

平成21年 5月 18日現在

研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2006-2008
 課題番号： 18770191
 研究課題名（和文）転写調節領域の構造的多様性からみた遺伝子発現機構の機能的進化の研究

研究課題名（英文）An evolutionary study on the transcriptional regulation mechanism in the context of the structural evolution of cis-regulatory region

研究代表者

美濃川 拓哉（MINOKAWA TAKUYA）
 東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
 研究者番号：60400305

研究成果の概要：

進化の原因の一つとして、発生調節遺伝子の発現調節メカニズムの変化が重要視されている。本研究では発生調節遺伝子 *wnt8* の転写制御領域に注目し、その構造と機能の進化の関係を解明することをめざした。研究の結果、①特殊な発生をするウニと典型的な発生をするウニの間で *wnt8* 遺伝子の発現パターンが異なること、②発現パターンの違いにもかかわらず、それぞれの遺伝子の転写調節領域は基本的に同じ機能を保持していること、③転写調節領域そのものの構造的変化よりも、この領域と相互作用する転写調節因子に起きた変化が遺伝子発現パターンの進化の過程で重要であった可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	240,000	3,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生物学

キーワード：進化発生、転写調節、ウニ

1. 研究開始当初の背景

生物の進化過程で重要な役割を果たした要因の一つとして、個体発生を司る発生調節遺伝子の役割の変化が注目されている。近年の進化発生学の成果は、発生調節遺伝子の発現調節メカニズムの変化が、生物の形態・生活史の進化プロセスで重要な役割を果たしたことを強く示唆している。たとえばウニの幼生骨片形成間充細胞の特異化過程に関与する発生調節遺伝子の多くは、幼生骨片を

もたないヒトデの胚発生過程では非骨片形成性間充細胞や内胚葉の発生に関与している。ウニとヒトデの間充細胞特異化にかかわる発生調節遺伝子群についての研究は、新規の形態や細胞タイプの進化には既存の発生調節遺伝子の発現場所や発現時期の変化が重要であることを示唆している。

発生調節遺伝子の発現場所と時期を決定するのは①転写調節領域と②そこに相互作用する転写因子群であり、進化機構解明を個

体発生学の方向からおこなうためには転写調節メカニズムの進化についての研究が極めて重要な意味を持つ。

このような状況のもと、発生調節遺伝子の発現調節メカニズムの進化に注目した研究が各地で始まりつつあった。申請者らは本研究申請当時、ホンウニ類の一種、アメリカムラサキウニの *wnt8* 遺伝子 (*Spwnt8*) の発現調節メカニズムを研究していた。我々の研究から *Spwnt8* の時間的・空間的発現は *wnt8* コード領域近傍にある複数の領域 (モジュール) によってコントロールされていることが明らかになった。これらのモジュールは、どれも異なった転写調節能力をもっていた。そのうちの一つであるモジュール A は初期卵割期から胚期にかけて、*wnt8* の空間的・時間的転写をコントロールする領域として同定された。

モジュール A は転写開始点より約 500bp 上流までの領域に相当する。先行研究から *Spwnt8* の発現を調節する転写因子として TCF が関与することが示唆されていたが、このモジュール A 内には予想通り複数の TCF 結合配列が存在し、この TCF 結合配列が *Spwnt8* の正確な時間的・空間的発現調節に極めて重要であることを申請者らは見出した。さらにモジュール A 内には TCF 結合配列以外にも未知の転写調節エレメントが存在することも示唆された。

先行研究と申請者らによる研究の結果を総合すると、モジュール A が長い進化の過程でもその構造と機能を高く保持している可能性が強く示唆されていたが、モジュール A の機能の進化についての研究は当時おこなわれていなかった。

本研究開始以前には、モジュール A の構造と機能はウニ類のなかでも比較的最近に進化したホンウニ類でしか調べられていなかった。約 2 億年前にウニ類の多様化がはじまったが、このときにホンウニ類と分岐したグループにカシパン類がある。カシパン類は砂泥底生活に適応した特殊な形態のウニ類である。申請者はこのカシパン類とホンウニ類の間で転写調節領域の構造と機能を比較すれば、現生ウニ類の大規模な放散が起こった約 2 億年前から現在までにおこった転写調節領域の構造的・機能的進化を解明できると考えた。

2. 研究の目的

生物の進化過程で重要な役割を果たした要因の一つと考えられている発生調節遺伝子の発現調節メカニズムについて、転写制御領域の構造的変化が転写調節能力の進化にどのようにつながったかを解明する。本研究では、ウニ類の内中胚葉形成メカニズムのキ

一遺伝子のひとつである *wnt8* 遺伝子の転写調節領域 (モジュール A) をモデル系として採用し、このモジュール A の構造と機能を、様々な遺伝距離にある種間で比較する。注目するのは①約 2 億年前に分岐したホンウニとカシパン類、②約 5 千万年前に分岐した比較的近縁なカシパン類 2 種などである。様々な種から得たモジュール A の構造と機能の比較解析をおこない、個体発生で重要な役割を果たす遺伝子発現調節領域 (シスエレメント) が長い進化過程でどのような構造的・機能的多様性を獲得したのかをあきらかにする。

3. 研究の方法

本研究ではさまざまなウニ類から *wnt8* 遺伝子のモジュール A を単離する必要がある。しかしこれまでに *wnt8* 遺伝子のクローニングがなされたウニ類はホンウニ 2 種類 (ともにアメリカ産) であり、本邦産のウニの *wnt8* 遺伝子のクローニングは行われていなかった。そこで本研究の最初のステップとして、間接発生型ホンウニ (バフンウニ)、間接発生型カシパン (ハスノハカシパン)、直接発生型カシパン (ヨツアナカシパン)、間接発生型ブンブク (オカメブンブク) の 4 種類の本邦産ウニから *wnt8* 遺伝子をクローニングした。これらの *wnt8* 遺伝子の mRNA 発現パターンは whole mount *in situ* hybridization (WMISH) で検討した。

モジュール A 相同領域の単離は Genome Walking 法によって行った。本法によって転写開始点より 5' 上流のゲノム DNA (約 1 kb 程度) を単離し、塩基配列決定をおこなった。この領域にモジュール A の相同領域が含まれる。

モジュール A の塩基配列解析と機能ドメイン推定にはカリフォルニア工科大学の Brown と Davidson によって開発された塩基配列解析ソフトウェア FamilyRelations を用いた。

FR 解析の結果、推定された機能ドメインの実際の転写調節機能を解明するために、CAT リポーター遺伝子発現コンストラクトを用いた発現解析実験をおこなった。市販の CAT リポーター遺伝子を含むプラスミド (プロメガ社 pCAT) のマルチクローニングサイトにさまざまなウニから単離したモジュール A 配列を挿入し、このプラスミドから作成した直鎖 DNA を顕微注入法でウニ胚に導入した。CAT 遺伝子の転写は WMISH 法で同定した。

4. 研究成果

研究の第一段階として、本邦産ウニ類の *wnt8* 相同遺伝子のクローニングおよび発現パターン解析を行った。その結果、間接発生型ウニであるバフンウニの *wnt8* の発現パタ

ーンはアメリカ産の近縁種アメリカムラサキウニのそれとほぼ同じだった（未発表）。同様に、間接発生型カシパンであるハスノハカシパンの *wnt8* も、その発現パターンは間接発生型ホンウニの *wnt8* と極めて類似していた（論文1）。

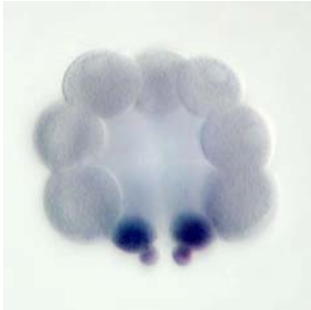


図1：ハスノハカシパン *wnt8* 遺伝子の28細胞期における発現パターン

一方、直接発生型カシパンであるヨツアナカシパンの *wnt8* の発現パターンは間接発生型ウニ・カシパンのそれとは重大な違いがあった。ヨツアナカシパンの *wnt8* の転写開始は64細胞期に小割球子孫細胞ではじまった。

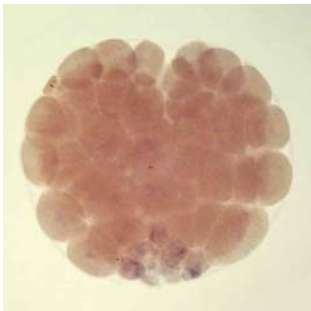


図2：ヨツアナカシパン *wnt8* 遺伝子の64細胞期における発現パターン

間接発生型ウニ・カシパンの *wnt8* の転写は小割球子孫細胞で始まるものの、そのタイミングは16細胞期であった。すなわち、直接発生型発生様式の進化の過程で、*wnt8* の転写開始のタイミングが約2細胞周期分遅れた可能性が示唆された（論文1）。この転写開始のタイミングの変化は転写調節メカニズムにおける進化的変化を反映している可能性がある。この予想外の発見をふまえ、以後の研究では、当初の目的であった2億年前に分岐したウニとカシパンにおけるモジュールAの進化に加え、直接発生型カシパンと間接発生型カシパンにおけるモジュールAの進化も研究対象とした。

約2億年前に共通祖先から分岐した2種の間接発生型ウニ（バフンウニとハスノハカシパン）のモジュールA相同領域の塩基配列の比較の結果、大規模な塩基の置換が起こっていることがわかった。この両者に共通する塩基配列があれば、それは2種の祖先ウニに既に存在し、現在まで保存されている重要な機能エレメントの候補であろう。さまざまな基準で類似配列を検索した結果、現在までに、

約10個程度の類似領域を発見した。しかし、その大部分を欠損した発現コンストラクトでも、空間的・時間的転写調節能力には影響が見られなかった。このことから、これらのエレメントは空間的・時間的転写調節とは異なる機能を果たしていると考えている。可能性としては転写量の調節に関与している可能性があり、将来はリポーター遺伝子産物の定量実験によって、転写量調節についての検討を行う必要があるだろう。

一方、約5千万年前に分岐した直接発生カシパン：ヨツアナカシパンと間接発生カシパン：ハスノハカシパンのA領域の塩基配列比較から、驚くべき大規模な塩基置換の存在が明らかになった。その置換の程度は2億年前に分岐したウニ／カシパン間に見られるのと同程度だった。この大規模な塩基配列置換の原因解明は今後の課題である。

バフンウニ、ハスノハカシパン、ヨツアナカシパンのモジュールAに機能的な違いがあるかどうかを明らかにするため、それぞれのウニのモジュールAコンストラクトをそれぞれの種の胚に導入する実験をおこなった（同種間注入実験）。これらの実験から、以下の結果を得た。(1)3種のウニのうち間接発生型ウニ2種については、モジュールAが *wnt8* の時間的・空間的発現パターンをコントロールする機能をもっていた。(2)ヨツアナカシパンのモジュールAにも転写活性化能はあるが、時間的・空間的調節能力は不十分だった。

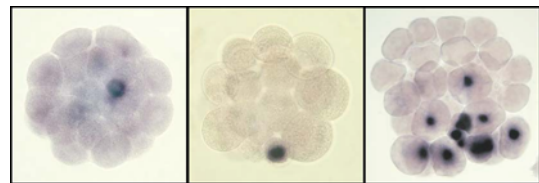


図3：3種のウニ類におけるモジュールAの転写調節能力。左2種は間接発生型ウニ類、右は直接発生カシパン。間接発生型ウニではCAT遺伝子は小割球で発現するが、直接発生型カシパンでは小割球以外の部分でも発現する。

次にある種の胚に別種由来のモジュールAコンストラクトを注入する実験をおこなった（異種間注入実験）。その結果、3種のウニのモジュールAは塩基配列がかなり異なっているにもかかわらず、間接発生型ウニ胚に導入した場合は、間接発生種の *wnt8* の時間的・空間的発現パターンを再現できた。一方、直接発生型ウニ胚中では3種のモジュールAは転写活性を示したが、空間的・時間的なコントロールが不正確だった。

一連の結果は2億年のウニ類の多様化の過程で、間接発生型種のモジュールAはその機

能をほとんど変化させずにいたことを示している。そしてその機能維持に重要なエレメントの候補として約 10 個の領域を同定することができた。一方、直接発生型発生様式の進化の過程では、モジュール A の果たす役割は大きく変わった。しかし、その機能の進化はモジュール A の構造の変化に由来するというよりは、むしろモジュール A と相互作用する転写因子群の変化に原因があるらしい。*wnt8* の早い転写開始時期を考慮すると、これらの転写因子群は母性因子として、あらかじめ未受精卵中に存在している可能性がある。モジュール A の転写活性とその進化についての研究は現在論文投稿準備中である。

本研究開始時には予想していなかったことだが、直接発生型カシパン：ヨツアナカシパンでは *wnt8* の発現のタイミングが間接発生型ウニ類とは大きく異なっていることが明らかになった。*wnt8* は細胞間シグナル分子をコードする遺伝子である。間接発生型ウニ類では *wnt8* は内中胚葉特異化の極めて初期に働くシグナルであり、16 細胞期の小割球で発現し、隣り合う大割球子孫細胞における内中胚葉特異化を促す。直接発生型カシパン：ヨツアナカシパンでは *wnt8* の発現のタイミングが遅れていることを考慮すると、ヨツアナカシパンの内中胚葉特異化メカニズム、特に小割球子孫細胞の発揮する誘導活性に大きな進化的変化がおこっている可能性が示唆される。そこで申請者とその共同研究グループはヨツアナカシパンの小割球が内中胚葉誘導能をもつかどうかを胚操作実験で検証した。その結果、ヨツアナカシパンの小割球には予想通り内中胚葉誘導能は無いことがわかった (論文 2)。このことはヨツアナカシパンの内中胚葉特異化メカニズムの進化には、*wnt8* の転写開始のタイミングが遅れることが極めて重要であった可能性を示唆している。直接発生カシパン：ヨツアナカシパンの特異な内中胚葉形成メカニズムの進化を理解する鍵は *wnt8* の転写調節を担う転写因子群の進化にあるかもしれない。

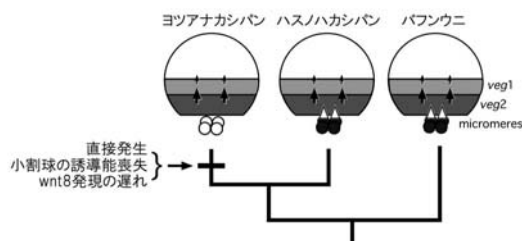


図 4: 直接発生型発生様式の進化、小割球誘導能の喪失、*wnt8* 遺伝子の発現タイミングの遅れの 3 現象はともにヨツアナカシパンの系統で生じた。

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 3 件)

① Hidewo Nakata and Takuya Minokawa (2009)

Expression patterns of *wnt8* orthologs in two sand dollar species. *Gene Expression Patterns*. **9**. 152-157. 査読有

② Minoru Iijima, Yasuhiro Ishizuka, Yoko Nakajima, Shonan Amemiya and Takuya Minokawa (2009)

Evolutionary modification of specification for the endomesoderm in the direct developing echinoid *Peronella japonica*: loss of the endomesoderm-inducing signal originating from micromeres. *Development, Genes and Evolution*. in press. DOI 10.1007/s00427-009-0286-8 査読有

③ 美濃川拓哉 (2007)

ゲノムからみたウニの特徴
遺伝 **61**. 2-3. 査読無

[学会発表] (計 1 件)

① 中田英男、美濃川拓哉

ヨツアナカシパン *wnt8* の発現パターンと転写調節領域の機能解析
日本動物学会第 78 回大会 (弘前) 2007 年 9 月 22 日

[図書] (計 1 件)

① 美濃川拓哉

ウニ学 (第 17 章: 遺伝子・ゲノムからみるウニの特徴) 369 頁~390 頁、東海大学出版会、2009 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美濃川 拓哉 (MINOKAWA TAKUYA)
東北大学・大学院生命科学研究所・准教授
研究者番号: 60400305

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし