

# 脊椎動物初期胚の後脳領域における位置情報の分子の実体の解明 Positional Information Governing Development of the Hindbrain in Vertebrate Embryos.

弥益 恭 理工学研究科生命科学部門  
Kyo Yamasu (Department of Life Science,  
Graduate School of Science and Engineering)

## 1. 序論

脊椎動物の脳発生では 脳内の様々な領域に形成されるシグナルセ タ が その周辺領域のパタ ニ グにおいて重要な役割を果たす。従って これらシグナルセ タ の形成制御機構を理解することが脳発生を理解する上で必須となる。代表的なシグナルセ タ 領域としては 後脳の第4 菱脳節 r4 及び中脳後脳境界 MHB が知られており それぞれ後脳後方及び中脳 小脳の発生を制御する。しかし 脳の発生におけるこれらの領域の重要性は広く認識されているにもかかわらず 胚内神経原基内において どのような機構でこれらの領域が形成されるのかについて 遺伝子レベルでの知見はほとんどない。本研究では この問題に取り込むことを目的として シグナルセ タ 領域に特異的に発現し これらの領域の形成を制御する遺伝子の転写制御機構の解析を行った。また 脳発生の制御に関わる新規遺伝子を見いだすため 脳形成異常変異体スクリ ニ グにも着手した。

## 2. 結果と考察

### 2-1. *hoxb1b* 遺伝子の発現調節機構の解析

ゼブラフィッシュ胚の r4 領域で最も初期に発現し この領域の発生を支配する遺伝子として ホメオボックス遺伝子 *hoxb1b* が知られる。我々はすでに *hoxb1b* の上流 8 kb 領域が体節形成期における後脳特異的発現を制御すること 下流 5 kb はそれより早い原腸形成期において後方神経板で発現を制御することを transgenic Tg 解析で明らかとしていた。そこでまず 上流 DNA 領域に様々な欠失を導入した上でレポ タ 遺伝子 GFP に対する転写調節活性をゼブラフィッシュ胚への遺伝子導入法により検討し この上流領域内に転写活性化領域が 2 カ所 UEC1, -4.6 kb; UEC2, -1.6 kb 存在することを明らかとした 図 。

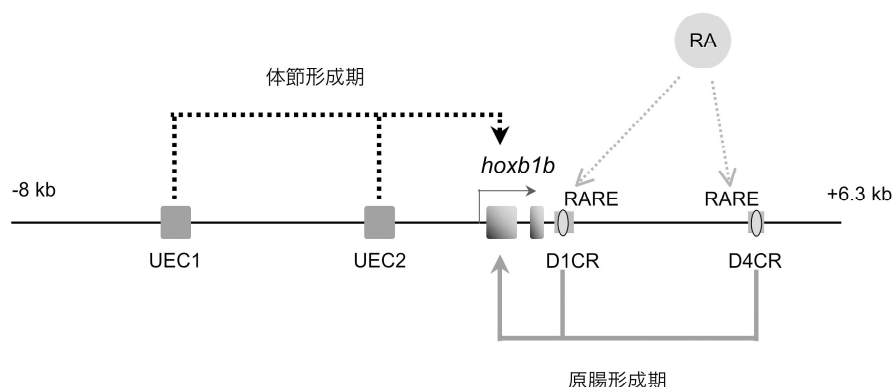


図 Hoxb1b の発現を調節するゲノム領域

一方 下流 5 kb 領域の転写活性化能が 領域 D1, +1.4 to +2.4 kb; D4, +4.4 to +5.5 kb に存在することをやはりレポ タ アッセイで明らかとした。さらに これら 領域内に 硬骨魚類間で保存された配列を 2 カ所に見いだした D1CR 及び D4CR 。これらの内部にはそれぞれ 1 カ所 retinoic acid RA 応答配列 (RARE)が存在する。これらの配列を破壊すると D1 及び D4 領域の転写調節活性はいずれも消失することから これらの RARE が後方神経管での *hoxb1b* の発現制御に必要であると考えられる。実際 luciferase 遺伝子をレポ タ として解析より D1 D4 いずれの転写活性も RA により増強された。

以前 ほ乳類の *Hox1* の発現がやはり RA により制御されること この発現制御が遺伝子下流の

RARE に依存することが報告されたが 本研究により RA による後方神経領域のパターンニングの制御が脊椎動物で広く保存されていることが明らかとなった。実際 RA は後方中胚葉で産生されることがゼブラフィッシュを含む様々な脊椎動物で最近明らかとなっている。しかし RA だけで *hoxblb* の発現前端が r4 の前端となることを説明することは難しい。現在 RA とともに働いて発現前端を r4 に決定する分子機構の検討をさらに進めている。

## 2-2. 脊椎動物胚発生における *pou2* 遺伝子の機能の解析

*pou2* 遺伝子は哺乳類の *Pou5F1* 相同遺伝子であり マウスでは初期胚細胞の未分化状態に維持に関わることが知られるが ゼブラフィッシュの場合 *pou2* 変異体 *spiel ohne grenzen*, *spg* の解析より *pou2* が内胚葉の形成 MHB の形成 そして後脳形成に必要であることが判っている。しかし 正常 *pou2* mRNA の導入による遺伝子強制発現実験では顕著な結果が得られていない。

我々は まず 転写活性化型 Pou2 VP16-Pou2 及び転写抑制型 Pou2 En-Pou2 遺伝子を作製し これらの mRNA を合成した上で胚に導入した。その結果 転写活性化型 Pou2 は前脳形成を抑制するのに対し 転写抑制型 Pou2 はむしろ MHB 及び後脳の形態異常を引き起こすこと 一部の胚で背側構造の肥大が起きることを見いだした。次に 特定発生時期での *pou2* 遺伝子の機能を検討するため 熱誘導性プロモーター *heat shock promoter*; *hsp* を抑制型 Pou2 遺伝子の上流域につないだ上 このコンストラクトをゲノムに取り込んだ Tg fish を作製した。様々な発生段階でこの Tg 胚に短時間の熱処理を加え 導入遺伝子の発現を誘導したところ 胞胚期に抑制型 Pou2 を誘導した場合は胚の背側領域の拡大がみられるのに対し 原腸形成終了期に誘導すると MHB 領域の形成不全が起きた。以上のことから *pou2* は 発生初期には背腹に沿った胚のパターンニング 原腸形成期には MHB 領域を含む脳形成の制御という少なくとも 2 つの発生過程に 転写制御を介して関わることが示唆された。

## 2-3. *pou2* 遺伝子の転写調節機構の解析

*pou2* は 卵形成時に発現した後 受精後は原腸形成期に予定神経領域 特に中脳 後脳周辺で一過的に発現し 体節形成期になると その発現は急速に消失する。我々はすでに *pou2* の脳における発現を制御する活性が遺伝子上流 6.5 kb 内に存在すること示唆するデータを transient 発現系により得ていた。そこで まずこの 6.5 kb 領域の制御下にある GFP 遺伝子コンストラクトを導入した Tg fish を作製し 導入胚での GFP の発現を蛍光及び *in situ hybridization* 法により詳細に検討したところ この導入遺伝子は内在 *pou2* の脳内での dynamic かつ領域特異的な発現を再現した。このことは *pou2* の脳内における発現調節領域が確かにこの 6.5 kb 内に存在することを明確に示す。さらにこの領域内の主制御領域が上流 2.3 kb 内にあることをやはり transient 発現により示した。

引き続き 2.3 kb 領域内に POU 転写因子結合配列 octamer; ATGCAAAT が 3 カ所存在することに注目し ゲルシフトアッセイにより Pou2 タンパク質との結合活性を検討したところ すべて Pou2 に特異的に結合することが明らかとなった。一方 これらの POU 結合配列に部位特異的塩基置換を導入したところ 上流 2.3 kb の転写制御能が消失した。従って *pou2* の脳における発現制御の維持には autoregulatory loop が関与すると考えられる。現在 *pou2* の中 後脳での特徴的な発現を原腸形成後期に活性化する初期制御領域の検討を進めている。

## 2-4. MHB 特異的に発現する *gbx2* 及び *fgf8* 遺伝子の発現調節

脊椎動物全ての胚において 中脳と小脳の発生を制御する MHB 領域の形成と維持は 様々な遺伝子が構築する調節ネットワークに依存するとされる。我々は MHB の形成とシグナル産生における鍵を握るとされる *gbx2* 及び *fgf8* 遺伝子について ゼブラフィッシュよりゲノム DNA をクローニングした。これらそれぞれについて 遺伝子周辺 DNA の転写調節能をやはり GFP をレポーターとした遺伝子導入実験で検討した。

まず *gbx2* については 遺伝子上流及び下流に MHB 特異的転写活性化領域 AMH enhancer が計 3 カ所存在した。その中で上流 enhancer AMH1 enhancer についてさらに検討を進め この enhancer 内の主たる活性領域に 転写調節因子 Pax2 と Otx2 の結合部位がそれぞれ 2 カ所 また

は5カ所存在することをゲルシフト法により示した。さらに Pax2 結合部位を部位特異的に破壊することで AMH1 enhancer の活性が失われること 図 AMH1 enhancer の作用が Pax2 欠失変異体魚 *noi* ではみられなくなることなどから AMH1 enhancer による *gbx2* の発現制御において Pax2 が重要であることを示した。


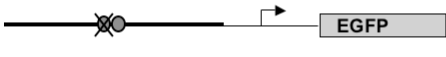
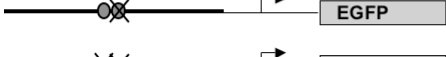

Construct	n	Expression in r1 (%)
 PB1-A-EGFP	271	40
 ΔPxl-EGFP	145	12
 ΔPxlII-EGFP	60	15
 ΔPxl/PxlII-EGFP	112	6

図 AMH1 enhancer 内に存在する Pax2 結合部位の役割。AMH1 内主活性領域である PB1-A の内部にある 2カ所の Pax2 結合部位 Px-1/II に塩基置換を導入し MHB 領域 r1 におけるレポ タ 遺伝子の発現を活性化させる能力を導入胚で検討した。

*fgf8* 遺伝子については 異なる胚領域での内在 *fgf8* の発現を再現しうる enhancer 領域が遺伝子周辺の異なる位置に多数存在していることを示した。胚発生における *fgf8* の複雑かつダイナミックな発現はこれらの enhancer により制御されると考えられる。この中で MHB での *fgf8* の発現を再現しうる S4.2 enhancer に注目して検討を進めた結果 この enhancer は中脳から後脳にかけて広く転写を活性化する#4 領域と 中脳と後脳での異所的発現のみ抑制する#2 領域の少なくとも 2カ所の調節領域を含んでいること #4 領域による転写調節には *gbx2* 同様 Pax2 が関与することを示した。

## 2-5. 脳形成異常変異体の作製と表現型解析

脳形成を制御する新規遺伝子とその機能を検討するため ENU を用いた化学変異原処理突然変異体の作製とスクリーニングを行った結果 中脳に異常を示す aa6k 変異体及び MHB と体節形成異常を示す変異体 *isthmus-somite disrupted; isd* を同定した。現在 aa6k について詳細な検討を進めており 中脳内に apoptosis が生じること 顎を形成する咽頭弓においては軟骨形成にも異常があることを見いだした。現在 原因遺伝子のマッピングを連鎖解析により進めており 原因遺伝子が連鎖群 LG3 内に存在し 1 cM の範囲内で連鎖する多型マーカーを決定した。現在さらにマッピングが進行中である。

## 3. まとめ

本研究では 後脳領域 特に r4 の形成を制御する *hoxb1b* 及び *pou2* について 後脳内領域に特異的な発現を制御するゲノム領域の特定に成功した。その結果 *hoxb1b* の発現には RA と RA 応答配列 *pou2* の発現では Pou2 自身による autoregulation が関与することが明らかとなった。また *gbx2* 及び *fgf8* の発現を制御するゲノム領域の検討でも大きな進展があり いずれについても MHB での発現を制御するゲノム領域が決定され 実際に制御を行う転写制御因子の一部が明らかとなった。今後 これらの遺伝子の発現制御機構をさらに検討し これらシグナルセクタの形成制御機構に取り組んでいきたい。

なお *pou2* については 熱誘導系という実験系の確立により 胚発生における役割を明らかとした。*pou2* の相同遺伝子は脊椎動物で広くみられるが これらの遺伝子の脳形成及び背腹軸に沿ったパターンにおける機能は知られていない。本研究をさらに発展させることで *pou2* を中心とした脊椎動物の発生制御機構の解明が期待される。

最後に 今回 脳形成異常変異体の作製に成功し その一つについては原因遺伝子の同定が進行中である。得られた変異体の表現型はこれまで報告がなく 全く新規の脳形成遺伝子 新規の脳形成制御機構の発見につながることを期待される。

## 4. 謝辞

本研究は研究室の二階堂昌孝助手及び学生諸君の協力の下に遂行された。この場を借りて感謝

致します。

## 5. 研究成果発表

### 原著論文

1. M. E. Islam, H. Kikuta, F. Inoue, M. Kanai, A. Kawakami, M. S. Parvin, H. Takeda, K. Yamasu  
Three enhancer regions regulate *gbx2* gene expression in the isthmic region during zebrafish development.  
Mech. Dev. (in press, 2006)
2. F. Inoue, S. Nagayoshi, S. Ota, M. E. Islam, N. Tonou-Fujimori, Y. Odaira, K. Kawakami, & K. Yamasu  
Genomic organization, alternative splicing, and multiple regulatory regions of the zebrafish *fgf8* gene.  
Develop. Growth & Differ. 48, 447-462 (2006)

### 著書

1. ウィルト発生生物学 Fred H. Wilt & Sarah C. Hake 著 赤坂ら監訳 弥益分担訳 東京化学同人 2006

### 学会発表

1. 井上詞貴 弥益 恭. ゼブラフィッシュ胚の中脳後脳境界における Fgf8 遺伝子の転写制御. 第 12 回小型魚類研究会 三島 2006 .
2. 太田 聡 弥益 恭. ゼブラフィッシュ Fgf8 の 2 種の isoform Fgf8a と Fgf8b の発現と機能の検討. 第 12 回小型魚類研究会 三島 2006 .
3. Md. E. Islam, H. Kikuta, F. Inoue, Mst. S. Parvin, A. Kawakami, H. Takeda, K. Yamasu. Three Enhancer Regions Regulate Expression of the *gbx2* Gene in the Isthmic Region during Zebrafish Development. Meeting on Zebrafish Development & Genetics Madison, USA
4. Md. E. Islam, H. Kikuta, F. Inoue, Mst. S. Parvin, A. Kawakami, H. Takeda, & K. Yamasu. Regulatory mechanism of the transcription of zebrafish *gbx2* gene in the isthmic organizer during brain formation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress Kyoto, Japan, 2006 .
5. 井上詞貴 弥益 恭. 脊椎動物胚の中脳後脳境界における *fgf8* 遺伝子の転写制御機構. 日本発生生物学学会第 39 回大会 広島 .
6. 太田 聡 藤森 典子 弥益 恭. ゼブラフィッシュ胚発生における FGF 受容体の役割の検討 第 28 回日本分子生物学会年会 博多 2005
7. 川鍋 俊博 石岡 亜季子 神藤 智子 武田 洋幸 弥益 恭. ゼブラフィッシュ *hoxb1b* 遺伝子の後方神経系特異的発現の制御 第 28 回日本分子生物学会年会 博多 2005
8. 井上 詞貴 弥益 恭. *fgf8* の中脳後脳領域における発現は領域特異的な転写の活性化と抑制に依存する 第 11 回小型魚類研究会 岡崎 2005 .
9. 小平裕子 井上詞貴 永吉さおり 川上浩一 弥益 恭. ゼブラフィッシュ *fgf8* 遺伝子の胚盤周縁部及び終脳における発現の制御機構 第 11 回小型魚類研究会 岡崎 2005 .
10. 太田 聡 藤森 典子 弥益 恭. ゼブラフィッシュ胚発生における FGF 受容体の役割の検討 第 11 回小型魚類研究会 岡崎 2005
11. K. Yamasu. Approach to the molecular mechanism of the hindbrain formation through the promoter analysis in zebrafish embryos. Strategic Conference of Zebrafish Investigators (Mount Desert Island, USA, 2005).
12. H. Kikuta, E. Islam, A. Kawakami, H. Takeda, K. Yamasu. Regulatory mechanism of the transcription of *gbx2* in the midbrain-hindbrain boundary region of zebrafish embryos. Fourth European Meeting on Zebrafish Genetics & Development (Dresden, Germany, 2005).
13. 井上詞貴 小平祐子 永吉さおり 川上浩一 弥益 恭.. ゼブラフィッシュ胚の MHB オ ガナイザ における *fgf8* の転写制御機構. 日本発生生物学学会第 38 回大会 (仙台 2005).