

# 2つの T-box 遺伝子産物 As-T と As-T2 の形とはたらき

「形とはたらき」領域 高橋 弘樹

## 要 旨

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。面白いことに、ホヤでは脊椎動物の T 遺伝子が発現する領域で2つの T-box 遺伝子 (*As-T* と *As-T2*) が発現し、しかも *As-T* は脊索でのみ、また *As-T2* は筋肉と尾芽でのみ発現する。さらに、mRNA の注入により *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。

## 1. 研究のねらい

1990年にマウスの短尾突然変異の原因遺伝子である *Brachyury* (*T*) 遺伝子がクローニングされて以来、この遺伝子がコードするタンパク質は T-ドメイン (あるいは T-box) と呼ばれる DNA 結合部位を含み、新規の転写制御因子として働くことが明らかになっている。マウスを初めとする脊椎動物では *T* 遺伝子は原腸陥入時の中胚葉 (筋肉形成領域を含む) および脊索で発現し、マウスおよびゼブラフィッシュの突然変異体の解析から *T* 遺伝子は脊索の分化と尾を含む体幹後部の形成に必須の遺伝子であることがわかっている。その後、この数年間に T-box 遺伝子産物は発生の上でさまざまな過程で機能を果たす重要な転写制御因子ファミリーを構成することがわかりだしている。

尾索動物ホヤの卵割パターンは一定で、オタマジャクシ幼生を構成する細胞数も少なく、細胞系譜や各割球の発生運命が解明されている。幼生の尾部の中央を走る正確に40個の脊索細胞、その両側に位置する42個の筋肉細胞の細胞系譜は完全に明らかにされている。このような特徴は脊索動物の中でもホヤだけにみられるもので、ホヤは細胞系譜に沿った遺伝子発現機構ならびに機能を解析する上で有利な研究材料を提供している。そのような背景をもと

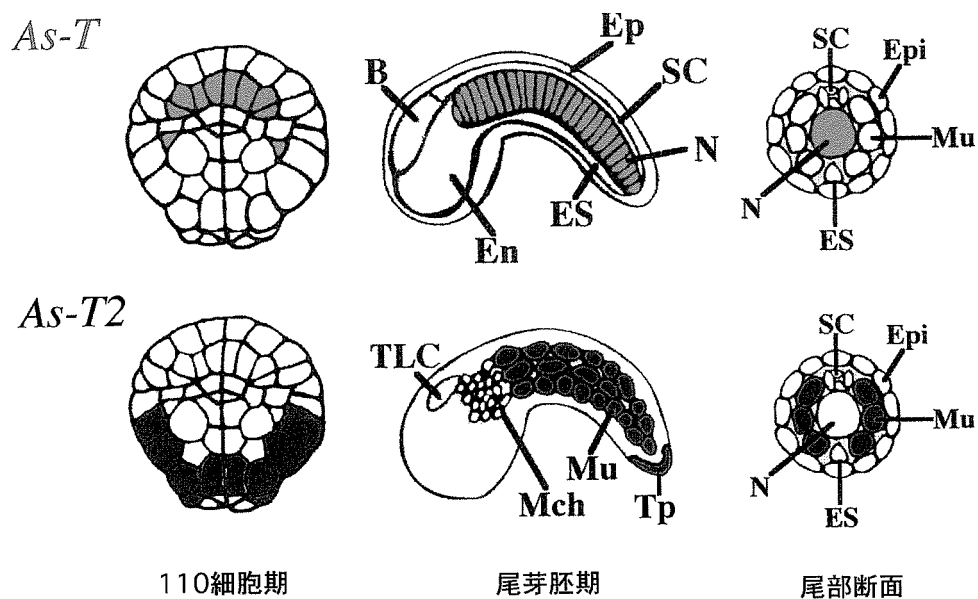


図1. マボヤの *As-T* と *As-T2* の発現領域模式図  
*As-T* は脊索細胞のみに発現し、脊索細胞分化に働く。*As-T2* は筋肉細胞と尾芽先端に発現し、筋肉細胞分化に働く。B: 脳胞 Ep: 表皮 En: 内胚葉 Es: 内胚葉索 N: 脊索 SC: 神経索 Mu: 筋肉 TLC: 体幹側細胞 Mch: 間充織細胞 Tp: 尾芽先端表皮細胞

に、すでにマボヤの *Brachyury* 相同遺伝子 (*As-T*) を単離し、*As-T* は脊索細胞でのみ発現すること (図1)、またその発現開始のタイミングは脊索細胞の発生運命が限定される時期と一致することを明らかにしている。さらに、マボヤの受精卵に *As-T* mRNA を顕微注入すると異所的に脊索の分化マーカーの発現が検出され、*As-T* の発現が脊索細胞分化に十分であることが示されている。さらに、マボヤの T-box 遺伝子の解析を進めてみると、マボヤにはもう一つ別の T-box 遺伝子 (*As-T2*) が存在し、この遺伝子は筋肉細胞と尾芽で発現すること (図1)、また *As-T2* の mRNA の顕微注入による過剰発現によって、非予定筋肉細胞で筋肉アクチン遺伝子およびミオシン重鎖遺伝子の発現が誘導されることが明らかになってきた。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。

## 2. 研究方法と成果

2つの T-box 遺伝子産物 *As-T* および *As-T2* の機能を解明するために、1). *As-T* および

*As-T2* の発現調節機構の解析、2). *As-T* および *As-T2* の機能ドメインの解析、3). *As-T* と *As-T2* の発現制御領域と機能解析、そしてさらに4). ターゲット遺伝子の解析を行った。

### (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いと推定される。そこで、まずはじめに *As-T* と *As-T2* の発現を調節する制御領域の解析を行った。それぞれの遺伝子の5'上流領域に *lacZ* をレポーター遺伝子としてつないだコンストラクトを作製し、マボヤの受精卵に顕微注入する方法で発現制御領域を調べてみた。すると、*As-T* の脊索での発現は転写開始点上流-280bpがあればレポーター遺伝子は脊索特異的に発現するが、転写開始点-250bpでは全く発現が認められなくなるという結果になった。ゲルシフト法とミュートーションコンストラクトを用いた解析の結果-280~-250bpに脊索特異的発現を調節するシスエレメントが存在することが示された。さらに、*As-T* 上流-172~-152bpの間には、マウスの *Brachyury* 遺伝子の *in vitro* でのDNA結合実験で示された、*Brachyury* の結合が予想される配列が2つパンドロームをなして存在する。-280-*lacZ* のコンストラクトからこの配列を取り除くとレポーター遺伝子の発現が消失し、逆に-280-*lacZ* と *As-T* mRNA を共注入すると、レポーター遺伝子の発現が異所的に検出されることから、*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係していると思われる。すなわち、*As-T* の脊索での発現には少なくとも2つの領域が必要なことになる。-280~-250bpの領域によって脊索特異的発現が開始され、次にそのとき発現が誘導された *As-T* 自身が T-box 結合配列を含む上流領域に結合してさらに脊索特異的発現を誘導すると考えられる。

*As-T2* について同様に発現制御領域を調べてみると、*As-T2* の尾部先端での発現を制御する領域は転写開始点から約-2kb上流に存在する。一方、筋肉での発現は転写開始点上流-230bpがあればレポーター遺伝子は筋肉特異的に発現するが、この領域のすぐ上流側に T-box 遺伝子の結合コンセンサス配列が2つ存在し、この配列を含む領域と *As-T2* mRNA の共注入を行うと異所的なレポーター遺伝子の発現が誘導された。一方で、この結合配列を含まない上流領域と *As-T2* mRNA の共注入では異所的なレポーター遺伝子の発現はみられなかった。このことから、*As-T2* においてもその筋肉細胞での発現制御において、*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と考えられる。

## (2) As-T および As-T2 の機能ドメインの解析

T-box 遺伝子の特徴づけている T ドメインは DNA 結合能を担い T-box 遺伝子が機能する上で重要な働きをしている。T ドメインは T-box 遺伝子ファミリー間で高度に保存されている一方で、それ以外の領域ではほとんど相同性は見いだされない。T-box 遺伝子の構造に着目した場合、ファミリー内での機能の違いをもたらす要因として大きく分けて2つの要因が考えられる。1つは T ドメインの認識配列がファミリー内で明確に異なっており、DNA との結合段階で厳密にターゲット遺伝子の発現制御領域に結合して転写を促すというものである。もう1つは T ドメインによる配列認識は比較的曖昧なもので、たとえば T ドメイン以外の部分と相互作用して働く因子が存在しその集合体として配列の認識、あるいは転写の制御を行っているという可能性である。

こうした可能性を検証するために、図 2. A で示すような *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調べた。その際に GFP をタグとしてつけて、タンパク質が翻訳されて核に移行していることを確認した。

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(図 2. B, b.d)。一方で *As-T2* の全長あるいは *As-T2* の T-box DNA 結合ドメインに *As-T* の C 末側転写活性化ドメインをつないだ *T2(BD):T(AD)* キメラを発現させた場合には、脊索細胞の異所的な分化はみられなかった(図 2. B, c.e)。つまり、*Brachyury* の T-box DNA 結合ドメインの特異性が脊索細胞分化の特異性を担っていることになる。

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は *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ている(図 2. B, c'.e')。一方で *As-T* の全長あるいは *T(BD):T2(AD)* キメラの場合には、このような異所的な筋肉細胞の分化はみられなかった(図 2. B, b'.d')。すなわち、筋肉細胞分化の特異性は *T2* の T-box DNA 結合ドメインの特異性が担っていることになる。これらの結果から、キメラ分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

*As-T* によって脊索細胞の分化を、あるいは *As-T2* によって筋肉細胞の分化を誘導すると

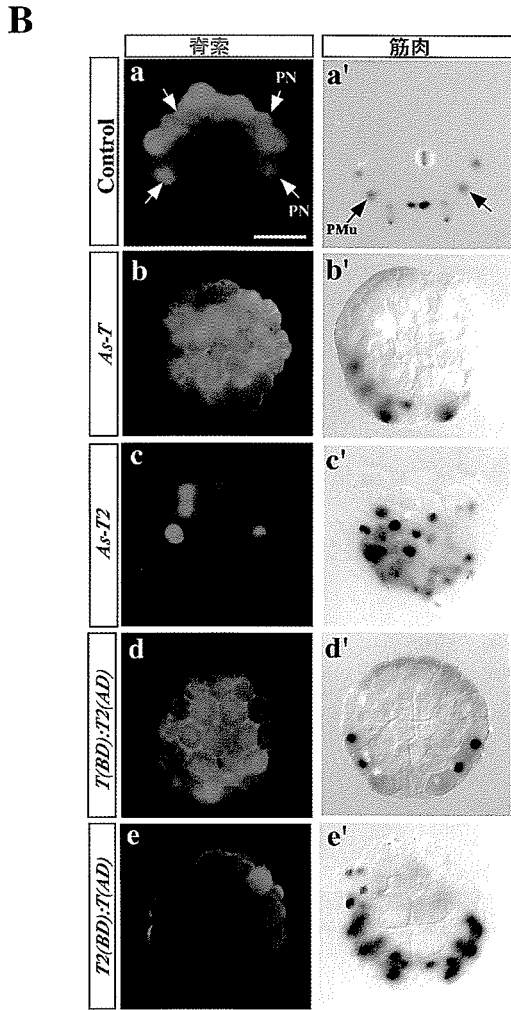
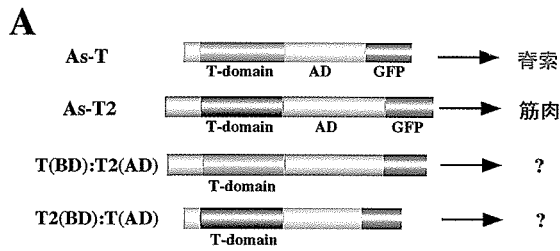


図 2. キメラ分子による As-T と As-T2 の機能ドメインの解析

- A. 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分子。
- B. キメラ分子の受精卵への顕微注入による効果。(a-e) 脊索細胞分化については脊索特異的に染色する Not-1 抗体を用いて検出している。(a'-e') 筋肉細胞分化については筋肉細胞特異的の marker 遺伝子であるミオシン重鎖遺伝子 (MHC) の *in situ* ハイブリダイゼーションの結果を示している。PN: 脊索前駆細胞 PMu: 筋肉前駆細胞

いう機能の特異性は T-box DNA 結合ドメインの特異性に依存している可能性がキメラ分子の実験によって示された。すなわち、As-T および As-T2 によって転写が活性化されるターゲット遺伝子の特異性は T-box DNA 結合ドメインの特異性に依存していることになる。

それでは、As-T と As-T2、自身の発現を制御 5' 上流領域に存在する T-box 結合配列の特異性はどうか? 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異所的にキメラ分子を発現させた胚における、lacZ レポーター遺伝子の発現を調べた。すると、As-T の T ドメインをもつキメラ分子 T(BD):T2(AD) は As-T 全長の mRNA と同じように、As-T-lacZ コンストラクトとの共注入によって、異所的な発現がみられた。一方、As-T2 の T ドメインをもつ T2(BD):T(AD) あるいは As-T2 全長の mRNA と As-T-lacZ コンストラクトとの共注入では異所的な発現はみられなかった。すなわち、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ることになる。As-T2 についても同様で、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 (図3)。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がかりになる可能性がある。

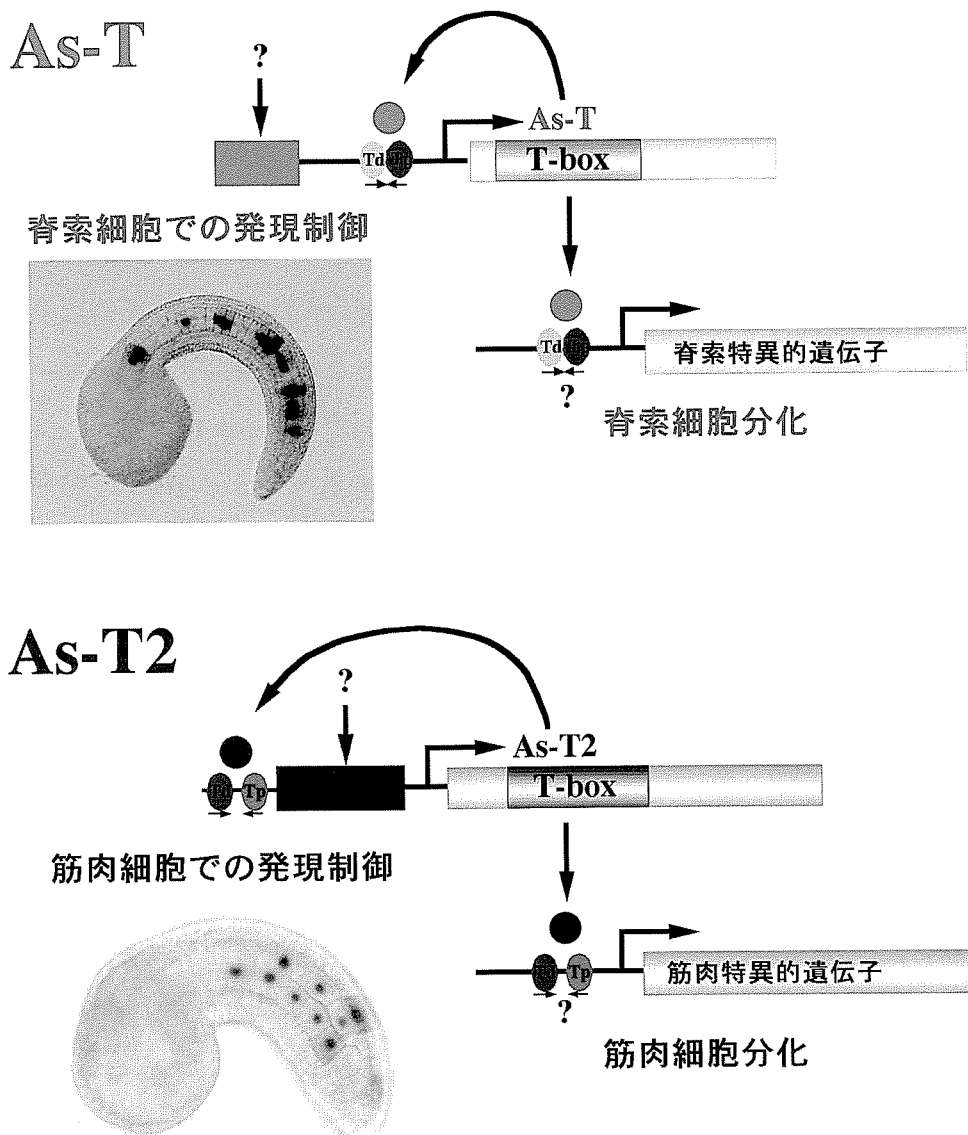


図3. *As-T*と *As-T2*の発現制御とターゲット遺伝子のモデル  
 トランス因子が *As-T*の発現制御領域に働くことで *As-T*の転写が開始され、*As-T*は自身の発現制御領域に存在する T-box 結合配列に結合して転写を活性化する一方、ターゲット遺伝子である脊索特異的遺伝子の転写を活性化し、脊索細胞の分化へと働く。*As-T2*の発現制御とターゲット遺伝子についても同様である。写真は *As-T-lacZ*による脊索細胞での染色、写真下は *As-T2-lacZ*による染色。

#### (4) ターゲット遺伝子の解析 -脊索形成の分子機構

個々の T-box 遺伝子を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。ここでは、ホヤの脊索形成過程で鍵となる働きをする *Brachyury* 遺伝子(T)の下流で働くターゲット遺伝子の解析結果について述べる。ユウレイボヤの *fork head* 遺伝子 (*Ci-fkh*) に *lacZ* をつないだコンストラクトをホヤの受精卵に導入すると、この遺伝子の発現パターンを正確に反映して、内胚葉（内胚葉索を含む）と脊索と神経索にレポーター遺伝子の発現が認められる。このコンストラクトの *lacZ* の代わりにユウレイボヤの *Brachyury* 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、*Brachyury* 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 ライブラリーをつくったところ、*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（図4）。

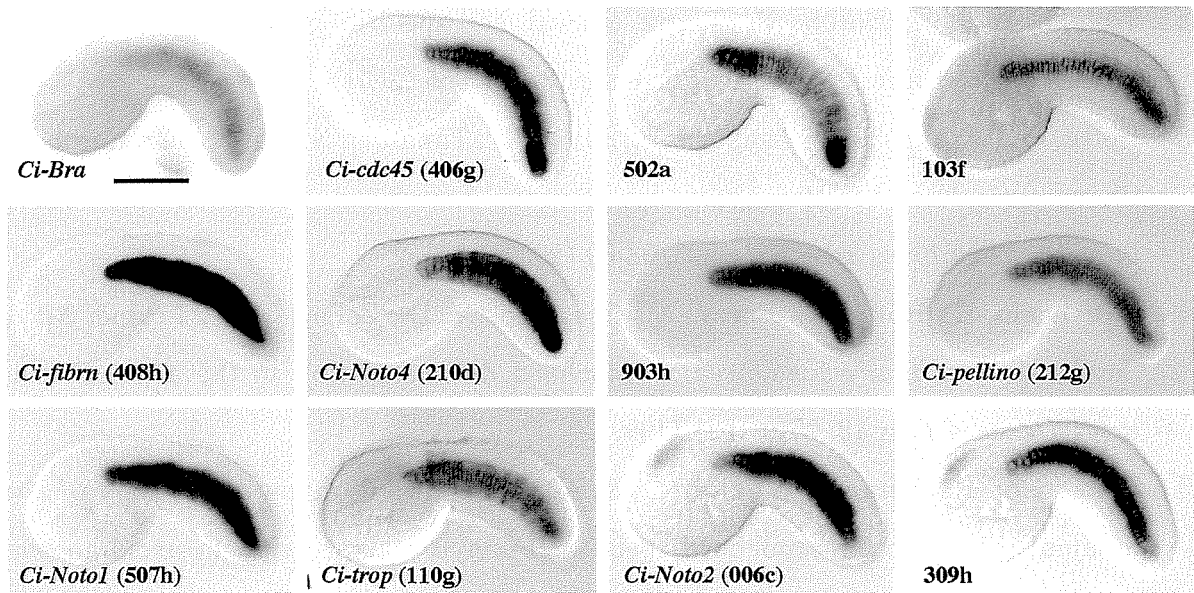


図4. 脊索細胞で発現する *Brachyury*(T) のターゲット遺伝子  
脊索細胞で発現するユウレイボヤ *Brachyury* と下流で働くターゲット遺伝子の発現。 *in situ* ハイブリダイゼーションによる染色で、各遺伝子はホヤ尾芽胚の尾部中央の脊索細胞で発現している。

### 3. 今後の展望

これまで述べてきたように、原始的な脊索動物であるホヤの *Brachyury* 遺伝子は脊索のみで発現し、しかもこの遺伝子の異所的発現は非予定脊索細胞を脊索細胞に分化させる能力をもつ。脊索は脊索動物という名がそこから由来するように、これらの動物群を特徴づける最も重要な形質である。脊索動物が進化する過程で、*Brachyury* 遺伝子に脊索形成という新しい機能が獲得されたものと思われる。したがって、おそらく祖先を共有していたであろう新口動物群のなかで、脊索をつくる動物と脊索をつくらない棘皮動物や半索動物の *Brachyury* 遺伝子の働きを比較解析することから、我々ヒトを含めた脊索動物の起源と進化を探れる可能性が生まれてきた。本研究による T-box 遺伝子ファミリーの機能特異性の解析は、種を越えた生物進化の分子メカニズムを理解する道にもつながる可能性がある。

### 4. 発表リスト

#### ・論文

- 1) Mitani, Y., Takahashi, H. & Satoh, N. Regulation of muscle-specific expression and function of an ascidian T-box gene, *As-T2*. *Development*. in press (2001).
- 2) Takahashi, H. & Satoh, N. Trunk lateral cell-specific genes of the ascidian *Halochynthia roretzi*. *Zoological Science* 18, 361-366 (2001).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) Hotta, K., Takahashi, H., Erves, A., Levine, M. & Satoh, N. Temporal expression patterns of thirty-nine *Brachyury*-downstream genes associated with notochord formation in *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Growth Differ.* 41, 657-664 (1999).
- 7) Mitani, Y., Takahashi, H. & Satoh, N. An ascidian T-box gene *As-T2* is related to the



Tbx6 subfamily and is associated with embryonic muscle cell differentiation. *Developmental Dynamics*. 215, 62-68 (1999).

・ 総説・解説

- 1) 高橋弘樹. 動物の発生における T ボックス遺伝子の機能進化. 蛋白質・核酸・酵素, Vol.46, No.10, 1349-1357 (2001).
- 2) 佐藤矩行・高橋弘樹・堀田耕司. ホヤの脊索形成機構. 細胞工学, Vol.20, No.3, 417-419 (2001).
- 3) 高橋弘樹・佐藤矩行. *Brachyury*. 「BioScience 用語ライブラリー」転写因子 <第 2 版>(田村隆明, 山本雅之, 安田國雄 編) 羊土社, 184-185 (1999).
- 4) Satoh, N., Hotta, K., Satoh, G., Taguchi, S., Yasuo, H., Tagawa, K., Takahashi, H. & Harada, Y., Developmental Mechanisms Underlying the Origin and Evolution of Chordates. In “The Biology of Biodiversity”, (ed. Kato, M.), Springer, 209-222 (1999).

外部発表 (論文 7 件、総説・解説 4 件、口頭発表 : 国内会議 5 件、国際会議 4 件)

謝 辞

本研究は京都大学大学院理学研究科 佐藤研究室および基礎生物学研究所 上野研究室のもとで行われたものである。本研究を遂行するにあたり、多大な協力をして下さいました、佐藤矩行教授、上野直人教授および共同研究者の三谷恭雄、堀田耕司、両氏に心から感謝します。