

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20770172

研究課題名（和文）

2重蛍光ゼブラフィッシュを用いたHox遺伝子群の発現異常を示す変異体の単離

研究課題名（英文）

Screening for the zebrafish mutants that exhibit the abnormal expression patterns of Hox genes.

研究代表者

川村 哲規 (KAWAMURA AKINORI)

埼玉大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：10466691

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物のからだには、肋骨や四肢などに代表されるように前後軸に沿った特徴的な形態がみられる。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尾とした研究から、Hox 遺伝子群がこの過程において中心的な役割を果たすことが知られている。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ー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が、脊椎動物の胚発生において、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殆ど分かっていない。本研究では、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、Hox 遺伝子の発現異常を示す変異体を単離することを第一の目標としている。エチレンニトロソウレアを用いて変異原処理した魚の第2代のファミリー魚(F2)を用いて、突然変異体スクリーニングを行った。その結果、これまでに初期発生において異常を呈する変異体を少なくとも13種類同定した。それらに対して、Hox 遺伝子の発現パターンを含めて、その表現型の詳細な解析を行っている。また、さらに多くの変異体を単離するため、引き続いて変異体スクリーニングを行っている。

研究成果の概要（英文）：

In vertebrates, the characteristic features such as limbs and ribs were observed along the anteroposterior axis. These morphological differences along the anteroposterior axis are specified during early embryogenesis. Genetic studies in *Drosophila* have shown that Hox genes play a central role in this process. Several lines of accumulating evidence indicate that the identity along the anteroposterior axis is specified by the ordered expression patterns of Hox genes in *Drosophila* as well as vertebrates. However, the molecular mechanism how the ordered expression patterns of Hox genes along the anteroposterior axis remains poorly understood in vertebrates. In this study to isolate the mutant that exhibits the abnormal expression patterns of Hox genes. I have performed the F2 mutant screening by using zebrafish treated with ENU mutagen. So far, I identified at least 13 mutants which exhibit the abnormal development in zebrafish. At present, I have investigated the expression patterns of several genes including Hox genes by whole-mount *in situ* hybridization. In addition, I proceed to perform the F2 screening for further identification of mutants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：発生、突然変異体、スクリーニング、転写制御機構、ゼブラフィッシュ、
遺伝子、脊椎動物、前後軸形成

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物のからだには、肋骨や四肢などに代表されるように前後軸に沿った特徴的な形態がみられる。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尾とした研究から *Hox* 遺伝子群がこの過程において中心的な役割を果たす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図は、発生生物学の教科書では必ずと言ってよいほど掲載されている。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、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分かっていない。その大きな理由のひとつとして、ショウジョウバエと脊椎動物における発生様式の根本的な違いが挙げられる。ショウジョウバエでは一定の大きさの胚に拡散性分子の濃度勾配（モルフゲン）が受精卵の両端に存在し、それが

引き金となり前後軸に沿ったホメオティック遺伝子の発現領域が誘導される。それに対して、脊椎動物では胚の後方に位置する尾芽の伸長に伴って後部側の領域が体幹部に付け加わっていく。つまり、脊椎動物では胚の大きさが増加しながら発生する。このため、脊椎動物の体幹部形成には時間軸と空間軸がきちんと制御されることが必要であり、従来のショウジョウバエでみられるモルフゲン勾配モデルとは異なった新しいシステムを用いている可能性が予想される。実際これまでの研究から、*Hox* 遺伝子座は高度にクロマチンが凝集された状態から徐々に解けていくことで *Hox* 遺伝子群の発現領域に、時間的および空間的共線性/コリアリティーがもたらせる機構や *Hox* タンパク自身が原始線状 (Primitive streak) へ流入するタイミングを調節することでニトリ胚の前後軸に沿った中胚葉細胞の分布位置を決定しているなどのユニークなモデルが提唱されている。しかしながら、これらの結果は全体から見ればおそらく氷山の一角が露わになったに過ぎず、総括的に理解するためには未知のメカニズムならびにそれに関わる因子を見出すことがこの問題に対する急務の課題である。

2. 研究の目的

本研究は、前後軸に沿った特異性を司る *Hox* 遺伝子群の発現領域をもたらし機構を明らかにするために、ゼブラフィッシュを用いて、*Hox* の発現の可視化した組換えに異常を示す突然変異体を遺伝学スクリーニング

により単離することと、体節形成異常を示す突然変異体や *Hox* 遺伝子群の発現を制御する因子の機能阻害胚を用い、詳細に *Hox* の発現領域を解析し、相関関係を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Hox* 遺伝子の発現領域を可視化した組換え魚の作製

Hox 遺伝子の発現を可視化するために、*Hox* 遺伝子座を含む BAC クローンに対して、SW102 大腸菌を用いた相同組換えにより、2つの *Hox* 遺伝子座 (*hoxc8a*, *hoxc10a*) をそれぞれ GFP, dTomato 蛍光タンパク質をコードする遺伝子に置き換える。組換えた BAC クローンをゼブラフィッシュ胚に導入し、*Hox* 遺伝子の発現を可視化した組換え魚を単離する。

(2) ゼブラフィッシュを用いた突然変異体スクリーニング

ゼブラフィッシュを用いた3世代交配法により、突然変異体スクリーニングを行った。具体的には、野生型の雄を用いて、3.5mM エチレンニトロソ尿素による変異原処理を1週間間隔で計5回行った。処理した雄を野生型の雌と交配し F1 を作製し、さらに F1 同士を交配させ、F2 ファミリーを作製した。作製した F2 ファミリーを用いて突然変異体のスクリーニングを行った。

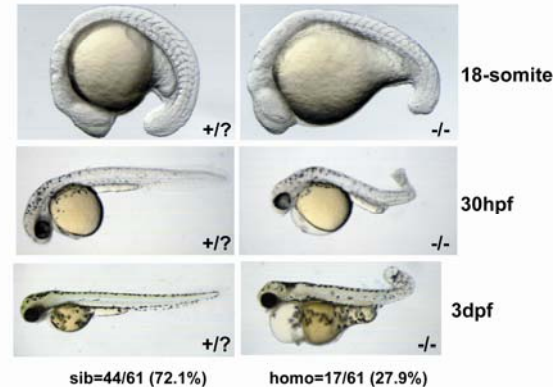
4. 研究成果

Hox 遺伝子の発現を可視化するために、*Hox* 遺伝子座を含む BAC クローンを2つ購入し、2つの *Hox* 遺伝子座 (*hoxc8a*, *hoxc10a*) をそれぞれ緑色の GFP, 赤色の dTomato 蛍光タンパク質をコードする遺伝子に組換えた BAC クローンを作出した。それぞれをゼブラフィッシュ胚に導入した結果、それぞれの蛍光タンパク質が予想される *Hox* 遺伝子の発現領域に蛍光がみられたが、それと同時に発生過程に異常が生じ、致死になった。生き残った胚を成魚まで育てて、交配を行ったが、BAC クローンが導入された胚をこれまでに得ることは出来ていない。この原因として、これらの BAC クローンには *hoxc8a*, *hoxc10a* 以外の *hox* 遺伝子も存在し、それらの遺伝子が胚に導入されることで、過剰に発現した結果、発生異常を考えられる。事実、*hox* 遺伝子の mRNA を過剰発現を胚の表現

形と類似していた。現在、濃度をより薄く調製し、胚への導入を試みている。

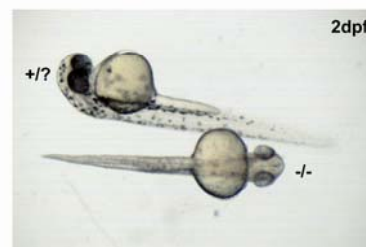
Hox 遺伝子を可視化した魚の作出に時間を要しているため、野生型の胚に対して、変異原処理を行い、突然変異体のスクリーニングを行った。その結果、初期発生において形態異常を呈する突然変異体をこれまでに13個、同定した。その中における代表的な例として、下の図に示す *sud317* 突然変異体は、前後軸に沿った体幹部の伸長不良が18体節期において顕著にみられた。また、受精後3日胚では、囲心腔の肥大が顕著に見られ、尾が上方へ曲がっていることが野生型と比較して分かる。また、表現形が生じた割合が27.9%だったことから、劣性の突然変異体であると考えられる。もう一つの具体例として、*sud323* は劣性の突然変異体であり、受精後2日目胚

sud317



において、明らかな前後軸に沿った体幹部長の差がみられる。頭部領域の差は殆どないのに対して、体幹部の長さが *sud323* ホモ変異体では著しく短い。また、*sud323* ホモ変異体では、色素細胞の形成が野生型と比べて不十分であることが観察され、色素細胞の形成

sud323



にも異常を呈していることが示唆される。また、その他にも興味深い変異体として、*sud309a* 突然変異体は、形態的には野生型と外見上区別することはできないが、接触刺激に対して殆ど逃避行動をとらない変異体などを単離した (data not shown)。今後

は、Whole-mount *in situ* hybridization 法による詳細なマーカー解析を行うことで、さらに突然変異体の異常を明らかにしたいと考えている。また、変異体スクリーニングを継続的に行うことで、さらなる興味深い突然変異体の単離を目指す。

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)

① Akinori Kawamura, Sumito Koshida, and Shinji Takada.

Activator-to-repressor conversion of T-box transcription factors by the Ripply family of Groucho/TLE-associated mediators.

Molecular and Cellular Biology vol. 28, 3236-3244 (2008).

[学会発表] (計 4 件)

① 吉村麻美、川村哲規、二階堂昌孝、山田浩二、新井 恒、弥益 恭

「咽頭弓を中心に頭部に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体の解析」

日本動物学会関東支部第 61 回大会、2009 年 03 月 20 日 (さいたま)

② 吉村麻美、川村哲規、二階堂昌孝、山田浩二、新井 恒、弥益 恭

「頭部構造及び逃避反応に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体 *aa6k* の解析」

第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 12 日 (神戸)

③ Mami Yoshimura, Akinori Kawamura, Masataka Nikaido, Koji Yamada, Hisashi Arai, and Kyo Yamasu

“Analysis of the zebrafish mutant with defects in the head structure and escape response”

第 14 回小型魚類研究会、2008 年 09 月 20 日 (岡崎)

④ Tadashi Okubo, Akinori Kawamura, Jun Takahashi, Akiko Ohbayashi, and Shinji Takada

“Ripply3 plays essential roles in pharyngeal development”

41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2008 年 05 月 29 日 (徳島)

[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 (AKINORI KAWAMURA)

埼玉大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：10466691