

進化生物学、発生生物学、ゲノム情報による複合的な形態形成研究

●小椋利彦

東北大学加齢医学研究所（神経機能情報研究分野）

＜研究の目的と進め方＞

脊椎動物の心臓は1心房1心室の魚類から2心房2心室の哺乳類まで、種によって特異な形態に進化してきた(図1)。しかしながら、このような多様な心臓の形成を調節する遺伝子は、どの動物種でも構造的、機能的によく似ている。では、類似した遺伝子は、どのようにして異なる組織形成を行うのであろうか？このような問いは、生物形態の発生と進化に直結する問題であり、多様性を生み出すメカニズムを探ることになる。本研究では、心臓の発生をモデルに、T-box 型転写因子を中心とした多様な因子が、どのように機能して形態の差を生み出すのかを研究することを目的としている。

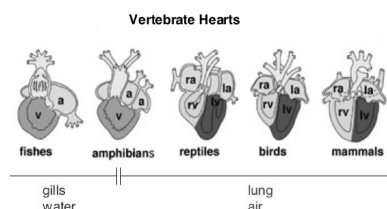
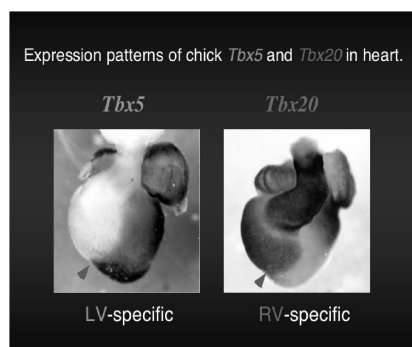


図 1

これまでの研究からニワトリでは Tbx5 遺伝子が左心室に、Tbx20 遺伝子が右心室に局限して発現していることがわかった (図2)。

図 2



このことは、DNA 結合ドメインが良く似た2つの T-box 遺伝子の進化と左右心室の分離が、つよく関連していることを示唆している。本研究は、この2つの遺伝子の機能を詳細に解析し、比較することで進化、発生、ゲノム情報の複合的な理解を深めることを目的としている。

また、T-box 型の転写因子は、どのように標的遺伝子の転写活性化を起こすのか、その分子メカニズムを解明することが、心臓の発生と進化を考える上で必須の問いであると考え、集中的に解析した。

＜研究開始時の研究計画＞

1) ゼブラフィッシュをも解いた実験系の確立

1心房1心室の心臓形態をもつ魚類の実験系として、ゼ

ブラフィッシュを用いた機能阻害 (loss of function)、強制発現系 (gain of function) の2つのアプローチが必要となった。このためゼブラフィッシュの飼育系と injection 用の機材、技術的な基盤をセットアップした。これまで、Tbx5、Tbx20 の morpholino oligo による機能阻害実験を行い、既に報告されているものと同じ形態変化を得ることに成功して、実験系がうまく機能していることが確認された。

2) ゼブラフィッシュ、ニワトリ、マウス心臓での発現解析

1心房1心室のゼブラフィッシュ、2心房2心室のニワトリとマウスをモデルに、Tbx5、Tbx20 の発現パターンを詳細に解析し、違いがあるかどうかを検証する。

3) Tbx5 と相互作用する新規遺伝子の単離

ショウジョウバエの遺伝学的な解析から、ハエの T-box 遺伝子 Optomotor blind と相互作用すると思われる遺伝子がいくつか報告されている。このデータをもとに、脊椎動物でも高度に保存されているものをゲノムデータベース上で検索する。また、分子生物学的な解析を進め、新しい因子の単離に努める。

4) Tbx5、Tbx20 の発現調節領域の単離、同定

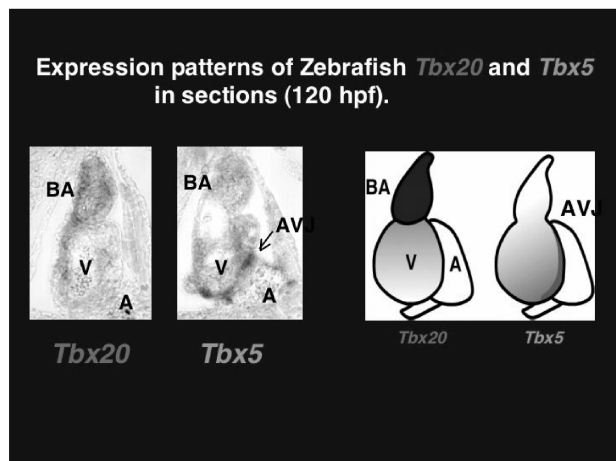
ゼブラフィッシュ、ニワトリ、マウス、ヒトのゲノム情報の比較から、Tbx5、Tbx20 遺伝子領域において、高度に保存されたいくつかのドメインを同定する。また、BAC クローンの購入によって、これらの領域を単離し、発現調節領域の解析を進める。

＜研究期間の成果＞

1) ゼブラフィッシュ、ニワトリ、マウス心臓での発現解析

ゼブラフィッシュ、ニワトリ、マウスの3種類の動物から Tbx5、Tbx20 遺伝子を単離した。それぞれの発現パターンを心臓において解析した結果、ゼブラフィッシュにおいては、両遺伝子ともに心室で発現が認められた。しかしながら、Tbx20 は Bulbus arteriosus (BA：マウス、ニワトリの大動脈に相当する outflow tract) に強い発現が認められ、心室では BA 付近でもっとも強く、心房側に行くに従って発現が減弱していた。Tbx5 の発現は、これと相補的な勾配を見せるように、心房と心室の境界付近でもっとも強い発現が見られ、BA 側に行くに従って発現が減弱していた (図3)。

図 3



このことは、ゼブラフィッシュにおいても、Tbx5、Tbx20 遺伝子は相補的に発現していることを示している。同時に、2心房2心室のニワトリ心臓では、両遺伝子は明確な発現境界を形成し、この境界部に心室中隔が作られて心室が二分されることを示唆している。事実、Tbx5 をニワトリ心室全体に強制発現させると、心室中隔が形成されず、完全な単心室と成ることが確認できた。このとき、本来右心室で発現する Tbx20 遺伝子の発現は抑制される。以上の機能的なデータから、Tbx5、Tbx20 遺伝子間には相互抑制的な関係が存在し、ニワトリにおいては、この抑制的關係をもとに明確な発現境界を作ることが2心室形成の基盤と成っているが、ゼブラフィッシュでは相互抑制的でありながらも、明確な発現境界ができないために心室中隔が形成されない可能性が出てきた。

この可能性を確かめるために、マウスでの Tbx5、Tbx20 の発現を確認したが、マウス心臓では、Tbx5 はニワトリ同様に左心室に局限するものの、Tbx20 は左右心室に均等に発現していた。このことは、マウス心臓では、Tbx5、Tbx20 間に、相互抑制的な関係が成立していないことを意味している。

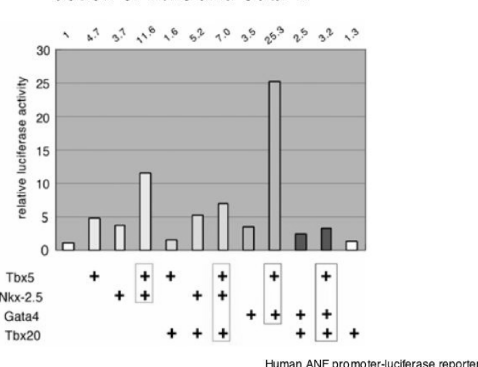
このような事実を説明する仮説の一つに、ゼブラフィッシュ、ニワトリ、マウスの Tbx5、Tbx20 は、別々の機能的進化を遂げ、異なる転写調節機能を獲得したと可能性が考えられた。この可能性を確かめるため、Tbx5 の標的遺伝子である Atrial Natriuretic Factor (ANF) のプロモーターを単離して、この遺伝子に対する調節能を確認した。ANF プロモーターに対し、Tbx5 は強い転写活性可能を示す。この性質は、ゼブラフィッシュ、ニワトリ、マウス、ヒトも Tbx5 を使って比較検討しても、全く差がなかった。Tbx5 は Nkx-2.5、GATA4 と協調的に働くことが報告されているが、これに関しても3者に違いは認められなかった。また、Tbx5 と Tbx20 を共発現した場合、ANF プロモーターの活性は著しく抑制され、Tbx20 は Tbx5 に対して抑制的に働くことを示唆している (図4)。このことは、ゼブラフィッシュ、ニワトリで両遺伝子が相補的に発現していることと符合している。この抑制化能に関しても、3者の Tbx5、Tbx20 に関して、違いは全く認められなかった。このことは、マウスの心臓では、何らかの要因で、この抑制化能が失われていることを意味している。すなわち、マウス左心室では、Tbx5、Tbx20 の両者が発現することから、心臓のこの領域では Tbx20 は Tbx5 の転写活性化能を抑制できなくなってい

ると考えられる。

以上の理由から、心臓の形態差は、Tbx5、Tbx20 遺伝子自体の進化というより、その転写調節能を調節する補助因子の変化による可能性、このような補助因子の機能を支配するシグナル伝達基盤の違いに由来するのではないかと考えられた。

図 4

Antagonistic action of Tbx20 against synergistic action of Tbx5 and Gata-4.



このような仮説を検証する目的で、Tbx5 と相互作用する新規遺伝子の単離を進めた。

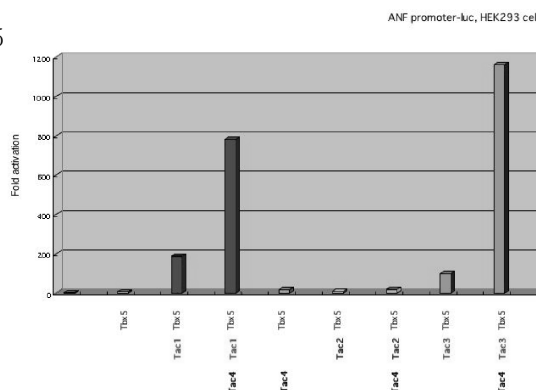
2) ゼブラフィッシュ、ニワトリ、マウス心臓での発現解析

ショウジョウバエの遺伝学的な解析から、ハエの T-box 遺伝子 Optomotor blind と相互作用すると思われる遺伝子がいくつか報告されている。このデータをもとに、脊椎動物でも高度に保存されているものをゲノムデータベース上で検索した。この結果、いくつかの遺伝子が保存されていることが明らかとなり、PCR、ライブラリースクリーニングによって複数単離した。

その中のいくつかを集中的に解析することとしたが、そのひとつの遺伝子 (Tac1) は、細胞質 (とくに細胞骨格) と核内に局在する蛋白をコードしていることがわかった。また、ゲノムデータベースの検索では、類似遺伝子が多数見つかり (Tac2、Tac3)、遺伝子ファミリーを形成していることが明らかとなった。

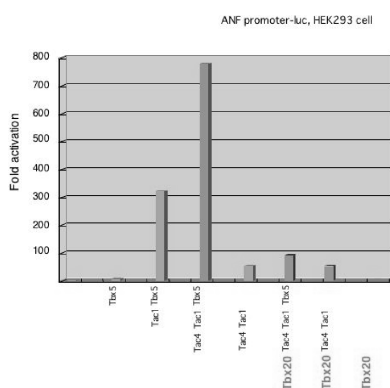
その後の解析から、Tac1、Tac3 は Tbx5 の転写活性可能を強力に強めるが、Tac2 にはその増強作用が全くないこともわかり、同じファミリーに属しながらも、その性質は異なっていることが明らかとなった。一方、解析を拡大するにつれ、Tac1、Tac3 は、その転写活性可能に全く異なるタイプの因子 (Tac4) を必要とすることもわかってきた。ANF プロモーターの転写活性可能でみると、Tac1、Tac4 が共に存在する条件で、Tbx5 は1000倍を超える、きわめて強力な転写活性可能を発揮することが見いだされた (図5)。

図 5



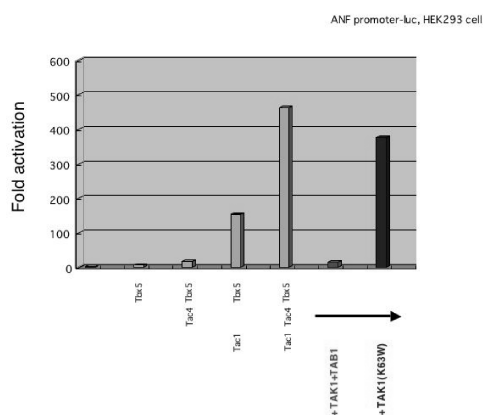
一方、Tat1、Tat4、Tbx5 による転写活性化能に対し、Tbx20 はやはり強い抑制化因子として働く (図6)。

図 6



また、Tat1、Tat4 の転写活性化能は、シグナル依存的であり、とくに、TGF β /BMP シグナルと関係が深いこともわかってきた。事実、TAK1/TAB1 存在下で、その強力な転写増強作用は完全に失われる (図7)。このことは、左右心室のシグナル状態が異なって Tbx5、Tbx20 の機能的な差を生み出している可能性と関連していると思われる。

図 7



さらに、興味深いことに、Tat1は、細胞に機械的な刺激をあたえると、細胞骨格から核内へ移動する、nucleo-cytoplasmic shuttling protein であった。心筋の発生は、心臓拍動、血流による mechanical stress に常にさらされており、この機械的な刺激が心臓の発生、成熟に重要な意味を持つことが以前から指摘されている。このことを考えあわせると、Tbx5 蛋白は、hemodynamic な mechanical stress の核内標的であり、我々の単離した新規遺伝子はその mediator である可能性が高い。また、Tbx5 は adult の心臓でも機能することから、高血圧などの hemodynamic stress によって遺伝子発現を制御し、心筋の hypertrophy、心筋の remodeling を調節するという、新たな機能が示唆される。そして、このような mechanical stress に対する適応の破綻が心不全であるともいえる。

また、Tat4 の機能も、シグナル状態ときわめて良く相関することがわかってきた。とくに、Tat4 は non-canonical Wnt シグナルによって、その機能が厳密に調節されていることだ見いだされた。このことは、ゼブラフィッシュ、ニワトリ、マウスで TGF β /BMP や non-canonical Wnt シグナル等の変化が、Tbx 蛋白の機能、ひいては心臓形態の差に結びつく可能性を示唆している。

本研究では、さらに新規遺伝子の単離を目指して検索、

クローニングを行い、複数個の候補遺伝子を単離して詳細な解析を加えている。

3) Tbx5、Tbx20 の発現調節領域の単離、同定

ゼブラフィッシュ、ニワトリ、マウス、ヒトのゲノム情報の比較から、Tbx5、Tbx20 遺伝子領域において、高度に保存されたいくつかのドメインを同定した。また、BAC クローンの購入によって、これらの領域を単離した。ゼブラフィッシュを用いた遺伝子発現系が確立できたことから、現在も、詳細に比較検討し、発現調節の分子メカニズムを解析している。

<国内外での成果の位置づけ>

Tbx5 遺伝子は Holt-Oram 症候群の原因遺伝子であり、本研究によってその発症メカニズムの一端が明らかとなった。心筋、心臓発生における Tbx 遺伝子の機能解析は、多角的な面から世界的に推進されており、現時点では転写因子としての Tbx 蛋白の転写調節機構、相互作用する未知の転写因子、GATA4 や Nkx-2.5 との相互作用の詳細に関心が移行しつつある。このような中で、本研究で明らかとなった Tbx 蛋白の転写因子としての分子機能が持つ意味はきわめて大きい。とくに、新規因子の単離は、直接先天性心疾患の原因遺伝子の解明にも結びつくことから、臨床的なアプローチも可能になってきており、事実、本研究中に、先天性心疾患の患児から調製された DNA で遺伝子診断を行なうプロジェクトがスタートしている。

また、転写因子の機能が、心筋に加わる機械的な刺激によって影響を受けるという概念の創出は、発生現象を考える上で、きわめて大きな知見であると考えられる。とくに、心臓は血流、血圧などの hemodynamic な機械的刺激を常に受けている器官である。そして、心臓の拍動による機械的刺激が、心臓の形態形成、心筋分化に影響を持つという多くの報告があり、本研究で得られた成果は、その分子実態に迫るものである。心臓の形態の動物種間の差は、遺伝子支配の差に加えて、微妙な形態の差や、機械的刺激の受容の差に起因する可能性も出てきたことから、今後の新しい展開が期待できる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

研究者が奈良先端科学技術大学院大学から東北大学に移動になったことに伴い、一定期間、実験が中止されたが、おおむね順調に研究できた。ただ、Tbx5、Tbx20 遺伝子の発現調節領域の解析は、トランスジェニックマウス等を用いた実験の必要性から、マウスでの研究系を立ち上げる必要が出てきた。このため、現研究室で、マウスを自由に扱えるための技術的な基盤を確立しようとしたが、これに時間を割かれて、比較生物学できなアプローチが十分にとれなかった。今後、そのような研究手法を発展させたいと願っている。ただ、新規遺伝子のノックアウトを行うための基盤技術はほぼ確立できたので、将来的にはたって、包括的な実験体系を取ることができるようになった。

<今後の課題>

1) ゼブラフィッシュを用いた実験

本研究でゼブラフィッシュを用いて mRNA やモルフォリーノオリゴを使った loss-of-function 実験や gain-of-function 実験が可能となった。また、ゼブラフィッシュ以外の動物種から遺伝子発現調節領域を単離して、その発現調節機構を解明する研究も行えることになった。本

研究では、このような手法による実験の成果を十分にあげることができなかったが、本研究で得られた新規遺伝子の機能解析も含めて、今後大きく発展する基盤を整備することができたと考ええる。

2) 新規遺伝子の機能解析

本研究で単離された新規の遺伝子について、前述したゼブラフィッシュの系での実験やノックアウトマウスの作製などを行い、詳細に解析する。これは、本研究で得られた成果の最も重要な部分であると考えている。

3) 機械的ストレスと心臓発生

本研究で、心臓発生における機械的、hemodynamic ストレスとの関連を、分子実態に迫りながら解析することが可能と成った。このテーマは、心臓発生、進化にとどまらず、心臓の生理機能といった医学的な側面も持っている。また、新規遺伝子の突然変異が、先天性心疾患の原因と成っている可能性も考え、今後、遺伝子診断も含めた医学的な展開が必要と成ってきている。現在、小児科との共同研究で、この遺伝子診断、先天性疾患の病因解明プロジェクトが開始されており、医学的な展開を進める。

4) 心臓形態の進化

心臓形態は、前述したように、動物種によって多様であり、これは固有の動物の棲息環境によっている。魚類は水中でえら呼吸を行い、両生類は水生から陸生に変化する。鳥類やほ乳類は陸生で肺呼吸を行う。このことは、心臓形態の進化が、呼吸様式と密接に結ぶついていることを意味している。同時に、心臓形態の進化と肺の進化は強制的に起こらなければ成らないことを示唆している。肺の発生は Tbx4 遺伝子によって規定されているという報告があり、複数の Tbx 遺伝子の協調的な進化が、重要な基盤となっている。今後、このような側面を意識し、Tbx 遺伝子全体の遺伝子進化と、形態の進化を総合的に研究することが必要であると考えている。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1) 論文

1、Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kida Y, Ogura T, Shimamura K, Nakafuku M.

Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the Pax6 transcriptional factor. Hum Mol Genet. 14, 1059-1068 (2005)

2、Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kohsaka S, Kida Y, Shiraishi T, Ogura T, Shimamura K, Nakafuku M.

The Pax6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. Hum Mol Genet. 14, 735-745 (2005)

3、Yasuyuki Kida, Tomoki Shiraishi and Toshihiko Ogura Identification of chick and mouse Daam1 and Daam2 genes and their expression patterns in the central nervous system.

Developmental Brain Research 153, 143-150 (2004)

4、Yasuyuki Kida, Tomoki Shiraishi, Takayuki Suzuki, Toshihiko Ogura

Chick Dach1 interacts with Smad1 and mSin3A to control AER formation and limb development along the proximal-distal axis.

Development 131, 4179-4187 (2004)

5、Mika Kamimura, Ken Matsumoto, Kazuko Koshiba-Takeuchi and Toshihiko Ogura

Vertebrate Crossveinless 2 is secreted and acts as a modulator of the BMP signaling cascade.

Developmental Dynamics 230, 434-445 (2004)

6、Takayuki Suzuki, Jun Takeuchi, Kazuko Koshiba-Takeuchi, and Toshihiko Ogura

Tbx genes specify posterior digit identity through Shh and BMP signaling.

Developmental Cell 6, 43-53 (2004)

7、Ken Matsumoto, Shigeki Nishihara, Mika Kamimura, Takao Otoguro, Masayuki Uehara, Yukiko Maeda, Keiko Ogura, Andrew Lumsden, and Toshihiko Ogura

The Iroquois prepatter gene Irx2 induces the complete transformation of tectum to cerebellum.

Nature Neuroscience 7: 605-612, 2004.

8、Shigeki Nishihara, Leo Tsuda and Toshihiko Ogura

The canonical Wnt pathway directly regulates NRSF/REST expression in chick spinal cord.

Biochemical and Biophysical Research Communications 311, 55-63 (2003)

9、Jun K. Takeuchi, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Makoto Ohgi, Hidetaka Shiratori, Ichiro Sakaki, Keiko Ogura, Yukio Saijoh, Toshihiko Ogura

Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis.

Development 130, 5953-5964 (2003)

10、Jun K. Takeuchi, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Takayuki Suzuki, Mika Kamimura, Keiko Ogura and Toshihiko Ogura

Tbx5 and Tbx4 trigger limb initiation through activation of the WNT/FGF signaling cascade.

Development 130, 2729-2739 (2003)

11、Toshihiko Ogura

In vivo electroporation: a new frontier for gene delivery and embryology.

Differentiation 70(4-5), 163-171 (2002)

12、Keiko Ogura, Ken Matsumoto, Asato Kuroiwa, Taku Isobe, Takao Otoguro, Vesna Jurecic, Antonio Baldini, Yoichi Matsuda and Toshihiko Ogura

Cloning and chromosomal mapping of human and chicken iroquois (Irx) genes.

Cytogenetics and Cell Genetics, 92 (3-4), 320-325 (2001)

2) その他の総説

- 1; 生体の科学 第56巻、第4号、272-279 (2005)
[特集]脳の遺伝子-どこでどのように働いているのか オーガナイザーFGF8シグナルを統合するIrx2遺伝子 松本健 小椋 利彦
- 2; 細胞工学 オーガナイザー FGF8シグナルを統合するIrx2 遺伝子 松本健、小椋利彦 第24巻、第5号、494-498 (2005)
- 3; 化学と生物 転写因子と形態形成ー細胞外シグナルの核内への伝達と器官形成の制御ー 木田泰之、小椋利彦 第42巻、第12号、807-813、(2004)
- 4; 加齢医学研究所雑誌 Tbx 遺伝子 進化と発生のdriving force 小椋利彦 第5巻、第1号、1-6、(2004)
- 5; 医学の歩み Topics 小脳形成を制驭するIrx2 遺伝子 第210巻、第11号、929 (2004) 小椋利彦
- 6; Bio Clinica Tbx 遺伝子がコントロールする器官形成、形態形成 第19巻、第8号、89-94 (2004) 小椋利彦
- 7; 整形・災害外科 分子レベルからみた整形外科疾患 Tbx 遺伝子と肢芽形成誘導 第46巻、第1号、2-3 (2003)
- 8; 遺伝子医学別冊 分子生物学実験シリーズ 図・写真で見る発生・再生実験マニュアル ニワトリ網膜視蓋投射解析法 134-144 (2002) 小柴和子・竹内純・小椋利彦
- 9; 医学のあゆみ 第199巻、第13号、876-882 (2001) 器官の極性決定と Tbx 遺伝子 竹内純、小柴和子、小椋利彦
- 10; 生体の科学 第52巻、第3号、210 - 215 (2001) 鳥類神経系のパターン形成に關与する Irx 遺伝子群 松本健、小椋利彦