

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770224

研究課題名 (和文) *Shh* 肢芽エンハンサー結合因子の網羅的探索研究課題名 (英文) Screening of factors binding to the *Shh* limb enhancer

研究代表者

天野 孝紀 (AMANO TAKANORI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・特任研究員

研究者番号：20419849

研究成果の概要 (和文)：マウス肢芽の *Shh* 遺伝子は、進化的保存配列の MFCS1 によって発現を制御される。MFCS1 には、多指症を呈する点突然変異が多数報告されており、この変異領域に焦点を当てて詳細に解析を行った。マウスの *Hx* 変異領域に結合する因子の網羅的探索の結果、*Msx1* を同定した。一方、マウスの他の 3 カ所の変異領域は特定の因子の結合が失われる機能欠損型であることが示唆され、多指の原因となる *Shh* の異所性の発現に異なる二つの分子メカニズムが関与することが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)： *Shh* is localized in the posterior mesenchyme of limb buds, which is regulated by limb-specific enhancer named MFCS1. A number of mutations are known in the mammalian MFCS1, most of which cause preaxial polydactyly. A yeast one-hybrid screen identified *Msx1* as a transcription factor binding to the *Hx*-mutated site. In the *Hx* mutant, *Msx1* can bind to the substituted *Hx*-site in MFCS1. By contrast, in other three mouse mutant, their single-base substitutions likely abolish repressor-binding sites in MFCS1 and thereby lead to the ectopic *Shh* expression in the anterior bud. Thus, this study revealed that there are two types' molecular etiologies in preaxial polydactyl mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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：遺伝子発現調節

## 1. 研究開始当初の背景

異なる脊椎動物種間のゲノム比較によって、非翻訳領域においても種間でよく保存された領域の存在が明らかにされている。その中には、ヒトとサカナにおいても 100 bp 以上の高度な保存性を示すものも存在する。レポーター遺伝子の発現解析などにより、多くの保存配列が組織特異的エンハンサーとして機能することが示されている。しかし、一

般的に転写調節因子の足場として必要とされるのは、ゲノム上の数～数十塩基程度であり、なぜ数百から千塩基にも及ぶ配列が進化的に保存されてきたのか明らかではない。*Shh* は、胚発生の形態形成過程における重要性から、最も組織特異的エンハンサーの解析が進んでいる遺伝子のひとつであり、高度保存配列の機能解明のための優れたモデルとなる。我々の所属研究室や海外のグループに

より、神経組織におけるエンハンサーをはじめ、四肢や口腔上皮、消化管のエンハンサーも同定され (Epstein et al., Development, 1999; Lettice et al., Hum. Mol. Genet., 2003; Sagai et al., Mammal Genome, 2004; Sagai et al., Development, 2009)、そのいずれも脊椎動物種間の保存性を有している。中でも四肢のエンハンサーである MFCS1 に関しては機能に関する知見が最も蓄積しており、ヒト・マウスの多指症の研究から、エンハンサー内に多くの点突然変異が見つかっていることに加え、ノックアウトマウスの解析によって肢芽での *Shh* の発現に必須の配列であることが示されている (Sagai et al., Development, 2005)。しかし、MFCS1 が全体的に失われたか、部分的に変化したかによって、欠指と多指という逆の表現型が得られており、個々の実験事実を統合して機能の解釈をすることが現状では非常に困難である。

MFCS1 に結合する転写調節因子としては、5' *Hoxd*、*Pbx1* が報告されており (Capellini et al., Development, 2006)、特に 5' *Hoxd* は、*Shh* 発現に必須の上流因子とされている。ただし、*Hoxd13* や *Hoxd10* の発現領域は *Shh* のそれに比べて広く、転写活性化因子だけでなく抑制因子も含めた複雑な制御機構が必要とされると考えられる。

また、申請者らが行った 3D-FISH 解析では、MFCS1 ノックアウトマウスの肢芽で *Shh* 翻訳領域の空間配置が野生型のものとは異なっており、染色体の高次構造変化に関与するクロマチンリモデリング因子の結合も示唆されている (Amano et al., Dev. Cell, 2009)。このように、最も解析の進んでいる *Shh* のエンハンサーにおいても結合因子の同定・機能解析は不十分であり、発現調節機構の実体の解明には至っていない。

## 2. 研究の目的

特定の組織に特定のタイミングで正確に遺伝子を発現させるには、複雑な転写調節情報が秩序だてて管理されなければならない。申請者は、*Shh* 遺伝子座の周辺に存在する進化的保存配列を転写調節領域のモデルとし、トランス因子の情報がエンハンサー配列上でどのように集積され、処理されていくのかを明らかにする。これにより、非翻訳領域に存在する保存配列が一定の長さを持ったまま進化的に維持されてきた生物学的意義を理解する。

本研究では、非翻訳領域の種間保存配列が進化の中で維持されてきた生物学的意義の解明を主眼とする。そのために、*Shh* の肢芽エンハンサーである MFCS1 を対象として、その機能エレメントの網羅的かつ詳細な解析を行う。具体的に、以下の二つの点に着目して実験を進める。

### (1) MFCS1 結合因子の同定と機能解析

多指症を呈する点突然変異の位置は、1.2 Kb の長さを有する MFCS1 内に散在していることから、複数の機能エレメントの存在が予想される。*Shh* 発現における個々のエレメントの機能を知るために、MFCS1 に結合するトランス因子を探索する。

### (2) *Hoxd13* の *Shh* 発現に及ぼす効果の解明

*Hoxd13* が MFCS1 に結合することは既知であるが、MFCS1 内に 11 個存在するコンセンサス配列をどのように利用しているのか明らかではない。本研究では、*in vivo* と *in vitro* の系を用いて、正常発生中に実際に使用されている *Hoxd13* 結合サイトを明らかにし、その結合量に応じた *Shh* の発現レベルの量的な制御について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) *Hx* 結合因子の探索

*Hx* は多指症のマウスであり、MFCS1 内に点突然変異を有し、マウス発生肢芽前側で異所的な *Shh* 発現を示す。申請者らは、ゲルシフトアッセイにより、この *Hx* 点突然変異を含む 40 bp の DNA 断片にマウス肢芽の核タンパク質が結合することをすでに明らかにしていた。この結合する因子を同定するために 40 bp の DNA 断片の DNA 断片を用いたイーストワンハイブリッド法を行い、対象 DNA 断片と相互作用する因子の同定を行う。

得られた結合因子に関しては、ルシフェラーゼアッセイにより転写活性能を評価する。

### (2) MFCS1 フラグメントの機能解析

*Hx* 点突然変異を含む 40 bp の DNA 断片を LacZ レポーターカセットにつなげて作製したトランスジェニックマウスは、肢芽の前側のみでレポーターを発現させることをすでに確認している。これは特定のエレメントが MFCS1 内の他の領域とは独立に機能し得ることを示している。*Hx* 以外の多指症を生じる点突然変異に関してもその領域含む DNA 断片を用いたレポーターコンストラクトを調製してトランスジェニックマウスを作製し、レポーターの発現パターンを調べる。ここでは MFCS1 内のそれぞれの領域が独立に有する機能に着目する。

さらに、MFCS1 から対象のフラグメントを欠損させたコンストラクトを用いてレポーターの発現パターンを調べ、MFCS1 全体の発現活性に与える効果を評価する。

## 4. 研究成果

### (1) *Hx* 変異領域に結合する因子の同定

*Hx* タイプの点突然変異を有する 20 bp を酵母に組み込み、マウスの 11.5 日胚の前肢芽から得られた cDNA を用いてイーストワンハイブリッド法を行った。得られた 45 個のクローンについて、配列の決定を行った。タン

パク質の翻訳領域を含む 14 クローンに関して、陽性・偽陽性の判定を行った。この結果、*Hx* 変異領域に結合する因子として Msh-like ホモオボックスタンパク質の *Msx1* が同定された。

DNA 配列の変異に伴う *Msx1* の結合能の違いを調べるために、*Msx1* を発現している 11.5 日胚の肢芽から核タンパク質を抽出し、ゲルシフトアッセイを行った。*Hx* 点突然変異を含む 40 bp の DNA 断片と対応する野生型の DNA 断片では、*Hx* 変異型の DNA 断片のみ特異的なバンドのシフトが起こり、肢芽タンパク質の結合がこの点突然変異に依存して起こることが明らかにされた (図 1)。さらに、抗 *Msx1* 抗体を用いたスーパーシフトアッセイにより、この肢芽の核タンパク質が *Msx1* であることを確認した。

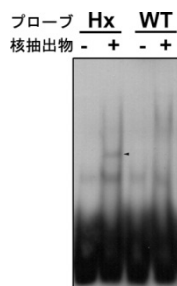


図1: 11.5日胚肢芽の核抽出物を用いたゲルシフトアッセイ。*Hx* プローブで特異的なバンドシフト(矢印)が見られる。

*Msx1* の MFCS1 を介した転写に対する影響を調べるため、NIH3T3 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。レポーターコンストラクトとして、1.2 Kb の野生型と *Hx* 変異型の MFCS1 配列をホタルルシフェラーゼにつないだものを用いた。*Msx1* は、転写に対して負の制御を行うことを示した報告が多く、一般的に転写抑制因子として機能すると考えられている。実際に申請者らの行ったルシフェラーゼアッセイでは、*Msx1* を単独に発現させた場合に、*Hx* タイプの変異の有無に関わらず、レポーターの転写を活性化させる作用は認められなかった。

歯芽発生において、*Msx1* は Pax9 と複合体を形成し、転写を正に制御することが知られている。*Msx1* と Pax9 を共発現させた細胞においては、*Hx* 変異型の MFCS1 配列を有したレポーターコンストラクトでのみ、有意なルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。11.5 日胚の肢芽では、*Msx1* も Pax9 も前側間充織での発現が観察されることから、*Msx1*-Pax9 複合体によって *Hx* の肢芽前側での異所的な *Shh* が誘導されていることが示唆される。

(2) 点突然変異領域の DNA 断片を用いた *in vivo* レポーターアッセイ

MFCS1 内にはヒトやマウスで多指症を呈する点突然変異が複数報告されている。ヒトの 5 ヶ所、マウスの *Hx* 以外の 2 ヶ所、ニワトリの 1 ヶ所のそれぞれの領域について、タンデムリピートのレポーターコンストラクトを調製してトランスジェニックマウスを作製し、レポーターの発現パターンを解析した。他の点突然変異を含む DNA 断片は *Hx* とは異なり、肢芽の前側にレポーター遺伝子の発現

を誘導することはなかった。このことから、肢芽エンハンサー内に変異を有し、多指という一見同様に見える症状を呈していてもそのエンハンサー上では異なる制御がなされていることが示唆された。特に *Hx* は、正常には結合しない *Msx1* タンパク質が結合するようになることから、Gain of function タイプの突然変異であることが明らかにされた。

(3) *Shh* を異所的に発現させる二つの異なるメカニズム

*Hx* タイプの点突然変異領域には、*Msx1* が結合するようになることから、*Hx* は gain of function 型の変異である。他の変異領域がどのようなメカニズムで機能しているのか調べるために、*Hx*、*M100081*、*M101116*、*DZ* の四種類の点突然変異領域に関して、変異した一塩基を欠失させた MFCS1 フラグメントをそれぞれ作成し、トランスジェニックマウスを用いた LacZ レポーターアッセイを行った。*M100081*、*M101116*、*DZ* の三種類に関しては、一塩基欠失によっても一塩基置換の場合と同様の LacZ の肢芽前側での異所性の発現が認められた。このことから、*M100081*、*M101116*、*DZ* の突然変異は、*Hx* とは異なって、本来結合するはずの転写因子の結合が阻害されている loss of function 型であることが示唆された (図 2)。

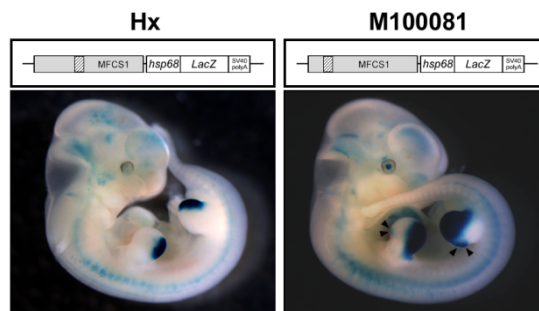


図2: MFCS1 から M100081 変異を示す一塩基を除去すると前側で過剰な LacZ レポーターの発現が見られる (矢印)。

(4) MFCS1 に対する *Hoxd* の作用

*Shh* 発現に必要とされる転写因子 *Hoxd13* に関しては、クロマチン免疫沈降法によって MFCS1 との結合が既に報告されている。MFCS1 には 11 個の *Hoxd* 予想結合配列が認められたが、その内の 3 か所に関して、変異を入れたコンストラクトをそれぞれ作製し、NIH3T3 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。どの *Hoxd* 予想結合領域を破壊した場合においてもレポーターの発現レベルが 1~2 割程度低下したことから、少なくともこの 3 か所の *Hoxd* 結合領域は、*Shh* の発現に際して同程度の貢献をしているようであった。

さらに、1.2 Kb の MFCS1 を分割し、300 bp 前後の短い DNA 断片を用いて LacZ レポーターコンストラクトを作製した。それぞれの DNA 断片は、1~4 つの *Hoxd* 予想結合配列を

含むように設計した。11.5 日胚のマウス肢芽組織において LacZ の発現を調べたところ、1～3つの Hoxd 予想結合配列を含むレポーターコンストラクトでは、いずれも LacZ の発現活性が認められなかった。一方、4つの Hoxd 予想結合配列を含むレポーターコンストラクトでは、肢芽後方の間充織に LacZ 発現が観察された。この結果から、正常な *Shh* の発現には、MFCS1 内の複数か所に一定数以上の Hoxd13 が結合することが必要とされるようである。*Shh* の発現量の調節に、転写を活性化する因子の結合状態という量的な制御が関与する可能性が示された。

## 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2件)

①Yokoyama H, Maruoka T, Aruga A, Amano T, Ohgo S, Shiroishi T, Tamura K. Prx-1 Expression in *Xenopus laevis* Scarless Skin-Wound Healing and Its Resemblance to Epimorphic Regeneration、*Journal of Investigative Dermatology*、査読有、Vol. 131、2011、2477-2485  
DOI: 10.1038/jid.2011.223

②Uejima A, Amano T, Nomura N, Noro M, Yasue T, Shiroishi T, Ohta K, Yokoyama H, Tamura K. Anterior shift in gene expression precedes anteriormost digit formation in amniote limbs、*Development, Growth and Differentiation*、査読有、Vol. 52、2010、223-234  
DOI: 10.1111/j.1440-169X.2009.01161.x

[学会発表] (計2件)

①天野孝紀、他、A BAC-transgenic mouse model for the long range enhancer-promoter interaction at the *Shh* locus、日本発生生物学会 第44回大会、2011年5月20日、沖縄

②天野孝紀、Long-range エンハンサーによる *Shh* 遺伝子の発現制御、みんなで建設的に考える会、2011年8月5日、名古屋

[図書] (計1件)

①天野孝紀、他、株式会社 エル・アイ・シー、生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール 2011、121-127

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

天野 孝紀 (AMANO TAKANORI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センタ

一・特任研究員

研究者番号：20419849