、咽頭弓の分節パターンに異常が生ずると、様々な臓器形成に影響し、先天性疾患として発症する。しかし、その発症機構はまだ十分解明されていない。それゆえ、咽頭弓の正常な分節形成のメカニズムを解明することは、先天性異常の原因究明に大きく貢献すると考えられる。

2. 研究の目的

これまでに、我々はマウスの咽頭弓に特異的に強く発現するRipply3遺伝子に注目して研究を行ってきた。Ripply3を欠損するマウスは、第3-4咽頭弓形成に異常がおこり、その後咽頭弓から派生する心臓流出路や胸腺、副甲状腺の形成にも大きな影響を及ぼし、新生仔致死となる。これまでに、Ripply3は、Tbox型転写因子Tbx1の新規の転写調節因子であることが示唆されている。

本研究では、咽頭弓の分節化に伴い周期的に発現のON/OFFを繰り返すRipply3の発現制御に注目し、新たなモデルとしての分子計時機構を解明する目的で、以下の研究を行った。

周期的な発現のON/OFFを繰り返すRipply3遺伝子の発現に参与する制御領域を同定する。また、それをin vivoで可視化するためのレポーターマウスを作製する。

Ripply3の発現を制御する上流因子としてTbx1および他の転写因子の作用機序を解明する。

以上、咽頭弓分節をRipply3遺伝子の上流因子の制御ネットワークの解析を通して、咽頭弓分節の周期性の実体を明らかにする。この研究は、体節の分節化とは異なる新たな分子計時機構の解明に繋がると考えられる。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6J マウスの BAC クローンから、Ripply3 遺伝子上流領域を単離し、cre と EGFP の融合遺伝子につなぎ、トランスジェニックマウス(pRipply3-creEGFP Tg マウス)を作製した。そのマウスから各ステージの胎仔を取り出し、咽頭領域の EGFP 蛍光の発現変化を時空間的に観察した。

(2) 上記プロモーター配列をルシフェラーゼレポーターにつなぎ、培養細胞(COS7)を用い

てRipply3プロモーターに対する各転写因子の作用を検討した。また、プロモーター配列の欠失型を作製し、制御領域の絞り込みを行った。

(3) Ripply3 KO マウスとEGFP レポーター-Tg マウスとの複合変異マウスを作製し、各遺伝型においてEGFPの発現がどのように影響を受けるか検討した。

(4) Ripply3 KO マウスに既に Knock-in されている LacZ レポーター遺伝子の発現についてヘテロ型のホモ型で比較した。

4. 研究成果

(1) Ripply3-creEGFP Tg マウスの樹立

Ripply3 は、内胚葉および外胚葉で咽頭弓を挟むように発現し、後方へ周期的にシフトすることから、Ripply3 発現細胞を可視化することが重要だと考えられた。そこで、マウス Ripply3 遺伝子のプロモーター配列に creEGFP 融合遺伝子をつないだトランスジェニックマウス(pRipply3-creEGFP)を作製した。6系統のEGFPを発現するfounderを解析し、内在性Ripply3の発現パターンを模倣するような2系統を選別し、トランスジェニックマウスとしてライン化した(図1)。

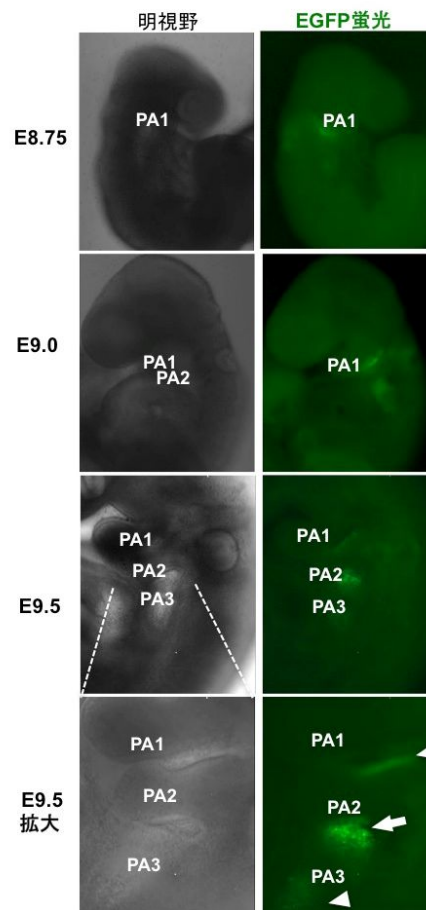


図1. Ripply3-creEGFP Tg マウス胚 (矢印:EGFP 発現が高い、矢頭:発現が低い)

EGFP の発現は、胎生 8.5 日頃に第 1 咽頭弓の分節予定領域にまず高発現が観察され、その後は咽頭弓分節が完了するまで発現するが、次第に弱まり、次の第 2 咽頭弓分節予定領域で EGFP の発現が上昇してきた。このように EGFP の発現は、咽頭弓分節にともない、発現の上昇と低下が第 4 咽頭弓が形成されるころまで、周期的に観察されることが明らかとなった (図 1)。

(2) 培養細胞を用いた Ripply3 プロモーター活性の解析

Ripply3 プロモーターをルシフェラーゼにつなぎ替え COS7 細胞を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、Ripply3 プロモーターは、Tbx1 のトランスフェクションにより量依存的に活性化した。一方、Tbx1 の転写活性は Ripply3 を共発現させると、量依的に抑制した。これらの結果から、Ripply3 の発現は、Tbx1 により活性化され、Ripply3 自身により抑制されるネガティブフィードバック機構によって調節されている可能性が示唆された。

さらに、プロモーター配列中に Tbox 結合配列と推察される配列が存在した。そこで、それらの配列を含む領域の欠失型を作製し解析したが、今のところ、どの Tbox 結合配列が重要であるか絞り込むところまでは至っていない。

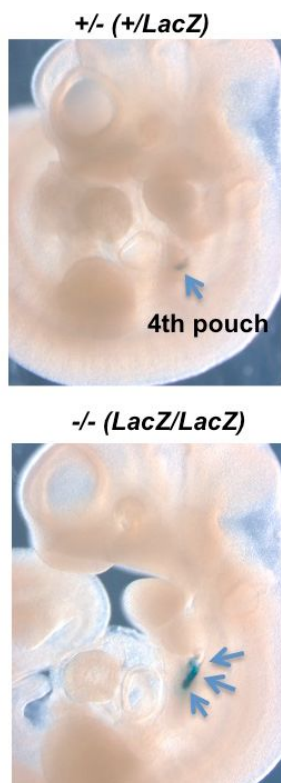


図 2 . 胎生 10.5 日の Ripply3 KO マウス胚の LacZ 染色。(矢印は LacZ 発現領域を示す。ホモ型では広がっている)

(3) Ripply3 欠損マウス胚における EGFP レポーターの活性化

Ripply3 KO マウスと EGFP レポーター-Tg マウスの複合変異体を作製し in vivo での EGFP 発現に対する影響を解析した。その結果、Ripply3 ヘテロ型や野生型に比べ、ホモ型では EGFP の発現が顕著に活性化し、発現領域もスリット状にはみえず、より後方の咽頭弓領域まで連続的に広がって発現していた。これらの結果は、in vivo においても Ripply3 プロモーターが自身のネガティブフィードバック機構により制御されている可能性を示唆した。

(4) LacZ レポーターの観察

Ripply3 KO マウスにおいて EGFP レポーターが顕著に活性化していたのと一致するように、Knock-in されている LacZ レポーターの発現も、ヘテロ型に比べ咽頭領域に強く発現し (図 2) 特に関節葉上皮では LacZ が顕著に後方まで広がって発現していた。

以上の結果から、Ripply3 の発現が咽頭弓の分節化の開始と完了に呼応するように周期的に ON/OFF を繰り返しながら後方へシフトしていく分子機構の一端として、Tbx1 による活性化と Ripply3 自身によるネガティブフィードバック機構が関与している可能性が示唆された。今後は、他の転写因子やレチノイン酸などのシグナル分子の影響も解析し、周期的な発現制御を詳細に解明したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

大久保直、高田慎治

「咽頭弓からの胸腺の形成と先天性異常の発症機構」 生化学 2012 年 84 巻 p168-176 (査読 無)

大久保直「細胞系譜解析からみた舌・軟口蓋上皮の幹細胞システム」 日本味と匂い学会誌 2011 年 18 巻 p29-35 (査読 無)

〔学会発表〕(計 5 件)

Okubo T, Takada S.: Glossopharyngeal nerve deficiency in Ripply3 mutant causes the failure of taste bud differentiation in posterior tongue. 第 36 回 日本分子生物学会 2013 年 12 月 4 日 神戸 ポスター発表

Okubo T, Takada S.: Role of the pharyngeal arch as an infrastructure of cranial nerve projection. 第 35 回 日本分子生物学会 2012 年 12 月 12 日 福岡 ポスター発表

Okubo T, Takada S.: Role of the pharyngeal arch as an infrastructure of cranial nerve projection. International Symposium Neuro-Vascular Wiring. 2012年11月12日~13日 Nara, Japan ポスター発表

Okubo T, Takada S.: Role of the pharyngeal arch as an infrastructure of cranial nerve projection for the development of taste buds in the posterior tongue. 第45回日本発生生物学会 2012年5月30日 神戸 ポスター発表

大久保直: 先天性多臓器異常に關与する新規転写調節因子Ripply3. 第24回北里大学バイオサイエンスフォーラム 相模原、北里大学 2011年8月24日 口頭発表

〔図書〕(計 1件)

Okubo T. (2014) Tbx1/Ripply3/Retinoic acid signal network that regulates pharyngeal arch development. Chapter 8. p97-108. New Principles in Developmental Processes (Springer)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大久保 直 (TADASHI OKUBO)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号: 10450719