

ウニ胚神経外胚葉特異的因子 foxQ2 の転写を調節するメカニズムの解析

山本 茜 (筑波大学 生物学類)

指導教員：谷口 俊介 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

体軸形成は、あらゆる動物の発生過程において最も初期に起こる現象の 1 つである。ウニの初期発生では、動物極と植物極を結ぶ前後軸（一次軸）と、それに直交する背腹軸（二次軸）に沿って細胞運命の決定がされていく。前後軸形成には、植物半球における Wnt/ β -カテニンシグナルの機能が重要な役割を担う[1]。一方、背腹軸形成には、腹側に局在する Nodal シグナルとその下流ではたらく Lefty、BMP2/4、Chordin などの TGF- β ファミリー分子群が必須な役割を担う[2]。直交して働く 2 つのシグナル経路は、それぞれ独立して細胞運命の決定に関与しているとされてきたが、2006 年と 2008 年に谷口らにより、それらが転写因子 FoxQ2 を介してリンクしていることが報告された[3, 4]。

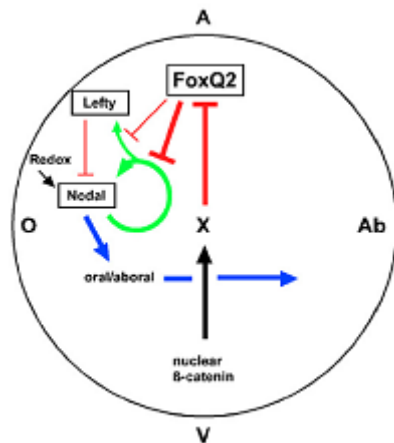


図 1: ウニの初期発生における一次軸と二次軸間の制御経路モデル [3]。

foxQ2 は AV 軸と DV 軸を繋ぐ重要な転写因子である。Wnt シグナルは foxQ2 に対して抑制的にはたらく、foxQ2 は Nodal に対して抑制的にはたらく。

A, 動物極; V, 植物極; O, 口側(腹側); Ab, 反口側(背側)

具体的には、Wnt/ β -カテニンシグナルで中心的な役割を果たす β -カテニンの核移行を抑制すると、正常胚では前端部領域に限局している神経外胚葉が胚全体に広がり、かつ、その胚は背腹軸を完全に失う現象がまず報告された[3]。さらに、神経外胚葉領域の形成に必須な転写因子 FoxQ2 の発現が、Wnt/ β -カテニンシグナルに間接的に制御されていること、および、背腹軸形成をコントロールしている Nodal の発現を FoxQ2 が抑制していること、の 2 点が報告された[4: 図 1]。しかしながら、Wnt/ β -カテニンシグナルの下流で、直接 foxQ2 の転写を抑制する因子や、動物極において foxQ2 の転写を誘導するメカニズムに関してはいまだに不明であった。

そこで、本研究では foxQ2 の転写を調節する機構を解析することで、体軸形成の過程で神経外胚葉がなぜ胚の前端部領域にのみ形成されるのかを理解することを最終目的とした。パフンウニゲノムには、foxQ2a と foxQ2b の 2 つの遺伝子が存在する。本研究室の先行研究により、foxQ2a, b 双方とも発生初期において発現がみられるが、それぞれの空間的発現パターンがわずかに異なることが明らかにされた[図 2]。本卒業研究ではその違いを生み出すメカニズムを明らかにするため、直接 foxQ2a および foxQ2b の転写調節をおこなう因子の特定を試みた。

【材料】

パフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus*

【方法】

- foxQ2a, b の基本コンストラクトの作製
すでにゲノム解読がされている北米ムラサキウニゲノムを参考にして、foxQ2a, b の発現調節に関わると思われる領域 8kb のクローニングをそれぞれ行った。クローニング産物を pCS2 ベクターに組み込み、GFP 発現解析のために 8kb の後に turbo Green Fluorescent Protein (tGFP) と MODC 配列を付加し、解析の基本となるコンストラクトを作製した。
- マイクロインジェクションと胚の観察
foxQ2a (もしくは b) 領域+tGFP+MODC の断片を PCR により増幅し、制限酵素 EcoRV で切断したゲノムをキャリアーとして KCl と混合後、受精卵にマイクロインジェクションを行った。発生 38-41hr 後に蛍光顕微鏡下でインジェクション胚における GFP 発現領域の観察し、同時に、GFP 発現率を求めた。

【結果・考察】

foxQ2a-cis 解析

foxQ2a の転写制御に関わる領域を探索し、11ヶ所の候補に絞り込むことができた。さらなる解析は現在進行中である。

foxQ2b-cis 解析

foxQ2b の転写制御に関わる領域を探索し、10ヶ所の候補に絞り込むことができた。foxQ2b については 3つの部位が発現制御に関与していることを示唆する結果を得ることができた。その領域に結合すると予測される転写因子が foxQ2b の転写を直接 ON にしている(発現の促進)可能性が高いため、現在候補因子の特定を行っている。また、転写因子 Myb が foxQ2b の発現調節に関与することが以前の解析から示唆されていたので、その遺伝子発現パターンについても現在解析中である。

foxQ2a, b-cis 解析結果の詳細については発表会で報告する。

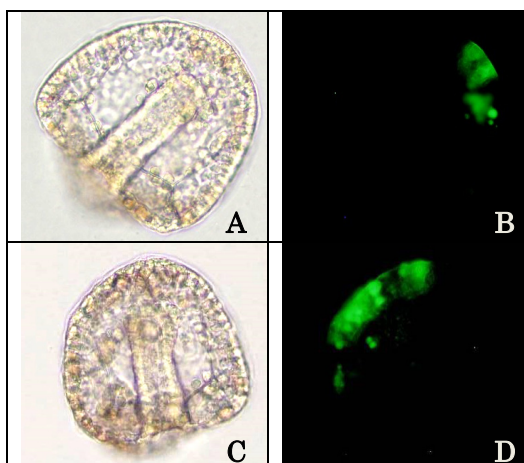


図 2: foxQ2a, b-tGFP の空間発現パターンの違い。受精後 40hr では、foxQ2b (D) の方が foxQ2a (B) よりも、GFP 発現領域が広い傾向がある。(A, B) foxQ2a の発現領域 (C, D) foxQ2b の発現領域

参考文献

- Logan et al. (1999) Development 126, 345-357.
- Duboc et al. (2004) Dev Cell 6, 397-410.
- Yaguchi et al. (2006) Development 133, 2337-2346.
- Yaguchi, S., et.al. (2008) Dev Cell 14, 97-107.