

1721-59

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文概要

論文題目

ゼブラフィッシュポリコム
相同遺伝子群の機能解析
Functional analysis of
zebrafish Polycomb group genes

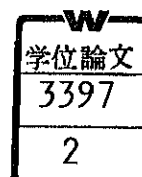
申請者

川村 哲規

Akinori Kawamura

物理学及応用物理学専攻 分子生物学研究

2002年 2月



発生・分化の過程において一旦樹立された遺伝子発現状態が細胞分裂を経ても安定に維持される現象は、20 世紀初頭から「決定」と呼ばれその機構の解明が待たれている。近年、問題をより絞り込み、この現象を“Cellular Memory”または“Transcriptional Memory”とも呼び、遺伝子複製を通じての遺伝子発現状態の維持に焦点を絞って研究が開始されているがその分子機構はまったく解っていないといってよい。1980 年代の後半になって、ショウジョウバエの遺伝学的研究から、この問題に分子レベルのアプローチをする端緒が開かれた。ポリコム遺伝子群およびトライソックス遺伝子群が、突然変異体の解析よりホメオティック遺伝子およびその他の遺伝子の発現状態の維持に機能していることが推察されている。1990 年代に入り、この遺伝子群のメンバーが次々とクローニングされ、それらの遺伝子産物が核内複合体を形成していること、また、クロマチンレベルで機能していることが徐々に明らかとなってきた。今日では、マウス、ヒト、アフリカツメガエル、線虫、テトラヒメナなどの動物から、また、植物のシロイヌナズナにおいても相同遺伝子が報告されており、ポリコム遺伝子群が生物の発生において遺伝子発現状態維持の基本的かつ普遍的制御機構に関わっていることを示唆している。また、主に、マウスにおけるジーンターゲットイングを用いた機能欠失解析から、脊椎動物において、ポリコム遺伝子群は *Hox* 遺伝子のみならず、様々な発生過程に重要な遺伝子の発現状態の維持に関与している可能性が示唆されている。

本論文は、発生学的に様々な優位な点を有するゼブラフィッシュを用い、そのポリコム相同遺伝子群を同定し、その機能について迫った結果を以下の 5 章にまとめたものである。以下に各章の概要を記す。

第 1 章においては、ショウジョウバエにおいてポリコム遺伝子群が遺伝子の発現状態の維持機構に関わっていることを示す知見とマウスを初めとする脊椎動物における相同遺伝子群について現在までに明らかになった事例についてまとめた。また、本研究で実験材料として用いたゼブラフィッシュのモデル動物としての有効性について述べ、本研究の目的とその独自性と意義について言及した。

第 2 章は、ショウジョウバエにおけるポリコム遺伝子群のメンバーである *Polycomb* 及び *Posterior sex combs* のゼブラフィッシュにおける相同遺伝子 *pc1* 及び *psc1* について述べている。これら単離した遺伝子の塩基配列を決定し、それから予想されるアミノ酸配列を、他種で報告された相同遺伝子と比較、考察した。次に、ノーザンブロット法、及び whole-mount *in situ* hybridization 法を用いて、それぞれの発生段階における発現パターンを明らかにした結果、この二つの遺伝子の発現は、発生段階及び発生部位において、それぞれが異なって発現していることが分かった。また、Yeast two hybrid 法及び GST pull down 法を用い、Pc1 と Psc1 は、互いに相互作用でき、かつそれぞれが自分自身とも結合し得ることを示した。さらに、どのアミノ酸部位がそれぞれの結合に関わってい

るのかを明らかにした。これらの結果から、ゼブラフィッシュにおいても“ポリコム・ワールド”が存在し、他種と同様に、ポリコム遺伝子群は発生過程において多種多様な複合体を形成していることが示唆される。

第 3 章においては、ショウジョウバエにおけるポリコム遺伝子群のメンバーである *polyhomeotic* のゼブラフィッシュにおける相同遺伝子 *ph2* についての発現解析から、この遺伝子群が体節形成に重要な役割を示すという全く新たな知見について述べている。この *ph2* 遺伝子には、二つの異なる転写産物 *ph2* α 及び *ph2* β が存在していることを分かった。これらを cDNA レベルで比較すると、双方の 3' 領域において、約 1.9kb に及ぶ全く同一の塩基配列を共有していることが明らかとなった。また、予測されるアミノ酸配列は、Ph2 α 、Ph2 β は共通の Open reading frame を共有しており、その結果、Ph2 β タンパクが Ph2 α タンパクの Carboxyl terminal 側に完全に含まれていることが明らかとなった。また、注目すべき点として、ショウジョウバエの *polyhomeotic* 遺伝子と脊椎動物の *ph* 相同遺伝子の間で保存されている Homology domain I、Homology domain II 及び Zinc finger が、この共通領域、つまり Ph2 β に含まれていることが明らかとなった。次に、*ph2* α 及び *ph2* β の発生段階における発現パターンをノーザンブロット法により解析した結果、*ph2* β は、発生過程を通じて発現がみられるが、*ph2* α は、受精後 9 時間 (90% epiboly) から受精後 24 時間 (prim-5) までの間に、一過的に発現していることが判明した。この *ph2* α の発現している発生段階は、ゼブラフィッシュにおける体節形成期と非常に関連したものであり、この遺伝子の体節形成における関与が示唆された。このことから、*ph2* α 、*ph2* β の発現を whole-mount *in situ* hybridization 法を用いて詳細に解析した結果、双方の転写産物とも体節に発現がみられることが明らかとなった。しかしながら、*ph2* α は 8-somite stage から、*ph2* β は 1-somite stage から発現が開始されるという時間的な発現の違いがあるということが明らかとなった。また、ひとつの体節内の局在においても、*ph2* α は、体節の後方境界に強い発現がみられ、前方境界に向かって徐々に弱くなっていること、これとは対照的に *ph2* β は、体節の前方境界に強い発現がみられ、後方境界に向かって徐々に弱くなっているという体節内部における転写産物の発現部位の相違があるという結果を得た。次に、*ph2* 遺伝子座をゼブラフィッシュ・ゲノムライブラリーより単離し、23 kb に及ぶ塩基配列を決定し、エキソン・イントロン構造を明らかにした。その結果、2 つの α 特異的なエキソン、1 つの β 特異的なエキソン、5 つの共通領域のエキソンが、5' 側から順々に配置されていること、*ph2* α cDNA における α 特異的配列と共通配列の境界、及び *ph2* β cDNA における β 特異的配列と共通配列の境界において、それぞれのエキソン境界にあたるということ、また、それぞれのエキソン・イントロン境界において、スプライシングのアクセプター及びドナー配列が存在していることが判明した。オリゴキャッピング法により、*ph2* β の転写開始点が、我々の明らかにした β 特異的なエキソンの 5' 近傍にあることを示し、*ph2* α と

*ph2 β*が別々の転写開始点から、転写されるという結果を得た。以上の結果は、単一の遺伝子座の異なる転写開始点から、*ph2 α* *ph2 β*は転写され、一方は、体節の前方側で強く発現し、もう一方は、体節の後方側で強く発現するという非常に興味深い発現パターンを明らかにしたものである。

第4章においては、第3章で示した *ph2 α* *ph2 β*の体節形成における機能について、2つの観点からの機能阻害実験により明らかにしている。1つ目は、モルフォリーノ・アンチセンス・オリゴを受精直後の卵にマイクロインジェクションすることにより、*ph2 α*、*ph2 β*、それぞれの機能を欠失した際の表現型を解析した。その結果、*ph2 α*モルファント（モルフォリーノ・アンチセンス・オリゴによる変異体）は、尾が背側方向に湾曲すること、また、*ph2 β*モルファントは、尾が内側に巻かれるという表現型を示した。また、心臓及び体節に共通した変異が生じるということが明らかとなった。特に体節において、野生型では矢じり型に尖った形を呈しているが、*ph2 α*及び *ph2 β*モルファントでは、体節がU字型に変形していることが分かった。このU字型の体節は、ゼブラフィッシュにおける *sonic hedgehog* 変異体 (*sonic you*) およびその下流で働く遺伝子の変異体 (*you too*、*u-boot* など) に共通して見られる表現型で、*ph2 α*及び *ph2 β*が *sonic hedgehog* の下流で働いているという可能性が強く示唆される。2つ目の機能阻害実験は、Ph2 α が Ph2 β を完全に含むという構造的類似点に着目し、機能阻害トラップを仕掛けた。Ph2 α と Ph2 β の機能的相違点を考える上で、Ph2 α に特異的なアミノ酸配列がなんらかの機能ドメインを有しているのではないかと想定した。仮に、Ph2 α に特異的なアミノ酸配列に相互作用するタンパクがあるとすると、Ph2 α 特異的なアミノ酸配列をマイクロインジェクションにより過剰発現すれば、この相互作用を阻害することができ、その結果、Ph2 α の機能失活の表現型、つまり *ph2 α*モルファントと似た表現型が生じるであろうと考えた。実際、Ph2 α に特異的なアミノ酸配列を過剰発現した表現型は、尾が背側方向に湾曲し、体節がU字型に変形した。この表現型は *ph2 α*モルファントと似たものであり、Ph2 α に特異的なアミノ酸配列を過剰発現することでドミナント・ネガティブ的に、この領域の機能を阻害するということが明らかとなった。また、この領域には見かけ上 nuclear localization signal (NLS)が存在しないため、SV40のNLSを結合させたときにのみ、この効果が生ずることが判明した。このことは、ドミナント・ネガティブ的阻害は核内で生じていることを示唆し、ポリコーム遺伝子群が核内複合体を形成するという知見と合致する結果を我々は得た。

最後に、第5章は本研究によって得られた結果の総括であり、特に *ph2* 遺伝子についての機能的な役割、今後の研究における方向性と課題について述べている。