

比較ゲノム解析による軸決定進化プロセスの解明

●松尾 勲

大阪府立母子保健総合医療センター研究所

<研究の目的と進め方>

進化上保存された非翻訳ゲノム領域の機能を明らかにするため、前後軸形成過程で働く遺伝子のシグナル領域が進化の過程でどのような役割（保存性と多様性）を担っているのかを明らかにする。具体的には、脊椎動物のなかで哺乳動物胚（マウス）と硬骨魚類（トラフグ、ゼブラフィッシュ）胚を比較して、体軸決定過程で初期内胚葉系列での発現制御に関わるゲノム配列とその遺伝的システムが種を超えてどの程度保存されているかを検討する。特に、脊椎動物のゲノムの中で最もコンパクトなトラフグゲノムを用いて、非翻訳ゲノム領域の機能をトランスジェニックマウス及びトランスジェニックゼブラフィッシュを作成して解析する。また、マウス胚の臓側内胚葉が硬骨魚類胚においてその胚発生上での組織が起源となっているのか、更には、マウス胚の臓側内胚葉が体軸形成においてどの程度保存された機能を担っているのかについても Wnt 関連分子が果たす役割等に注目して検討する。以上の解析を通じて、哺乳動物へ至る体軸決定の進化プロセスを明らかにしたい。

<2007 年度の研究の当初計画>

i) マウス胚軸形成における Wnt シグナルの解析。

両生類や魚類を初めカノニカル Wnt シグナルを片側で抑制することが体軸（背腹軸）形成に重要な過程であることが知られているが、遺伝子機能が重複していることもあり、カノニカル Wnt シグナルの軸決定プロセスにおける詳細な機能は依然として不明である。現在までに、マウス胚においてはカノニカル Wnt とその拮抗因子が細胞移動に反発性及び誘引性因子として関与していることを明らかにしている。そこで、マウス胚において、カノニカル Wnt リガンド、拮抗因子、それらのメディエーターの発現を mRNA レベル及びタンパク質レベルで、詳細に解析する。また、これら Wnt シグナル関連分子の機能を解明するため、Wnt 関連分子を過剰に発現したトランスジェニックマウスなどを作成し、その表現型を解析する。以上の解析から、他の脊椎動物で示されているカノニカル Wnt シグナルによる軸決定プロセスが哺乳動物でどの程度保存され、多様化したのかを検討する。

ii) ゼブラフィッシュ胚におけるフグゲノム領域の機能解析。

マウス及びフグの *Otx2* 遺伝子の非翻訳ゲノム領域（シス制御領域）の機能をゼブラフィッシュ胚に用いて解析する。特に、臓側内胚葉での発現を支配するフグ *Otx2* ゲノム領域と GFP をレポーター遺伝子として持つトランスジェニックゼブラフィッシュの発現解析を行ってきた。*Otx* 以外のマウス臓側内胚葉特異的に発現する遺伝子の発現をゼブラフィッシュ胚においてホールマウント in situ ハイブリダイゼーション法や RT-PCR 法を用いて、解析する。以上の発現解析を通じて、軸形成に重要な働きをしているマウス胚の臓側内胚葉組織が進化上、どのようなプロセスを経て形

成されるようになったのか示唆を得る。

<2007 年度の成果>

i) 初期原条期のマウス胚では beta-catenin の発現が前方で低下し、後方で昂進することを明らかにしている。そこで、前後軸極性化に異常をしめす *Foxa2* ホモ変異胚において、beta-catenin の発現を詳細に解析した。その結果、*Foxa2* ホモ変異胚では、*Otx2* ホモ変異胚同様、軸に沿った非対称な beta-catenin の分布が失われていた。しかし、*Foxa2* ホモ変異胚は、*Otx2* ホモ変異胚とは異なり、初期神経胚期には一時的に前方領域（前脳）が形成される。この一見すると矛盾した表現型の差異を明らかにするため、前脳の形成に関与している前方中内胚葉組織の分子マーカーで両変異体を解析した。その結果、*Otx2* ホモ変異胚では、発現が認められない *Dkk1* 遺伝子が、*Foxa2* ホモ変異胚では、野生型と比べてもより昂進して発現していた。*Dkk1* 遺伝子はカノニカル Wnt シグナルの拮抗因子として beta-catenin の分解を促すことから、*Foxa2* ホモ変異胚において、前方形成に必要な beta-catenin の低下は、異所的な *Dkk1* 発現によってもたらされていることが強く示唆された。以上の結果は、マウス臓側内胚葉においてカノニカル Wnt シグナルの拮抗因子である *Dkk1* 遺伝子は、前後軸形成過程で、将来の前側に特異的に発現し、前後軸の形成に重要な機能を担っているという我々の仮説を強く支持する。更に、前方中内胚葉におけるカノニカル Wnt シグナルが、前方（前脳）形成においても、必須な機能を担っていることを示唆している。つまり、他の脊椎動物において報告されていたカノニカル Wnt シグナルの前後軸形成における機能は哺乳動物への進化の過程でも保存されていると考えられる。

次に、カノニカル Wnt リガンドであるマウス *Wnt8A* とその拮抗因子である *Dkk1* を過剰に発現したマウス胚の表現型を解析した。これらのマウスでは、原条形成以前に前後軸形成に異常がみとめられることを報告していたが、更に、前脳形成過程において異常がみられることを明らかにした。具体的には、*Dkk1* 遺伝子を過剰に発現させると前脳領域が拡大し、*Wnt8A* を過剰に発現させると逆に縮小していた。前後軸に沿った神経上皮マーカーを用いて解析したところ、*BFI* や *Six3* などの前脳特有な発現が、*Dkk1* 発現マウスでは拡大し、*Wnt8A* 発現マウスでは縮小していた。これらの結果は、他の脊椎動物で示されてきたカノニカル Wnt シグナルの抑制が前脳領域の形成に関与するというモデルとよく一致し、進化的にも保存された機構であることが示唆される。

ii) 現在までに、*Otx2* 遺伝子の臓側内胚葉における発現を支配するフグ 1.1kb ゲノム断片がゼブラフィッシュ胚においてどのような機能を担っているか検討するため、トランスジェニックゼブラフィッシュを作製している。レポーター遺伝子の発現を、*Otx1,2,3* などの内在性の遺伝子発現と比較したところ、フグ 1.1kb ゲノム

断片によって支配されたレポーター発現は、*Otx* 遺伝子群の発現ドメイン内に含まれていること、更に、内在性の *Dkk1* 遺伝子の発現と極めて類似していることが分かった。この結果は、小型魚類においてもカノニカル Wnt シグナルが関与する前後軸決定機構が、シス配列のレベルで、更には転写因子のレベルで保存されている可能性が示唆される。

<国内外での成果の位置づけ>

i) 今回、我々は、マウスの臓側内胚葉における *Otx2* 遺伝子の発現にフォークヘッドファミリーの転写因子である *Foxa2* が直接 *Otx2* 遺伝子の発現を支配することで前後軸決定を担っていることを明らかにした。現在までに、ホヤの *otx* 遺伝子の内胚葉系列での発現がフォークヘッドファミリーの結合配列によって制御されていることを共同研究者とともに明らかにしている (Oda-Ishii et al., *Development* 2005)。更に、ホヤのフォークヘッドファミリー転写因子 *FoxAa* が、*otx* 遺伝子や Wnt 拮抗因子と考えられる *sFRP1/5* を制御することで、前方領域の形成に働いていることが示された (Lamy et al., *Development* 2006; Imai et al., *Science* 2006)。以上の結果は、脊索動物の尾索類から脊椎動物のほ乳類に至る進化の過程で、軸決定、特に前方決定のプロセスが *Foxa2*-*Otx2* 遺伝子カスケードを介した、Wnt シグナル抑制メカニズムが保存されてきたことを強く示唆している。

ii) 我々はフグ *Otx2* 遺伝子周辺の非翻訳領域に脊椎動物間で保存された 7 つの配列を報告している (Kimura-Yoshida et al. *Development* 2004)。最近、このように脊椎動物間で保存されたフグ非翻訳ゲノム配列が約 1400 箇所のクラスターとして *Otx2* 以外の多くの発生制御遺伝子周辺に存在することが明らかにされた (Woolfe et al. *PLoS Biol.* 2005)。また、魚類を用いた統計遺伝学的な解析から、発生制御遺伝子周辺の非翻訳ゲノム領域の変異に伴う遺伝子発現の変化が、脊椎動物の形態進化に極めて重要な役割を担っていることが示唆された (Shapiro et al., *Nature* 2004; Shapiro et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006)。今後、前後軸決定に関わる遺伝子の非翻訳ゲノム領域の機能を詳細に種間で比較解析することで、脊椎動物の軸決定の進化プロセスを解明できると期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

マウスの前後軸決定過程において、カノニカル Wnt シグナルの関連分子の発現を発生過程で詳細に解析するため、蛍光タンパク質などをマーカーとする遺伝子組み換えマウスを作製する必要がある。現在、ベクターの構築中であり、早急に発現解析に必要なマウスを樹立したい。

<今後の課題>

i) Wnt 関連分子の発現を蛍光タンパク質なので観察可能な遺伝子組み換えマウスをすることで、より詳細に、発現を解析したい。更に、カノニカル Wnt リガンドやその拮抗因子を過剰に発現したトランスジェニックマウスにおいて観察された前脳領域の形成異常が、Wnt シグナルが果たす細胞レベルでのどのような機能が阻害されることによって生じた結果であるのか、各種マーカーなどを用いて、詳細に表現型を解析することで、明らかにしたい。

ii) 臓側内胚葉での発現を支配するフグ *Otx2* ゲノム領域と GFP をレポーター遺伝子を持つトランスジェニックゼブラフィ

シュの発現解析を行ってきた。今後、このゼブラフィシュ胚での GFP の発現を他の発生段階も含め、共焦点レーザー顕微鏡等を用いて詳細に解析する。また、マウス臓側内胚葉特異的なマーカー遺伝子である、引き続き、*hex*, *gooseoid*, *Dkk1*, *Fox* や *Lhx* 等の発現をゼブラフィシュ胚においてホールマウント in situ ハイブリダイゼーション法や RT-PCR 法を用いて、詳細に解析する予定である。

以上の解析から、他の脊椎動物で示されているカノニカル Wnt シグナルによる軸決定プロセスが哺乳動物でどの程度保存され、多様化したのかを、非翻訳ゲノム領域の遺伝子発現制御機能に注目して明らかにしたい。

<成果公表リスト>

1) 論文 / プロシーディング

- 0601231946
C. Kimura-Yoshida, H. Nakano, D. Okamura, K. Nakao, S. Yonemura, J. A. Belo, S. Aizawa, Y. Matsui and I. Matsuo
Canonical Wnt signaling and its antagonist regulate anterior-posterior axis polarization by guiding cell migration in mouse visceral endoderm.
Developmental Cell 9, 639-650 (2005)
- 0612211747
松尾 勲, 向井 一寛, 中野 博, 木村一吉田 千春
顔面頭蓋奇形に関わる遺伝子座
大阪府立母子保健総合医療センター雑誌 21, 75-79 (2005)
- 0702201627
C. Kimura-Yoshida, E. Tian, H. Nakano, S. Amazaki, K. Shimokawa, J. Rossant, S. Aizawa and I. Matsuo
Crucial roles of *Foxa2* in mouse anterior-posterior axis polarization via regulation of anterior visceral endoderm-specific genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 5919-5924 (2007)
- 0801230845
S. Sato, T. Inoue, K. Terada, I. Matsuo, S. Aizawa, Y. Tano, T. Fujikado and T. Furukawa.
Dkk3-Cre BAC transgenic mouse line: A tool for highly-efficient deletion in retinal progenitor cells.
Genesis 45, 502-507 (2007)
- 0801230850
C. Koike, A. Nishida, S. Ueno, H. Saito, R. Sanuki, S. Sato, A. Furukawa, S. Aizawa, I. Matsuo, N. Suzuki, M. Kondo, and T. Furukawa
Functional roles of *Otx2* transcription factor in postnatal mouse retinal development
Mol. Cell. Biol. 27, 8318-8329 (2007)

<公開 URL>

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/inst-mch/Byo/Byo.html>