

Sox 遺伝子の機能と発現制御機構の多様化から探る系統発生のゲノム基盤

●蒲池 雄介 ◆内川 昌則 ◆近藤 寿人

大阪大学 大学院生命機能研究科

<研究の目的と進め方>

脊椎動物の複雑で多様な体制の成り立ちを理解するには、その進化の過程でゲノムに起こった遺伝子の重複と倍加、さらにそれに引き続く遺伝子の機能と発現調節の変化が、体制を形作る基礎となる初期発生システムに対して、如何に影響を与えているかを知る必要がある。本研究では、初期発生システムで重要な役割を果たしている遺伝子に注目して、

(1) 遺伝子の重複・倍加にともない個々の遺伝子に生じた発現調節とタンパク質機能の多様化、

(2) 動物種の多様化の過程で保存されている発現調節機構と種特異的な調節機構、

(3) 発現調節の多様化と発生様式の違いとの関連

について研究し、脊椎動物における系統発生のゲノム基盤を探る。特に、神経系と感覚器の発生に重要な役割を果たしているグループBの Sox 遺伝子ファミリーに注目して、ゼブラフィッシュ・ニワトリ・マウスを用いて比較ゲノム解析をおこなう。

グループB Sox 遺伝子群を含むゲノム領域の比較分析により、グループBの祖先遺伝子の tandem duplication がもともとあってB1とB2が生じ、さらに2度の genome duplication とB2メンバーの一部脱落によって、現在のメンバーであるB1(Sox1/2/3/19)とB2(Sox14/21)になったことが示されている。哺乳類の Sox15 は、B1メンバーとは大きく異なるためグループGに分類されるが、魚類 sox19 とオースログの関係にある。この過程では、タンパク質機能の二極化(転写活性化因子B1と抑制因子B2)、また遺伝子の構成(種間)と発現パターン(パラログ間、種間)に多様化が起こっていることから、グループB Sox は遺伝子進化の格好の研究対象となる。これらの結果を踏まえて本研究では、グループBのSOX因子群について、転写因子としての機能、発現パターン、各遺伝子のエンハンサー(発現制御配列)をさまざまな生物種で総合的に解析し、系統発生と個体発生の多様化の元となっているゲノム基盤を明らかにしようという、学際的な立場での研究を進める。

<2007年度の研究の当初計画>

グループBの Sox 遺伝子群の発現制御配列とタンパク質機能の比較解析を、動物種間、パラログ間、およびB1とB2間で体系的に行い、(1)単一の祖先遺伝子から、発現パターンの共通性と差異が如何にして同一グループ遺伝子群に生じたのか、(2)種間でのオースログの発現パターンの共通性と違いはどのように生じたのか、(3)タンパク質機能の保存と多様化、について研究する。ニワトリ、ゼブラフィッシュ、マウスを中心なモデル動物として利用するとともに、他の生物種のゲノム情報も駆使して研究を進める。以下の項目について重点的に解析を進める。

グループB1 Sox 遺伝子群の発現制御機構の比較解析

Sox2, Sox3 は、ニワトリ・マウスでは中枢神経系の原基全体で発現されるが、これに相当する発現がゼブラフィッシュでは sox19 にみられる。この研究項目では、これまでのニワトリ Sox2 遺伝子のエンハンサー群の詳細な解析結果を踏まえて、(1)Sox2 の発現制御の種間での共通性と差異の解明、(2)ニワトリ Sox3 遺

伝子およびゼブラフィッシュ sox19 遺伝子の発現制御配列の探索と Sox2 の制御機構との比較を行い、種間・パラログ間での制御の共通性と差異の解明を行う。また、羊膜類と魚類の間でどのように Sox の役割分担が進化の過程で起こったのかを解明する。

グループB1 Sox の遺伝子・タンパク質機能の比較解析

ゼブラフィッシュは、ゲノムの倍加により生成したB1 sox の4パラログ遺伝子群を完全に保持しており、遺伝子構成が sox1a,1b,2,3,19a,19b (a, b は魚類で起こったゲノム倍加により生じたもの)となっている。発現パターンの解析結果を考え合わせると、機能の分担が羊膜類より進んでいると考えられる。この項目では、ゼブラフィッシュ胚において体系的な遺伝子機能のノックダウンを行い、パラログ間の機能の重複と分担についての解析を行うとともに、種間における機能の保存と差異を研究する。

グループB1とグループG (Sox15) の比較解析

オースログ間の違いが最も大きい sox19 と Sox15 の発現パターンとタンパク質の転写制御活性の比較を通して、進化における保存と変遷を解析する。

グループB1とB2の比較解析

tandem 重複により生じたと考えられるグループB1とB2の発現制御配列の比較解析より、類似した発現をもたらす分子基盤を理解する。

<2007年度の成果>

Sox2 遺伝子の発現制御配列の解析と種間での保存

Sox2 の神経系での発現は、マウス・ニワトリとゼブラフィッシュでは大きく異なっている。前者の動物種では、Sox2 の発現が神経系全体を覆うが、後者では sox19 がその役割を果たしており、sox2 の強い発現は前方の中枢神経系に限られる。したがって、Sox2 遺伝子の発現制御機構は、種の特徴を色濃く反映していることが予想される。ニワトリ Sox2 遺伝子の周辺約200 kb のDNA領域で発現制御配列の探索を行ったところ、中枢神経系、感覚器の原基で活性をしめすエンハンサーを数多く同定することに成功した。これらのエンハンサーを詳細に解析したところ、活性領域が重なるものが数多く存在することがわかった。これは、Sox2 の発現は、胚発生における、ある特定の時期、部位においてさえも、複数のエンハンサーにより制御されている可能性が高いことを示す。

さまざまな生物種間でのゲノム比較を行ったところ、哺乳類・鳥類間で保存されている多数のエンハンサー群の多くは、両棲類でも保存されているが、魚類ではその一部のみが保存されていることが見出された。哺乳類から魚類まで保存されているエンハンサー(N-2など)について、実際にその活性も保存されているかを調べたところ、ニワトリ・マウスの配列がゼブラフィッシュ胚でも類似した活性を持つことが確認された。また、興味深い点としては、鳥類と両棲類間でのみ保存されているエンハンサー配列や、鳥類・両生類およびヒトでは保存されているが、マウスでは保存されていない配列なども見出された。このことは、主要なエンハンサーは動物種間でよく保存される傾向にあるが、一方で特定の種間でのみ保存されているエンハンサーも存在することを示

している。また、これは *Sox2* の発現パターンが動物種ごとに細部では異なることを反映していると思われる。

Sox3 遺伝子の発現制御配列の探索

Sox3 は、中枢神経系の発生過程において *Sox2* と類似した発現を示す。また、興味深い点としては、動物種間で比較すると、*Sox2* と *Sox3* の発現が置き換わっている場合がしばしば見られる。これらのパラログ間での発現調節システムの保存と差異を明らかにするため、ニワトリ *Sox3* 遺伝子の制御配列の探索に着手した。*Sox2* 同様、*Sox3* も遺伝子砂漠に存在しているが、その周辺 250 kb のゲノム領域には他の生物にも保存されている配列が多く存在する。したがって、このゲノム領域について、ニワトリ胚を用いたエレクトロポレーション法により、エンハンサー活性を持つ配列の探索を行っている。現在のところ、興味深い活性パターンを持つ複数の断片を得ている。

グループ B1 Sox の遺伝子機能の比較解析

グループ B1 Sox の遺伝子機能について、各パラログの個性とパラログ間における機能補完を解析するために、ゼブラフィッシュ胚においてモフォリノオリゴヌクレオチド (MO) による遺伝子活性のノックダウンを体系的に実施した。初期胚で働く *sox2*, *3*, *19a*, *19b* について、1 遺伝子ずつをノックダウンした場合は、ほとんど胚発生に影響を与えなかったが、4 遺伝子を同時にノックダウンすると、中枢神経系の形成を含め胚発生に著しい異常が見られた。一方、3 遺伝子をノックダウンした場合には、残りの 1 遺伝子の発現が行われる時期・部位では、弱い影響しか見られなかった。したがって、4 遺伝子の内一つでも働き得る状況では、発生は比較的正常に進行すると考えられる。また、発生の初期には発現がない *sox1a/b* を含めて、いずれかの *sox* mRNA を同時に導入することで、ノックダウン胚はかなりレスキューされることが分かった。したがって、各遺伝子がコードするタンパク質の分子機能には大きな違いはなく、各遺伝子の個性は主に発現時期とパターンの違いに基づくと考えられる。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究は、グループ B Sox 遺伝子群に関しての多岐にわたる当該グループの研究が基礎となっている。具体的には、(1) 転写制御因子としての B1 SOX の詳細な機能解析をおこない、B1 SOX による転写活性化は、発生プロセスに応じたパートナー因子との協調作用を必要とする、(2) *Sox2* 遺伝子の複雑な発現制御が、多数のエンハンサーによりもたらされること、そのエンハンサーの予測に、適切な系統上の距離を持つ動物種のゲノム配列の比較が有効である、ことなどを世界に先駆けて示してきた。さらに、本研究では、遺伝子の倍加にともなったパラログ遺伝子群の創生、またパラログ遺伝子の動物種間での差別的な使用に対応した、エンハンサー群の保存性を示した。動物種間での発生システムの原理的な普遍性と、種間で見られる形態の多様性を比較ゲノムの観点から解明して行く基盤をつくった。一つの研究グループ内で、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュの胚の遺伝子操作を用いた研究を並行して行うことで、非常に効率的でユニークな研究が行え、比較ゲノム学、機能ゲノム学分野における貢献が今後も期待できる。また、本研究により *Sox2* 遺伝子座は、脊椎動物の中で制御配列が最もよく分かっているゲノム領域の一つとなっており、実際オポッサムゲノムを比較解析した論文 (Mikkelsen et al., 2007, Nature) でも取り上げられている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

グループ B1 と B2 およびグループ G SOX のタンパク質機能の *in vivo* における比較をゼブラフィッシュのノックダウン胚のレス

キューに基づいて行う予定であったが、回復の指標を明確に定めることが困難であった。現在、遺伝子レベルでの発現の回復を指標にすることで、タンパク質機能の比較を進めている。

<今後の課題>

これまでの研究は、グループ B Sox 遺伝子群のうち、発現制御配列については、主にニワトリ *Sox2* 遺伝子を対象とし、遺伝子機能については、主のグループ B1 Sox 遺伝子群の解析をゼブラフィッシュ胚を用いて行った。発現制御配列の解析については、ニワトリにおいて *Sox2* と一部類似した発現をしめす *Sox3* の発現制御配列の詳細な解析を現在進行させている。今後は、ゼブラフィッシュにおいては主要な B1 Sox となっている *sox19a/b* の発現制御配列の解析も行うことで、パラログ間における発現制御の保存と差異の分子基盤を明らかにしていく。また、B1 Sox と B2 Sox のゲノム配列の単純な比較による保存配列の同定は今のところ出来ておらず、既存の配列比較プログラムでは見出されない程度の類似性しか残っていない可能性があるため、制御配列を実験的に探索する必要がある。遺伝子機能については、より対象を拡張し B2 Sox を含めて解析を行い、B1 Sox と B2 Sox が、どのように異なる機能を持つようになったのかを明らかにする。この解析には、ゼブラフィッシュ胚におけるノックダウンおよびそのレスキュー実験を活用する。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 0801291104

Inoue, M., Kamachi, Y., Matsunami, H., Imada, K., Uchikawa, M., Kondoh, H. PAX6 and SOX2-dependent regulation of the Sox2 enhancer N-3 involved in embryonic visual system development. *Genes Cells*. 12, 1049-1061. (2007)

2. 0801291014

Kamachi, Y., Okuda, Y., Kondoh, H. Quantitative assessment of the knockdown efficiency of morpholino antisense oligonucleotides in zebrafish embryos using a luciferase assay. *Genesis*. 46, 1-7. (2008)