

論文内容の要旨

論文題目：Morphological Change Caused by Loss of the Taxon-Specific

Polyalanine Tract in Hoxd-13

(Hoxd13 における系統分類群特異的なアラニンリピートの
人為的欠損による形態的变化)

氏名 阿南 圭一

導入

近年、蛋白質において反復構造をとるアミノ酸配列（単一アミノ酸反復配列；HAAR）が注目されるようになってきた。とりわけアラニン残基の多数連続する配列であるアラニンリピート（pA; 論文では polyalanine tract と表記）は、病理学的にも関心が高い（図 1）。その理由として pA が原因で起こるヒト遺伝性疾患が、9 種類知られていることが挙げられる。pA をコードする塩基配列もまた、(GCN) n という不完全反復配列であり、リピート数の増減させる変異が非常に起こりやすい。よって結果として pA においてはアミノ酸レベルの増大 (expansion)、縮小 (contraction) といった変化が頻繁に起こる。そして増大・縮小変異に関連して、pA の獲得 (repeat gain)、喪失 (repeat loss) といった動的な変異も起こる。よって pA など単一アミノ酸反復配列は、増大・縮小・獲得・喪失という進化的な配列変化によって蛋白質の系統分類群特異性を容易に作り出すことが出来ると考えられる。

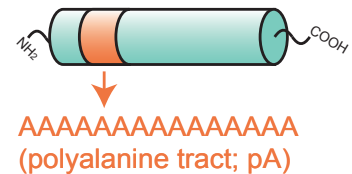


図1 pA とは

それでは pA の獲得や喪失などのアミノ酸配列上の進化が、生物の形質進化にどのように関連しているのだろうか。しかし、蛋白質内における pA の機能性についての知見は、いまだ乏しい。そこで、本研究では pA の進化が推進する形質進化についての手がかりを探るために、Hoxd-13 について研究を行った。Hoxd-13 蛋白質はおもに四肢や外生殖器の形態形成を司っている転写因子である。先行研究から哺乳類の Hoxd-13 は pA を有することがわかっていた。またこの蛋白質は pA の異常な増大によりヒトおよびマウスの遺伝性疾患を引き起こし、多指合指症という手掌部および足距部の形成不全の原因となる。そこで Hoxd-13 蛋白質における pA の進化と機能を研究することにより、本研究では、pA の獲得および喪失が脊椎動物の形質進化に関与しうるかどうかが明らかにすることを試みた。

結果

羊膜類に特異的な polyalanine tract (pA)

まず脊椎動物 Hoxd-13 におけるアミノ酸配列の比較解析を行った (図 2)。この結果から哺乳類、鳥類などの羊膜類において Hoxd-13 は pA を獲得していたが、魚類、両生類において pA を有しないことがわかった。羊膜類にのみ pA の存在が保存されたということは、羊膜類 Hoxd-13 における pA の重要性を示唆する。



図2 Hoxd-13 pAの獲得

Hoxd-13^{ΔA} 変異マウスの形態的特徴

Hoxd-13 における pA 獲得喪失の重要性を検討するために、ジーンターゲットングにより、pA コード領域を欠失変異させた Hoxd-13 (Hoxd-13^{ΔA}) をもつマウスを作成した。これはマウス Hoxd-13 において pA の喪失という進化上の現象を人工的に引き起こしたものである。

この Hoxd-13^{ΔA} 変異体で確認された形質について解析する際に、本研究では特に親指に注目した。親指は Hoxd-13 のノックアウトマウスで関節が全くなくなるなど深刻な異常を引き起こす部位である。そして親指に関する解析の結果、以下に示す通り Hoxd-13^{ΔA} 変異マウスと野生型との間で異なる特徴を発見した。

指骨と中手骨の間には、Sesamoid bone と呼ばれる小さな骨が存在している。この骨の形態を調べてみると、上肢の親指の Sesamoid bone では一つの指に二つあるタイプ (paired type) と一つしかないタイプ (single type) が存在することがわかった (図 3)。

そこで Hoxd-13^{ΔA} 変異体の集団と野生型の集団とで数を集計してみると、Hoxd-13^{ΔA} 変異マウスでは、野生型比べて single type があらわれる割合が有意に高いことが明らかになった (図 4)。この結果は、Hoxd-13^{ΔA} 変異が上肢親指の形態形成に影響を与えていることを示唆する。

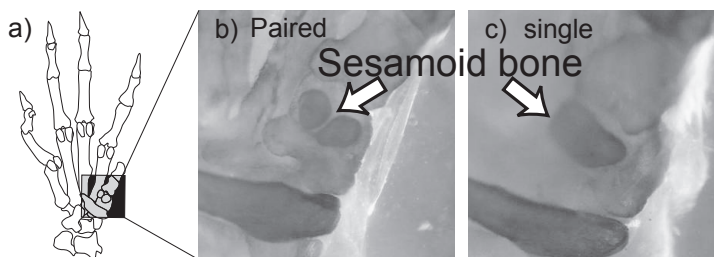


図3 Sesamoid boneの2つのタイプ

遺伝子型	Paired	single	Fisher's exact test
Hoxd-13 ^{ΔA} /Hoxd-13 ^{ΔA}	8	32	**
Hoxd-13 ^{ΔA} /+	20	28	
+/+	34	14	

** は P < 0.01 を示す

図4 遺伝子型と豆状骨のタイプ別に分けた上肢の数

近交系統の差は Sesamoid bone の形態に影響しない

前節の解析において、野生型 *Hoxd-13*、つまり何も処理していない *Hoxd-13* 遺伝子を持つマウスにおいても若干 single type が見られた。したがって変異導入以前から存在する遺伝的要素の違いが存在していて、それが骨のタイプ決定に関与している可能性を否定できない。特にマウスの近交系統の差異が影響している可能性が考えられる。特に前節の解析では、*Hoxd-13*^{ΔA} アリルは常に 129 系統という近交系マウスの染色体から遺伝し、野生型 *Hoxd-13* は常に B6 系統に由来している。従ってもともと *Hoxd-13* 遺伝子座付近に 129 系統と B6 系統で Sesamoid bone の形質を決める遺伝的違いが存在しているとする、*Hoxd-13*^{ΔA} の有無にかかわらず元から存在する系統差だけで前節の実験結果を再現できてしまう。

よって、*Hoxd-13* の系統差の影響を排除し場合でも、*Hoxd-13*^{ΔA} の変異の有無により Sesamoid bone の形態の違いを引き起こすことができるかどうか調べた。方法の要点としては、変異アリルも野生型アリルも、同じ 129 系統に由来するようにしたマウス同士で比較したことである。そうすることによって *Hoxd-13* が位置する染色体の遺伝的バックグラウンドをそろえることができるので、変異の有無の効果だけを検討できる。実際には、変異 *Hoxd-13* アリルは必ず 129 系統に由来するので、野生型 *Hoxd-13* アレルも 129 系統から継承した野生型マウスを作出した。各個体の *Hoxd-13* が、129 系統と B6 系統のうちどちらの系統に由来しているのか調べる方法として、*Hoxd-13* 遺伝子座付近に存在するマイクロサテライトマーカー D2Mit37 を用いることで染色体を区別した。以上のような準備をしてサンプルとなるマウスを用意した上で、骨形態解析をおこなった。その結果、129 系統に由来する集団同士でも、*Hoxd-13* における ΔA 変異の有無で Sesamoid bone のタイプ決定の割合が有意に異なることが明らかになった。よってこれらの結果は Sesamoid bone のタイプ決定から、系統差の関与を排除できることを示唆する。

Sesamoid bone の詳細な形態解析

次になぜ異なるタイプの Sesamoid bone が見られるのかを明らかにするために、詳細な形態解析を行った。Single type ができる原因として次のようなことが考えられる。発生過程

で二つのうち一方の骨を失って残った骨の形成が大きく成長して single type となる可能性と、paired type の2つの骨が癒合して single となる可能性の2つである。そこでどちらが

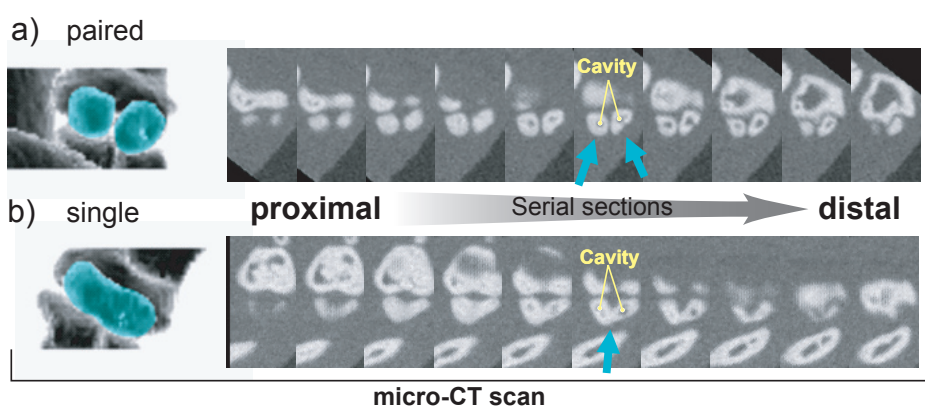


図5 Micro CTによるSesamoid bone内部の観察

正しいか検討するために、私はmicro CT解析によってsesamoid boneの内部構造を詳細に調べた(図5)。その結果、single typeの一つの連続した骨の内部には、2つの髓腔と思われる構造が見られることがわかった。髓腔は一つの骨の一つと考えられるので、したがってこの結果は、single typeでは発生過程で2つの骨もしくは軟骨原基形成時の軟骨が癒合していることを示唆している。

考察

単一アミノ酸反復配列の機能性

本研究は pA の獲得喪失をモデル動物により実験的に再現することを試みた。そして以上の解析の結果のとおり、*Hoxd-13*^{ΔA} 変異が Sesamoid bone のタイプ決定に異常をもたらすことが示された。これは *Hoxd-13* 蛋白質における pA 喪失が形質レベルの違いを作り出す要因となりうることを示す。そして一方で *Hoxd-13*^{ΔA} 変異遺伝子にとって立場を変えてみると、野生型遺伝子は pA を獲得したアリルと考えることが出来る。よって *Hoxd-13* が pA を獲得した場合も形質に影響があると考えられる。従ってまとめると本研究は、pA の獲得と喪失が形質に影響を与えうることを示唆する。

単一アミノ酸反復配列の獲得喪失の進化的重要性

本研究においては、*Hoxd-13* についてのみ調べたが、このような機能性を、Hox 蛋白質以外の蛋白質に含まれる pA も同様に持っていると考えられる。*Hoxd-13* と同じく他の蛋白質でも pA は増大変異によって機能の異常を示すので、本来の長さにおいてもそれら pA は機能を持っていると考えられるからである。そして同じことが pA 以外の単一アミノ酸反復配列についても当てはまるかもしれない。なぜなら他種のアミノ酸によって構成された反復配列もまた増大変異した状態での機能が、報告されているからである。蛋白質に含まれるすべての反復配列に機能性があると現時点において結論付けることは出来ないが、その候補となる反復配列の数は多い。今回見られたように個々の反復配列の効果は小さくとも、多数の反復配列が蛋白質の機能にかかわっていると考えると、それらのプロオームに対する影響力は無視できないだろう。

単一アミノ酸反復配列については、以前の研究からも増大、縮小という長さの進化における重要性が指摘されてきた。それに加えて本研究から、獲得、喪失についてもそれぞれが形質レベルの進化に関与していることが示唆された。よって、単一アミノ酸反復配列が生物の進化に果たしている役割はこれまで今まで知られていた以上に大きいかもしれない。今後は、更なる研究により、反復配列獲得喪失の影響がどう分子レベル起こっているのか解明されるべきであろう。