

プロジェクト名： 大脳・間脳領域を誘導する前方神経境界の形成制御機構の解析
プロジェクト代表者： 弥益 恭（理工学研究科・教授）

1. 序論

脊椎動物の発生において、神経板の前端部（前方神経境界、Anterior neural boundary, ANB）は終脳（後の大脳）と間脳の形成を誘導するシグナルセンターであり、前方脳領域の発生において極めて重要な役割を果たす。実際、マウス胚の神経板前端部である前方神経隆起（Anterior Neural Ridge, ANR）は、初期胚では終脳及び間脳前方領域の誘導、後期発生では終脳背側領域に由来する大脳皮質の前後に沿ったパターンニングに関わっており（Shimamura& Rubenstein, 1997）、硬骨魚類であるゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）の場合も、ANR に相当する前方神経境界（Anterior Neural Boundary, ANB）が終脳（大脳）発生を制御する（Houart et al., 1998）。以上は、脊椎動物の個体発生において、終脳・間脳形成のメカニズムが共通であり、これを理解する上で ANR/ANB 領域の発生機構の解明が必要であることを示している。

我々は本研究において、ゼブラフィッシュ胚における ANB の形成機構を理解することを目的として、ANB 及びその後の終脳で特異的に発現する *emx3* 遺伝子及び *fgf8* 遺伝子の ANB・終脳特異的発現制御機構の解析を行った。

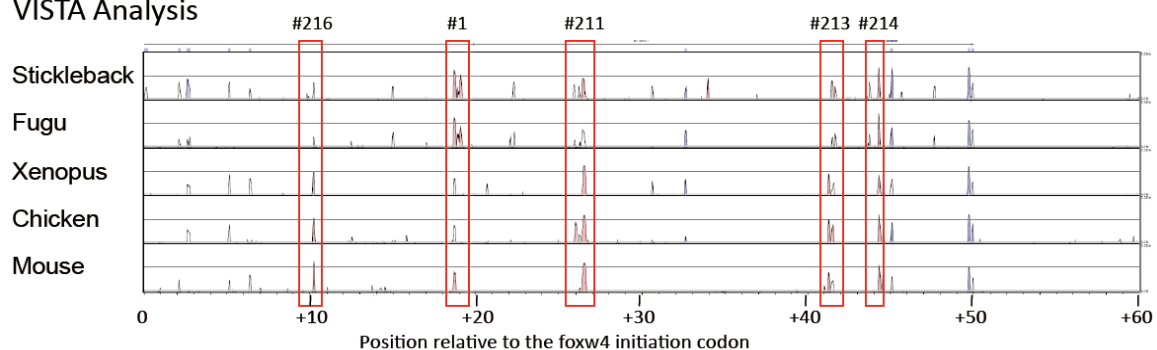
2. 結果

2-1. *fgf8* 遺伝子の ANB エンハンサーの同定と結合因子

ゼブラフィッシュ胚の場合、*fgf8* 遺伝子は初期体節期以降に ANB 領域で発現する。しかし、我々が以前行った *fgf8* 周辺ゲノム DNA (-13 kb から +17.8 kb) の転写調節活性の検討では ANB での転写活性化領域は見出されていない（Inoue et al., 2006）。

Figure 1.

VISTA Analysis



一般に、脊椎動物に共通する発生制御遺伝子の転写調節領域は異種間で保存されるため、ゼブラフィッシュ *fgf8* 遺伝子の下流ゲノム配列 (+17.4 kb から +77.4 kb) を各種脊椎動物の相当ゲノム配列と VISTA 解析により大規模比較した結果、*fgf8* の下流に存在する *fbxw4* 遺伝子の第 5 及び第 6 イントロン内に 5 カ所の保存配列が見出された (Fig. 1)。これらの保存配列 DNA のゼブラフィッシュ胚における転写調節能を緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を用いたレポーター実験で検

討した結果、NCS#213 領域 (352 bp) 及び NCS#214 領域 (393 bp) の 2 保存領域について、24 時間胚での ANB (終脳前端) における転写活性化能が見出された。

2-2. *emx3* 遺伝子の ANB エンハンサーの同定と結合因子

emx3 はホメオドメイン転写因子 Emx3 の遺伝子であり、マウスやゼブラフィッシュで終脳形成に関わること、ANB 及び終脳特異的に発現することが知られる。今回、ゼブラフィッシュ *emx3* 遺伝子のゲノム配列 (-30 kb~+30 kb) を各種脊椎動物ゲノムの相当領域と VISTA 解析により比較することで、*emx3* の上流-2.4 kb の位置にある 88 bp 配列 (Emx3 Noncoding conserved Sequence, ENS) が魚類間で保存されていること、この領域を含む 0.9 kb ゲノム DNA に ANB/終脳での転写活性化能があることを見いだした。結合しうる転写因子を Patch public 1.0 により検討した結果、Sp1/8、Zic、Pax、Lef/Tcf、Fox、Ngn、ホメオドメイン転写因子等、脳形成に関わる様々な転写因子が結合する塩基配列が見いだされた。実際、神経細胞分化を制御する転写因子 Ngn 及び終脳形成を制御する転写因子の Emx3 自身が *emx3* の ANB エンハンサーである ENS 配列に特異的に結合することを EMSA 法により確認した。

3. 今後の展望

本研究において、前方脳形成を制御する 2 つの遺伝子について、ANB/終脳特異的エンハンサーを明らかとした。現在、これらの領域に結合し、転写制御を実際に行う転写調節因子の特定を進めており、今後は epigenetic な発現制御を視野に入れつつ、同定されたエンハンサーの機能と転写制御機構の解明をめざす。ANB 領域の脳、間脳形成における役割については最近広く認識されるようになってきたが、ANB 形成の遺伝子制御機構についての研究はほとんどない。以上の研究は、脊椎動物の ANB 形成制御に関わる遺伝子カスケードの解明に大きく貢献するものである。

4. 謝辞

以上の研究においては、前研究室メンバーの井上詞貴君 (現理研 CDB)、天海 創君、中村理恵子さん、現研究室メンバーの黒柳友里さん、志村恭介君、平 一志君、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。

論文発表

1. S. Ota, N. Tonou-Fujimori, and K. Yamasu

The roles of the FGF signal in zebrafish embryos analyzed using constitutive activation and dominant-negative suppression of different FGF receptors.

Mech. Dev. 126, 1-17 (2010)

外部資金

科学研究費補助金 (基盤研究 C) 2008-2010 年度「脊椎動物胚の脳原基部域化を支配するシグナルセンターの形成制御機構」(代表; 2009 年度分 130 万円、計 481 万円)