

Otx 後方発現境界制御の解析

Mechanism of the Determination of the Caudal Otx Expression Boundary

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

¹ Graduate 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

² Center for Developmental Biology (CDB), RIKEN

Abstract

To understand the formation of the midbrain-hindbrain boundary (MHB) in the neural plate, which functions as a local organizer to pattern the midbrain and cerebellum of vertebrate embryos, we examined, using the zebrafish and mouse, the roles of the class-V POU gene (*pou2*), as well as the regulatory mechanism of the expression of *pou2*, *fgf8*, and *otx2*, all of which are considered to establish the MHB and promote its development to form the organizer. The results together revealed a complex gene network that is involved in the MHB development and later brain formation in vertebrates.

Key Words: Brain formation, midbrain-hindbrain boundary, mouse, transcriptional regulation, zebrafish

1. 序論

動物の中樞神経系、特に脳が果たす機能は、個体の恒常性の維持から行動、感覚、感情、意欲、思考、認知、創造性等の高次機能まで多岐にわたっており、その重要性については論を待たない。これら多様な脳機能の解明は、我々人間そのものを理解することに直結する一方、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欠であり、現在様々なアプローチがなされている。しかし、特に人間を始めとする高等脊椎動物においては脳の構造と機能は極めて複雑化しており、このことが脳の理解を阻んでいるのが実情であろう。この問題を解決するには、そもそも脳が個体発生の過程でどのように形成されるのか、そして脊椎動物の進化の過程でどのように複雑化したのかを明らかにすることが重要な鍵となると期待される。

初期の脊椎動物脳形成における重要な過程は、神経誘導により生じた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) の形成と MHB 領域からの分泌シグナル (FGF8) の産生が必要であることが、調べられたすべての脊椎動物で知られる。

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 クラス V 転写因子の遺伝子 *pou2/pou5f1* の機能、2) *pou2/pou5f1* 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脳と中脳の発生を決定する *Otx2* 遺伝子について、その MHB を後端とした前中脳特異的発現の制御機構の検討を行った。

2. 実験方法

(1) N 末領域欠失 *Pou2* と *Engrailed* 転写抑制領域の融合タンパク質をコードする遺伝子の上流に熱誘導性プロモーターを挿入し、この熱誘導性遺伝子 HEP を導入した transgenic fish (HEP Tg) [1] の胚に様々な発生段階で 28.5→37°C、1 時間のヒートショック処理を行ない、その後の発生を検討した。

(2) *pou2* の上流 6.5 kb 領域 [2]、マウス及びゼブラフィッシュ *Otx2* の前中脳エンハンサー (FM enhancer) [3]、*fgf8* の下流 1.3 kb 領域 (S4.2 領域) [4]、あるいはそれらに種々の内部改変を導

* 〒338-8570 さいたま市桜区下大久保 2 5 5
TEL/FAX : 048-858-3417
E-mail : kyamasu@mail.saitama-u.ac.jp

入した DNA 領域を GFP レポーター遺伝子 (*egfp*) につないだ。これらをゼブラフィッシュ胚に導入し、発現を蛍光、または *egfp* mRNA の検出で検討することにより、6.5 kb 領域、FM enhancer、1.3 kb 領域内の転写調節領域の同定を行なった。

(3) 転写調節領域内に見いだされた Pax2 結合配列、Pou2 結合配列、retinoic acid (RA) 応答配列に各々ゼブラフィッシュ Pax2 (Pax2a)、Pou2、RA 受容体 (RAR/RXR) が結合するかについて、Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) により検討した。

3. 結果

(1) 中脳—後脳領域の形成における *pou2/pou5f1* 遺伝子の機能の検討

HEP Tg 胚に異なる発生時期でヒートショックを加えて HEP の発現を誘導し、その後の発生を観察した。Sphere 期 (受精後 4 h, 4 hpf) で HEP を誘導すると胚体全体の背側化、30% epiboly (4.7 hpf) では原腸形成の異常、75% epiboly 期 (8 hpf) -bud 期 (10 hpf) では MHB における峡部形成欠損、bud 期-3 体節期 (11 hpf) では峡部の形態異常が生じた。Bud 期前後で HEP を誘導すると、24 hpf で *pax2a* の発現も消失していた (図 1)。これらの表現型は、*pou2* 機能欠失変異体 (*spiel ohne grenzen*) のものとよく対応することから、HEP は正常 *pou2* の発現を dominant negative に阻害すると結論した。

Bud 期に HEP を誘導した Tg 胚において、様々な脳領域マーカー遺伝子の発現を経時的に検討したところ、*pax2a*、*wnt1* の MHB での発現、*fgf8* の後脳前方での発現が処理後 1 時間後ですでに低下していた。一方、*eng2a* と *gbx2* の同じ MHB 領域での発現も低下はするが、消失はしなかった。

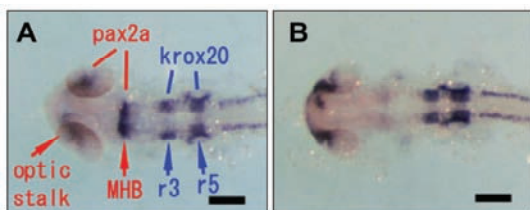


図 1. Bud 期で HEP を誘導した胚では、24 hpf での MHB において *pax2a* の発現が消失する (B)。眼胞 (optic stalk) における *pax2a* の発現、後脳第 3/5 菱脳節 (r3/r5) での *krox20* の発現はほとんど影響を受けない。(A) 対照胚。

(2) *pou2/pou5f1* 遺伝子の脳における発現制御[2]

上流 -6.5 kb から開始コドンまでの領域 (-6.5/ATG) について、GFP をレポーターとしてゼブラフィッシュ胚で行った発現解析により、この -6.5/ATG 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 (図 2)、その発現調節能

は主として上流 -2.2 から -0.1 kb までの 2.1 kb 領域に存在することを見いだした。また、この領域内に 4 カ所の Pou2 結合配列 (Octamer 配列) が存在し、ここを通して Pou2 の発現が autoregulatory に制御されることを、EMSA 解析 (図 3)、レポーター解析、*pou2* の強制発現と機能阻害実験により明らかとした。その一方、中脳後脳領域への *pou2* の発現を限定させる機構の少なくとも一つが、後方から分泌される RA による 2.1 kb 領域の転写調節能の抑制であることを見出した。

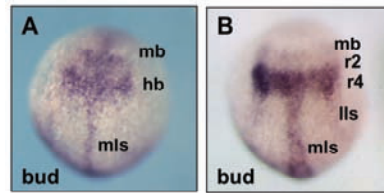


図 2. (A) *pou2* 遺伝子上流の -6.5/ATG 領域の制御下にある GFP 遺伝子 (*egfp*) の mRNA は、内在 *pou2* (B) と同様 bud 期前後の胚の中脳 (mb) 及び後脳 (hb) で一過的に発現する。

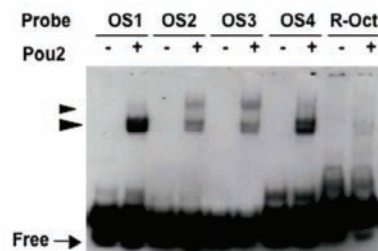


図 3. 中脳・後脳形成遺伝子 *pou2* の転写制御領域にある 4 カ所の部位 (OS1-OS4) に Pou2 タンパク質が結合する (矢じり、ゲルシフト法)。

(3) *Otx2* の前・中脳特異的な転写制御機構

マウス胚 *Otx2* 遺伝子の脳領域特異的な発現の制御機構、そして脊椎動物脳の進化との関係を知るために、以下に述べる一連の研究を行った。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* の発現は MHB を後端として前・中脳特異的に活性化されることを Tg マウス胚で示した。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 配列でのみ見られる前方神経外胚葉 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 特異的な発現の制御[5]

多様な *fgf8* の発現領域の一つ、MHB における発現制御を知るため、以前見出していた下流の S4.2 領域の正確な転写調節能を、Tg 胚における

GFP レポーターの発現の詳細な解析により検討し、S4.2 が MHB の他、眼柄、嗅覚上皮、内耳原基での *fgf8* の発現制御領域であることを示した(図4)。S4.2 に様々な変異を導入して転写調節能への効果を検討することで、S4.2 内の#2/3/4 領域 (342 bp) が転写調節のコア配列であること、#2 と#4 内にある Pax2 結合配列 (図 4)、そして *pax2a* 自体が脳領域での S4.2 の活性化に必要であること、#2 内の 28 bp 領域が転写抑制領域として発現を MHB に限局する機能を持つことを明らかとした。

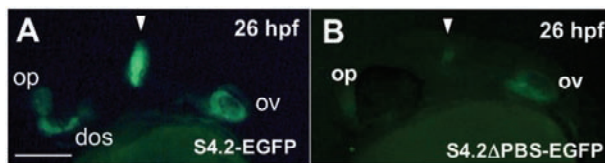


図 4. S4.2 の制御下にある GFP 遺伝子 (S4.2-EGFP) は MHB (白矢印) の他、嗅覚上皮 (op)、眼柄 (dos)、内耳原基 (ov) で発現するが、Pax 結合配列 (PBS) を破壊すると (S4.2ΔPBS-EGFP)、MHB 及び眼柄のみで発現が消失する。

4. 考察

HEP Tg 胚を用いた HEP 誘導実験で観察された各種の発生異常が、MHB における形態異常を含め、*pou2* 機能欠失変異体での表現型と類似することから、HEP の強制発現は内在 *pou2* の機能を阻害するものと考えられる。HEP は構造的には Pou2 の転写抑制型であることから、本来の Pou2 転写因子はおそらく転写活性化を行うと予想される。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 の発生を制御するものと推論した。実際、マウス *Pax2* の転写調節領域にはマウスでの Pou2 相同因子 Oct3/4 の結合配列が見いだされており、今回の結果とよく対応する。

pou2 の中脳・後脳における発現については、上流の 2.1 kb が主たる制御領域と考えられる。*pou2* はこの領域を介して positive autoregulatory loop による正の制御と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。しかし、正確な発現の制御には他のメカニズムも予想されており、今後さらに詳細に 2.1 kb 領域の制御機構を明らかとする必要がある。

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。本研究での *otx2* の前中脳特異的発現の制御機構と *fgf8* の MHB 特異的発現制御の解析は、この問題の解明に至る二つの異なるアプローチ

といえる。*Otx2* については、マウス、ゼブラフィッシュという系統上はなれた脊椎動物における発現調節の比較により、脊椎動物において本質的な制御機構の解明を目指したが、実際、両動物種における *otx2* 制御の共通性と相違点、そしてその裏付けとしての DNA 領域の特定が現在進んでいる。一方、*fgf8* の MHB 特異的発現についても、ゼブラフィッシュにおいて、S4.2 領域が内部にある転写活性化領域と抑制領域の相互作用を通して発現の領域特異性を担うことをレポーター解析と生化学的研究により明らかとした。今後、転写活性化、転写抑制の詳細についての一層の検討が必要であろう。

今後、*otx2* 及び *fgf8* の領域特異的転写制御機構の解析を進める一方、これらの遺伝子より早い時期に働く *pou2* 遺伝子の役割の機能を検討することで、MHB の決定とその後の発生を制御する遺伝子ネットワークを明らかにできるものと考えられる。

5. 謝辞

以上の研究においては東京大学の黒川大輔博士、理研 CDB の井上詞貴博士、University of Rajshahi の Shahnaj Parvin さん、研究室の中本アンドルー君、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。

6. 参考文献

- [1] 中本アンドルー, ゼブラフィッシュで体軸および脳形成を制御する POU 転写因子の研究. 埼玉大学大学院理工学研究科博士前期課程修士論文 (2007)
- [2] 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)
- [3] Kurokawa D, Kiyonari H, Nakayama R, Kimura-Yoshida C, Matsuo I, Aizawa S. Regulation of *Otx2* expression and its functions in mouse forebrain and midbrain. *Development* 131, 3319-3331. (2004)
- [4] Inoue F, Nagayoshi S, Ota S, Islam ME, Tonou-Fujimori N, Odaira Y, Kawakami K, & Yamasu K. Genomic organization, alternative splicing, and multiple regulatory regions of the zebrafish *fgf8* gene. *Develop. Growth & Differ.* 48, 447- 62 (2006)
- [5] 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)