

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。さらに、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。

<2008年度の研究の当初計画>

グループB Soxは、祖先型の遺伝子からゲノムの重複と倍加を通して、B1 (Sox1/2/3/19/19は、哺乳類ではグループG Sox15に変化) とB2 (Sox14/21) という現在のメンバーになったと考えられる。この過程で、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、オーソログ間）に多様化が起こっている。

羊膜類におけるB1 Soxの中心メンバーであるSox2遺伝子については、これまでの詳細な発現調節配列の解析で、数多くのエンハンサー群により緻密な制御がなされていることを見出している。ニワトリ Sox3は、発生の多くの局面で発現パターンがSox2に類似しており、制御配列が進化の過程でどのように変遷しているのかを知るための良い比較対象となる。本年度は、広範囲のSox3ゲノム域における発現調節配列の探索と、Sox2エンハンサー群との比較、また制御機構レベルでの保存と差異について詳細な研究を進める。

ゼブラフィッシュでは、ニワトリ Sox2およびSox3に類似したパターンの発現がSox19aにみられるが、Sox2/3はより限局して発現される。ゼブラフィッシュ Sox19a 遺伝子の発現制御配列の実験的同定も進める。

ニワトリ Sox2、Sox3、およびゼブラフィッシュ Sox19a の発現制御配列の解析結果に、他の生物種のゲノム情報を合わせて、オー

ソログ間・パラログ間での相互比較を徹底的に行う。オーソログ間の比較を通して、動物種間でどのように Sox の発現領域の役割分担が進化の過程で起こったのかを、制御配列の保存性と特殊性の観点から調べる。また、パラログ間に存在する制御の共通性と進化の過程で生じた差異にも注目して解析を行う。

グループB (B1 および B2) SOX のタンパク質機能の比較解析については、タンパク質間の機能の違いを生体内の機能として比較検討する。これには、ゼブラフィッシュの遺伝子操作法（ノックダウン法、mRNA の顕微注入による発現など）の利便性を活用する。また、ノックダウン胚にさまざまな Sox mRNA を導入し、ターゲット遺伝子によりレスキューのされ方に違いがあるかを調べ、各遺伝子がコードするタンパク質の分子機能の違いについて検討する。

<2008年度の成果>

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が、一方で動物種間では、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を開始した。Sox2 同様、Sox3 も遺伝子砂漠に存在しているが、その周辺約 230 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、多数のサブ断片を作製し、その断片がエンハンサー活性を持つかを、ニワトリ胚を用いたエレクトロポレーション法で調べた。そのうち、12断片が中枢神経系あるいは感覚器の原基でエンハンサー活性を示した。このうち10の断片は、ヒト、マウス、カエルで保存された配列を含んでいた。後方神経板で活性をもつ Sox2 N-1 エンハンサーに類似した活性を示すもの (Sox3 NP-1) など、興味深い活性パターンを持つ断片が見出されている。現在、Sox2 N-1 と Sox3 NP-1 が受ける制御について、類似性と差異に注目した詳細な解析を進めている。

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ーフオ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遺伝子の発現がおこる時期・部位では、弱い影響しか見られなかった。また、4遺伝子のノックダウン胚は、Sox1a,

Sox1b を含めて、いずれかの B1 *Sox* mRNA を同時に導入することで、形態的にほぼ同様にレスキューされることが分かった。また、ノックダウンにより発現が影響を受ける遺伝子を個別にしらべても、回復の程度にメンバー間でおおきな違いは見られなかった。これらの結果は、B1 SOX タンパク質の機能には各メンバーで大きな違いがないことを示している。したがって、B1 *Sox* 各遺伝子の個性は、発現パターンの違いによるところが大きいと考えられる。

一方、これまでの実験結果は、B1 SOX が転写活性化因子、B2 SOX が転写抑制因子として働くことを示していた。しかし、4 遺伝子のノックダウン胚をもちいたレスキュー実験で、恒常的に転写活性化因子として機能するよう改変された SOX ではレスキューが部分的にしか起こらないこと、また恒常的に転写抑制因子として働くよう改変された SOX でも、ごく一部の遺伝子発現に回復が見られることが見出された。このことは、B1 SOX が、ごく一部のターゲットに対しては、転写抑制因子として働く可能性があることを示唆している。

さらに、B1 *Sox* 4 遺伝子のノックダウン胚の解析から、発生初期の表現型が、*spg* 変異体（ゼブラフィッシュ OCT3/4 をコードする遺伝子に変異を持つ）の表現型と極めて類似した部分があること、また共通のターゲットとなる遺伝子も数多く存在することが分かった。哺乳動物においても、ES 細胞の幹細胞性の維持や、マウス胚発生の初期過程で SOX2-OCT3/4 複合体が重要な役割を持つことが示されている。魚類と哺乳類とは、初期発生の様式に様々な違いが見られるが、重要な共通要素として SOX2-OCT3/4 により制御されるカスケードが有ると考えられる。

<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) 転写抑制因子としての 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。実際、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、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。また、B1 *Sox* の体系的なノックダウン解析をゼブラフィッシュで行うことで、B1 *Sox* 遺伝子群の機能の共通性と多様性の理解について、先駆的な成果が得られている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本年度は、ゼブラフィッシュ *Sox19a* 遺伝子の発現制御配列の

実験的同定を十分に進展させることが出来なかった。また、ニワトリ *Sox3* の制御配列の解析については、数多くの制御配列の同定には成功したが、*Sox2* と *Sox3* の制御配列の単純な比較から、両者に保存する制御配列を見出すことは困難であることが分かった。これは、*Sox2* と *Sox3* の制御配列の間には、転写因子の結合配列レベルでの類似性しか残っていない可能性が考えられる。

<今後の課題>

グループ B *Sox* 遺伝子群のうち、発現制御配列については、ニワトリ *Sox2* 遺伝子を対象に詳細な解析をおこなうとともに、*Sox2* と一部類似した発現をしめすニワトリ *Sox3* の発現制御配列の解析に現在注力している。今後は、ニワトリ *Sox2* と *Sox3* の制御配列について詳細な比較分析を行うと共に、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予定である。また、*Sox2* と *Sox3* の制御配列の単純な比較では、保存配列の同定は今のところ出来ていない。転写因子の結合配列レベルで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解析し、上流の転写因子との関係性を解析していく必要がある。遺伝子機能については、主にグループ 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ている。ゼブラフィッシュでは、より対象を拡げ B2 *Sox* を含めて解析を行い、B1 *Sox* と B2 *Sox* が、どのようにして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。また、種間における機能の保存性と差異を明らかにするため、B1 *Sox* の多重ノックアウトマウスとの表現型の比較も行う予定である。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 0901161022

Evolution of non-coding regulatory sequences involved in the developmental process: Reflection of differential employment of paralogous genes as highlighted by *Sox2* and group B1 *Sox* genes. Kamachi Y., Iwafuchi M., Okuda Y., Takemoto T., Uchikawa M., and Kondoh H. Proc. Japan Academy, Ser B. in press (2009) .

2. 0901161035

Ogura E., Okuda Y., Kondoh H., and Kamachi Y. Adaptation of GAL4 activators for GAL4 enhancer trapping in zebrafish. Dev. Dyn. in press (2009) .

2. 0901151332

Kanamori, A., Toyama, K., Kitagawa, S., Kamehara, A., Higuchi, T., Kamachi, Y., Kinoshita, M., and Hori, H. Comparative genomics approach to the expression of *figa*, one of the earliest marker genes of oocyte differentiation in medaka (*Oryzias latipes*) . Gene. 423:180-187 (2008) .