

平成 26 年 5 月 23 日

報道関係者各位

国立大学法人 筑波大学

卵における遺伝子の働きを調べる新しい手法「マスク法」を開発 動物の形態形成の仕組みを解明するための有力なツール

研究成果のポイント

1. ホヤの卵において、狙った遺伝子の機能だけを抑制する新しい研究手法を開発しました。
2. これは、たくさんの遺伝子が関与する受精後の発生過程において、個々の遺伝子が果たす役割を解明する上で有効な手法であり、マスク法と名付けました。
3. マスク法を用いて、卵における遺伝子の働きをより早く、より簡便に調べることが可能となります。

国立大学法人筑波大学（以下「筑波大学」という）生命環境系の笹倉靖徳教授らは、ホヤの卵を用いて、狙った遺伝子の機能を特異的に抑制する新しい研究手法を開発しました。

一般に、卵内では多くの遺伝子が働くことで、受精後の発生過程が指定されています。多細胞生物の体作りの仕組みを解明するためには、卵内での遺伝子の働きを調べる必要があります。しかしながら卵は非常に複雑な細胞であり、個体の成熟後に形成される細胞であることから、卵内での遺伝子機能の解明は実験技術の発展した現在にあっても非常に困難です。

ホヤは、卵内における遺伝子の機能が 100 年以上も前から解析されてきた歴史があります。本研究では、そのホヤを用いて、卵内で働いている遺伝子の機能を選択的に抑制するという、これまで困難であった操作に成功しました。

マスク法と名付けた本手法により、「卵内で遺伝子がどのように機能することで多細胞生物の体が構築されていくのか」という発生現象の基本メカニズム解明の進展が期待されます。

この成果は Nature グループのオンライン誌「Scientific Reports（サイエンティフィックレポート）」に、英国時間 5 月 23 日午前 10 時付（日本時間 23 日午後 6 時）で掲載されます。

*本研究は文部科学省及び日本学術振興会の科学研究費補助金により行われました

研究の背景

多細胞生物は、一般的に受精卵から発生します。この発生の過程では、細胞が分化して特殊化し、形態形成により器官が形成されることなど、様々な変化が生じます。そうした変化がどのタイミングで、またどの領域で生じるかは遺伝的に指定されています。卵には遺伝子の転写産物（mRNA）が蓄積されていて、そのような発生の仕方を制御しています。生物の発生を理解するには、卵内の遺伝子やその転写産物が、発生初期の変化をどのように調節しているかを理解することが欠かせません。

しかしながら、卵内での遺伝子機能を調べることは技術的に容易ではありません。遺伝子の機能を明らかにするには、特定の遺伝子機能を欠いた個体（突然変異体など）を得て「その遺伝子機能が無い状態でどのような異常が見られるか」を観察することが効果的です。通常、卵の形成は生物個体の一生の後半に起こるため、遺伝子機能が欠損した個体をその段階まで飼育する必要があります。ところが、特にその遺伝子が卵以外でも重要な機能を持っている場合には、その遺伝子機能を欠いた個体を卵が形成される段階まで飼育することは非常に難しくなります。よく行われる手法として、卵やその元となる細胞に遺伝子の機能を抑制する物質を導入するやり方がありますが、導入が技術的に難しいことや、遺伝子の機能を完全に抑制できるわけではない等の欠点があります。それらの問題を克服する必要がありました。

ホヤは卵内に数多くの遺伝子の転写産物、すなわち mRNA を蓄えています。その mRNA の一部が特定の領域に局在し、体の頭部-尾部といった方向や、筋肉などの細胞の分化を指定していることが古くから知られています。この理由から卵内 mRNA の機能の解析が盛んに行われてきました。

しかし、これまでそれらの卵内 mRNA の機能を効果的に抑制する手法があまりなく、遺伝子の多くについて、卵での機能は不明なままです。ホヤでは、前述の「遺伝子機能を欠損した」個体の作製技術が発達してこなかったこともあって、卵における遺伝子機能の解明が立ち遅れていました。本研究グループは、このホヤの欠点を克服して遺伝子機能を探る研究を続けてきました。ホヤの1種カタユウレイボヤを用いて、遺伝子やゲノム改変技術を成功させ、また突然変異体を作り遺伝子機能を明らかにしてきました。

研究内容と成果

本研究においては、前述のゲノム改変技術を用いて、卵において緑色蛍光タンパク質遺伝子 GFP を発現させ、「光る卵」を生み出すホヤ系統の作製を試みました（図1）。しかしながら作製した系統の多くでは、卵で GFP を発現しませんでした。何らかの理由で、ホヤでは GFP の発現が卵において抑制されてしまうことがわかりました。また、得られた卵から発生した個体が異常な発生を示すことを見出しました（図2）。

GFP を卵で発現させるにあたっては、卵で機能する遺伝子の部分配列を融合させました。今回の研究では、ホヤ卵で発現することが既に知られている *Ci-pem* という遺伝子の一部を

使いました。そこで、異常な発生の原因はこの *Ci-pem* に関連しているのではないかと予想し、卵におけるこの遺伝子の mRNA の発現を調べました。すると、通常は卵内で発現し、一部に局在しているはずの *Ci-pem* mRNA が、本実験で作製した系統の卵では発現していないことがわかりました (図3)。つまり、卵での *Ci-pem* の発現を抑制することに成功していたのです。またこのことにより、*Ci-pem* がホヤの初期発生に非常に重要な働きをしていることがわかりました。

続いて、*Ci-pem* 以外の遺伝子も同様の手法で阻害できるかどうかを調べました。*Ci-pem* の代わりに *Ci-mT* 遺伝子の一部あるいは *Ci-Nut* 遺伝子の一部を GFP につないで系統を作製したところ、それぞれ *Ci-mT* と *Ci-Nut* 遺伝子がそれぞれの系統の卵において発現抑制され、mRNA が消失することがわかりました (図4の左)。また、それらの卵では、他の遺伝子の発現には影響がありませんでした。つまり、それぞれの遺伝子を特異的に抑制した卵を得ることができたこととなります。

遺伝子の中には、卵で機能するだけでなく、発生過程で別の機能を持つ遺伝子も数多く存在します。そのような遺伝子の働きを調べるには困難が伴います。その遺伝子の機能を阻害した場合、得られた異常がはたして卵内での働きを阻害したためなのか、あるいは別の機能を阻害したためなのかを区別して調べるのが難しいからです。

同研究グループは、上記の卵内 mRNA の発現抑制が、発生過程での遺伝子機能にも影響を与えるかを確認しました。*Ci-Nut* 遺伝子は卵内だけでなく、神経系でも発現して機能します (図4の右)。そこで *Ci-Nut* の抑制系統において、卵だけでなく神経系でも発現が消失しているかを観察しました。すると、卵での発現がないにもかかわらず、*Ci-Nut* は神経系では正常に発現していました (図4の下)。つまり今回発見した手法は、遺伝子の発現を卵でのみ特異的に抑え、発生過程途中での発現や機能には影響を与えないことがわかりました。

今後の展開

今回、発見した卵での遺伝子抑制方法を、遺伝子機能をマスクするという意味を込め、マスク法 (MASK : **M**aternal mRNA-**s**pecific **k**nockdown) と名付けました。本研究の今後の展開は2つあります。1つはマスク法を用いて、ホヤの卵内 mRNA の機能を解明することです。マスク法は遺伝子改変系統を作製するだけの単純な方法です。この方法を用いることにより、ホヤ卵で発現している遺伝子の mRNA を抑制し、その機能を1つでも多くの遺伝子について明らかにしたいと考えています。もう1つは、マスク法によって遺伝子の発現が卵でのみ抑えられる仕組みを解明したいと考えています。それを解明することで、ホヤ卵でのユニークな遺伝子発現調節の仕組みが明らかになると期待しています。

参考図

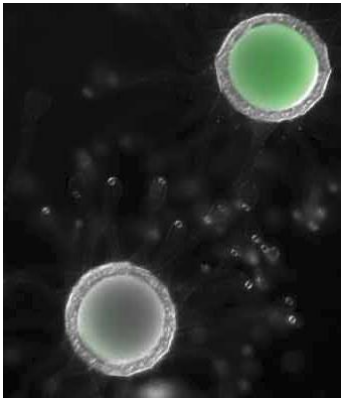


図1 ホヤ卵における GFP の発現。GFP が発現し緑に光る卵（右上）も得られるが、多くの場合、卵は左下のように GFP を発現せず、光らない。図は *Scientific Report* の該当論文から引用。



図2 正常なホヤ幼生（左）と、GFP の光らない卵から育った幼生（右）。ホヤの幼生は通常オタマジャクシの形をしているが、右側の幼生はそのような形態を取れず、非常に強い形態上の異常を示す。図は *Scientific Report* の該当論文から引用。

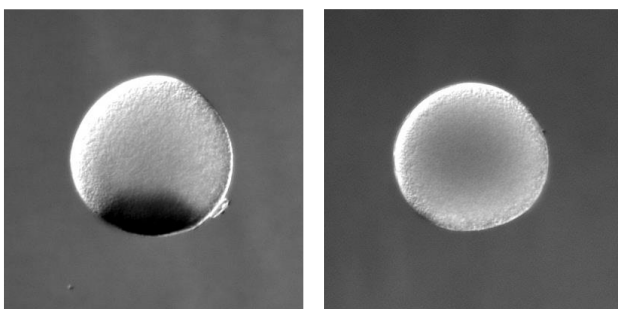


図3 *Ci-pem* mRNA の卵内での発現（左）と、*Ci-pem* の発現がマスク法により消失した卵（右）。*Ci-pem* mRNA は卵の一部に局在し（黒で示された部分）、体の後ろ側を作る領域を指定する。右の卵では、*Ci-pem* の発現が検出限界以下になっている。図は *Scientific Report* の該当論文から引用。

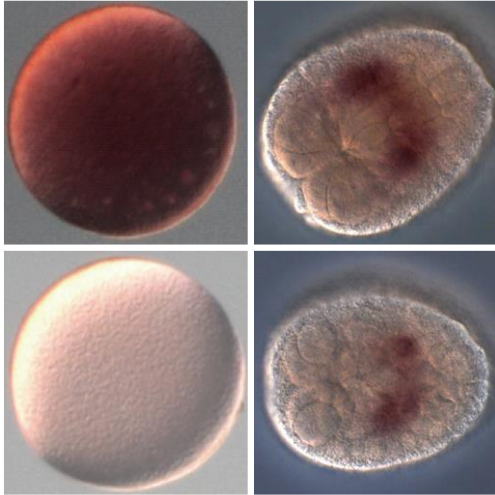


図4 *Ci-Nut* の卵（左）と発生の進んだ胚（右）における発現。茶色が *Ci-Nut* の発現を示す。*Ci-Nut* は卵及び神経系で発現する。上の2枚は正常個体での発現。下の2枚はマスク法により *Ci-Nut* の発現を抑制した個体。下では、卵での発現は検出できていないが、神経系での発現は正常に検出できている。図は *Scientific Report* の該当論文から引用。

掲載論文

Transposon-mediated targeted and specific knockdown of maternally expressed transcripts in the ascidian *Ciona intestinalis*

論文題名（和訳）ホヤの一種カタユウレイボヤの卵内で発現する遺伝子転写産物におけるトランスポゾンを用いた選択的かつ特異的な発現抑制

著者：飯塚貴子¹、三田薫¹、保住暁子¹、濱田麻友子²、佐藤矩行²、笹倉靖徳¹

1. 筑波大学・生命環境系/大学院生命環境科学研究科
2. 沖縄科学技術大学院大学・マリングenomクスユニット

公開日：英国標準時間 2014年5月23日午前10時（日本時間5月23日 午後6時）

問い合わせ先

筑波大学・生命環境系（下田臨海実験センター勤務）
教授 笹倉 靖徳（ささくら やすのり）