

研究種目：若手（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770206
 研究課題名（和文） Notch シグナルによる Tbx6 依存的な Mesp2 発現制御機構の解明
 研究課題名（英文） Analyses of Tbx6 dependent, Notch-driven regulation of Mesp2 expression
 研究代表者
 安彦 行人（YASUHIKO YUKUTO）
 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官
 研究者番号：40370944

研究成果の概要：

体節形成遺伝子Mesp2およびその上流の因子に関する機能解析を行った。Mesp2発現制御領域のTbx6結合サイトに変異を加えたエンハンサーノックアウトマウスを作製し、当該Tbx6結合サイトの変異によりMesp2遺伝子が完全に発現及び機能を喪失することを確認した。また、良好な抗Tbx6抗体の作製に成功し、Tbx6はTbx6発現領域全域にわたってMesp2発現制御領域に結合していること、従ってMesp2の発現を前方傍軸中胚葉に局限させている他の因子が存在することを示唆する結果を得た。さらに、メダカにおけるMesp2類似遺伝子であるmespbの発現制御領域をMesp2上流にノックインしたマウスを作製し、体節形成が完全に正常に行われること、すなわちMesp遺伝子発現制御機構が進化的に高度に保存されていることを明らかにした。

これらの結果は原著論文としてDevelopment誌に発表した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	0	1,500,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000		3,300,000

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

1. 研究開始当初の背景

申請者は、体節形成の鍵となる転写因子Mesp2の発現制御機構を解析した結果、Tbx6がその発現に必須の因子であることを明らかにした。しかし、Mesp2は体節形成のサイ

クルごとに周期的に発現する遺伝子であるのに対し、Tbx6は周期的な発現を示さない。この矛盾に対して申請者は、周期的なNotchシグナルが、Tbx6が共存するときのみ、Mesp2の発現を活性化することを明らかにし

た (Yasuhiko *et al.*, PNAS 103:3651-3656, 2006)。

Notch シグナルについては、ショウジョウバエを用いた研究を中心に精力的な解析が進められてきているが、申請者が発見した Tbx6 依存的な Notch シグナルの作用機構は全く新規な知見であった。Mesp2 遺伝子の上流には Notch シグナルへの応答に必要な配列が含まれるが、Notch シグナルは単独では Mesp2 の発現を上昇させることができず、隣接した T-box 結合配列に Tbx6 が結合することを必要とする。Tbx6 は何らかの機構で、Mesp2 上流配列が Notch シグナルに反応することを「許可」する「門番」として働いていると考えられた。

2. 研究の目的

本申請期間の研究においては Tbx6 の「門番」としての働きを可能にする分子メカニズムを、申請者がすでに詳細に解析済みである Mesp2 発現制御配列をモデル系として解明することを目指した。また近年、Tbx6 が Wnt シグナルとも共同して下流遺伝子の制御を行うことを示唆する結果が報告されていることから、Tbx6 の胎生期における「門番」としての働きの普遍性の検討を進めることとした。

3. 研究の方法

(1) Mesp2 発現制御領域に存在する Tbx6 結合配列を破壊したノックアウトマウスを用い、クロマチン免疫沈降法により生体内での Tbx6 タンパク質結合が Mesp2 発現制御に必須であることを証明することを試みた。

(2) メダカで同定された Mesp 類似遺伝子の発現制御領域をマウス Mesp2 発現制御領域を置き換えるように導入したマウスを樹立し、Mesp 遺伝子の発現制御機構が生物種を超え

て普遍的なものであるかを検討した。

4. 研究成果

(1) マウス Tbx6 タンパク質に対する良好な抗体の作製に成功した。これを用いて Mesp2 発現制御領域に対するクロマチン免疫沈降の実験系を樹立した。実験の結果、Tbx6 結合配列を破壊したノックアウトマウス (Mesp2 発現を失っている) においても、Tbx6 はなお Mesp2 発現制御領域に結合しているという意外な事実が明らかとなった。

さらに解析したところ、Mesp2 発現制御領域には Mesp2 発現に必要なとはされない Tbx6 結合配列も存在することがわかった。この結果より、Mesp2 発現制御領域に結合した Tbx6 は無条件に Mesp2 発現を上昇させるわけではなく、結合配列自体、あるいは結合配列周辺の構造に一定の条件が必要であることが示唆された。これは、Tbx6 による発現制御機構 (上記の「門番」としての機能も含む) を解明する上で今後大きな手がかりとなることが期待される。

(2) メダカ *mespb* (Mesp2 のメダカにおける機能的相同遺伝子と思われる) 遺伝子の発現制御領域により、マウス Mesp2 の発現制御領域を置き換えたノックインマウスの樹立に成功した。得られたマウスは形態的に完全に正常であり、Mesp2 遺伝子の発現も正常であった。メダカとマウスの Mesp 遺伝子発現領域は、T-box 転写因子の結合配列を複数含むということ以外に配列上の類似は少ないが、機能的には完全に相補しうることが示された。この結果は、T-box 転写因子による Mesp 遺伝子の発現制御機構は生物種を超えて普遍的であることを示す。また、Tbx6 による Notch シグナルへの反応の「許容」という機構も保存されていること、すなわち Tbx6 の「門番」としての機能も進化的に保存された

普遍的なものであることを示唆する。

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)

Yukuto Yasuhiko, Satoshi Kitajima, Yu Takahashi, Masayuki Oginuma, Harumi Kagiwada, Jun Kanno, and Yumiko Saga
Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm specific enhancer of *Mesp2*
Development, **135**, pp3551-3519, 2008. 査読あり

[学会発表] (計5件)

1. 安彦 行人、原口 清輝、北嶋 聡、高橋 雄、菅野 純、相賀 裕美子:Tbx6 は体節形成において *Mesp2* の発現を制御する
第40回日本発生生物学会大会(細胞生物学会合同)(2007.5)

2. Yukuto Yasuhiko, Satoshi Kitajima, Yu Takahashi, Masayuki Oginuma, Harumi Kagiwada, Jun Kanno and Yumiko Saga :
Functional importance and evolutionary conservation of Tbx6 binding sites in presomitic mesoderm (PSM) specific enhancer of *Mesp2*.

第41回日本発生生物学会年会(2008.5)

3. Yukuto Yasuhiko, Satoshi Kitajima, Yu Takahashi, Masayuki Oginuma, Harumi Kagiwada, Jun Kanno and Yumiko Saga :

Multiple, evolutionally conserved T-box binding sites in cis-regulatory sequence are required for presomitic mesoderm (PSM) specific expression of *Mesp2*

日本発生生物学会・フランス発生生物学会合同年会"Frontiers in Developmental Biology 2008"(2008.9)

4. Yukuto Yasuhiko, Satoshi Kitajima, Yu Takahashi, Masayuki Oginuma, Harumi Kagiwada, Jun Kanno and Yumiko Saga :
Functional Importance of Evolutionally Conserved Tbx6 Binding Sites in the Presomitic Mesoderm (PSM) Specific Enhancer of *Mesp2*.

The 16th CDB Meeting, "Cis-sequence Regulation and its Evolution"(2008.10)

5. Yukuto Yasuhiko, Satoshi Kitajima, Yu Takahashi, Masayuki Oginuma, Harumi Kagiwada, Jun Kanno and Yumiko Saga :
Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm (PSM) specific enhancer of *Mesp2*.

第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同年会(2008.12)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安彦 行人 (YASUHIKO YUKUTO)

国立医薬品食品衛生研究所、毒性部、主任
研究官

研究者番号：40370944

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：