

# 脊椎動物胚において脳領域化を行う遺伝子制御機構の解明

Studies on the regulatory mechanism of the brain regionalization in vertebrate embryos.

弥益 恭 (理工学研究科・教授)

Kyo Yamasu (Grad. Sch. Sci. Eng., Professor)

## 1. 序論

ヒトを始めとする脊椎動物の脳は、運動、知覚、思考、意欲などの高次機能を担う大脳皮質、運動機能中枢の小脳、そして様々な生命維持機能を制御する脳幹から構成される。脳が持つこれらの多様な制御機能を解明することは、人間の生命活動と精神活動を理解する上で不可欠であるのみならず、様々な先天的・後天的精神疾患の病因の解明と治療、脳機能の工学的応用にもつながりうる重要な研究課題である。脳の複雑な機能の背景には、大脳や小脳の皮質層状構造、様々な神経核、そしてニューロンが形成する神経ネットワークなどの複雑な高次構造があるが、これらは全て、胚発生において、脳原基である外胚葉性肥厚構造=神経板の内部で進行する3次元の 패턴形成と領域化、そして適切な時期と領域における神経細胞分化、神経軸索の伸張とネットワークの形成により生じるものである。従って、これらの脳形成過程は、細胞核内の遺伝情報により制御される「自己組織化能力」、「自律的制御能力」の一つと位置づけられる。

脊椎動物胚の神経板が脳に発生する際に最初に見られる構造の出現、つまり脳の領域化が神経板の内部に生じるシグナル分泌センターに依存することが近年明らかとなりつつある。代表的なものとしては、神経板前端に生じる前方神経境界 (Anterior Neural Boundary, ANB) および中脳後脳境界 (Midbrain-Hindbrain Boundary, MHB) があり、各々が終脳 (大脳)・間脳及び中脳・小脳の誘導とパターン形成を制御するシグナルを分泌する。なお、このシグナルの実体は成長因子の一種、Fgf8であることがマウス及びゼブラフィッシュで明らかとされている。これらのシグナルセンター領域の形成を制御する遺伝子機構を理解することが、脊椎動物、そしてヒトの脳を理解する上で不可欠である。

本研究計画において、我々は、発生遺伝学、発生工学的手法を利用した研究に適する小型熱帯魚ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を脊椎動物のモデルとして用い、上述した脳領域化の分子レベルでの制御機構について解析を試みた。具体的には、まず、胚発生初期に脳原基の ANB 及び MHB に特異的に発現する2つの発生制御因子、Fgf8 と Gbx2 に着目し、これらの因子をコードする遺伝子 (*fgf8*, *gbx2*) のシグナルセンターにおける発現 (転写) 制御機構を解析することにより、脳の領域化において働く遺伝子ネットワークの、より上位で機能する分子レベルの脳形成制御機構の解明をめざした。その一方、我々は、以前より進めてきた発生異常変異体スクリーンの結果、MHB 及び中胚葉の分節構造 (体節) に異常を示す *isthmus-somite disrupted (isd)* 及び接触刺激反応及び顎形成に異常を示す *aa6k* 変異体を単離していたが、この両変異体について、染色体上の位置決定 (マッピング) を行い、原因遺伝子を特定することにより、脳の領域化を制御する新規遺伝子及び新たな脳形成制御システムを明らかとすることをめざした。

## 2. 結果と考察

### プロモーター解析による脳領域化の分子機構の研究

#### 1. ゼブラフィッシュ *fgf8* 遺伝子の MHB における発現を調節するゲノム領域 (S4.2 エンハンサー) の解析:

脊椎動物 *fgf8* 遺伝子は、体節形成期胚の中脳後脳境界 (MHB) に発現し、中脳と小脳の形成形成、あるいはパターンニングを制御する。我々はすでにゼブラフィッシュ *fgf8* 遺伝子の下流+14.0 kb の位置に、MHB での発現を活性化する 3.8 kb ゲノム DNA 領域 (S4 領域) を同定しており (Inoue et al., 2006)、本研究では、この転写調節領域についてさらに検討を行った。

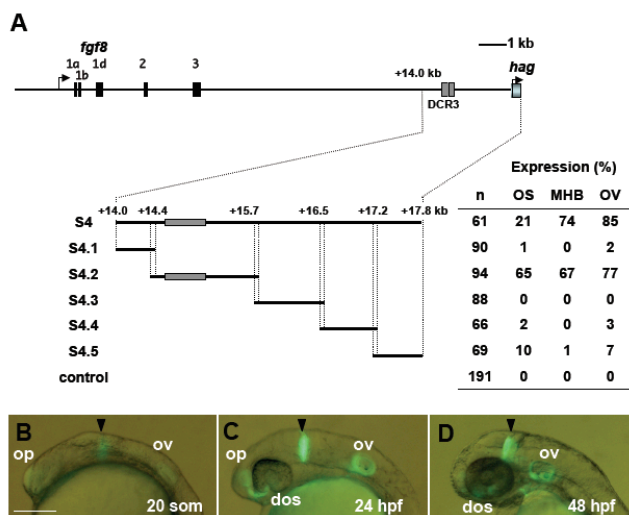


図1. ゼブラフィッシュ *fgf8* 遺伝子の構造と転写調節領域. (A) 黒四角はエクソン (1a, 1b, 2, 3)、灰色四角は保存配列 DCR3 を示す. その下に各 DNA 領域の OS, MHB, OV における発現活性化率を示す (%). (B-D) S4.2 エンハンサーによる Tg 胚での GFP の発現. 矢じりが MHB での GFP レポーター遺伝子の発現を示す.

領域及び#4領域による発現を、中脳及び後脳の中央部で抑制すること、(3) #2領域と#3/#4領域の協調作用により、発現がMHB (後脳前端) に限定されることを明らかとした。

なお、#2/#3/#4領域の配列は、魚類からほ乳類を含む調べた限り全ての脊椎動物の *fgf8* 遺伝子に共通に見られており、S4.2エンハンサーによる *fgf8* 遺伝子の制御機構は、脊椎動物の進化において保存されていることが伺われる。

## 2. S4.2エンハンサーのPax2転写因子による制御；

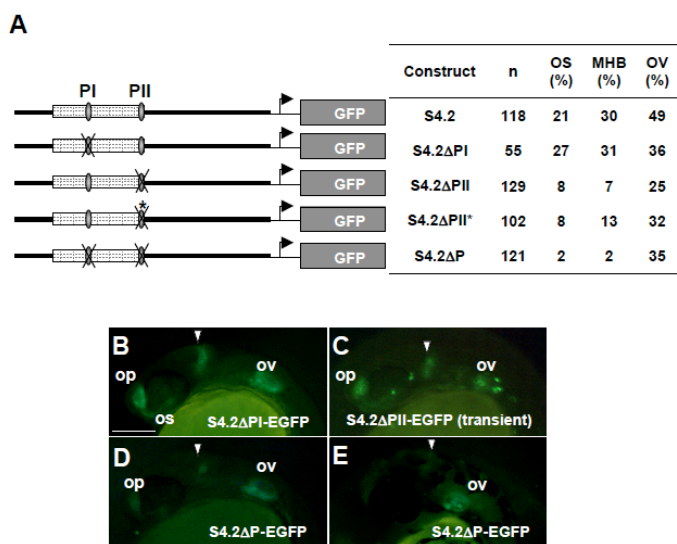


図2. S4.2 エンハンサー中の Pax2 結合配列の重要性. (A) エンハンサー中の Pax2 結合配列を破壊した上、転写制御能を検討した. (B-E) 各欠失コンストラクトの導入胚における発現. 単独の破壊では MHB での発現が減少し (B,C)、両方の配列が破壊された場合、MHB での発現は消失する (D,E).

その結果、まずS4.2内の1.3 kb領域 (S4.2領域) に、MHBでの発現制御活性が局在することを明らかとし、この領域をS4.2エンハンサーと名付けた (図1)。このエンハンサーの制御下にあるレポーター遺伝子 (GFP) をゼブラフィッシュ胚に導入してTransgenic 魚 (Tg魚) を作成し、Tg胚におけるレポーターの発現を、蛍光観察及びin situ hybridization法により詳細に検討した結果、MHBのほか、耳胞 (OV)、嗅覚上皮 (OP) 眼柄遠位部 (DOS) においても転写の活性化が起きることを明らかとした。

S4.2エンハンサー内に様々な欠失を導入した上、欠失S4.2の発現調節能をやはりレポーターの発現で検討することにより、(1) S4.2の内部にある#3領域及び#4領域が中脳から後脳前方で広く転写を活性化すること、(2) 33 bp領域 (#2c領域) が#3

同等された転写調節領域の塩基配列を検討することにより、転写活性化領域の#4領域に加え、転写抑制領域である#2領域にも、MHB周辺で発現する転写因子Pax2の結合配列が見いだされた (各々PxI、PxII部位、図2)。Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) 法によりこれらの配列へのPax2の結合能を検討したところ、Pax2と関連遺伝子Pax8がin vitroで実際に特異的にこの2カ所に結合した。さらに、クロマチン免疫沈降法により、胚内でもPax2結合配列にPax2が結合していることを示唆する結果を得ている。

これらのPax2結合配列が実際にS4.2エンハンサーの転写制御機能に必要であることを示すために、PxI、PxIIのいずれか、あるいは両方を破壊したS4.2エンハンサーの転写制御能をレポーターアッセイにより検討し、この2

カ所のPax2結合配列が協調的にMHBでのS4.2エンハンサーの活性に寄与していることを明らかとした。また、S4.2エンハンサーのMHBにおける転写活性化能は、Pax2遺伝子変異体 (*no isthmus*) では消失した。一方、Pax2の脳における強制発現により、S4.2エンハンサーの活性が中脳、あるいは後脳後方で異所的に活性化されることを確認した。以上は、Pax2がS4.2を介して*fgf8*の発現を胚で制御していることを示している。

### 3. ゼブラフィッシュ*fgf8*遺伝子のANBにおける発現調節領域の解析:

*fgf8*はそのほかに体節形成期胚のANB領域で発現して終脳(大脳)及び間脳の形成を制御する。そこでANBにおける発現調節領域(エンハンサー)を遺伝子周辺で検討した結果、遺伝子上流-7.5 kbから-4.0 kbまでのE2領域がANBエンハンサーの活性を持つこと、さらにその内部の1 kb領域(A2/A3領域)に活性が限局することを見いだした。現在、E2領域による転写制御能について、Tg胚を用いて詳細な検討を進めている。

### 脳形成異常変異体を利用した脳形成遺伝子の解明

脊椎動物の脳形成を制御する新規遺伝子を同定する目的でゼブラフィッシュを用いた変異体スクリーニングを行った結果、すでにMHB異常変異体*isthmus-somite disrupted (isd)*、旧称*ak1*及び中脳と顎形成の異常を示す*aa6k*変異体を得ており、本研究においてこれら変異体の解析を行った。まず*isd*については、1) 脳における領域マーカー遺伝子の発現解析より、初期における脳の基本的な領域化はほぼ正常に起きているものの、その後(体節形成期以降)の脳胞形成が異常であることが示された。また、2) *isd*胚でも沿軸中胚葉の分節(体節形成)の開始は野生型胚と同様にみられるが、その後発生が進むと分節が停止し、すでに生じた体節も形状が異常となること、3) 後方構造、特に尾部の伸張が見られず、かわりに膨大すること、4) 体節における筋細胞の分化が不完全であることが明らかとなった。

一方、*aa6k*変異体では、1) 中脳の未発達に加え、2) 接触刺激に対して応答性がないこと、4) 顎軟骨の形成不全がみられるが、顎形成に重要な役割を持つ神経堤細胞の分化と初期の移動は正常であることを明らかとした。*aa6k*変異については染色体多型マーカー(SSLPマーカー)を利用して染色体上の位置決定(マッピング)を行った結果、第3染色体上において連鎖マーカーを同定した。このマーカーの近傍には4-5個の遺伝子の存在が予想されたため、現在、これらを原因遺伝子の候補とし、各候補遺伝子について、*aa6k*変異体での塩基配列、そして変異体胚での発現パターンの異常の有無を検討中である。

### 3. まとめ

本研究の結果、以下のことが明らかとなった。

(1) *fgf8* 遺伝子の MHB での発現は、中脳・後脳における発現の活性化と中脳、後脳後方における発現抑制の協調作用により制御されていることが明らかとなった。

(2) 中脳・後脳での発現の活性化においては Pax2 結合部位が中心的な cis element であり、MHB 領域での発現に関しては実際に *pax2a* 遺伝子が不可欠である。

(3) 転写抑制には 33-bp 領域 (#2c 領域) が必要不可欠であるが、その作用を制御する trans 因子(転写因子)については今後の課題である。

(4) 以上の MHB 特異的制御領域の配列(DCR3)は脊椎動物の*fgf8* 遺伝子で高度に保存されており、*fgf8* の MHB での発現制御機構自体脊椎動物の進化の過程で保存されてきたと考えられる。

(5) 終脳、間脳の Fgf8 によるパターンニングにおいて重要な *fgf8* の ANB エンハンサーを *fgf8* 上流に同定しており、現在このエンハンサーによる制御機構の解明を進めている。

(6) 発生異常突然変異体スクリーニングにより単離した2種の変異体 *isd* と *aa6k* についての表現型の詳細な解

析の結果、各々が脳の形成に加えて体節 (*isd*) または顎 (*aa6k*) の形成不全を示した。従って、これらの変異体の原因遺伝子は脳形成を含む発生の様々な過程に関与するという多様な機能を有する。現在原因遺伝子の特定のため、ポジショナルクローニングを進めており、*isd* については数個の遺伝子を候補として絞り込んでいる。

今後、これらの研究をさらに発展させることにより、脊椎動物の脳形成における脳原基の領域化の遺伝子制御機構にさらに迫れるものと期待している。

#### 4. 謝辞

本研究は二階堂昌孝助教及び研究室の学生諸君の協力のもとに行われました。また、*isd* 変異体については東京工業大学生命理工学研究科の川上厚志博士との共同研究です。この場を借りて感謝いたします。

#### 5. 研究成果発表

##### 原著論文

1. M. Nikaido, K. Doi, T. Shimizu, M. Hibi, Y. Kikuchi, & K. Yamasu

Initial specification of the epibranchial placode in zebrafish embryos depends on the fibroblast growth factor signal.

*Dev. Dyn.* 236, 564-571 (2007)

2. 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 isthmus during zebrafish development.

*Mech. Dev.* 123, 907-924 (2006)

3. 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- 62 (2006)

##### 学会発表

1. K. Yamasu, 2nd Strategic Conference of Zebrafish Investigators (Asilomar, CA, USA). Expression of *fgf8* in the MHB region is regulated by cooperative functions of the activator and suppressor elements in the downstream region.

2. 井上詞貴、弥益 恭, 第12回小型魚類研究会(三島).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

3. 太田 聡、弥益 恭, 第12回小型魚類研究会(三島).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

4. Md. E. Islam, H. Kikuta, F. Inoue, Mst. S. Parvin, A. Kawakami, H. Takeda, K. Yamasu. 7th International Conference on Zebrafish Development & Genetics (Madison, USA) . Three Enhancer Regions Regulate Expression of the *gbx2* Gene in the Isthmic Region during Zebrafish Development.

5. Md. E. Islam, H. Kikuta, F. Inoue, Mst. S. Parvin, A. Kawakami, H. Takeda, & K. Yamasu. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress Kyoto, Japan) . Regulatory mechanism of the transcription of zebrafish *gbx2* gene in the isthmus organizer during brain formation.

6. 井上詞貴、弥益 恭.日本発生物学会第39回大会(広島).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.