

## 研究課題別評価

### 1.研究課題名 環状遺伝子形成のメカニズムとその生物学的意義

### 2.研究者氏名 :下田 修義

グループメンバー :山越 貴水 (研究期間 H13.4.1. ~ H.15.9.31.)

宍戸 裕二 (研究期間 H13.4.1. ~ H14.3.31.)

### 3.研究の狙い :

本研究の当初の狙いは、ゼブラフィッシュのノーテールという遺伝子が染色体外に環状遺伝子として存在する可能性を検討することにあった。しかし研究を開始してまもなく、少なくともノーテール遺伝子が染色体外に存在するという可能性については否定されたため、計画していた実験計画を中止した。そして方向転換をして、ノーテール遺伝子において観察されていたいくつかの不思議な現象に生物学的な意味を見いだすことを狙いとした。

### 4.研究結果 :

野生型ゼブラフィッシュにおいて突発的に尾ひれが欠損する、あるいは脊索形成に異常を持つ胚が現れるという現象が、ノーテールという遺伝子の不安定性によるものと予想し、ノーテールのゲノム構造、そして転写産物を徹底的に調べた。その結果、1)ノーテール転写産物の平均3%にほぼランダムな欠損変異が生じていること、2)ノーテールのイントロンにおいてDNAの二本鎖切断点が生じること、3)ノーテールの偽遺伝子様構造を持つDNAがゼブラフィッシュ細胞に存在することなどがわかった。私は2)と3)の結果から、偽遺伝子がノーテールの切断に乗じて対合し、その結果、ノーテールのメチル化が生じるのではないかという仮説を立てた。これは真菌類において、任意の遺伝子のコピーを導入すると、両者がメチル化により不活性化されるという報告や、その類似のシステムが植物から、哺乳類に至るまで存在するという報告から推測したものである。ゼブラフィッシュの発生過程を通してノーテールのメチル化の状態を解析したところ、予想した通りにノーテールがde novoのメチル化を受けることが明らかになった。そしてメチル化と時を同じくして、ノーテール転写開始点付近のクロマチン構造が、転写を抑制する形に変化していた。メチル化の進行する時期はノーテールの脊索および尾芽での発現が減少、消失する時期に当たり、ノーテールのメチル化により転写が抑制されることが強く示唆された。興味深いことにこのノーテールのメチル化は制御のあらゆる器官においてみられたが、精子は例外であった。つまりノーテールのメチル化は生殖細胞では生じないか、もしくはその分化の過程で脱メチル化が生じていることを意味した。また調べた限りほかのゼブラフィッシュ遺伝子においては、de novoのメチル化が観察されなかったことから、ゼブラフィッシュはノーテールだけをピンポイントでメチル化する仕組みを備えていることが明らかになった。

### 5.自己評価 :

研究開始当初に設定した実験計画は、ノーテールが染色体外に環状遺伝子として存在するという予想が外れて実際にはほとんど遂行しなかった。これは残念であったが、少なくともそれまでに観察していたノーテールに関するいくつかの奇妙な事実は、現在振り返ってみても、ノーテールの染色体外における存在により説明ができるものと思う。したがって申請した研究を計画したこと

自体は、誤りでなかったと判断している。研究開始早々にこの点に気がついたので、その後、研究を別の方向で展開をすることができた。そして最終的に、非哺乳動物において初めて遺伝子のエピジェネティカルな制御をノーテールにおいて見いだすに至った。私たちがノーテールメチル化の機構としてたてたモデルは、偽遺伝子がもとの遺伝子に対して DNA メチル化を通して発現を抑制するというもので、もしそれが正しければ、それは将来、遺伝子の機能発現における新たな仕組みとして認識されるものと考えている。本研究は特にその可能性を提示できた点で意義があると信じている。しかしそうであればなお一層そのモデルを検証する必要があるわけだが、そのための実験方法が現時点でも考えつかない。ここが悩みであり、そして我々の研究の弱点である。また本研究は、ゼブラフィッシュにおいてみられる尾や脊索の異常が、ノーテールの不安定性によるものではないかというところからスタートとしている。この点も明らかにできておらず、全体として、より一層の思考・実験が必要であったと反省している。

#### 6. 研究総括の見解：

エピジェネティクスがポストゲノム時代の重要テーマとして注目され始めている。ゼブラフィッシュという独自の材料に着目し、特にそのノーテール現象を中心に、着実に成果をあげてきた。現在はまだ研究途上にあるが、今後の見るべき展開を十分に期待してよい。

#### 7. 主な論文等：

1. K. Yamakoshi, Y. Shishido and N. Shimoda, "Generation of DNA Double-Stranded Ends in and Aberrant Transcripts of the Zebrafish no tail Gene" revised (2003)
2. K. Yamakoshi and N. Shimoda, "De novo DNA Methylation at the CpG island of the Zebrafish no tail Gene" *Genesis* 37, 195-202 (2003)
3. K. Yamakoshi and N. Shimoda, "PCR-based Cloning of an Intronless Zebrafish no tail Gene", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 598-602 (2003)

#### 口頭発表

1. 下田修義、山越貴水 「ジーンサイレンシングによるノーテール遺伝子転写調節の可能性」第 26 回日本分子生物学会年会、神戸、2003 年 12 月
2. 下田修義、山越貴水 「ゼブラフィッシュのエピジェネティクス」第 9 回小型魚類研究集会、理研(和光)、2003 年 9 月
3. 下田修義、山越貴水 「切れる遺伝子 no tail」第 8 回小型魚類研究集会、三島、2002 年 8 月