

論文内容の要旨

論文題目 Transgenic analysis of medaka *mesp-b* enhancer in somitogenesis

(訳 トランスジェニック法によるメダカ *mesp-b* 遺伝子の体節形成における発現制御機構の解析)

氏名 寺崎 晴美

脊椎動物において体節は、分節性構造のもととなる重要な構造体である。その形成過程はきわめてダイナミックであり、神経管の両脇にある傍軸中胚葉がからだの前側から順番にくびれ切れることで形成される。体節の規則的な分節パターンは「clock-and-wavefront」と呼ばれるメカニズムによって形成されると考えられている。これは、未分節中胚葉 (PSM) において分子時計 (clock) の振動がおり、wavefront が前方から一定の速度で後退しながら clock の振動を止め、分節ポイントを決める、というモデルである(図1)。その分子的な実態は、これまで主にマウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルなどを用いた発現パターンや変異体の解析などから明らかにされつつある。実際、Notch/Delta シグナル因子は、PSM 後方で振動を生み出すのに必要であり、Fgf、Wnt、レチノイン酸シグナルは前後軸に沿った濃度勾配を形成して wavefront の位置と後退を制御することが示されている。

前方 PSM では特に bHLH 型転写因子をコードする *Mesp2* 関連遺伝子が分節時計の停止と各体節の前後極性の確立に重要な役割を果たしている。*Mesp2* 関連遺伝子の発現は PSM で予定体節 1 つ分に相当する領域に始まり、やがて予定体節の前方に局限する。その後この発現前方境界に沿って体節境界が形成される。さらに、振動する発現パターンを示す hairy 関連遺伝子の発現はこの *Mesp2* の発現部位と重なるように停止する。さらに近年、hairy 関連遺伝子または Notch シグナルが *Mesp2* 関連遺伝子と相互に制御しあって振動や分節パターン形成に寄与していることが明らかになっている。一方 *Mesp2* 遺伝子の発現には、PSM で広範囲に発現している T-box 遺伝子が必要であることも示されている。以上のことから体節境界形成の過程には、*Mesp2* 関連遺伝子を中心として複数の遺伝子が関与する遺伝子ネットワークが機能していると考えられる。

このように発現パターンが厳密に制御され、体節形成に重要な役割をもつ *Mesp2* 関連遺伝子の発現制御機構については、これまでマウスやアフリカツメガエルで解析が行われている。その結果、マウス *Mesp2* の PSM でのエンハンサは転写開始点のすぐ上流 300bp の領域に存在するのに対し、アフリカツメガエルの *Mesp2* 相同遺伝子である *Thy1* の PSM における発現は、その上流約 3.5 kb の領域により制御されていることが示唆されている。しかしながらいずれの場合においても、*Mesp2* 関連遺伝子の発現を直接制御する上流因子については不明な点が多い。

そこで本研究では、モデル動物として多くの利点を持つメダカを用いて、*Mesp2* に相同な *mesp-b* 遺伝子の発現制御機構を解析し、体節形成を制御する分子機構をより具体的に明らかにしようと試みた。メダカは世代期間が短く多産なため、トランスジェニックの作成に適し

ている。また体外受精で卵が透明なため、初期発生の詳細な観察や胚操作などの実験にも適している。さらにメダカは、同様の特徴をもつゼブラフィッシュに比べてゲノムサイズが小さく構造も単純であると予想されることから、ゲノム領域の配列が比較的単純であることが期待される。実際、今回扱った領域については、ゼブラフィッシュの同様な解析に比べ、配列比較やトランスジェニック解析が比較的容易に行えた。

メダカ *mesp-a, b* は、近年、当研究室の村上らにより単離され、さらに、これらを含む BAC 領域の配列が解析された。そこで私はまず、この情報を用いて、*mesp-a, b* 遺伝子配列の種間比較、及び両遺伝子の発現パターンの再解析を行った。その結果、メダカ *mesp-a, b* とゼブラフィッシュ、マウス、ニワトリの *mesp* 遺伝子の bHLH 領域のアミノ酸配列はよく保存されており、これらが *Mesp* 遺伝子ファミリーを形成することが確認できた。さらにその発現パターンを調べると、原腸胚期には *mesp-a* のみが予定中胚葉の marginal zone に発現し、その後、体節形成期には *mesp-a, b* ともに神経管両脇の前方 PSM で 1 ~ 2 本のストライプ状に発現した。このような発現パターンは他種の *mesp* 遺伝子のものと極めて良く似ている。これらの結果から、メダカ *mesp-a, b* がそれぞれマウス *Mesp-1, 2* の相同遺伝子であると結論された。

そこで次に、体節形成への関与がマウスやゼブラフィッシュでより強く示唆されている *mesp-b* に着目し、その発現制御領域を探索した。最初に、長いゲノム配列を比較することができる PipMaker や VISTA などの解析ソフトを用いて、*Mesp2* あるいは *mesp-b* 周辺のゲノム配列をマウスやゼブラフィッシュと比較したが、特に保存性の高い領域は見つからなかった。次に、メダカ *mesp-b* 周辺のゲノム配列をレポーターである EGFP につないで、メダカ胚に導入してトランスジェニックを作成し、発現制御領域を特定した。その結果、上流 5 kb の領域を用いることにより、*mesp-b* 遺伝子に特徴的な体節前方領域に局限したストライプ状の発現を再現することができた。このことから、メダカ *mesp-b* 上流 5 kb の領域に、その発現の特徴を再現するのに必要な配列があることが判明した。次に、上流 2.8 kb までは 5 kb の領域とほぼ同様の発現が見られたのに対し、1.4 kb まで削るとその発現が低下し、発現パターンにも異常が見られた。このことから、*mesp-b* 遺伝子の上流 1.4 kb から 2.8 kb の間に *mesp* 遺伝子の体節前方での発現に重要な領域があることが示唆された。

mesp-b 遺伝子の上流 2.8 kb の領域には T-box、RBPJ_ (Notch/Delta シグナル下流の転写因子)、Tcf (Wnt シグナル下流因子)、レチノイン酸などの *mesp* 遺伝子の発現制御への関与が示唆されている因子に対する既知の結合配列が複数存在していた。そこで私は、これらの配列を削った各種の 2.8 kb エンハンサを作成して、その活性を調べた。その結果、レチノイン酸応答配列を削った場合はその影響が観察されなかったが、予想された 2 つの T-box binding site、2 つの RBPJ_ binding site、およびいくつかの Tcf binding site を削ると、レポーターである GFP 遺伝子の発現が低下することが判明した。

さらに私は、これらの結果が実際に予想される上流因子の影響によるものかどうかを確認するため、トランスジェニック胚に対して *Tbx24*、Notch、レチノイン酸の活性阻害実験を行い、2.8 kb あるいは各種の結合配列を削った配列が応答するかどうか、すなわちそのエンハンサの活性が変化するかどうかを調べた。まず、*Tbx24* の翻訳を阻害すると、内在性 *mesp-b* 遺伝子の発現が著しく低下することを確認した。また、2.8 kb エンハンサによる GFP の発現は、2 つの *Tbx* 結合配列を削ったのみの場合と同様に著しく減少した。同様に、Notch シグ

ナルの活性を薬剤 DAPT によって阻害すると、内在性 *mesp-b* の発現が低下し、2.8 kb エンハンサによる GFP の発現も、2 つの RBPJ_結合配列を削ったのみの場合と同様に低下した。さらに、Tbx や RBPJ_結合配列を欠失させた 2.8 kb エンハンサは、上述の活性阻害に反応せず、低い活性のままであった。これらの結果から、Tbx24 と Notch/Delta シグナルがそれぞれ予想された結合配列を介して *mesp-b* 遺伝子の発現制御に関与することが強く示唆された。

一方で、レチノイン酸の合成阻害剤 Disulphiram 処理では、2.8 kb エンハンサによる GFP の発現は内在性 *mesp-b* の発現同様著しく低下した。しかしながら、予想されたレチノイン酸応答配列を削ったエンハンサでも Disulphiram 処理により GFP の発現が著しく低下した。このことから、レチノイン酸シグナルは 2.8 kb エンハンサを通じて *mesp-b* 遺伝子の発現を制御するが、その作用は予想された応答配列以外の領域を介することが示唆された。

以上の結果から、メダカ *mesp-b* の未分節中胚葉での発現制御領域が上流 2.8 kb に存在すること、さらに、Tbx24、Notch シグナル、レチノイン酸がこのエンハンサ活性に必要であることが明らかになった (図 2)。マウス *Mesp2* の発現制御領域はそのすぐ上流 300bp に存在するが、その中に今回解析した Tbx, RBPJ_結合配列が存在する。一方、メダカでは *mesp-b* の発現に必要なこれらの配列が上流 2.8kb の領域内に散在していた。これらの結果は、*Mesp* 遺伝子の発現制御の機構は脊椎動物間で保存されている可能性が高いが、重要な因子の結合配列モチーフの存在様式が種間で異なっていることを示している。今後、Fgf シグナルなど、今回機能が示されたシグナル因子以外に対応する結合配列についても解析を進めることで、*Mesp* 遺伝子の発現制御機構及びその進化的意義がより詳細に明らかになることが期待される。

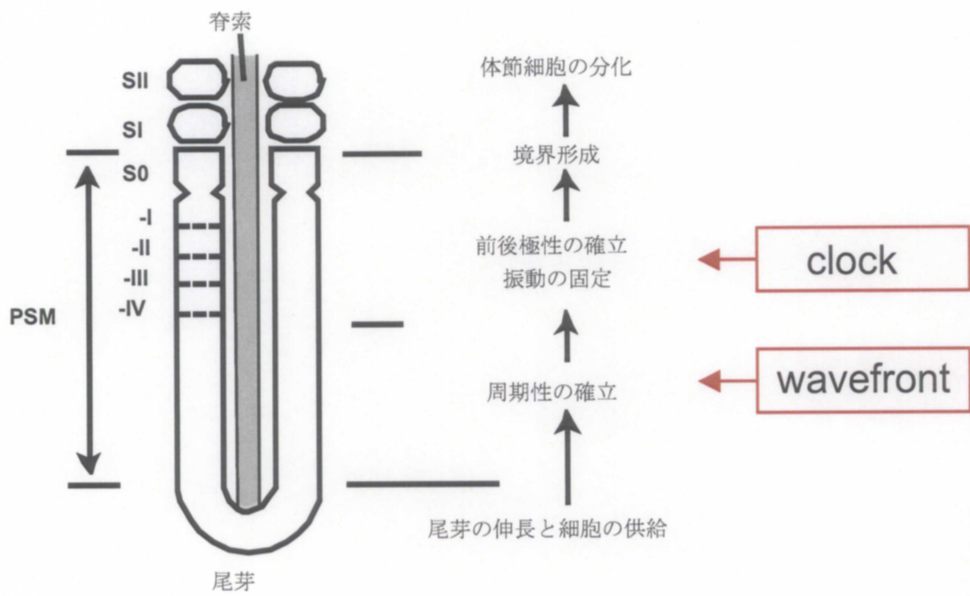


図 1

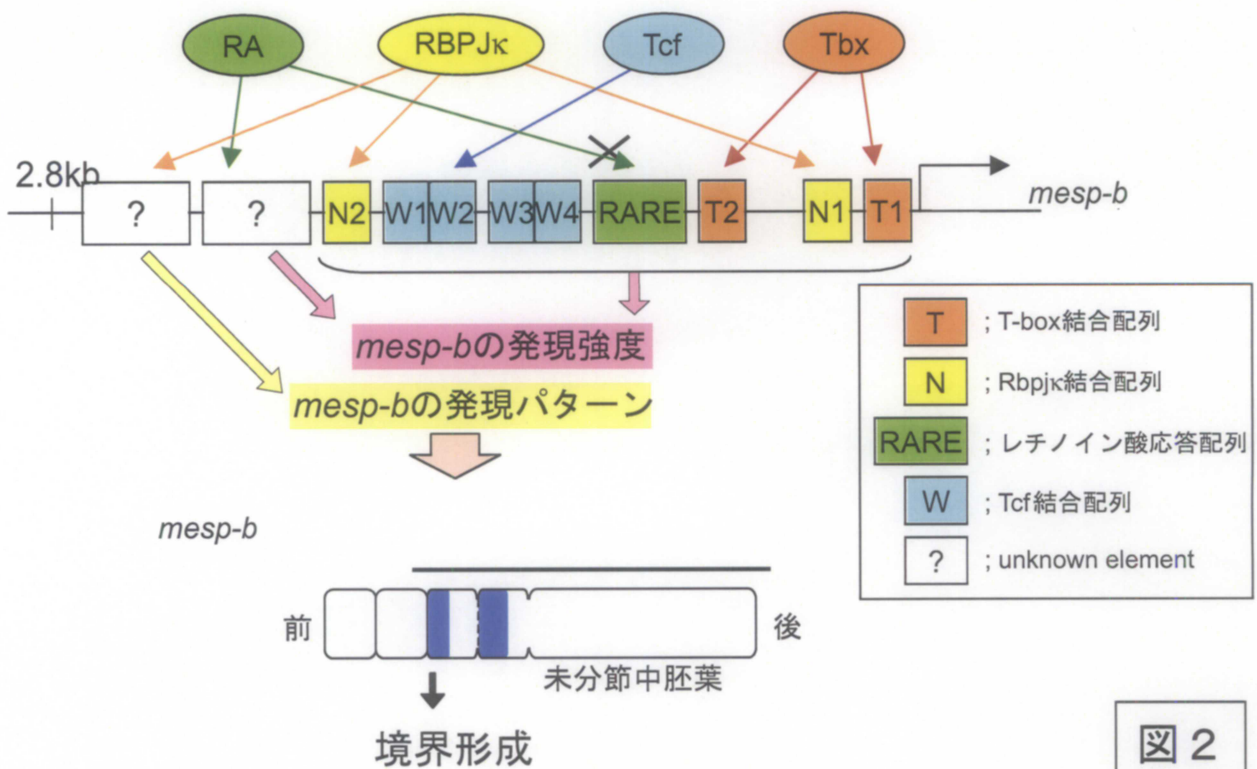


図 2