

プロジェクト名：脊椎動物脳形成を制御する遺伝子ネットワークの解明

プロジェクト代表者：弥益 恭（理工学研究科・教授）

1. 序論

脳は我々ヒトを初めとする動物の生命維持、恒常性等の生体制御系の中核であると共に、記憶、学習、認知、感覚受容、運動制御、そして様々な精神活動に不可欠な器官であり、この機能の理解は、ヒトそのものの本質的理解から各種脳・神経疾患の解明、そして工学的応用において重要な意味を持つ。この目的を達成する上で、脳の発生・発達の機構を理解することが不可欠である。我々はこの複雑な構造の形成のしくみを明らかにするため、遺伝子レベルの解析に優れた脊椎動物脳発生研究のモデルであるゼブラフィッシュを用いて研究を進めてきた。本年度は以下の成果を得た。

2. 結果

（1）脳原基における中脳/小脳誘導領域の確立機構

①脊椎動物の脳形成においては、予定中脳後脳境界（Midbrain-Hindbrain Boundary, MHB）に形成される峽部がシグナルセンター（峽部オーガナイザー）として中脳と小脳を誘導するとされる。この発生機構を知るため、MHB及び峽部の形成遺伝子*gbx2*について、*hsp70l*由来の熱誘導性プロモーターにつないだ上でゼブラフィッシュゲノムに導入した。得られたtransgenic (Tg) 系統の胚において、様々な発生段階で加温誘導により*gbx2*の発現を誘導し、その効果を形態レベル、遺伝子レベルで検討した結果、原腸形成終了期で*gbx2*を誘導した際に峽部欠損が顕著に見られること、その際に、*gbx*遺伝子と共にMHBを決定するとされる*otx2*遺伝子の予定前・中脳での発現が直ちに低下すること等を見出した。さらに、原腸形成終了期での*gbx2*強制発現により直ちに発現が変動する遺伝子群を、マイクロアレイ法により網羅的に同定した。現在、これら同定遺伝子の発現について、*in situ*法、qPCR法により検討を進めている。

②*gbx2*の強制発現は予定前脳・中脳の形成を抑制することを我々は以前に見出しているが(Kikuta et al., 2003)、その産物であるGbx2ホメオドメイン転写因子が転写活性化、転写抑制のいずれに働くかについては明らかとなっていない。そこで、VP16転写活性化ドメイン、Engrailed転写抑制ドメインを融合させたタンパク質の遺伝子 (*vp-gbx2*, *en-gbx2*) を作製し、そのmRNAをゼブラフィッシュ胚に導入して効果を検討したところ、*en-gbx2*が野生型*gbx2*の効果を再現すること、*vp-gbx2*はむしろ前・中脳の拡大を誘発することを見出した。従って、Gbx2は転写抑制因子と推定された。このことをさらに確認するため、峽部で発現する脳形成制御因子遺伝子*fgf8a*のMHBエンハンサー (S4.2領域) をLuciferase遺伝子につなぎ、このレポーター遺伝子 (S4.2-Luc) に対する*gbx2*の効果を、神経分化能を持つ胚性癌細胞 (P19C6) において、Luciferase Assayにより検討した。その結果、*gbx2*はS4.2エンハンサーの転写活性化能を抑制することを明らかとした。

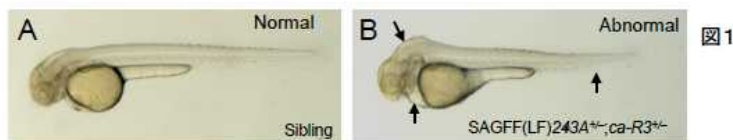
（2）前脳形成オーガナイザーANBの形成制御機構

①脊椎動物胚において、終脳（大脳）と間脳は、神経板前端に生じるシグナルセンター（前方神経境界、ANB）からの分泌因子により誘導される。ANB領域の形成制御機構を明らかにするため、ANB及びにその後の終脳の形成遺伝子である*emx3*ホメオボックス遺伝子の転写調節機構を検討した。すでに上流-2.9 kbから-2.0 kbまで (-2.9/-2.0領域) が終脳特異的エンハンサーであることを示していたが、

今回、この活性を-2.2/-2.1領域に絞り込むことに成功した。また、-2.6/-2.3領域は頭部表皮での異所的発現を誘導するが、この活性は-2.3/-2.0領域により抑制されることを示した。現在、この領域に結合しうる転写因子をゲルシフト法等により検討している。

(3) GAL4-UAS系の導入

脳形成の遺伝子制御機構を明らかにするため、GAL4-UAS遺伝子強制発現系の導入を進めた。以前に作製した活性型FGF受容体遺伝子*ca-R3*にUAS配列をつないでゲノムに導入し、得られた系統魚とGAL4を全身的に発現する系統魚(SAGFF(LF)243A)を交配することで、子孫胚において実際に*ca-R3*が誘導されること、対照と比べ(図1A)、主として頭部、心臓、尾部の形成異常を誘発できることを示した(図1B)。また、前脳形成遺伝子(*emx3*と*foxg1*)にUAS配列をつなぎ(UAS-*emx3*、UAS-*foxg1*)、これらのコンストラクトとGAL4 mRNAを胚に共導入することで、*emx3*及び*foxg1*の発現を誘導できることを確認した。これらの発現胚では、各遺伝子のmRNA導入に対応する脳形成異常が見られている。さらに、Tol2トランスポゾン系を利用してこれらUASコンストラクトのゲノムへの導入に成功しており、GAL4-UAS系による前脳形成遺伝子の強制発現実験に着手している。



3. 考察と今後の展望

中脳/小脳誘導領域の確立機構に関しては、MHB領域が*gbx2*の脳形成への作用に対して最も感受性が高く、また原腸形成終了期に応答能が最も高いことを明らかとした。今後、*gbx2*下流標的の遺伝子についてマイクロアレイに基づいた網羅的解析を行うことで、*gbx2*を中心とした遺伝子ネットワークの解明に発展することが期待される。

また、*emx3*の終脳エンハンサーの解析により、活性領域が約100 bpまで狭められた。終脳特異的発現制御には表皮での異所的発現活性化能とその抑制能が関わることも示唆された。今後、発現調節機構の詳細を明らかとすることで、終脳の形成を制御する遺伝子機構の解明が可能と考えられる。

一方、今回の研究で、ショウジョウバエではすでに強力な遺伝子操作技術となっているGAL4-UAS系について、ゼブラフィッシュへの導入が推進された。少なくとも導入胚でのtransient発現についてはこの強制発現系が機能することが確認されており、今後、GAL4系統、UAS系統魚を作製することで、ゼブラフィッシュでGAL4-UAS系を利用した遺伝子強制発現が現実的となる。この技術は、脳形成、神経形成の遺伝子制御を詳細に検討する上でも強力な武器となるものと予想される。

論文発表

I. M. Saito, K. Yamasu, & T. Suyemitsu. Binding properties of thyroxine to nuclear extract from sea urchin larvae. Zoolog. Sci. 29, 79-82 (2012)

外部資金

科学研究費補助金(基盤研究C) 2011-2013年度「小型魚モデルの利点を駆使した脳形成オーガナイザーの形成制御機構の解明」(代表; 2011年度分140万円)