

Title	両生類胚の初期発生においてIRG1は高温特異的に発現する
Sub Title	High-temperature-dependent expression of IRG1 in amphibian early embryogenesis
Author	久保, 友里恵(Kubo, Yurie)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2015
Jtitle	生命と情報 No.22 (2015.) ,p.107- 115
JaLC DOI	
Abstract	<p>代表的なモデル実験動物であるアフリカツメガエル(<i>Xenopus laevis</i>)は, 13°Cから30°Cという幅広い温度において正常な胚発生を進めることができる。これは温度によって変化するタンパク質の立体構造の影響を緩和させる分子が存在している可能性を示唆させる。そこで私はツメガエル胚を対象として, 該当する分子の同定ならびに解析に取り込むことにした。</p> <p>まず, 異なる温度で培養した胚に対して発現比較スクリーニングを行ったところ, IRG1(immunoresponsive gene 1)が高温条件下で特異的に発現する候補因子に挙げられた。この上昇はRT-PCRでも確認された。そこで, IRG1をクローニングし, 発現解析ならびに機能解析用ベクターに挿入した。in situ hybridizationによる詳細な発現解析でも高温特異性は認められた。ただ, IRG1 mRNAを顕微注入したが, 温度に対する胚の生存の感受性に大きな変化は確認できなかった。面白いことに, 塩基性条件化でもIRG1の発現上昇が認められた。</p> <p>IRG1は確かに高温条件に登場する分子であったが, 機能については議論の余地が残る。また, 半致死的条件マーカーとしての活用も期待される。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2015年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000022-0107

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

High-temperature-dependent expression of *IRG1*
in amphibian early embryogenesis

両生類胚の初期発生において*IRG1*は高温特異的に発現する

環境情報学部4年 久保友理恵

要旨

代表的なモデル実験動物であるアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)は、13 °Cから30 °Cという幅広い温度において正常な胚発生を進めることができる。これは温度によって変化するタンパク質の立体構造の影響を緩和させる分子が存在している可能性を示唆させる。そこで私はツメガエル胚を対象として、該当する分子の同定ならびに解析に取り組むことにした。

まず、異なる温度で培養した胚に対して発現比較スクリーニングを行ったところ、*IRG1* (*immunoresponsive gene 1*)が高温条件下で特異的に発現する候補因子に挙げられた。この上昇はRT-PCRでも確認された。そこで、*IRG1*をクローニングし、発現解析ならびに機能解析用ベクターに挿入した。*in situ hybridization*による詳細な発現解析でも高温特異性は認められた。ただ、*IRG1* mRNAを顕微注入したが、温度に対する胚の生存の感受性に大きな変化は確認できなかった。面白いことに、塩基性条件化でも*IRG1*の発現上昇が認められた。

*IRG1*は確かに高温条件に登場する分子であったが、機能については議論の余地が残る。また、半致死的条件マーカーとしての活用も期待される。

Keywords: 温度変化, 初期発生, 遺伝子発現, マイクロアレイ, *IRG1*

1. 背景

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)には、非常に幅広い温度範囲において胚発生を正常に進めることが可能であるという特徴がある。低い温度では13 °C付近から、高い温度では30 °C付近に至るまで、正常に発生を行うことが可能であり、発生速度も温度の上昇と比例して速くなる(Khokha *et al.*, 2002; Tinsley *et al.*, 2011)。しかし、この幅広い温度範囲で正常に発生が進むという点に疑問が生じる。なぜなら、初期発生には様々なタンパク質が関わっており、タンパク質の立体構造は液相、pH、そして温度といった要素によって構造が決定するとい

養はすべて0.1x SSを用いて行った。10x SSに対して、HClを用いてpH 5と6の0.1x SSに調整し、NaOHを用いてpH 8と10の0.1x SSに調整した。

黒田研の基本プロトコルの記載されたウェブページ: <http://kerolab.jp>

2.2. RNA抽出とマイクロアレイ解析からのRT-PCR解析ならびに*in vitro*転写によるプローブ作成と*in situ* hybridization

サンプルは15 °C (1サンプル), 22 °C (2サンプル), そして29 °C (1サンプル)の3条件において, stage 10 (原腸胚期)まで培養した。各3個分の胚を1.5 mLチューブに入れ, 胚の入ったチューブに1 mLのRNAisoを入れた。溶解した各サンプルからフェノール・クロロホルム核酸抽出法によってRNAを抽出し, 20 µLの超純水に溶かした。マイクロアレイ解析は産業技術総合研究所(つくば市)に委託した。RT-PCRの方法, *in vitro*転写ならびに*in situ* hybridizationは黒田研の基本プロトコルに従った。用いたプライマーを以下の通り。

IRG1-fw primer: 5' -GCAGCTCCTCTCCATTCTCACTAAGCTTTG-3'

IRG1-rv primer: 5' -GGGAAGTATGACTGTGTATTGGTGACTTTTATGTTACTG-3'

2.3. mRNAの合成と顕微注入

pCS2-*IRG1*をAsp718で直鎖化した後, mMessage mMachine SP6 Kit (#AM1340, Ambion)を用いてmRNAを合成した。合成はkitのプロトコルに従った。合成した*IRG1* mRNAを適切な濃度に希釈した後, 顕微鏡下で電動マイクロインジェクター(#IM-300, ナリシゲ)及び微小ガラス針を用いて胚内にmRNAを注入した。

3. 結果

3.1. 異なる温度で培養した胚のマイクロアレイ解析と*IRG1*遺伝子

培養温度として, 15 °C (1サンプル), コントロール胚として22 °C (2サンプル), そして29 °C (1サンプル)の3段階で原腸胚期まで培養した。それらのサンプルからTotal RNAを抽出し, マイクロアレイ・スクリーニングによって比較した結果, 高温条件において*IRG1*の発現が高いことが判明した。*IRG1*をクローニングし, 発現解析用ならびに機能解析用ベクターに挿入した(図2)。

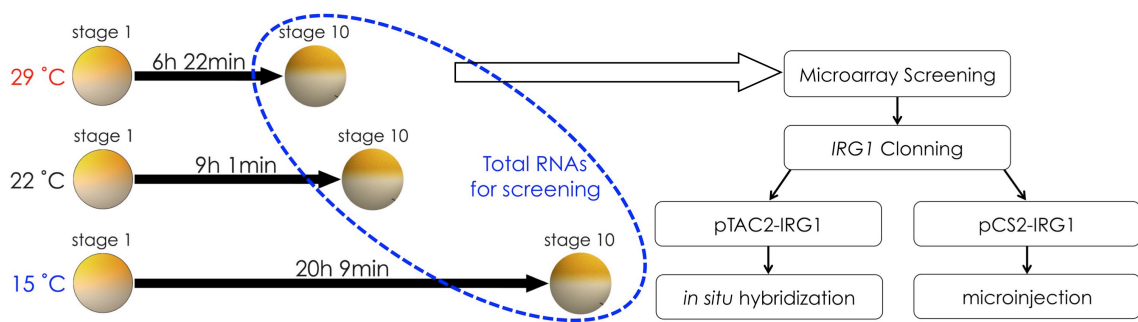


図2 Total RNAを抽出し，*IRG1*遺伝子解析を行った研究の流れ

原腸胚期まで培養した15°C，22°C，そして29°Cの胚をRNA抽出し，マイクロアレイ解析を行った．*IRG1*の全長クローニングをし，発現解析用としてpTAC2のプラスミドに挿入した．機能解析用では*IRG1*をpCS2プラスミドに挿入した．

3.2. *IRG1*はRT-PCRと *in situ hybridization*法により高温条件下で発現を確認

RT-PCR解析を用いて，発生分化マーカーである*Chordin*と*Noggin*との発現比較を行った．*IRG1*は高温で顕著に発現しているのに対し，*Chordin*と*Noggin*はどの温度条件でも同程度に発現していた(図3)．*in situ hybridization*では，stage 10，14，そして20の胚を用いて，発現確認を行った．その結果，stage 14で各温度の比較確認を行ったところ，目立ったシグナルは得られなかった(図4E-G)．しかし，stage 10と20においては，15°Cと22°Cの胚(図4C，D，I，J)を比較すると，28°Cで培養した胚のシグナルが濃く発現していることが確認できた(図4B，H)．

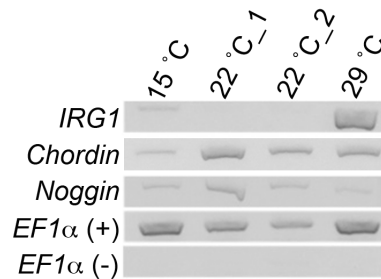


図3 *IRG1*と発生分化マーカーである*Chordin*と*Noggin*の発現確認

*IRG1*は高温条件下のみでバンドが確認できる．発生分化マーカーで温度条件に発現を左右されない*Chordin*と*Noggin*のバンドも同様の濃さであることがわかる．いずれもポジティブコントロールとして*EF1α*を用いた．+は逆転写酵素を含む場合，-は含まない場合を示す．

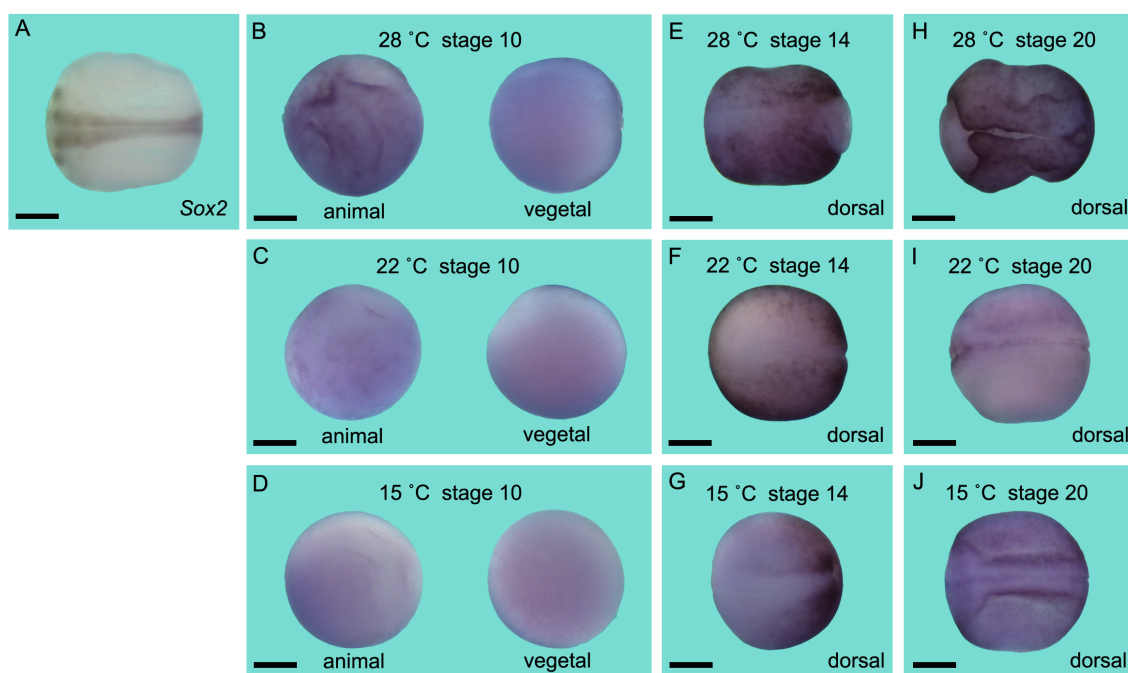


図4 *IRG1*の高温での発現上昇を示す*in situ hybridization*法の結果

(A) ポジティブコントロール. 22 °Cでstage 20における*Sox2*の発現. 予定神経領域のみが染色されている. (B-J) *IRG1*に対して*in situ hybridization*を行った胚. (B-D) stage 10, (E-G) stage 14, (H-J) stage 20の胚に対して*in situ hybridization*を行った結果. (B) stage 10まで28 °Cで培養した胚. C, Dと比較すると濃く染色されている. (C) 22 °Cでstage 10まで培養した胚. (D) 15 °Cでstage 10まで培養した胚. (E-G) 28 °C, 22 °C, そして15 °Cでは温度による影響が見られなかった. (H) stage 20まで28 °Cで培養した胚. I, Jと比較すると濃く染色されている. (I) 22 °Cでstage 20まで培養した胚. (J) 15 °Cでstage 20まで培養した胚. スケールバーは0.5 mm.

3.3. *IRG1*の胚全体への顕微注入

*IRG1*は細胞代謝に影響している遺伝子であるという報告がされている(Michelucci *et al.*, 2013). また, *in situ*の結果から高温特異的に発現している遺伝子であることが得られた(図4). それ故, 高温条件下にさらされたことで生じた炎症反応によって死滅するはずの細胞が, *IRG1*の発現によって細胞代謝を活性化して細胞死を回避する働きを持っていることが示唆される. 今回, *IRG1* mRNAを胚に顕微注入を行い各温度(28, 22, そして16°C)で48時間培養し表現型の比較解析を行った(図5). その結果, それぞれの温度で培養したコントロール胚と比較しても, 高温(図5E), 常温(図5F), そして低温(図5G)において顕著な表現型を示さなかった. つまり, 常温と低温で表現型が示されないことから, *IRG1*遺伝子は高温にのみに発現する遺伝子であることが明らかになった.

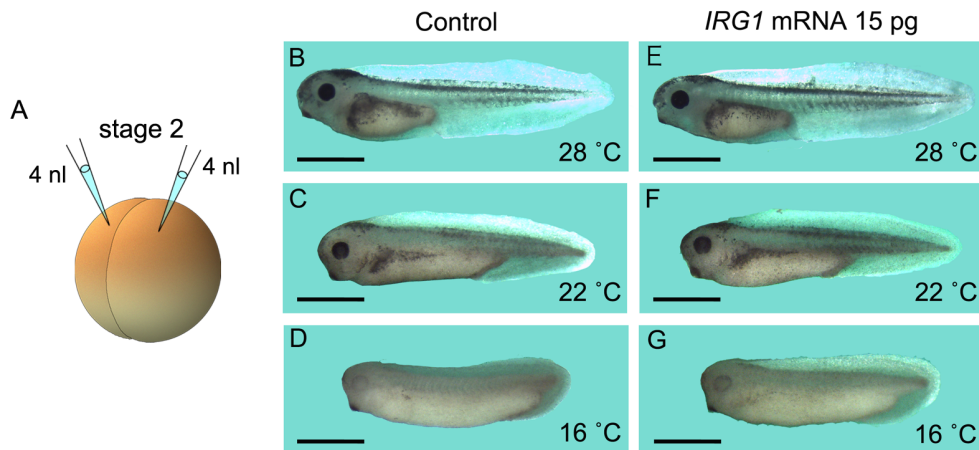


図5 *IRG1*を過剰発現しても温度変化に対する感受性は変わらない
 (A) 2細胞期における*IRG1* mRNAの胚全体への顕微注入. (B-G) 48時間まで培養させた胚. (B-D) E-Fに対するコントロール胚. (E-F) *IRG1* mRNA 15 pgを顕微注入した胚. 目立った表現型は観察されない. スケールバーは1 mm.

3.4. pHによる胚への影響

機能獲得型実験の結果により、*IRG1*遺伝子は悪条件に反応する遺伝子であることが示唆された。今回の実験では、培養液である0.1x SSのpHを変えて、化学的悪条件を作り出した。通常の培養に用いる0.1x SSのpHは7.4である。胚が培養可能なpH 5-10までの間で、22 °Cの温度で培養を行った。

その結果、コントロールであるpH 7.4は発現をしていないのに対し、pH 5とpH 6では薄いバンド、pH 8とpH 10では濃いバンドの*IRG1*の発現が見られた(図6)。

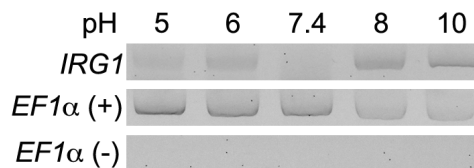


図6 化学的悪条件は*IRG1*の発現上昇を導く

22 °Cで培養し、stage 10でサンプリングを行った胚に対するRT-PCRの結果。pH 7.4ではバンドが見えないのに対し、pH 5, 6, 8, 10では*IRG1*の発現が見られた。ポジティブコントロールとして*EF1α*を用いた。+はRNA抽出液に対して逆転写酵素を加えた反応液、-はRNA抽出液をPCR法のテンプレートに用いたことを示す。

4. 考察

本研究において私は、脊椎動物の初期発生において高温特異的に発現上昇を示す遺伝子として*IRG1*を同定した。*IRG1*遺伝子は温度変化によって初期発生に影響していることがわかり、なおかつ悪条件において強く発現していることがわかった。ここでは、1) 悪条件での

*IRGI*の働きの理由、2) *IRGI*遺伝子のマーカーにむけての検討、そして3) 温度と発生の解明について議論していく。

4.1. 悪条件での*IRGI*の働きの理由

*IRGI*はマクロファージにおいて、際立った働きを示す。最近の報告では、魚類であるゼブラフィッシュにLPS (lipopolysaccharide)を含むバクテリアを用いた顕微注入実験で、*IRGI*遺伝子の過剰発現を促すことが報告されている(Sanderson *et al.*, 2015)。魚類以外にも哺乳類においても、*IRGI*はミトコンドリア内のATP合成に関与していることが知られており、その役割としてメチレンコハク酸の放出を促す(Degrandi *et al.*, 2009)。このメチレンコハク酸の増加はマクロファージの抗菌活性化を促す性質を持っている(Michelucci *et al.*, 2013)。

顕微注入実験では、どの温度でも胚への表現型に影響がなかった(図5)。胚は高温条件にさらされることでダメージを受け、死滅する細胞も生じるが、死滅した細胞は免疫システムによって除去されることで、周りの細胞への細胞死の影響が抑えられる。かつ、細胞代謝により細胞の増殖が促されることで、減少した細胞が補填され、結果的に正常な発生が行われると考えられる。

4.2. *IRGI*遺伝子のマーカーにむけての検討

本研究では*IRGI*が高温条件において発現上昇するだけでなく、pHにも感受性を示すことを示した。データとして示さなかったが、強酸性として区分できる0.1x SS (pH 3)で培養した胚は死滅した。しかし、pH 5では*IRGI*の発現が確認でき、弱酸性での培養が可能であることが示された。二酸化炭素を含む自然の雨はpH 5.6といわれており、pH 5以下の雨は酸性雨であることから、悪条件の環境下でもアフリカツメガエル胚は生育することが可能である事が示唆されたが、条件下で培養した場合と比較して*IRGI*の発現が弱い事が示された(図6)。アルカリ性溶液は皮膚などのタンパク質と統合して溶かす性質があるため、この化学的条件変化に応じて*IRGI*が強く発現したことが示唆される。それ故、*IRGI*を悪条件特異的マーカーとしての反応を調べていく価値がある。pHの違う培養液のみで調べたが、これ以外にもバクテリアの注入や塩濃度などの悪条件を調べていくことができる(Lee *et al.*, 1995)。特に、*IRGI*はLPSに反応して過剰に発現することが報告されていることから、LPSが含まれたタンパク質を顕微注入すると過剰に発現することが予測される。

4.3. 温度と発生の解明

本研究は、温度と発生という関係性で、初めてその遺伝子を報告する。特に温度というア

アプローチについては、知見がないため、発生生物学の分野において極めて注目される研究成果になり得るものである。さらに、*IRG1*遺伝子はマーカー遺伝子の役割を果たす可能性がある。代表的なマーカーの例として、*Chordin*が挙げられる。*Chordin*は神経誘導因子であることが知られており、研究において比較対象として用いる遺伝子の一つである(Sasai *et al.*, 1994)。本研究は、特定の遺伝子の初期発生における役割を調べる上での新たな遺伝子マーカーとして活用できることが期待される。

5. 謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導と適切なアドバイスをしてくださいました黒田裕樹准教授に心より感謝申し上げます。また、卒業生の大畑佳久さん、院生の古川知世さん、ケロラボメンバー全員には研究への助言など助けて頂きました。そしてマイクロアレイ解析に協力してくださいました産業技術総合研究所の伊藤弓弦先生と小沼泰子先生に深くお礼申し上げます。最後に、すばらしい研究環境や機会を与えてくださった富田勝教授に深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

- Degrandi, D., Hoffmann, R., Beuter-Gunia, C., and Pfeffer, K. (2009). The proinflammatory cytokine-induced IRG1 protein associates with mitochondria. *J. Interferon Cytokine Res.* 29, 55-67. [PMID: 19014335]
- Hall, C.J., Boyle, R.H., Astin, J.W., Flores, M.V., Oehlers, S.H., Sanderson, L.E., Ellett, F., Lieschke, G.J., Crosier, K.E., and Crosier, P.S. (2013). Immunoresponsive gene 1 augments bactericidal activity of macrophage-lineage cells by regulating β -oxidation-dependent mitochondrial ROS production. *Cell Metab.* 18, 265-278. [PMID: 23931757]
- Horswill, A.R., and Escalante-Semerena, J.C. (2001). In vitro conversion of propionate to pyruvate by *Salmonella enterica* enzymes: 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) and aconitase. Enzymes catalyze the conversion of 2-methylcitrate to 2-methylisocitrate. *Biochemistry.* 40, 4703-4713. [PMID: 11294638]
- Khokha, M.K., Chung, C., Bustamante, E.L., Gaw, L.W., Trott, K. A., Yeh, J., Lim, N., Lin, J.C., Taverner, N., Amaya, E., et al. (2002). Techniques and Probes for the Study of *Xenopus tropicalis* Development. *Dev. Dyn.* 225, 499-510. [PMID: 12454926]
- Lee, C.G., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., and O'Brien, W.E. (1995). Cloning and analysis of gene regulation of a novel LPS-inducible cDNA. *Immunogenetics.* 41, 263-270. [PMID: 7721348]
- Michelucci, A., Cordes, T., Ghelfi, J., Pailot, A., Reiling, N., Goldmann, O., Binz, T., Wegner, A., Tallam, A., Rausell, A., et al. (2013). Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110, 7820-7825. [PMID: 23610393]

- Sanderson, L.E., Chien, A.T., Astin, J.W., Crosier, K.E., Crosier, P.S., and Hall, C.J. (2015). An inducible transgene reports activation of macrophages in live zebrafish larvae. *Dev Comp Immunol.* 53, 63-69. [PMID 26123890]
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L.K., and De Robertis E.M., (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell*, 78, 779-790. [PMID: 8001117]
- Tinsley, R.C., York, J.E., Everard, A.L., Stott, L.C., Chapple, S.J., and Tinsley, M.C. (2011). Environmental constraints influencing survival of an African parasite in a north temperate habitat: effects of temperature on egg development. *S. B. S.* 138, 1029-1038. [PMID: 21524323]