

脊椎動物の脳形成におけるシグナル分泌センターの形成制御機構の解明

プロジェクト代表者：弥益 恭（理工学研究科・教授）

1. 序論

動物の脳については、個体の生命維持機能から行動制御、感覚、論理的思考、認知、創造性等の高次機能まで多様かつ重要な機能が知られる。従って、脳機能の理解は人間そのものの理解に不可欠であるのは当然であるが、さらに様々な脳・神経疾患の発症機構と診断、そしてその治療法の開発にも不可避の研究課題である。しかしながら、高等脊椎動物において、脳の構造と機能は極めて複雑化しており、全体像の把握は容易ではない。従って、脳の理解においては、個体発生における形態的複雑化の過程を明らかにすることが重要なヒントを与えるものと期待される。

脊椎動物の脳形成初期においては、予定中脳と後脳の境界部（Midbrain-Hindbrain Boundary, MHB）の形成、そして MHB 領域からの分泌シグナル（FGF8）の産生が周辺領域、特に中脳と小脳の発生に必要であることが近年明らかとなった。本研究ではまず、1）中脳-後脳領域、特に MHB の形成における POU 転写因子遺伝子 *pou2/pou5f1* の機能、2）*pou2* 遺伝子の脳領域における発現制御機構、3）MHB における *fgf8* 遺伝子の発現調節について、小型魚ゼブラフィッシュを用いた研究を行った。また、4）マウス及びゼブラフィッシュで前方脳領域の発生に不可欠な *Otx2* 遺伝子の前・中脳特異的発現制御機構の検討を行った。

2. 結果

(1) 中脳及び後脳領域の発生における *pou2* 遺伝子の機能

転写抑制型 *pou2* 遺伝子（HEP）を熱誘導できる Tg 魚（HEP Tg）の胚に、異なる発生時期でヒートショックを加え、その後の発生を検討した。その結果、HEP が活性化される時期により異なる効果（表現型）を示すこと、これらの表現型が *pou2* 機能欠失変異体のものとよく対応することを見出した。以上より、HEP は正常 *pou2* の発現を dominant negative に阻害しており、*pou2* は脳形成を始めとする発生の様々な局面で重要な機能を果たすと結論した。Bud 期での HEP 誘導後、MHB 周辺における各種遺伝子の発現を継時的に観察した結果から、*pax2a* 及び *wnt1* は *pou2* の直接下流に位置しており、*pou2* はこれらの遺伝子を介して MHB の発生を制御すると推論された。

(2) *pou2* 遺伝子の脳における発現制御^[1]

上流-2.2 kb から -0.1 kb までの 2.1 kb 領域が中脳から後脳にかけて *pou2* の発現を再現しうること、この領域内の 4 カ所の Octamer 配列と *pou2* 遺伝子が発現制御に関与することを、EMSA 解析、レポーター解析、そして *pou2* の強制発現と機能阻害実験により明らかとした。一方、胚内で放出されるレチノイン酸（RA）が 2.1 kb 領域の作用を抑制することを見出した。従って、*pou2* は 2.1 kb 領域を介して、positive autoregulatory loop による正の制御に加え、後方中胚葉で産生される RA による負の制御を受けると推定される。

(3) *Otx2* の前・中脳特異的な転写制御機構

MHB の位置を決定するのは前・中脳領域での *otx2* の発現と後脳領域での *gbx2* の発現の境界であるとされるが、その詳細な遺伝子機構は不明である。本研究では、マウス胚 *Otx2* 遺伝子の脳領域特異的発現の制御機構について以下のことを明らかとした。①マウス *Otx2* の FM enhancer 内にある脊椎動物での保存配列 (CR) と非保存領域 (NCR) の協調作用により、*Otx2* の発現が前・中脳特異的に活性化されることを示した。②マウス *Otx2* FM enhancer の CR 配列とゼブラフィッシュ *otx2* の CR 相同配列のキメラ DNA について、マウス Tg 胚における転写調節能を検討し、ゼブラフィッシュ CR 配列内にある前方神経外胚葉 enhancer 活性の特定を進めた。③ゼブラフィッシュ *otx2* の CR 相同配列にある各種転写因子結合配列の役割を、ゼブラフィッシュ胚において検討した。

(4) *fgf8* 遺伝子の MHB 特異的発現の制御^[2]

fgf8 の中脳後脳境界における発現制御を検討した結果、遺伝子下流の S4.2 領域が MHB での発現制御領域であることを示した。さらに、*fgf8* は S4.2 内の #2/3/4 領域 (342 bp) を介して *pax2a* の制御を受けること、#2 領域内の 28 bp 領域が転写抑制領域として機能することで *fgf8* の発現を MHB に限局することを明らかとした。

3. 結論

本研究では、脊椎動物の脳形成における MHB の重要性に着目した。まず、MHB 領域の発生を制御する *pou2* の機能解析とその発現制御機構を検討し、一方で、*gbx2* とともに MHB の位置決定に不可欠な *otx2* の前中脳特異的発現の制御機構の解明を試みた。さらに MHB 由来シグナルとされる *Fgf8* の遺伝子について、MHB 特異的発現制御の解析を進めた。これら異なる方向からの分子発生学、発生遺伝学的アプローチを今後さらに発展させることにより、MHB、ひいては脳形成を制御する複雑な遺伝子ネットワークの解明の糸口が得られるものと考えられる。

4. 謝辞

以上の研究においては理化学研究所・発生再生科学総合研究センター (理研 CDB) の相澤慎一博士及び須田容子博士、東京大学の黒川大輔博士、研究室のメンバーであった井上詞貴博士 (現理研 CDB)、Shahnaj Parvin 博士 (現 University of Rajshahi)、中本アンドルー君、斎藤慎二君、その他のメンバーの協力をいただきました。この場を借りて感謝いたします。

5. 参考文献

[1] Parvin MS, Okuyama N, Inoue F, Islam ME, Kawakami A, Takeda H, & Yamasu K. An autoregulatory loop and retinoic acid repression regulate *pou2/pou5f1* gene expression in the zebrafish embryonic brain. *Dev. Dyn.* 237, 1373-1388 (2008)

[2] Inoue F, Parvin MS, & Yamasu K. Transcription of *fgf8* is regulated by activating and repressive *cis*-elements at the midbrain-hindbrain boundary in zebrafish embryos. *Dev. Biol.* 316, 471-486 (2008)