

動物間で保存された *Hox* 遺伝子群のホヤにおける新規機能の解明-*Hox13*による感覚器官の形成-

田島 由佳子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 笹倉 靖徳 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

動物は初期発生において、様々な遺伝子の発現によりその形態を作り上げる。特に脊椎動物においては、複雑なボディプランを保持しており、私はその複雑な形態の形成に関わる遺伝子の進化に興味を持った。進化を理解するためには、祖先型動物を知ることが重要となる。尾索動物は脊椎動物に最も近縁な動物群であり、原始的な形質を多く残している。一方で、脊椎動物と相同な遺伝子も多く保存しており、尾索動物は脊椎動物の祖先を考える上で最も適した生物である。

本研究では *Hox* 遺伝子に焦点を当てる。*Hox* 遺伝子群は動物間で保存されており、前後軸に沿った構造の形成に寄与するなど、動物のボディプランの進化を考える上で欠かすことができない遺伝子群である。この *Hox* 遺伝子群の1つである *Hox13* は、脊椎動物において体節構造の最も後方で発現し、「体節構造形成の終末」を決める遺伝子としてはたらく(1)。しかし、脊椎動物ゲノムには *Hoxa13* から *Hoxd13* の4つのパラログが存在するため、完全な機能解明には至っていない。

カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) は、尾索動物門に属し、世代時間の短さや遺伝子構成の単純さから、遺伝子機能解析の好材料である。加えて全ゲノムが解読されており、1セットの *Hox* 遺伝子群を保存していることが明らかとなっている(2)。また、ホヤは明確な体節構造を持たないため、*Hox* 遺伝子群の機能も脊椎動物とは大きく異なる可能性もある。先行研究より、カタユウレイボヤでは変態後の消化管に *Hox13* の発現が認められているが(3)、その機能は明らかになっていない。そこで本研究ではカタユウレイボヤの *Hox13* のノックアウトを行い、遺伝子の機能解析を行った。

方法

○*Hox13* ノックアウト

Hox13 のホメオドメインをターゲットとする TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) を設計して導入し、表現型の観察を行った。また、種々の組織で特異的に遺伝子発現を引き起こすプロモーターを用いて TALEN を発現させ、組織特異的なノックアウトを行った。

○トランスジェニック系統の作製

トランスポゾンベクターである Minos を用いて、*Hox13* のプロモーターに *Kaede* の配列をつなげた人工 DNA を導入し、ゲノムへの形質転換を誘導した。この個体を飼育し、野生型と掛け合わせ、ゲノム DNA に *Hox13>Kaede* コンストラクトが組み込まれた個体を継代して、系統を樹立した。

○逆転写 (RT-PCR)

発現を確認したい器官または組織を摘出し、AGPC 法を用いて RNA を精製した。この RNA を鋳型に cDNA を合成し、*Hox13* のプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動でバンドの有無を確認した。

結果

○*Hox13* ノックアウト

TALEN を導入した個体では、輸精管先端に存在する赤色素細胞が集積した感覚器官 Orange Pigment Organ (OPO) が形成されなかった。また OPO マイナスの個体では精子形成は認められたものの、輸精管内に貯蔵されない傾向があることが明らかとなった。この *Hox13* のノックアウト個体は生存可能であり、先行研究より *Hox13* の発現が確認されていた消化管では、異常は観察されなかった。このノックアウトを組織特異的に行うと筋肉と神経で *Hox13* をノックアウトしたときに同様の表現型が得られた。

○トランスジェニック系統の観察

先行研究では *in situ hybridization* によって *Hox13* の発現が確認されている。しかしながら、発現量が少ない組織では、この手法での発現の検出は困難である。トランスジェニック系統を用いることで、安定かつ高感度な蛍光タンパク質を用いた遺伝子発現の可視化が可能となる。

トランスジェニック系統の観察を行うと、先行研究で明らかになっていた消化管での発現に加えて入水孔や出水孔、脳、さらに輸精管での *Kaede* の発現が明らかになり、これらの器官で *Hox13* が発現していることが示唆された。RT-PCR を行うと、脳と OPO での *Hox13* の発現が確認された。一方で、OPO を構成する赤色素細胞では、*Kaede* の発現は確認されなかった。

結論と展望

本研究によって、カタユウレイボヤにおける OPO の形成不全という *Hox13* ノックアウトの表現型を初めて確認した。また、筋肉と神経組織で組織特異的にノックアウトを行うと同様の表現型を示すことが明らかになった。この OPO マイナスの個体では精子を貯蔵することができないことが明らかとなった。カタユウレイボヤの放精は光刺激によって引き起こされ、OPO は適切なタイミングでの放精に関与していると考えられる。また、この OPO では RT-PCR によって *Hox13* が発現していることが明らかとなった。これらにより OPO 形成における *Hox13* の関与が強く示唆された。

加えて、現在までに報告されていた領域以外での *Hox13* の発現も、トランスジェニック系統の観察と RT-PCR により新たに発見した。この発現領域には、OPO を構成する赤色素細胞に類似した赤色の細胞が存在した。しかしながら、どの赤色素細胞でも *Hox13* の発現は確認されなかったことから、*Hox13* は赤色素細胞の機能に細胞自律的な関与ではなく、間接的な関与、例えば輸精管先端への色素細胞の集合を制御していると考えられる。今後はより詳細な OPO 形成メカニズムについて研究を進め、*Hox13* の形態形成における機能解明と、脊椎動物と機能の比較を行う。

参考文献

1. Teddy Y. et al. (2009) *Dev Cell* **17**, 516-526.
2. Dehal P. et al. (2002) *Science* **298**, 2157-2167.
3. Ikuta T. et al. (2004) *PNAS* **101**, 15118-15123.