

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 ◆吉田 千春

地方独立行政法人 大阪府立病院機構 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コードゲノム領域の機能を解析することを通じて、前後軸形成過程で働く遺伝子のシスゲノム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、パブリックなゲノムデータベースが公開されている脊椎動物（主に哺乳動物胚と他の脊椎動物胚）を比較して、固有に保存されている非コードゲノムエレメントの機能を、トランスジェニックマウスを作成し、その表現型を解析することによって、体軸決定過程での臓側内胚葉等における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解明する。また、Wnt 関連分子が体軸形成において、どの程度保存され、又は多様化した機能を担っているのかについて、マウスの前脳形成過程に注目して検討する。以上の解析を通じて、哺乳動物へ至る前後軸決定の進化プロセスを明らかにしたい。

< 2008 年度の研究の当初計画 >

- i) マウス胚前後軸形成におけるWntシグナルの機能解析。両生類や魚類においてカノニカルWntシグナルを片側で抑制することが体軸（背腹軸）形成に重要なプロセスであることが知られているが、哺乳動物においては遺伝子機能が重複していることもあり、詳細は依然として不明である。そこで、前後軸決定にキーとして働くカノニカルWntシグナル分子がどのような役割を果たしているのかを明らかにする。具体的には、マウス胚においてカノニカルWntリガンド、その拮抗因子である*Dkk1*を過剰に発現したトランスジェニックマウスの表現型を詳細に解析する。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、多様化しているのかを明らかにする。
- ii) 保存された非コードゲノム領域の比較機能解析。マウス*Dkk1*遺伝子はカノニカルWntの拮抗因子として、前後軸形成過程において哺乳動物に特徴的な前方臓側内胚葉と呼ばれる組織で特異的に発現する遺伝子である。そこで、異種間で保存された*Dkk1*遺伝子周辺のゲノム断片をマウス胚に導入し、臓側内胚葉組織における発現に与える影響を比較解析することで、保存された非コードゲノム領域の果たす機能を明らかにする。特に、発生制御因子のシス領域はゲノムの数百キロベースに渡って散在していることが多いため、BACを用いた制御領域の同定を行う予定である。以上の解析から、脊椎動物間で保存、多様化した非コードゲノム領域の軸決定プロセスにおける進化的な意義を解明する。更に、他の脊椎動物種における機能を明らかにするために、マウス以外の脊椎動物種を用いても、非コードゲノム領域の機能解析を行う。特に、フグ等の非コードゲノムエレメントの機能をゼブラフィッシュ胚を用いて解析する。既に、フグゲノム領域に存在するマウス臓側内胚葉での発現調節領域を用いて、GFPをレポーター遺伝子としたトランスジェ

ニックゼブラフィッシュを作製している。そこで、作製したゼブラフィッシュ胚における発現を詳細に解析する。また、マウスの臓側内胚葉特異的なマーカー遺伝子の発現についても詳細に解析する。以上から、マウス胚の前後軸決定機構が進化上、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について示唆を得る。

< 2008 年度の成果 >

- i) カノニカルWntリガンドであるマウス*Wnt8A* cDNAとその拮抗因子である*Dkk1* cDNAをユビキタスに発現するCAGプロモーターの下流で発現させたトランスジェニックマウス胚の表現型を解析した。トランスジェニックマウスは、組み換えタンパク質であるCreを発現するマウスと交配させて得られた子孫でのみ、特異的に*Wnt8A*や*Dkk1*が発現するように、プロモーターとこれらのcDNAの間にloxP配列で挟まれたlacZ遺伝子を挿入した。実際、得られたトランスジェニックマウスでは、ユビキタスに*Wnt8A*や*Dkk1*の発現が観察された。これらのトランスジェニックマウス胚の表現型を観察すると、前脳形成時期において顕著な異常を示すことが分かった。前後軸に沿った神経上皮マーカーで発現解析を行ったところ、*Dkk1*過剰発現胚では、終脳マーカーである*Six3*の発現領域が拡大し、結果として間脳、中脳、後脳領域のマーカーである*En2*, *Fgf8*, *Wnt1*や*Irx2*の発現領域は、野生型に比べてより後方にシフトしていた。つまり、*Dkk1*遺伝子を過剰に発現させると、将来終脳になる領域が拡大することが分かった。一方、*Wnt8A*過剰発現胚では、終脳マーカーである*Six3*の発現領域が退縮し、中脳、後脳マーカーである*En2*, *Fgf8*や*Gbx2*の発現領域が前側にシフトしていた。この結果、*Wnt8A*を過剰に発現させると終脳領域が縮小することが明らかになった。更に、カノニカルWntシグナルのレポーターマウスと交配し、トランスジェニックマウス胚におけるWnt活性を解析したところ、野生型胚と比べて、*Dkk1*過剰発現胚では顕著なWnt活性の低下が、*Wnt8A*過剰発現胚では、活性の昂進が認められた。以上の知見を考え合わせると、哺乳動物胚において、カノニカルWnt活性を抑制すると終脳領域が拡大し、逆に活性化すると終脳領域が縮小することが強く示唆される。

次に、実際どのような細胞レベルでの現象を介して、Wntシグナルが前脳の大きさを制御しているのか明らかにするため、より詳細な解析を行った。まず、連続組織切片を作製し、終脳の形成過程における外胚葉組織の形態を観察したところ、頭部の神経管が閉鎖する時点で既に、前脳の大きさに有意な差があることを見いだした。さらに、光学顕微鏡レベルの解析及び電子顕微鏡レベルの解析を行ったところ、表皮外胚葉と神経上皮の境界が曖昧になり、表皮外胚葉の一部がより神経上皮に類似した形態を示していることが分かった。この結果は、Wntシグナルが、神経上皮と表皮外胚葉の運命決定に何らかの機能を果

たしていることを強く示唆している。

今回得られた知見は、他の脊椎動物で示されてきたカノニカル Wnt シグナルの抑制が終脳領域の形成に関与するという分子メカニズムは、進化的にも保存されていることを示している。更に、哺乳動物胚においては、他の生物種においては詳細を明らかにできなかった Wnt シグナルの細胞レベルでの機能を新規に示唆するものでもある。

- ii) 哺乳動物胚において、もっとも最初に前後軸決定がなされる組織は、臓側内胚葉と考えられている。現在までに、臓側内胚葉内の前後軸に沿った Wnt シグナルの非対称性が、軸決定に重要な機能を果たしていることを明らかにしてきた。そこで、Wnt シグナルの非対称な分布がどのような非コードゲノム機能の獲得で起こったのかを解明するため、キーとなっているマウス *Dkk1* 遺伝子の臓側内胚葉における発現制御機構の解析を行った。まず、*Dkk1* 遺伝子の非コードゲノム領域 (-124kb ~ +99kb) をもつ BAC ベクターを用いて、大腸菌内の相同組み換え法を用いて、*Dkk1* 遺伝子産物と融合するようにレポーター遺伝子 (蛍光タンパク質 YFP の一種 Venus) を挿入した BAC ベクターの構築を試みた。また、*Dkk1* 遺伝子座全体を他の脊椎動物種の非コード領域と比較することで、10 以上の高度に保存された非コード領域を見いだした。

また、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 ゲノム断片がトランスジェニックゼブラフィッシュ胚において特有な発現を支配することを見いだしている。このレポーター遺伝子の発現について、マウスの臓側内胚葉特異的に発現する遺伝子群 (*hex*, *Dkk1*, *gooseoid* 等) のゼブラフィッシュ相同遺伝子の発現と比較解析したところ、極めて類似することが分かった。この結果は、マウスの前後軸決定機構に関わる分子群が、小型魚類においても、シス配列及び転写因子の両レベルで保存されている可能性が強く示唆された。

<国内外での成果の位置づけ>

Wnt シグナルの前後軸決定における機能に関しては、他の脊椎動物において前脳領域の形成に関与していることが明らかにされているが、実際にどのような細胞レベルの役割によって、前脳の大きさを制御しているのかは全く不明であった。今回、詳細な解析から、外胚葉が、将来前脳となる神経上皮細胞と表皮となる外胚葉へと分かれる運命決定に重要な機能を果たしていることが示唆された点で、貴重な発見であると考えられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

当初、*Dkk1* 遺伝子産物の機能解析を行う必要性から、大腸菌内での BAC 組み換え体には、内在性遺伝子との融合タンパク質となるコンストラクを作製していたが、BAC 内部での反復配列によるアバラントな組み換え等により、適切な BAC コンストラクトが得られていない。現在、i) 異なるゲノム領域を含む BAC クロームを用いてのコンストラクトの作製、ii) 融合タンパク質でなく、内在性遺伝子を完全に除去する形でのコンストラクトの作製を進めており、来年度にはトランスジェニックマウスでの発現解析を行える予定である。

<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、より詳細な発現解析を行いたい。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、細胞レベルでの特異的マーカー (分化、極性、増殖) 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。更に、表現型が、カノニカル経路とノンカノニカル経路のどちらに依存しているかについては、それぞれの経路の変異体との遺伝学的な相互作用を解析することで明らかにしたい。

- ii) 臓側内胚葉内での前後軸極性を支配する非コードゲノム領域の機能解析に関しては、BAC ベクターを用いた領域全体の機能解析と種間で保存された固有な非コード配列との両面で解析を進める。これらの非コード領域の *Dkk1* 遺伝子発現に与える影響に関して、トランスジェニックマウスを作製することで、検討したい。

以上の解析から、他の脊椎動物で示されている 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

- 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)
- 0806201308
T. Sasaki, H. Nishihara, M. Hirakawa, K. Fujimura, M. Tanaka, N. Kokubo, C. Kimura-Yoshida, I. Matsuo, K. Sumiyama, N. Saitou, T. Shimogori, and N. Okada. Possible involvement of SINEs in mammalian-specific brain formation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 4220-4225 (2008)
- 0901041903
S. Sugiyama, A.A. Di Nardo, S. Aizawa, I. Matsuo, M. Volvitch, A. Prochiantz, and T. K. Hensch. Experience-dependent transfer of *Otx2* homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity.
Cell, 134, 508-520 (2008)

<公開 URL>

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