

研究課題別研究評価

1. 研究課題名：2つの T-box 遺伝子産物 As-T と As-T2 の形とはたらき

2. 研究者名：高橋 弘樹

3. 研究のねらい：

T 遺伝子は、T-boxと呼ばれる DNA 結合部位を含む新規の転写因子をコードし、脊椎動物では脊索の分化と尾を含む体幹後部の形成に重要な働きをもつ。As-T および As-T2 をそれぞれ過剰発現させると、As-Tは脊索の分化を、As-T2は筋肉の分化を異所的に誘導する。すなわち、非常によく似た T-boxを持つ転写因子の一方が脊索細胞の分化を、もう一方が筋肉細胞の分化を制御する。それではどのようにして As-T は脊索を作り As-T2 は筋肉を作るのか。本研究においては、この 2 つの T-box 遺伝子産物 As-T および As-T2 のダイナミックな機能を追跡した。

4. 研究結果及び自己評価:

(1) As-T および As-T2 の発現調節機構の解析

As-T が脊索細胞の分化に As-T2 が筋肉細胞の分化に正しく機能するためには、それぞれの発現が脊索細胞と筋肉細胞に正確に制御されていなければならない。そこで、As-T と As-T2 の発現を調節する制御領域の解析を行った。その結果 As-T の発現制御には、As-T 自身のオートレギュレーションが関与していることが示唆された。すなわち、As-T の脊索での発現が開始されると、発現が誘導された As-T 自身が上流領域に結合してさらに脊索特異的発現を誘導する。一方、As-T2 の筋肉細胞での発現制御にも、As-T と同様なオートレギュレーションによる転写活性化が関与していることが明らかになった。

(2) As-T および As-T2 の機能ドメインの解析

T-box 遺伝子の機能の特異性を担うドメインを明らかにするために、As-T と As-T2 の T-box DNA 結合ドメイン(BD)と転写活性化ドメイン(AD)を入れ替えたキメラ遺伝子を作成し、それぞれの mRNA をマボヤ卵に顕微注入して異所的に発現させ、脊索細胞に分化するのか、あるいは筋肉細胞に分化するのかを調べた。その結果、As-T の T-box DNA 結合ドメイン(BD)に、As-T2 の C 末側転写活性化ドメイン(AD)をつないだ T(BD):T2(AD)キメラを発現させた場合には、As-T の全長を発現させた場合と同じように異所的に脊索細胞が分化した。一方、筋肉細胞分化を調べてみると、T2(BD):T(AD)キメラを発現させた胚で As-T2 の全長を発現させた場合と同様に、異所的に筋肉細胞が分化した。これらの結果から、T-box 遺伝子の機能は、それぞれが持つ T-box DNA 結合ドメインの特異性によって決定されることが示唆された。

(3) As-T と As-T2 の発現制御領域と機能進化

それでは、As-T と As-T2 自身の発現を制御する 5' 上流領域に存在する T-box 結合配列の特異性はあるのか、As-T と As-T2 それぞれの 5' 上流領域(T-box 結合配列を含む)の lacZ コンストラクトとキメラ分子をマボヤ受精卵に共注入して調べた。その結果 As-T の発現を制御する領域に存在する T-box 結合配列は、As-T の T-box DNA 結合ドメインに特異性があり、As-T2 の発現を制御する領域に存在する T-box 結合配列は、As-T2 の T-box DNA 結合ドメインに特異性があることが示された。つまり、マボヤの 2 つの T-box 遺伝子 As-T と As-T2 は in vivo においてそれぞれの 5' 上流領域の T-box 結合配列と、その発現制御領域によって転写される T-box 遺伝子が認識する結合配列の特異性がリンクしていることになる。このことは、T-box 遺伝子の DNA 結合ドメインの変化と T-box 遺伝子自身の発現制御領域が協調して変化していることを示唆する結果であり、祖先型の T-box 遺伝子からいかにして機能と発現の特異性を確立してきたかという、進化に伴う遺伝子ネットワークの変化を考える手掛かりになる。

(4) ターゲット遺伝子の解析

個々の T-box 遺伝子もつ生理機能の特異性を明らかにするには、それぞれの下流で働くターゲット遺伝子を解析することが重要になってくる。ユウレイボヤの fork head 遺伝子(Ci-fkh)の発現制御領域に T 遺伝子(Ci-Bra)の cDNA をつないだコンストラクトをつくり、これをエレクトロポレーションによって導入すると、Ci-Bra が内胚葉に発現し、内胚葉索を脊索に変えるように働くために、T 遺伝子の下流遺伝子が動き出す。こうして、脊索が過剰にできた胚と正常胚 cDNA とのサブトラクションによって得られた cDNA ライブラリーを作成したところ、Ci-Bra によって発現が誘導される下流遺伝子であることが確認された、501 個の独立した cDNA クローンが得られた。次にこれらすべてのクローンについて、in situ ハイブリダイゼーションにより発現パターンを調べてみると、38 個の脊索特異的に発現する遺伝子が明らかになった。

5. 領域総括の見解

発生の際にそれぞれの組織が分化する仕組みは、発生生物学の主要な対象である。本研究は、ホヤを用いて脊索と筋肉を分化させる遺伝子の解析を行い、それぞれの遺伝子を見出し、さらにその調節の詳細を明らかにしつつある。3年間で、きちっとした成果を得た点で典型的な成功例である。ただし、これから先の仕組みとなるとたいへん複雑で、なかなか進めないところである。どう切り込んでいくかを見守りたい。

6. 主な論文等：

- 1) Mitani, Y., Takahashi, H. & Satoh, N. Regulation of muscle-specific expression and function of an ascidian T-box gene, As-T2. *Development*. 128, 3717-3728 (2001).
- 2) Hotta, K., Takahashi, H., Asakura, T., Saitoh, B., Takatori, N., Satou, Y. & Satoh, N. Characterization of Brachyury-downstream notochord genes in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Biol.* 223, 68-80 (2000).
- 3) Takahashi, H., Hotta, K., Erves, A., Gregorio, A. D., Zeller, R.W., Levine, M. & Satoh, N. Brachyury-downstream notochord differentiation in the ascidian embryo. *Genes & Dev.* 13, 1519-1523 (1999).
- 4) Takahashi, H., Mitani, Y., Satoh, G. & Satoh, N. Evolutionary alterations of the minimal promoter for notochord-specific Brachyury expression in ascidian embryos. *Development*. 126, 3725-3734 (1999).

特にさきがけ研究を代表する論文

1),2),4)