

Otx 後方発現境界制御の解析

Mechanism of the Determination of the Caudal Otx Expression Bo

弥益 恭^{1*}、須田容子²、相澤慎一²
Kyo Yamasu^{1*}, Yoko Suda², Shinichi Aizawa²

¹ 埼玉大学 大学院理工学研究科

1Graduate School of Science and Engineering, Saitama University

² 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター

²Center for Developmental Biology (CDB), RIKEN

Abstract

To understand the mechanisms governing the establishment of the midbrain-hindbrain boundary (MHB), which organizes the formation of the midbrain and hindbrain in vertebrate embryos, the molecular aspects of the developmental process were examined in zebrafish embryos. We first examined the regulation of the MHB-specific transcription of *fgf8* that is specifically expressed at the MHB, suggesting that the regulatory mechanism is conserved during vertebrate evolution. We also analyzed the *in vivo* activities of intramolecular deletions in *Gbx2*, which contributes to the MHB development together with *Otx2*, revealing multiple functional subregions within the *Gbx2* protein. Finally, the role of the FGF-FGF receptor in brain formation was analyzed using modified forms of FGF receptors, and showed the involvement of the growth factor signal in different aspects of brain formation in early embryos.

1. 序論

動物の脳が果たす機能は、個体の生命活動、恒常性の維持から、行動、感覚、感情、意欲、思考、認知、創造性等の各種高次機能まで多岐にわたっている。これらのきわめて高度かつ複雑な脳機能を理解する上では、脳が個体発生の過程でどのように形成されるのかを、形態的のみならず、遺伝子レベルで明らかにすることが不可欠である。この問題は、学術的に重要であるのみならず、様々な脳・神経疾患の発症機構と診断、そして特に現代社会で問題となりつつある発達障害、知能障害の理解と教育、あるいは健常児とその後の成人での適切な教育、学習活動法の開発にも大きく寄与することが予想される。

脊椎動物脳形成の初期における重要な過程は、神経誘導により生じた神経外胚葉（神経板）の前後軸の決定とその後の領域化であり、特に中脳と小脳の形成には予定中脳と後脳の境界部（Midbrain-Hindbrain Boundary, MHB）からの分泌シグナルの産生が必要である。MHBの確定には、初期神経板の前方で発現する *Otx2* 遺伝子及び後方で発現する *Gbx* 遺伝子が重要な役割を果たすことが、マウス、ニワトリ及びゼブラフィッシュを用いて明らかにされた。しかし、*Otx2* の発現後方境界と *Gbx* 発現の前方境界の決定機構、そしてこれらの遺伝子の相互作用の実体は未だに明らかとはなっていない。

本研究では、(1) MHB 由来シグナルである *Fgf8* の MHB 特異的発現制御機構についての脊椎動物での普遍性、(2) *Otx2* と並んで MHB 決定の主役である *Gbx* 転写因子の分子内機能ドメイン、そし

* 〒338-8570 さいたま市桜区下大久保255
TEL/FAX : 048-858-3417
E-mail : kyamasu@mail.saitama-u.ac.jp

て（３）脳の領域化での主要制御因子である繊維芽細胞成長因子（FGF）シグナルの脳発生における役割について、検討を行った。

2. 実験方法

（１） 各種脊椎動物のゲノム配列を Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/>)より入手し、VISTA 解析により種間保存配列の検索を行った。ゼブラフィッシュの *fgf8* と *fgf8.2*、メダカ *fgf8.2*、マウス *Fgf8* の下流に見いだされた保存配列 DCR3[1,2]は、各動物種から精製したゲノム DNA を鋳型として Polymerase Chain Reaction (PCR) により増幅した。一方、*egfp* 遺伝子上流にゼブラフィッシュ *hsp70-4* 遺伝子の heat shock promoter をつないだレポーター遺伝子（*hsp-egfp*）の DNA 断片を、やはり PCR で調製し、これを各動物種 DCR3 DNA とともにゼブラフィッシュ胚に微小注入した。これとは別に、マウス *Fgf8* 由来 DCR3、あるいは 2c 相当領域^[1]を欠損させたマウス DCR3 をゼブラフィッシュ *fgf8* promoter とともに *egfp* につないだコンストラクトを作成し（各々 mDCR3-EGFP、mDCR3 Δ 2c-EGFP）、ゼブラフィッシュ胚に導入した。これら導入胚におけるレポーターの発現を、受精後 24 h (24 hours post-fertilization, hpf) に蛍光実体顕微鏡で観察した。

（２）マウス En2 遺伝子の MHB エンハンサーに見られる Pax2 結合配列 (BS-I) を Digoxigenin で標識し、このプローブとゼブラフィッシュ Pax2 (Pax2a) タンパク質の混合液に、各動物種由来 DCR3 DNA を過剰に加えて結合反応を起こさせ、Pax2a-BS-I の複合体の形成及びそれに対する過剰 DCR3 配列の競合効果を Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) により検討した。

（３）Gbx2 遺伝子のコード領域に様々な欠失を導入した上で pCS2+プラスミドに組み込み、これを鋳型として合成した mRNA をゼブラフィッシュ胚に微小注入した。導入胚における脳形成について、形態的には 24 hpf において観察し、分子レベルでは、

10 hpf (bud 期)における脳領域マーカー遺伝子の発現を in situ hybridization (ISH)により検討した。

（４）ゼブラフィッシュの 4 種の FGFR 遺伝子 (*fgfr1-4*) 各々について、以下のように活性型遺伝子 (ca-*fgfr*)、膜結合型 dominant-negative 遺伝子 (mdn-FGFR)、分泌型 dominant-negative 遺伝子 (sdn-FGFR) を作製し、pCS2+に組み込んだ上、mRNA を合成してゼブラフィッシュ胚に微小注入した。

ca-FGFR については、ショウジョウバエ Torso の細胞外及び膜貫通領域のコード領域に FGFR の細胞質領域のコード領域をつないだ。mdn-FGFR としては各 FGFR の細胞質領域を欠失させ、sdn-FGFR としては膜貫通領域と細胞質領域を欠失させた遺伝子を作製した。

表現型は形態の観察及び各種胚領域マーカー遺伝子の発現の ISH による検出により検討した。

3. 結果

ゼブラフィッシュ胚脳原基での中脳後脳境界 (MHB) について決定制御機構の研究を行い、以下の成果を得た。

MHB シグナル *Fgf8* の発現制御機構の普遍性^[1,2]

前年度までの研究で、ゼブラフィッシュ胚における *fgf8* 遺伝子の MHB 特異的転写が、遺伝子下流に存在する S4.2 領域により制御されること、S4.2 内に存在し、ほ乳類、鳥類、両生類、そして魚類で保存されている非翻訳領域 DCR3 が、S4.2 の転写調節活性を担うことを明らかとした（図 1）。MHB 領域による中脳・小脳誘導が脊椎動物で共通の脳形成機構であり、そのシグナル分子の実体が MHB で特異的に発現する *Fgf8* であることもマウス、ゼブラフィッシュで明らかとされていることから、同脳領域での *fgf8* の発現制御機構も脊椎動物の進化の過程で保存されていると予想された。

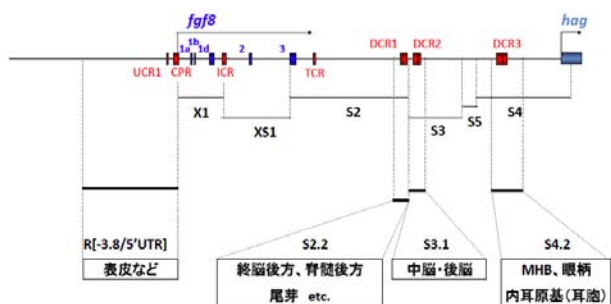


図 1. ゼブラフィッシュ *fgf8* 遺伝子周辺の各ゲノム領域で、特定胚領域において転写活性化能を持つものを示す。また、脊椎動物間で保存された配列をボックスで示す。

この可能性を検証するため、ゼブラフィッシュについては *fgf8* の DCR3、真骨魚類共通祖先でゲノム重複とともに生じたと推定される *fgf8.2* の下流に見られる DCR3、メダカ *fgf8.2* 下流の DCR3、そしてマウス *Fgf8* 下流の DCR3 を、ゲノム DNA を鋳型とした PCR で増幅した。これらの DCR3 DNA を、ゼブラフィッシュ heat shock promoter 制御下にある *egfp* 遺伝子 DNA (hsp-*egfp*) とともにゼブラフィッシュ胚に導入し、24 hpf で蛍光の発現を検討したところ、すべての DCR3 DNA について、MHB、耳胞、眼柄で蛍光が観察された。また、マウス *Fgf8* DCR3 をゼブラフィッシュ *fgf8* のプロモーターとともに *egfp* につないだコンストラクト (mDCR3-EGFP) も導入胚の同じ胚領域で特異的な発現を示した。従って、DCR3 による MHB 特異的な *fgf8* の転写活性化は脊椎動物で共通であることが示唆された。

以前の研究において^[1,2]、ゼブラフィッシュ *fgf8* DCR3 の領域特異的転写調節に関しては、Pax 転写因子による転写活性化と 2c 領域による中脳、後脳での転写抑制が主たる分子機構と結論した。この機構自体もやはり脊椎動物で保存されているかを検討するため、まず EMSA 法により、ゼブラフィッシュ Pax2a と Pax 結合配列 DNA (BS-I) の結合に各動物種 *fgf8* の DCR3 が競合するかを検討したところ、ゼブラフィッシュ *fgf8* と *fgf8.2* の DCR3、メダカ *fgf8.2* DCR3、そしてマウス *Fgf8* DCR3 はすべて競合活性を持つこと

がわかった。従って、いずれの DCR3 も Pax 転写因子の結合活性を持つと考えられる。また、mDCR3-EGFP より 2c 領域に相当する 28 bp 領域を欠失させ、このコンストラクトをゼブラフィッシュ胚に導入すると (mDCR3 Δ 2c-EGFP)、蛍光の発現が中脳、後脳に拡大する胚が観察された。このことは、2c 領域の転写抑制能がほ乳類 DCR3 にも存在することを示唆する。

MHB の決定に関わる Gbx2 転写因子の分子内機能ドメインの解析^[3]

Gbx は脳原基の後方に発現し、前方で発現する *Otx2* との相互作用により MHB の決定を行うとされる。ホメオドメインを持つという構造的特徴から転写因子とされるが、その実際の分子的機能は不明である。このタンパク質の転写制御活性、そして MHB 形成における機能を知るため、本研究では、*Gbx2* 遺伝子に様々な欠失を導入した上、mRNA 微小注入による脳形成への効果を検討した。

まず、野生型 *Gbx2* mRNA はすでに我々が以前に明らかにしたとおり、前脳及び中脳の形成を阻害することを、24 hpf における形態観察及び 10 hpf (bud 期)における遺伝子マーカーの ISH での検出により確認した。N 末領域、C 末領域のいずれかを欠失させた場合、前中脳抑制効果は弱くなるものの依然として観察されたが、両方を欠失した場合、あるいはホメオドメインを欠失させた場合、活性は消失した。従って、N 末領域、C 末領域のいずれも前中脳抑制効果を持っており、ホメオドメインは *Gbx2* の機能に必須であるといえる。

N 末領域内には、転写抑制能をもつとされる Eh1 様配列及び一般には転写活性化能を持つとされる高プロリン配列 (Pro 配列) が見られるため、各々、あるいは両方を欠失させた *Gbx2* 遺伝子 (*Gbx2* Δ E、*Gbx2* Δ P、*Gbx2* Δ EP)、両者に挟まれた介在配列 (Int 配列) を欠失させた *Gbx2* (*Gbx2* Δ I)、そしてこれらをすべて欠失させた *Gbx2* 遺伝子 (*Gbx2* Δ EIP) を作製し、やはり mRNA 注入より強制発現させた。

その結果、Gbx2 Δ E と Gbx2 Δ EP で前中脳抑制効果が減弱したことから、Eh1 配列が N 末領域の活性を担うと推定された。おもしろいことに、Gbx2 Δ I および Gbx2 Δ EIP の強制発現では、前脳領域は形成されるのに対し、MHB 領域が欠損し、さらに中脳領域が小脳化することが見いだされた。

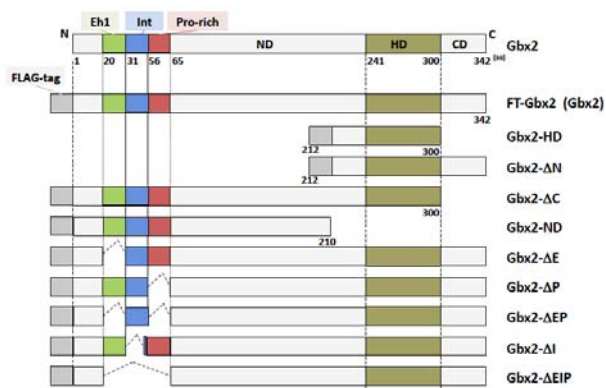


図2. ゼブラフィッシュ Gbx2 に様々な分子内欠失を導入し、mRNA の微小注入を行った。数字はアミノ酸を表す。

(3) 個体発生における FGF-FGFR シグナルの役割の検討 (図3)

まず、4 種ある FGFR (Fgfr1-4) が関わる細胞内シグナルの初期発生における役割を検討するため、各々の活性型 FGFR (ca-FGFR) の mRNA を胚に導入し、24 hpf まで表現型を検討した。その結果、形態的にも分子レベルでも、全ての ca-FGFR で胚全体の背側化、2 次体軸の形成、そして前中脳欠損が主たる表現型であり、違いは見られなかった。

4 種の FGFR 各々の mdn-FGFR について強制発現を行ったところ、基本的にはいずれも効果は同じであり、脳領域はほぼ正常に形成されるのに対し、後方構造の欠損を引き起こした。しかし、効果の強さに違いがあり、特に FGFR3 の mdn 遺伝子はきわめて強い効果を示した。各 mdn-FGFR について、異なる FGF リガンド mRNA と共導入を行い、各 FGF のリガンドの効果 (胚体の背側化) に対する抑制作用を検討したところ、mdn-FGFR の胚発生に

対する効果の強さは、抑制しうる FGF の種類と関係があり、mdn-FGFR3 は調べた全ての FGF を阻害することが見いだされた。

sdn-FGFR は、分泌された上で FGF リガンドをトラップし、結果的に FGF シグナルを遮断すると予想される。各 FGFR について、分泌型 dominant-negative 遺伝子 (sdn-FGFR) の強制発現効果を検討したところ、sdn-FGFR3 について、頭部では MHB 領域が欠損するとともに、耳胞の縮小と胴尾部の特異的な欠損が見られた。また、胴尾部で大規模な細胞死が観察された。これらの異常は mdn-FGFR に比べてきわめて領域特異的であった。各遺伝子マーカーの発現を検討したところ、MHB 領域での異常が確認されたほか、尾芽特異的マーカーの発現が消失した。各種 FGF の mRNA との共導入の結果、sdn-FGFR3 は Fgf8 サブファミリー成長因子 (Fgf8、Fgf8.2、Fgf17、Fgf24) を特異的に阻害するのに対し、他の Fgf サブファミリー成長因子に対しては効果がなかった。

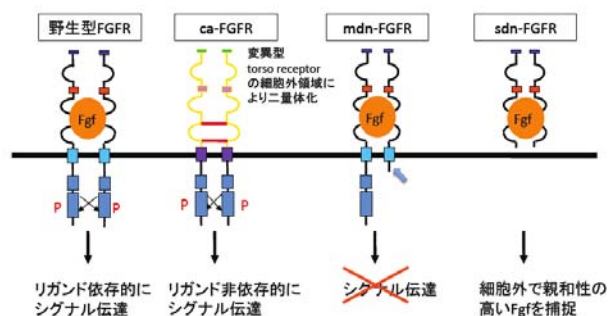


図3. 本研究で作製した改変 FGF 受容体。

4. 考察

Fgf8 の発現制御機構は脊椎動物の進化において保存されている

今回の研究により、ゼブラフィッシュ *fgf8* 遺伝子の MHB 特異的エンハンサー (S4.2 領域) におけるコア配列 DCR3 が、他の脊椎動物 *fgf8* 下流でも保存されているのみならず、いずれの動物種由来でも MHB (及び耳胞、眼柄) エンハンサー活性と Pax

結合配列を持つこと、マウス DCR3 については 2c 相当領域に中脳、後脳での転写抑制活性が有ることが明らかとなった。これらの結果は、MHB シグナル本体である Fgf8 の MHB 特異的転写制御機構が脊椎動物の進化の過程で高度に保存されていることを示している。このことはまた、ゼブラフィッシュが脊椎動物 MHB 形成の分子機構を理解する上でモデルとして有用であることを示すものである。

Gbx2 転写因子の分子内領域構造

すでに我々は以前の研究で、Gbx2 が前脳及び中脳の形成に抑制的であることを明らかとしたが、本研究により、Gbx2 転写因子内には複数の異なる機能配列を明らかとした。まず、ホメオドメインはこの機能発現には不可欠であるといえる。また、N 末領域及び C 末領域はいずれも前中脳形成に抑制的な活性を持つと推定される。両者の配列には類似性が見られず、意外な結果であったが、今後両者の活性の詳細な比較が必要である。N 末領域の活性は、その内部にある Eh1 領域に依存することも今回の結果から示唆された。Int 領域の欠失は中脳の脳化を引き起こすが、Gbx2 の前脳阻害効果をキャンセルすることから、この領域は Gbx2 の前脳形成阻害効果を担うが、中脳阻害は別の Gbx2 内領域によると推定される。Gbx2 Δ I 及び Gbx2 Δ EIP による中脳阻害は小脳化を伴うが、その機構は今後の課題である。

FGF シグナルによる発生制御についての改変型

FGFR 遺伝子を用いた解析

各種 FGFR の活性型遺伝子はいずれもゼブラフィッシュ胚発生に基本的に同じ効果を示した。4 種の FGFR の存在はこれまで調べられた全ての脊椎動物で共通であるが、今回の結果は、4 種ある FGFR により活性化される細胞内シグナルは、少なくとも初期発生では基本的に同じであることを示す。4 種の FGFR 遺伝子を破壊した際の表現型が各々違うことがマウスで報告されているが、今回の結果から

予想される FGFR 間の機能の違いは、発現する領域と時期、そして対応する FGF リガンドの違いによるものと推定される。

mdn-FGFR は胚内の正常 FGFR と 2 量体をつくり、それらの機能を阻害するとされる。今回、すべての mdn-FGFR が基本的に同じ後方構造抑制効果を示した点については、mdn-FGFR と正常 FGFR の結合には厳密な分子種特異性がなく、ある mdn-FGFR は内在するすべての FGFR を阻害するためと推定される。ただ、効果の強さに違いが有ることから、各 mdn-FGFR が様々な FGFR に対して示す親和性にはある程度違いがあり、正常 FGFR への干渉能力に選択性があるものと考えられる。また、今回の結果から、mdn-FGFR3 は全ての FGF-FGFR シグナルに対して抑制的であることが明らかとなった。今後、動物の個体発生や細胞機能における FGF シグナルの役割を研究する上で有用なツールとして利用できるものと考えられる。

一方、sdn-FGFR の中で sdn-FGFR3 について、きわめて特異性の高い表現型が観察された。具体的には MHB、耳胞、そして尾芽形成に異常が認められた。FGF との共導入の結果は、sdn-FGFR3 が Fgf8 サブファミリー特異的阻害を行うことを明らかとした。実際、*fgf8* の変異体では MHB 欠損及び耳胞の縮小が知られており、sdn-FGFR3 強制発現の効果とよく一致する。一方で *fgf8* の変異体では顕著な後方異常、あるいは尾芽欠損は観察されておらず、おそらく、他の Fgf8 サブファミリーが尾芽形成に関与していると推定される。Fgf8 サブファミリー成長因子には多数のメンバーがあり、しかも類似の発現パターンをとるため、通常の遺伝子機能阻害では機能の重複がある際にそれを見いだすことができない。こうした場合、sdn-FGFR3 は Fgf8 サブファミリーの機能を明らかにする上で有用な分子的ツールとして利用できる期待される。

5. 謝辞

以上の研究においては研究室のメンバー、特に井

上詞貴博士（現理研 CDB）、太田聡博士（現九州大学生体防御医学研究所）、中山由紀子さん、佐藤嘉朗君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。

6. 参考文献

- [1] 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)
- [2] 井上詞貴, 脊椎動物の胚発生を制御する成長因子遺伝子 *fgf8* の転写制御機構. 埼玉大学大学院理工学研究科博士後期課程博士論文 (2008)
- [3] 中山由紀子, ゼブラフィッシュ *Gbx2* 転写因子による脳形成制御機構の研究. 埼玉大学大学院理工学研究科博士前期課程修士論文 (2009)
- [4] Ota, S, Tonou-Fujimori, N, & Yamasu, K. 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 (2009)
- [5] 太田 聡, 脊椎動物の胚発生における繊維芽細胞成長因子シグナルの役割の研究. 埼玉大学大学院理工学研究科博士後期課程博士論文(2009)