

脊椎動物の前後軸形成に異常を示す突然変異体の単離

プロジェクト代表者：川村哲規（理工学研究科・助教）

1. 研究目的

脊椎動物のからだには、肋骨や四肢などに代表されるように前後軸に沿った特徴的な形態がみられる。このような前後軸の位置による形態の違いは、発生過程において確立される特異性によってもたらされ、ショウジョウバエの遺伝学的解析を端尾とした研究から、*Hox* 遺伝子群がこの過程において中心的な役割を果たすことが知られている。脊椎動物においても、*Hox* 遺伝子群がこのようなパターンを前後軸に沿って形成し（下図）、前後軸のアイデンティティーを決めていることはこれまでの多くの研究結果から支持されている。しかしながら、脊椎動物の胚発生において、この秩序だった発現パターンがどのようにして形成されるのかに関しては殆ど分かっていない。本研究では、ゼブラフィッシュを用いた突然変異体スクリーニングにより、*Hox* 遺伝子の発現異常を示す変異体を単離し、その分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。



マウス胚における*Hox*遺伝子群の発現をそれぞれ色分けして示した

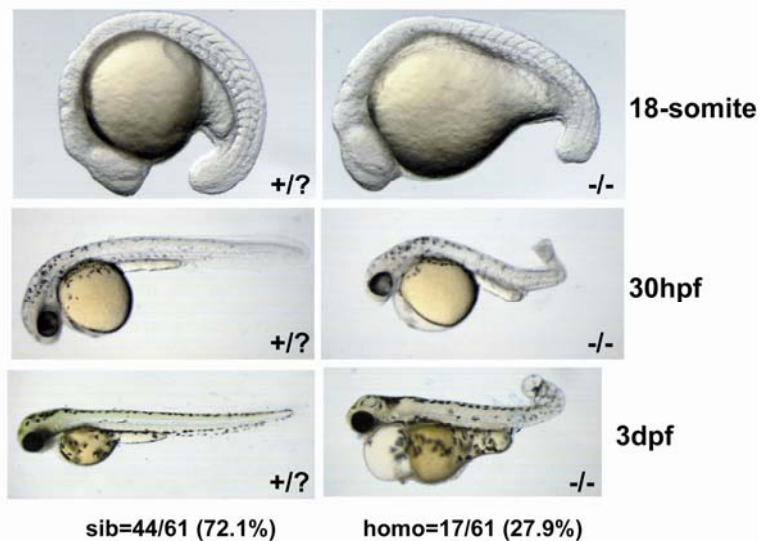
2. 結果

(1) ゼブラフィッシュを用いた突然変異体スクリーニング

3世代交配法により、突然変異体の探索を中心に行ってきた。脳領域がGFPで可視化された組換え魚(S4.2 transgenic fish)¹もしくは野生型の雄を用いて、3.5mM エチレンニトロソ尿素による変異原処理²を行った。処理した雄を野生型の雌と交配しF1を作製し、さらにF1同士を交配させ、F2ファミリーを作製した。現在までに、数十系統のF2ファミリーを用いてスクリー

ーニングを行い、初期発生において形態異常を呈する突然変異体を少なくとも10個、同定した。その中における代表的な例として、右に示す *sud317* 突然変異体は、前後軸に沿った体幹部の伸長不良が18体節期において顕著にみられる。また、受精後3日胚では、囲心腔の肥大が顕著に見られ、尾が上方へ曲がってい

sud317

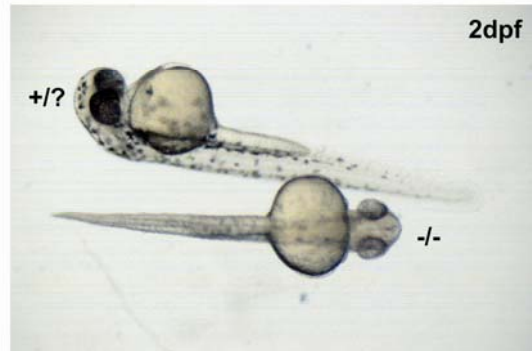


ることが野生型と比較して分かる。また、表現形が生じた割合が 27.9%だったことから、劣性の突然変異体であると考えられる。もう一つの具体例として、*sud323* は劣性の突然変異体であり、受精後 2 日目胚において、明らかな前後軸に沿った体幹部長の差がみられる。頭部領域の差は殆どないのに対して、体幹部の長さが *sud323* ホモ変異体では著しく短い。また、*sud323* ホモ変異体では、色素細胞の形成が野生型と比べて不十分であることが観察され、色素細胞の形成にも異常を呈していることが示唆される。また、その他にも興味深い変異体として、*sud309a* 突然変異体は、形態的には野生型と外見上区別することはできないが、接触刺激に対して殆ど逃避行動をとらない変異体などが得られている (data not shown)。

3. まとめ

現在、突然変異体スクリーニングを行っている途中経過での結果であるが、ENU 変異原処理により初期発生に異常を示す突然変異体が少なくとも 10 系統得られている。その中には、本研究課題である脊椎動物の前後軸形成に異常を示す可能性をもつ突然変異体を同定した。今後は、Whole-mount *in situ* hybridization 法による詳細なマーカー解析を行うことで、さらに突然変異体の異常を明らかにしたいと考えている。また、変異体スクリーニングを継続的に行うことで、さらなる興味深い突然変異体の単離を目指す。前後軸の特異性をもたらす *Hox* 遺伝子群の発現制御には、ヒストンのメチル化修飾やインスレーターなどクロマチン構造の変化による発現制御機構の関与が指摘されている³。今後は、これらの発現機構を明らかにする上で、染色体を生体内で可視化することで、発生の過程でどのような染色体高次構造の変化が見られるのかについても解析を進めていきたいと考えている。

sud323



4. 参考文献

1. Inoue, F., Parvin, M. S. & Yamasu, K. Transcription of *fgf8* is regulated by activating and repressive cis-elements at the midbrain-hindbrain boundary in zebrafish embryos. *Dev Biol* **316**, 471-86 (2008).
2. Solnica-Krezel, L., Schier, A. F. & Driever, W. Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics* **136**, 1401-20 (1994).
3. Chambeyron, S., Da Silva, N. R., Lawson, K. A. & Bickmore, W. A. Nuclear re-organisation of the *Hoxb* complex during mouse embryonic development. *Development* **132**, 2215-23 (2005).