

ウニ胚小割球特異的に発現するmicrolホメオボックス遺伝子ファミリーに関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16521

氏名	北村 一二三
生年月日	
本籍	岐阜県
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第526号
学位授与の日付	2002年9月30日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	ウニ胚小割球特異的に発現する <i>micro1</i> ホメオボックス遺伝子ファミリーに関する研究
論文審査委員(主査)	山口 正晃(理学部・助教授)
論文審査委員(副査)	櫻井 勝(理学部・教授) 岩見 雅史(自然科学研究科・助教授) 東 浩(理学部・助教授) 山下 克美(自然科学研究科・助教授)

学位論文要旨

Abstract

The animal-vegetal (A-V) axis of sea urchin embryos is morphologically evident at the 16-cell stage of development. Mesomeres, macromeres, and micromeres are arrayed along the A-V axis. The vegetal micromere differentiates into the skeletogenic mesenchyme and functions as a signaling center. To date, no zygotic or maternally specified gene with restricted expression in the micromere at the 16-cell stage has been reported. We performed subtraction PCR and dot blot hybridization using poly(A)⁺ RNA extracted from the micromere (tester) and the mesomere (driver) in order to identify micromere-specific genes. Using a cDNA fragment identified in this screen, we isolated four similar but distinct cDNA clones from a library, which corresponded to a group of genes that we refer to as the *micro1* family. The *micro1* family encoded putative transcription factors with a homeodomain, which had 87-95% identity between family members. The most highly conserved protein was encoded by *PIHbox12* from *Paracentrotus lividus* (71-76% identity among family members). Northern blot hybridization and *in situ* hybridization demonstrated that *micro1* was transiently activated during the early cleavage stages and that the transcript was restricted to the micromere. Thus, the expression domain was complementary to that of *PIHbox12* along the animal-vegetal axis. The *micro1* gene family has at least six loci, including polymorphic alleles, which are probably clustered in the genome. *PIHbox12* and *micro1* constitute a novel family of paired-like class homeobox genes. Phylogenetic analyses suggest that *PIHbox12* / *micro1* evolved exceptionally rapidly.

はじめに

ウニ未受精卵は動物-植物極軸(A-V軸)に沿って分極している。この極性は16細胞期に外面

的に現れる。第4卵割が植物半球で不等割であるため、A-V軸に沿って8つの中割球、4つの大割球、そして4つの小割球を生ずる。その後、中割球は外胚葉に分化し、大割球は主に内胚葉に分化し、小割球は骨片形成中胚葉へと分化する。

割球を単離・培養した実験の結果から、小割球のみは細胞自律的に分化することが示されている。小割球は単離・培養しても、他のいかなる割球と再構成しても、それ自身は骨片形成中胚葉になることから、その分化が細胞自律的に限定されている。また、割球の除去及び再構成実験から、小割球は胚発生の形成中心として働くことが示されている。すなわち、動物半球である中割球からなるアニマルキャップを単離・培養すると外胚葉性の永久胞胚になるが、このアニマルキャップと小割球を組み合わせて培養すると、小割球自身は骨片形成中胚葉に分化するだけでなく、アニマルキャップに内胚葉である原腸を誘導する。また、異なる発生段階において小割球またはその子孫細胞を除去する実験から、この内胚葉誘導シグナルは16-60細胞期の小割球及びその子孫細胞より放出されていることが示されている。これまで、この小割球の分化に関わる因子、そして放出される内胚葉誘導シグナルの実体を解明するために、多くの研究グループが小割球特異的に発現する遺伝子の単離を試みている。しかしいずれも成功していない。

本論文に示す研究もまた、小割球の分化と内胚葉誘導シグナルの放出に関わる因子を明らかにすることを目的として、小割球特異的遺伝子を検索したものである。これまで多くの研究グループが成功していないにもかかわらず、あえて試みた理由は割球の分離方法にある。従来のシヨ糖密度勾配法の場合、小割球の分離は可能だが、大割球と中割球は分離できないだけでなく、多くの小割球が混入する。このために、これまでの差次的スクリーニングは成功しなかったと考えられる。しかし、近年エルトリエーターを用いて3種の割球を生きたまま大量に分離する方法が開発された。この方法では各割球が95%以上の純度で分離できるため、大・中割球分画への小割球の混入が非常に少なくなる。

今回この方法で分離した小割球と中割球のmRNAを用い、サブトラクションPCRとドットプロットで小割球特異的に発現する遺伝子を検索した結果、*micro1*を単離した。本論文はこの*micro1*に関する研究の報告である。

micro1 遺伝子ファミリーの単離

小割球で特異的に発現する遺伝子を単離するため、エルトリエーターを用いてバフンウニ (*H. pulcherrimus*) 16細胞期胚の3種の割球を分離し、mRNAを抽出した。得られた小割球(テスター)と中割球(ドライバー)のmRNAを用いてサブトラクションPCRを行ない、そのPCR産物をドットプロットで検索した結果、3種類のcDNA断片を得た。うち1つのcDNA断片をプローブにしてcDNAライブラリースクリーニングを行なったところ、よく似た4種類のcDNAを得た(図1)。そこでこれらのcDNAに対応する遺伝子を*micro1A-D*と名付けた。*micro1A-D*cDNAから予想されるアミノ酸配列を調べたところ、全てN末側にホメオドメインを持つ転写因子をコードしていた。*micro1A-D*相互間のhomologyは86-98%、identityは86-94%であった。ついで*micro1*に近縁な遺伝子をBLASTで検索したところ、*PIHbox12*と最も高い相同性を示した。*PIHbox12*はヨーロッパ産ウニの一種*P. lividus*から単離された遺伝子で、初期卵割期に動物半球でzygoticに発現する。*micro1A-D*と*PIHbox12*の相同性はhomologyが81-82%、identityが68-75%であった。

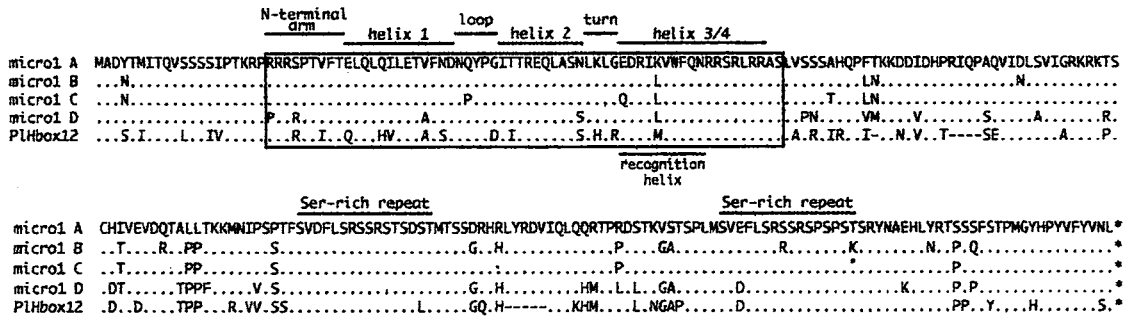


図1. micro1A-DとPIHbox12のアミノ酸配列の比較

マルチコピー遺伝子である *micro1*

micro1A-D が複数の遺伝子座を持ち、ファミリーを形成するのか調べるために、精子ゲノムのサザンプロットを行なった(図2 A)。ここでは生息地の異なる3個体由来の精子ゲノムを *EcoRI*、*EcoRV* により切断し、プローブには *micro1A* のホモボックスを除いた Δ Hbox を用いた。プロットの結果、いずれの個体でも約 10 本のシグナルが検出されたことから、*micro1* はシングルコピーではなくマルチコピー遺伝子で、ファミリーを形成することが明らかになった。

次に *micro1* 遺伝子ファミリーの遺伝子座の数を推定するため、1 個体の精子ゲノムをテンプレートにして *micro1* ファミリーに共通なプライマーを用いたゲノム PCR を行なった。ゲノム PCR 産物 48 クローンの塩基配列を決定したところ、11 種類の異なる *micro1* 配列が区別され、しかも 2 種の配列を除いて複数クローン同じ配列が得られた。これはこの個体の *micro1* 遺伝子ファミリーのメンバーが 11 種でほぼ飽和に達したことを示している。従って、*micro1* 遺伝子ファミリーは少なくとも 6 つの遺伝子座をもつと考えられる。また、他個体の *micro1* 遺伝子ファミリー配列の解析から、*micro1* 遺伝子座に遺伝的多型が存在することが示唆された。

次に 8-base cutter の *NotI* と *SfiI* を用いて 1 個体の精子ゲノムを切断した後、パルスフィールド電気泳動を行ない、 Δ Hbox をプローブに用いてサザンプロットを行った(図2 B)。すると、6-base cutter のサザンプロットで約 10 本あったシグナルは数本に減少した。この結果は、*micro1* 遺伝子ファミリーの少なくとも一部がクラスターを形成していることを示している。

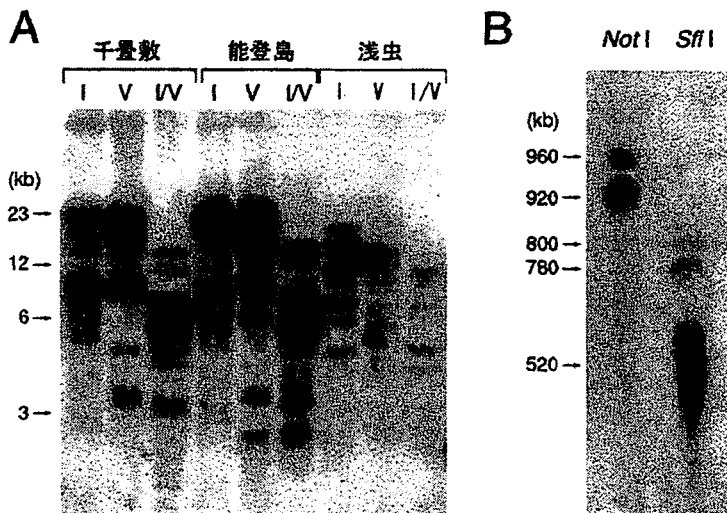


図2 *micro1* は多重遺伝子族である

新規の paired-like class ホメオボックス遺伝子である *PIHbox12* と *micro1*

BLAST で検索を行なった結果、*micro1* 遺伝子ファミリーは多くの paired-like class ホメオボックス遺伝子と近縁であった。そこで *PIHbox12*、*micro1* そしてその他のホメオボックス遺伝子のホメオドメインについて、近隣結合法で系統解析を行なった (図 3)。他のホメオボックス遺伝子ファミリー (*anf*、*goosecoid*、*ceh-10*、*otx*) の各動物種におけるオーソログな遺伝子は、高いブートストラップ値でクレードを形成した。同様に *micro1* 遺伝子ファミリーも *PIHbox12* と共に他から独立したクレードを形成した。このことは paired-like class ホメオボックス遺伝子の中で *PIHbox12/micro1* が新しいタイプのホメオドメインをもつことを示している。

図 3 の系統樹において、*anf* ファミリーのクレードはセキツイ動物のみで構成されているため、クレード内の分枝は 3.5-4 億年の歴史を反映している。それに対して、*PIHbox12/micro1* はホンウニ目のみから構成されているため、3-4000 万年の歴史を反映している。にもかかわらず、両者の分枝パターンにより示される遺伝的距離は同程度である。このことは、*PIHbox12/micro1* ファミリーの分子進化速度が *anf* ファミリーよりも、10 倍速かったことを示している。

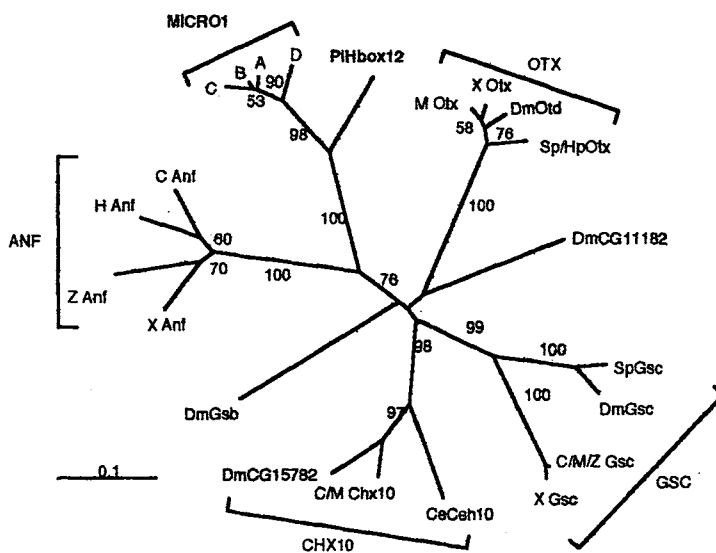


図 3 *micro1*、*PIHbox12*、他の paired-like class ホメオボックスタンパクのホメオドメインの配列に基づく近隣結合樹

micro1 の発現様式

micro1 遺伝子がいつ発現するのか調べるため、*micro1A* をプローブとして各ステージの mRNA を用いたノーザンブロットを行なった (図 4 A)。すると、*micro1* mRNA は 16 細胞期から強く検出され、120 細胞期にそのピークを迎えた。さらに初期胞胚期まで強く検出されるが、孵化胞胚期になると急激に減少し、間充織胞胚期にはほとんど検出されなくなった。

また、*micro1* が胚のどこで発現するのか調べるために、*micro1A* をプローブに用いて、各割球由来の mRNA を用いたノーザンブロット (図 4 B) と 16-60 細胞期胚の *in situ* ハイブリダイゼーション (図 4 C) を行なった。16 細胞期には *micro1* は小割球で非常に強く検出され、しかも小割球の植物極側表層付近に局在していた。32 細胞期でも同様に小割球の子孫細胞で強くシグナル

が検出され、また大小割球より小小割球の方が強く検出された。さらに 60 細胞期でも小小割球で検出された。16 及び 32 細胞期においては、中割球とその子孫細胞でも弱く検出されたが、大割球とその子孫細胞ではほとんど検出されなかった。以上の結果から *micro1* は植物極側の小割球で強く発現し、また動物極側の中割球でも弱く発現するが、大割球では発現しないという発現様式をとることがわかった。

リチウムは *GSK3β* を阻害し、 β カテニンを核に移行させることが知られている。そこで分離後リチウム処理した中割球での *micro1* の発現を調べたところ、リチウム処理によって *micro1* が誘導されることが明らかになった。このことは *micro1* が β カテニンの標的遺伝子である可能性を示唆している。

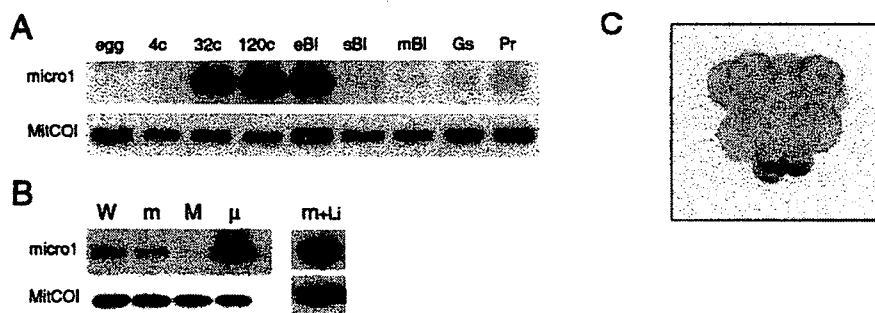


図 4 *micro1* の発現解析

まとめ

小割球の分化や誘導シグナルの放出に関わる因子を調べるため、小割球特異的に発現する遺伝子を検索し、*micro1* 遺伝子ファミリーを単離した。*micro1* はマルチコピー遺伝子で、少なくとも 6 つの遺伝子座を持っており、それはクラスターを形成している。また、*micro1* は *PIHbox12* と近縁で、これらは新規のホメオボックス遺伝子ファミリーを形成している。この *micro1* は zygotic に 16 細胞期から初期胞胚期にかけて小割球とその子孫細胞で強く発現する。

micro1 の機能はまだ明らかになっていない。しかし、その発現様式から β カテニンの下流に存在すると考えられ、小割球の分化や他の割球への誘導シグナルの放出に関わる可能性のある遺伝子である。

学位論文審査結果の要旨

提出された学位論文の評価と、平成 14 年 8 月 8 日に行われた学位申請者の口頭発表および質疑応答の結果をふまえて審査をおこない、同日開催の審査委員会において以下のとおり判定した。

本研究は、ウニ 16 細胞期胚の小割球特異的に発現する遺伝子 *microl* の構造と発現様式の解析結果を記述したものである。*microl* は subtraction PCR/dot blot 法によって単離された遺伝子で、小割球特異的遺伝子としての最初の報告例であることの意義は非常に大きく、世界的に大きな反響をよんでいる。具体的な研究成果は以下の 5 点である。*microl* は (1) ホメオドメインを含む転写因子をコードしている、(2) 小割球とその子孫細胞で初期卵割期に一過的に活性化される、(3) 少なくとも 6 つの遺伝子座をもつマルチコピー遺伝子で、おそらく染色体上でクラスターを形成している、(4) paired-like class ホメオボックス遺伝子に属し、その中で *PIHbox12* とともに新規のファミリーを構成している、(5) 小割球における核 β -カテニンの直接の標的遺伝子である、ことを示した。1930 年代に H. Rostadius によって行われた伝説的な実験から、小割球はそれ自身自律的に骨片形成細胞へと分化すること、また隣接する細胞を内胚葉へと誘導することが示されている。しかし、その決定因子と誘導シグナルの実体はいまだに明らかにされていない。現在進行中の Loss-of-function 実験は、*microl* がその決定因子で、誘導シグナルの上流にあることをつよく示唆している。

以上、本論文は、ウニの発生において中心的役割をする小割球の分化および誘導機構を分子的に解明する端緒となるものであると高く評価される。したがって、博士（理学）に値すると判定した。