

# 脊椎動物の前脳部域化を制御する 遺伝子機構の解析

埼玉大学大学院 理工学研究科

博士後期課程

理工学専攻・生命科学コース

平成 29 年度修了

13DB002

Wang Zhe

# 目次

目次	.....	2
要旨	.....	3
序論	.....	5
材料と方法	.....	8
結果	.....	17
考察	.....	26
謝辞	.....	35
参考文献	.....	36
図の説明	.....	40

## 要旨

脊椎動物の初期発生において、*gbx2* homeobox 遺伝子は原腸形成期に神経板の後方で発現し、中脳と小脳を誘導する峽部オーガナイザーの位置決定に貢献することが知られる。マウスの場合、*gbx2* はその後の脳形成において、大脳基底核、そして間脳の視床でも発現するが、終脳、間脳を含む前脳の発生での *gbx2* の役割の詳細はわかっていない。本研究では、発生生物学での優れた研究モデルであるゼブラフィッシュにおいて、前脳形成における *gbx2* の果たす役割を検討した。

まず、原腸形成終了後のゼブラフィッシュ胚中枢神経系原基における *gbx2* の発現を、Whole mount *in situ* hybridization (WISH)により検討し、この遺伝子が体節形成後期(18-24 hours post-fertilization/hpf)において、ゼブラフィッシュ胚腹側終脳の側方部で一過的に発現すること、36 hpf 以降の咽頭胚においては視床領域で発現することを明らかとした。さらに、*gbx2* の領域特異的エンハンサーの制御下で EGFP を発現し、蛍光により *gbx2* の発現を再現する Transgenic (Tg)魚を用いることで、終脳および視床における *gbx2* の内在発現の動態を追跡可能であることを示した。*gbx2* の腹側終脳での発現の詳細については、前脳の領域マーカー遺伝子の発現と 2 色 Fluorescence *in situ* hybridization により比較し、*gbx2* の発現が、前脳前方の形成に関わる遺伝子 *emx3*, *six3b*, *dlx2a*, *otx2*, *shha*, *pax6a* の発現と密接な関係にあることを示した。まず、*gbx2* 発現は、外套下部の脳室層領域における *dlx2a* 発現と密接に関連し、さらに *emx3* の発現する終脳背側 (外套) の脳室層領域にまで広がっていた。また、外套下部および視床下部における *six3b* と *pax6a* 発現、そして間脳における *otx2* と *pax6a* の発現パターンとの比較も、*gbx2* が終脳の脳室層領域において発現することを示した。この結果、*gbx2* が終脳部位化遺伝子の発現を制御することにより終脳の形成を調節することを示唆した。

*gbx2* の終脳形成における役割を検討するために、加温誘導性 *gbx2* を保有するトランスジェニック系統魚[Tg(*hsp70l:gbx2*)]の胚を加温処理することで、*gbx2* を内在遺伝子の終脳での発現開始に先立つ 16 hpf において誘導し、前脳部域化に関与する転写因子遺伝子、そして分泌因子遺伝子の発現に対する効果を WISH 及び定量的 PCR (qPCR)により調べた。その結果、前脳領域の発生に関わる転写因子遺伝子である *otx2*, *emx3*, *six3b*, そして *dlx2a* の発現が抑制された。この際、腹側終脳における *six3b* と *dlx2a* の発現低下が特に顕著であるのに対し、背側終脳での *emx3* の発現低下は比較的軽微であった。分泌因子遺伝子については、神経管背側領域の形成を行うとされる *bmp2b* と *wnt1* の発現が抑制される一方、終脳腹側の形成を誘導する *shha* が活性化された。一方、*gbx2* の機能欠損変異体の胚においては、背側終脳での *emx3* の発現が前方に拡大し、終脳腹側での *dlx2a* の発現が増強された。

次に、野生型の *gbx2* と人工エストロゲン受容体を繋いで作成した人工遺伝子 *gbx2-ERT2* の mRNA を胚に注入し、この胚を Tamoxifen 処理することで、Gbx2 タンパク質を内在 *gbx2* 遺伝子の終脳での発現開始に先立つ 16 hpf において活性化し、前脳部域化に関与する転写因子遺伝子、そして分泌因子遺伝子の発現に対する効果を WISH により調べた。その結果、前脳領域の発生に関わる転写因子遺伝子である *six3b*, そして *dlx2a* の発現が顕著に抑制されることが明らかになった。分泌因子遺伝子については、終脳腹側の形成を誘導する *shha* が対照的に活性化された。一方、活性化型の *gbx2* (*vp-gbx2*)とエストロゲン受容体を繋いだ人工遺伝子(*vp-gbx2-ERT2*)の mRNA を胚に注入し、上述のように誘導し、前脳部域化に関与する転写因子遺伝子、そして分泌因子遺伝子の発現に対する効果を WISH により調べ

た結果、前脳領域での *dlx2a* 発現がやや抑制されたが、*six3b* の発現については弱いながら増強が見られ、視床下部での *shha* の発現が抑制された。

以上より、*gbx2* は、体節形成後期においては終脳脳室帯領域で発現し、他の転写因子遺伝子と成長因子遺伝子の発現を主として抑制的に制御することで、終脳の領域化、特に外套下部、つまり基底核原基の形成に関与すると考えられる。

次に、終脳における *gbx2* の発現を調節する細胞内シグナル伝達を明らかにするため、終脳での発現開始に先立つ時期(14-18 hpf)において、様々なシグナル伝達経路の活性を制御する薬剤（活性化剤または阻害剤）でゼブラフィッシュ胚を処理し、*gbx2* の発現を検討した。その結果、BIO 処理による Wnt シグナルの活性化、レチノイン酸(RA)シグナルの活性化、SU5402 処理による FGF シグナルの阻害のいずれによっても、終脳における *gbx2* の発現が大幅に抑制されることが見出した。従って、終脳における *gbx2* の発現は Wnt シグナルと RA シグナルで抑制される一方、FGF シグナルを必要とすると考えられる。終脳での *gbx2* の発現調節においてこれらのシグナルが働く発生時期を特定するため、上述した 14-18 hpf の時期内の異なる時期で同様に Wnt シグナル伝達の活性化、RA シグナル伝達の活性化 FGF シグナル伝達の阻害を行って *gbx2* の発現を検討した結果、FGF シグナルはこの時期において継続的に *gbx2* 発現に必要とされること、Wnt シグナルと RA シグナルによる Wnt と RA は検討した時期を通じて *gbx2* の発現抑制に働くことを見出した。

最後に、*gbx2* の視床形成における役割を検討するため、前述の *Tg(hsp70l:gbx2)* 系統魚胚を、*gbx2* の発現が見られる直前の 34 hpf において加温処理し、*gbx2* を誘導した上、視床原基とその周辺脳領域で発現する転写因子遺伝子の発現に対する効果を WISH 及び qPCR により調べた。その結果、いずれの手法でも、転写因子遺伝子である視床での *irx1b* の発現、視床と中脳での *dbx1a* の発現、そして視床と視床下部での *olig2* の発現について抑制が観察された。また、WISH により *gbx2* の機能欠損変異 48 hpf 胚においては *irx1b* の発現低下が見られた、ただし、72 hpf の変異体胚において、*irx1b*, *dbx1a*, *olig2* の発現に特に異常は見られていない。これらの結果は、咽頭胚期の間脳において、*gbx2* は視床形成に、視床形成遺伝子の発現を通して関与することを示す。

以上のように、本研究は、*gbx2* 遺伝子が、体節形成後期には腹側終脳の形成、咽頭胚期では視床形成に関与することを明らかとしたものである。

## 序論

*gbx* homeobox 遺伝子サブファミリーには、脊椎動物の間で高度に保存されている二つの転写因子遺伝子、*gbx1* と *gbx2* が知られており、これまでに *gbx2* の役割が詳細に検討されてきた。この遺伝子は、ゼブラフィッシュ(Kikuta et al., 2003; Rhinn et al., 2013; Su & Meng, 2002), *Xenopus* (von Bubnoff et al., 1996), ニワトリ (Fainsod & Grenbaum, 1989), 哺乳類 (Matsui et al., 1993; Murtha et al., 1991) など、様々な脊椎動物で同定されている。

マウスやニワトリの場合、*gbx2* は原条期胚において後方神経板で発現し (Niss and Leutz, 1998; Wassarman et al., 1997), 同様の発現は *Xenopus* の原腸胚でも観察されている (von Bubnoff et al., 1996)。マウスにおいては、遺伝子ターゲティング法により *gbx2* の破壊実験が行われた。得られた *gbx2* 欠損胚では、峡部、小脳、そして菱脳節 1-3 (r1-3) が欠損する一方、中脳は尾側に拡大しており、結果的に中脳、後脳領域における前後パターンニングに大幅な異常が起きている (Wassarman et al., 1997)。以上の知見から、マウス胚での峡部発生において *gbx2* は不可欠とされた。また、E10.5 のマウス胚において、中脳-r1 領域に *gbx2* を異所的に過剰発現させると、MHB は前方にシフトし、さらに中脳、小脳の欠損を引き起こす (Sunmonu et al., 2009)。なお、*Xenopus* 胚の場合、*gbx2* 過剰発現は、体軸の短縮、前方脳の欠損を伴った小頭胚を誘導する (Tour et al., 2001)。このことは *gbx2* が前方脳の形成には抑制的であることを示した。こうした研究から、後方神経板で発現する *gbx2* は前方神経板で発現する *otx2* と相互抑制的に働き、この *otx2-gbx2* 間の相互発現抑制が中脳と後脳の境界、いわゆる中脳後脳境界 (Midbrain-Hindbrain Boundary, MHB) の位置決定と確立に関与するとされる (Joyner et al., 2000)。MHB はその後、さらに周辺にシグナルを放出することで中脳と小脳を誘導とパターンニングに関与する、この領域はその後、峡部と呼ばれるくびれ構造を形成するため、峡部オーガナイザーとも呼ばれる (Rhinn and Brand, 2001)。なお、マウスやニワトリの胚の場合、*gbx1* は MHB 領域では発現せず (Waters et al., 2003; Rhinn et al., 2004)、峡部形成には関与しないと考えられる。

一方、所属研究室及び Brand らの研究室は、ゼブラフィッシュの場合、初期原腸胚から *gbx1* が後方神経外胚葉で発現するが、この発現はその後消失し、代わって *gbx2* が後期原腸胚以降、後脳前方で発現することを示した (Kikuta et al., 2003; Rhinn et al., 2003)。すなわち、四足類胚の後脳前方は初期発生を通じて *gbx2* の発現が見られるのに対し、ゼブラフィッシュ胚の場合、原腸形成期の後脳前方ではまず *gbx1* が発現し、その後、この発現は *gbx2* により置き換わっていることになる。四足類と魚類での *gbx* 遺伝子の発現の違いに関しては、所属研究室により、魚類の進化過程における *gbx* 遺伝子の転写調節シスエレメントの変化とその後の機能的なシャッフリングによると推定されている (Islam et al., 2006)。

Morpholino oligo を用いた機能阻害実験では、ゼブラフィッシュの場合、*gbx1* は MHB の位置決定に関わるのに対し、*gbx2* はその後の峡部構造の形成と維持に関与することが示唆された (Kikuta et al., 2003; Rhinn et al., 2009)。一方、TILLING 法によって得られた *gbx1* と *gbx2* の変異体の解析では、いずれの変異でも単独ホモ接合体では MHB 形成の異常は軽微であり、二重変異胚のみで峡部形成の異常が明瞭に観察された。従って、魚類の場合、MHB・峡部の形成に関して、2 つ *gbx* 遺伝子は、異なる発生段階で機能的に分業しているが、重複した機能を持っており、相互に補うことが可能といえる。実際に、*gbx1* と *gbx2* のいずれもが、前脳と中脳を含む前方の脳領域の発達を抑制することが示されており、同様の生化学的特性を有すると考えられる (Kikuta et al., 2003)。

なお、所属研究室の中山らは、加温誘導性 *gbx2* 遺伝子 (*hsp-gbx2*) を保有するトランスジェ

ニック魚[*Tg(hsp70l:gbx2)*]を作製した。これを用いた遺伝子誘導実験により MHB 形成における *gbx2* の役割を調べた結果(Nakayama et al., 2013), *gbx2* の一過的な誘導は峡部欠損を引き起こすこと、脳原基の *gbx2* 活性に対する応答能は、原腸形成終了期 (Bud 期) で最も高く、峡部形成に関して、*gbx* 遺伝子はこの発生時期で最も重要であることが示唆された(Nakayama et al., 2013)。この結果は、Bud 期前後で発現が重複する *gbx1* と *gbx2* について、各々の変異の効果が単独では軽微であることを部分的に説明している。

さて、MHB の確立する原腸形成期の後も、*gbx2* は様々な発生時期に異なる胚領域で発現し、これらの領域の発生を制御することが明らかとなりつつある。実際、コンディショナルノックアウトにより E9 以降に後脳 r1 で *gbx2* を欠損させたマウス胚での研究から、この時期における *gbx2* の機能は *Otx2* の抑制ではなく、峡部オーガナイザー遺伝子の発現の維持であることが示された(Li et al., 2002)。また、*gbx2* 欠損マウス胚は、異常な神経堤細胞のパターン形成および咽頭弓由来構造の欠損を示された(Byrd et al., 2005)。Xenopus 胚でも *gbx2* は神経堤細胞の特異化の最も初期の因子である。この場合、*gbx2* は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの下流にあり、*Zic1* との相互作用、*Six3* の抑制、そして神経褶の決定因子 *Pax3* と *Msx1* の発現制御を通して神経堤の分化誘導を行う(Li et al., 2009)。ニワトリにおいて、脳室の確立後、*gbx2* は間脳の別個領域でも検出され、咽頭内胚葉、耳胞、咽頭弓、体節中胚葉、側方前腸内胚葉、腹側芽芽外胚葉などの領域に見られた(Shamim and Mason, 1998; Niss and Leutz, 1998)。一方、マウス胚脊髄の運動ニューロン及び介在ニューロンは、*gbx2* を一過的に発現する細胞に由来することが細胞運命追跡実験によって示された。実際、E12.5 の *gbx2* 変異胚では、介在ニューロン前駆細胞および脊髄パターンリングが異常となる(Luu et al., 2011)。

さらに、*gbx2* は前脳の発生にも関与することが明らかになりつつある。マウス *gbx2* は E12.5 の時期に大脳基底核(basal ganglia)と視床で発現することが示された(Bulfone et al., 1993)。大脳基底核については、*gbx2* は特に内側基底核隆起(MGE)で発現する。MGE で生じて接線方向移動をする *gbx2* 発現細胞からは線条体のコリン作動性介在ニューロンが生じるのに対し、放射状移動をする *gbx2* 発現細胞は、主に前脳基底部(basal forebrain)における GABA 作動性および他の非コリン作動性ニューロンに分化する(Chen et al., 2010)。実際、*gbx2* 変異マウスでは線条体のコリン作動性ニューロンの移動が異常となることも観察されている。なお、*gbx2* はコリン作動性ニューロンの分化においては *Lhx8* の下流で働くことも示されている(Zhao et al., 2003)。

*gbx2* は間脳視床でも発現することがマウスで観察されている(Bulfone et al., 1993; Bulfone et al., 1995)。視床は、すべての感覚モダリティの受容器から求心性線維の投射を受け、嗅覚以外の感覚情報の中心的統合部位として機能する。統合された感覚情報はさらに大脳皮質に伝達され、意識的知覚を生み出す(Blackshaw et al., 2010)。マウスの場合、*gbx2* は異なる視床核の神経前駆細胞において特定の発生段階で発現し、各々の前駆細胞の分化を制御すると考えられている(Li et al., 2012)。また、コンディショナルノックアウト実験では、*gbx2* が視床から皮質への視床皮質投射にも関与することが示された(Li et al., 2012)。さらに、*gbx2* は分裂後のニューロンから神経前駆細胞にフィードバックループを介して手綱の形成を抑制すると同時に視床ニューロンのアイデンティティを維持するために必要とされた(Mallika et al., 2015)。

*gbx* サブファミリーのもう一つのメンバーである *gbx1* については、上述したように、ゼブラフィッシュでは *gbx2* とともに峡部形成に関わるのに対し、四足類のマウスやトリの胚ではそうした機能は知られていない。マウス *gbx1* は、後脳前方では発現せず、r3 と r5、眼胞、および MGE で発現する(Waters et al., 2003)。ゼブラフィッシュでも、*gbx1* は、後脳発生中に非常にダイナミックの発現が見られた。80% epiboly において、後脳原基全体で発現

し、体節形成期は後脳 r4 において強く発現する、9 somite 期になると他の菱脳節の発現も上昇するが、16 hours post-fertilization (hpf)以後に r4 の発現は他の菱脳節に比べて弱くなった。24 時間胚で *gbx1* は r4 の発現が減少した。30 hpf においては、*gbx1* は終脳基底核において発生しつつある前交連領域、背側の optic recess に接して発現した(Rhinn et al., 2003)。

峡部形成以外での *gbx1* の機能についても近年、マウス等で明らかとなりつつある。前脳基底部では、*Lhx7* と *gbx1* がコリン作動系ニューロンの発生に重要とされる(Asbreuk et al., 2002)。脊髄後角では、*gbx1* は、GABA 作動性ニューロンの特定サブセットの分化を制御する(John et al., 2005)。さらに、*gbx1* 欠損マウスは、総体的運動能力の欠損(a gross locomotive defect)、脊髄内の固有受容感覚回路の組み立ての異常、および脊髄腹側の *ISL1*<sup>+</sup>運動ニューロンの減少などの表現型を示した(Buckley et al., 2013)。

ゼブラフィッシュの場合も前脳での *gbx2* の発現が観察されている。体節形成終了期に相当する 24 hpf の胚では、*gbx2* の発現は終脳で観察されている(Su and Meng, 2002; Islam et al., 2006)。視床における *gbx2* の発現も 36 hpf のゼブラフィッシュ胚で知られる(Kikuta et al., 2003)。しかし、これまでゼブラフィッシュ胚の前脳における *gbx2* の発現の詳細、そして前脳形成での *gbx2* の役割は知られていない。また、ゼブラフィッシュ *gbx1* についても、峡部形成以外の胚発生過程への関与の可能性はこれまで知られていない。

本研究ではまず、ゼブラフィッシュ胚の脳原基における *gbx1* と *gbx2* の発現の比較を行った上、*gbx2* の終脳での発現について詳細に検討した。さらに、*gbx2* について、時期特異てきな過剰発現と転写調節活性の制御、そして変異体の利用により、終脳と間脳の発生・発達における役割を検討した。また、*gbx2* の終脳での発現制御に関わる分泌性シグナルの関与について検討を行った。以上の結果は、*gbx2* が、マウスで知られるように峡部に加えて前脳の部域化を制御すること、ゼブラフィッシュが脳形成における *gbx2* の役割、作用機構の検討に適することを示したと言える。

## 材料と方法

### 材料

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*; 基本的には RW 系統を使用) は、水温 27°C において、明期 14 時間–暗期 10 時間の明暗サイクル下で飼育した。胚を得る際は、明期の終了する 2–3 時間前に 10–20 匹の成魚をガラス玉の敷き詰められた交配用水槽に移した。翌朝、点灯の 1–2 時間後にサイフォンを用いて胚を吸い上げ、これを網で回収した。回収胚は 25°C または 28.5°C で飼育した。なお、発生段階は受精後の時間(hpf, hours post-fertilization), または Kimmel らに従って表記する(Kimmel et al., 1995)。Prim-5 期以降で観察を行う際は、必要に応じて 1-phenyl-2-thiourea (PTU, Nacalai Tesque)を飼育水に添加し (最終濃度 0.03 mg/mL), 色素合成を阻害した。

*gbx2* の脳領域特異的の発現の追跡には、*gbx2* の脳領域特異的エンハンサーの制御下で EGFP を発現する transgenic (Tg)ゼブラフィッシュ系統[Tg(*gbx2:egfp*)] (XB9K1 を使用した) を用いた。なお、この Tg 魚胚では、EGFP が MHB に加え、視床と終脳での *gbx2* の発現を再現することが確認されている(Islam et al., 2006)。*gbx2* 遺伝子を胚で誘導するためには Tg(*hsp70l:gbx2*)系統魚 (中山, 2013) を用いた。この Tg 魚には *heat shock cognate 70-kd protein like* 遺伝子(*hsp70l*)のプロモーター制御下にある *gbx2* (*hsp-gbx2*)がゲノムに導入されており、加温誘導により一過的な *gbx2* の発現誘導が可能である。Tg 魚の維持については、*hsp-gbx2* をヘテロで持つ Tg 魚と野生型魚を交配して得られた子孫胚を成熟まで飼育し、これらの子孫胚では 50%の胚が *hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>と予想される。成熟魚の尾部末端を少量切り取り、genotyping を行った、*hsp-gbx2* を持つ魚はヘテロの Tg(*hsp70l:gbx2*)系統魚である。*gbx2* 変異体としては、*gbx2* の Coding Region 内で Homeodomain の前で 1 塩基置換により Stop Codon が生じた系統を用いた(*gbx2*<sup>h253</sup>; Su et al., 2014)。

成魚や胚の扱いについては、埼玉大学動物実験委員会の承認を得た上で、埼玉大学動物実験規則に従って行った。

### 胚の薬剤処理

各種発生制御シグナルの *gbx2* の発現制御における役割を検討するため、胚を 10 somite 期 (14 hpf)から 18 somite 期(18 hpf)の特定期間において以下の薬剤で処理した：Wnt シグナル伝達阻害剤, IWR-1 (SIGMA) ; Wnt シグナル活性化剤, BIO (CAYMAN CHEMICAL COMPANY) ; SHH シグナル伝達阻害剤, cyclopamine (LKT Laboratories) ; FGF シグナル伝達阻害剤, SU5402 (Wako) ; Nodal シグナル伝達阻害剤, SB431542 (Wako) , BMP シグナル伝達阻害剤, dorsomorphin (Wako) ; Notch シグナル伝達阻害剤, DAPT (Tokyo Chemical Industry Co.) ; Retinoic Acid (SIGMA)。すべての薬剤について、ストック溶液は dimethyl sulfoxide (DMSO)を溶媒として調製した。胚は、薬剤を含む 1/3 Ringer 液(NaCl 38.7mM KCl 9.7mM, CaCl 2.6mM, HEPES 1.7mM)中で処理した(最終濃度: 100 μM IWR-1, 20 μM BIO, 80 μM cyclopamine, 50 μM SU5402, 100 μM SB431542, 20 μM dorsomorphin, 50 μM DAPT, 10<sup>-7</sup> μM Retinoic Acid/RA)。また、対照胚は 0.5% DMSO で同様に処理した。

### 遺伝子工学的手法

大腸菌の培養、プラスミドのトランスフォーメーション、DNA 及び RNA の泳動は、基本的に Sambrook らに従った(Sambrook et al., 1993)。塩基配列の決定の際は、Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応を行い、反応産物を Applied Biosystems



3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により解析した。配列データの解析には SerialCloner 2.6.1 ([http://serialbasics.free.fr/Serial\\_Cloner.html](http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html))を用いた。

#### プラスミドの調製 (NucleoSpin 法)

プラスミドの精製はスピнкаラム法、またはアルカリ-SDS 法を用いて行った。

スピнкаラム法は NucleoSpin Plasmid QuickPure (TaKaRa)を用いて以下のように行った。適切な抗生物質（最終濃度 50–100 µg/mL）を含む 3 mL LB 液体培地(10 g/L polypeptone, 10 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl)にプラスミドを持つ大腸菌のシングルコロニーを植菌し、37°C で一晩振とう培養した。翌朝、1.5 mL マイクロチューブ に約 1.5 mL 大腸菌懸濁液を移し、室温、15,000 rpm で3分間、遠心した。上清を除去した上で残りの懸濁液を加え、同様に遠心した上で上清を除いた。得られたペレットに 250 µL A1 Buffer を加え、ボルテックス により大腸菌を懸濁した後、250 µL A2 Buffer を加え、ゆっくりと転倒混和した。これに 300 µL A3 Buffer を加えてさらに混和し、室温、15,000 rpm で3分間遠心した。一方、キット付属のカラムと 2 mL のマイクロチューブを必要数用意し、カラムをチューブの上に置いた上で上清をカラムに加え、室温、15,000 rpm で3分間遠心した。下のチューブに回収した液を捨てた上、450 µL AQ Buffer をカラムに加え、室温、15,000 rpm で3分間遠心した。その後、カラムの下に新しいマイクロチューブを交換した上、カラムのゲル表面の中央に 50 µL TE Buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)を加え、1分間静置後、室温、15,000 rpm で3分間遠心することでプラスミドをチューブに溶出させた。

アルカリ-SDS 法は以下のように行った。適切な抗生物質（最終濃度 50–100 µg/mL）を含む 2 mL LB 液体培地にプラスミドを持つ大腸菌のシングルコロニーを植菌し、37°C で一晩振とう培養した。翌朝、1.5 mL マイクロチューブ に約 1.5 mL 大腸菌懸濁液を移し、室温、12,000 rpm で3分間、遠心した。上清を除いた。得られたペレットに 100 µL Soln 1 Buffer(50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH8.0, 10 mM EDTA)を加え、ボルテックス により大腸菌を懸濁した後、200 µL Soln 2 (0.2 N NaOH, 1% SDS)を加え、ゆっくりと転倒混和した。これに 150 µL Soln 3 (3 M K, 5 M acetate)を加えてさらに混和し、氷に5分間静置後、4°C、12,000 rpm で3分間遠心した。上清を除いて得られたペレットに 100 µL および 0.5 µL RNase (10 mg/mL)を加え、37°C で30分間保温した。2.5 M NaCl, 20% polyethylene glycol 液を 100 µL を加えてさらに混和し、氷に30分間静置後、12,000 rpm で10分間、遠心した。上清を除いた。得られたペレットに 100 µL TE を加え、これに4°C に冷やした等量の phenol/chloroform/isoamyl alcohol (50:49:1, P/C/I)を加えて激しく攪拌した上、4°C、15,000 rpm で5分間遠心した。得られた上清を新しいマイクロチューブに移した上、1/10 量の 3 M sodium citrate, pH 7.0 と2倍量の 99.5% ethanol を加え、4°C、15,000 rpm で20分間遠心した。得られた沈殿を冷却 70% ethanol で洗浄した上、50 µL TE に溶解した。

#### 胚からの RNA の抽出

胚からの RNA 精製のためには、36 hpf 野生型胚 30 個に 1 mL ISOGEN (Wako)を加えて1分間激しくボルテックスし、針とシリンジを用いて胚を完全破碎した。溶解液は室温で5分間静置後、以下の処理を加えたが、場合によりこの段階で-80°C で長期保存した。まず、溶解液に chloroform を 200 µL 加え、30秒間ボルテックスした上室温で2分間静置した。これを 15,000 rpm、4°C で15分間遠心し、その後、RNA を含む水層を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移した上、500 µL isopropanol を加えた。これを室温で5分間静置した後、15,000 rpm、4°C で10分間遠心し、上清を除去した。沈殿に冷却 70% ethanol を 1 mL 加え、15,000 rpm、4°C で10分間遠心し、沈殿を壊さないように上清を除去した。得られた沈殿を 5–10

分間風乾し, diethyl pyrocarbonate (DEPC; Nacalai Tesque)で処理した純水(DEPC-DW) 20  $\mu$ L に溶解し,  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した.

#### 逆転写による cDNA の合成

精製した胚由来 RNA 1  $\mu$ g に 2  $\mu$ L 5 x FirstStand buffer (Invitrogen), 3  $\mu$ L dNTPs (2.5 mM each, Takara), 1  $\mu$ L 0.1 M dithiothreitol (DTT, Invitrogen), 1  $\mu$ L 100  $\mu$ M Olig dT Primer (Takara)を加え, さらに DEPC-DW を加えて 8.5  $\mu$ L とした. この混合液を  $70^{\circ}\text{C}$  で 5 分間加熱した上で徐々に  $30^{\circ}\text{C}$  まで冷やし, 0.5  $\mu$ L Ribonuclease inhibitor (40 U/ $\mu$ L, ToYoBo)及び 1  $\mu$ L M-MLV reverse transcriptase (200 U/ $\mu$ L Invitrogen)を加え,  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間保温して逆転写反応を行った後,  $98^{\circ}\text{C}$  で 10 分間加熱して逆転写酵素を失活させた.

#### 脳領域マーカー遺伝子 cDNA の PCR による増幅とクローニング

逆転写により得られた cDNA 液 1  $\mu$ L に 10  $\mu$ L 5 $\times$ PrimeSTAR GXL Buffer (Takara), 4  $\mu$ L dNTPs (2.5 mM each, Takara), 1  $\mu$ L PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara)と 33.8  $\mu$ L 滅菌純水(DW)を加え, 脳領域マーカー遺伝子特異的なプライマーペア(100 pmol/ $\mu$ L; Table 3)を 0.1  $\mu$ L 加えた. これをまず  $98^{\circ}\text{C}$  で 2 分間加熱した上, PCR を行った ( $98^{\circ}\text{C}$ , 10 秒間;  $60^{\circ}\text{C}$ , 15 秒間;  $68^{\circ}\text{C}$ , 2 分間; 30 サイクル).

得られた PCR 産物を, プライマー末端に付加した配列に対応する制限酵素(*Bam*HI, *Eco*RI, *Xba*I)で消化した上(Table 3), PCR Cleanup Kit (Axygen)を用いて以下のように精製した.

まず, 消化 DNA に PCR-A 液 (キット添付) を 3 倍液量加えて混合する. 一方, キット付属のカラムと 2 ml のチューブを必要数用意し, カラムをチューブの上に置いた上で上述の混合液を加え, 室温, 15,000 rpm で 1 分間遠心した. 下のチューブに回収した液を捨てた上, 700  $\mu$ L W2 Buffer をカラムに加え, 室温, 15,000 rpm で 1 分間遠心した. 再び下に貯まった液を捨て, 450  $\mu$ L W2 Buffer をカラムに加え, 室温, 15,000 rpm で 1 分間遠心した. その後, 新しい 1.5 mL マイクロチューブと交換し, カラムのゲル表面の中央に TE Buffer を 50  $\mu$ L 加え, 1 分間静置後, 室温, 15,000 rpm で 1 分間遠心して PCR 産物を下のチューブに回収した.

精製した PCR 産物を, 対応する制限酵素で直線化した pCS2+DNA とモル比 10 対 1 で混合し, DW を加えて 5  $\mu$ L とした上, DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (TaKaRa)を用いてライゲーションした. これを *E. coli* (DH5 $\alpha$ )にトランスフォーメーションした上, 得られたコロニーよりプラスミド DNA を前述したように精製した.

#### vp-gbx2-ERT2 遺伝子の作製

pCS2+vp-gbx2HD プラスミド (岡本, 2003; Khan et al., 2012b) 液 1  $\mu$ L (1 ng/ $\mu$ L)に 10  $\mu$ L 5 $\times$ PrimeSTAR GXL Buffer (Takara), 4  $\mu$ L dNTPs (2.5 mM each, Takara), 1  $\mu$ L PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara)と 33.8  $\mu$ L 滅菌純水(DW)を加え, vp-gbx2 遺伝子特異的なプライマーペア(100 pmol/ $\mu$ L; Table 6)を 0.1  $\mu$ L 加えた. これをまず  $98^{\circ}\text{C}$  で 2 分間加熱した上, PCR を行った ( $98^{\circ}\text{C}$ , 10 秒間;  $60^{\circ}\text{C}$ , 15 秒間;  $68^{\circ}\text{C}$ , 1 分間; 30 サイクル).

得られた PCR 産物を, プライマー末端に付加した配列に対応する制限酵素(*Ca*II)で消化した上(Table 6), PCR Cleanup Kit (Axygen)を用いて以下のように精製した.

まず, 消化 DNA に PCR-A 液(PCR Cleanup Kit, Axygen)精製した PCR 産物を, 対応する制限酵素で直線化した pCS2+ERT2 DNA とモル比 10 対 1 で混合し, 純水(DW)を加えて 5  $\mu$ L とした上, DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (TaKaRa)を用いてライゲーションした. これを *E. coli* (DH5 $\alpha$ )にトランスフォーメーションした上, 得られたコロニーよりプラスミド DNA を上述

のように精製した。

#### Whole mount *in situ* hybridization (WISH)法

遺伝子の胚内での発現を調べるために、基本的には Schulte-Merker らに従って 以下のよ  
うに WISH を行なった(Schulte-Merker et al., 1992).

##### (1) Digoxigenin (DIG) 標識と fluorescein (FLU) 標識リボプローブの調製

DIG 標識と FLU 標識リボプローブの合成及び mRNA の合成の際は、まず鋳型 DNA を適  
切な制限酵素で消化して直線化した(Table 4). 直線化プラスミドを 1% sodium dodecyl sulfate  
(SDS), 10 mM EDTA, pH8.0 に溶かし、200 ng/ $\mu$ L になるように Proteinase K (SIGMA)を加えた  
上、37°C で 30 分間、引き続き 56°C で 30 分間保温した。これに 4°C に冷やした等量の  
phenol/chloroform/isoamyl alcohol (50:49:1, P/C/I)を加えて激しく攪拌した上、4°C, 15,000 rpm  
で 5 分間遠心した。得られた上清を新しいマイクロチューブに移した上、1/10 量の 3 M  
sodium citrate, pH 7.0 と 2 倍量の 99.5% ethanol を加え、4°C, 15,000 rpm で 20 分間遠心した。  
得られた沈殿を冷却 70% ethanol で洗浄した上、DEPC-DW に溶解した。

DIG 標識・FLU 標識リボプローブの合成は、DIG RNA labeling mix (Roche Diagnostic)また  
は Fluorescein RNA Labeling Mix (Roche Diagnostic)と RNA transcription kit (STRATAGENE)を用  
いて以下のように行なった。Proteinase K 処理を行なった直線化鋳型プラスミド DNA 1  $\mu$ g  
に、4  $\mu$ L 5 x transcription buffer (STRATAGENE), 2  $\mu$ L 10 x DIG/Fluorescein RNA labeling mix,  
0.8  $\mu$ L 0.75 M DTT, 1  $\mu$ L RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ L, ToYoBo), 2  $\mu$ L RNA polymerase (下  
述)を加えて混合し、DEPC-DW で総量を 20  $\mu$ L とした。37°C で 2-3 時間保温した後、2  $\mu$ L 0.5 M  
EDTA, 2.5  $\mu$ L 4 M LiCl, 75  $\mu$ L 99.5% ethanol を加え、4°C, 15,000 rpm で 25 分間遠心し、得ら  
れた沈殿は冷却 70% ethanol で洗浄した。なお、用いた RNA polymerase は、T3 RNA  
polymerase (50 U/ $\mu$ L, STRATAGENE), T7 RNAPolymerase (50 U/ $\mu$ L, STRATAGENE), または SP6  
RNA polymerase (20 U/ $\mu$ L, Roche)である(Table 4).

##### (2) アルカリ処理によるプローブの断片化

得られた沈殿を 100  $\mu$ L アルカリ溶液(42 mM NaHCO<sub>3</sub>, 63 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 5 mM DTT)に溶か  
し、60°C で 50 分間保温した。その後、10  $\mu$ L 3 M sodium citrate, pH 5.2 と 250  $\mu$ L 99.5%  
ethanol を加え、4°C, 15,000 rpm で 20 分間遠心して沈殿を得た。これを冷却 70% ethanol で洗  
浄し、100  $\mu$ L DEPC-DW に溶かして用時まで冷凍保存した。

##### (3) 胚の固定と Proteinase K 処理

ゼブラフィッシュ胚の卵殻をピンセットで除去した上で予定段階まで発生させた上、胚に  
4°C で冷却した 4% paraformaldehyde/phosphate-buffered saline (PBS)を加えた、一晩静置した  
上(4°C), 100% methanol に置換し、使用時まで-20°C で保存した。

その後、100% methanol 中の固定胚を室温に戻し、以下の全ての操作を室温で行なった。  
まず固定胚を 70% methanol/PBST (0.1% Tween-20 in PBS), 50% methanol/PBST, 30%  
methanol/PBST に各 5 分間浸し、その後 PBST で 5 分間ずつ 2 度洗浄した。prim-5 期以前の  
胚の場合は直ちに後述のハイブリダイゼーションのステップに入るが、prim-5 期以降の胚に  
ついてはまず 4% paraformaldehyde/PBS で 20 分間再固定し、さらに 10  $\mu$ g/mL Proteinase  
K/PBST で 5 分間処理した。この後、PBST で 1 分間洗浄し、再度 4% paraformaldehyde/PBS  
で 20 分間固定した上、PBST で 5 分間ずつ 2 度洗浄した。

##### (4) ハイブリダイゼーション

引き続き、固定胚に 1 mL pre-hybridization buffer (50% formamide, 5 X SSC,0.1% Tween-20)  
(SSC; 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate)を加え、65°C で 15 分間保温した (プレハイブリダ  
イゼーション)。その後、DIG 標識プローブ(0.1 ng/ $\mu$ L)を含む 1 mL hybridization buffer に置換  
し、65°C で一晩保温した。なお、プローブは hybridization buffer 中であらかじめ 68°C で 15

分間加熱した。翌日, hybridization buffer を除去し, 50% formamide/2 X SSCT (0.1 % Tween-20 in 2 x SSC)中で 20 分間ずつ 2 回, 2 X SSCT 中で 15 分間, 0.2 X SSCT 中で 25 分間ずつ 2 回, 65°C で洗浄した。

(5) 抗 DIG 抗体処理及び発色反応

0.2 X SSCT を除去し, 100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20, pH 7.5 (MABT)で 5 分間ずつ 2 回洗浄したのち, 固定胚に blocking solution (1% blocking reagent [Roche] in MABT)を加え, 室温で 1 時間静置した。その後, Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche) を blocking solution で 5000 倍に希釈して加え (基本的には用時調製), 4°C で一晩反応させた。翌日, 抗体液を除いた上, 固定胚を室温にて MABT で 15 分間ずつ 6 度洗浄した。

staining buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.1 % Tween-20)により, 胚を室温にて 5 分間ずつ 2 度洗浄した後, 発色反応は BCIP-NBT 発色キット(Nacalai Tesque)を用いて以下のように行った。1 mL 発色液に移し, 遮光条件下, 室温で 30 分間—3 時間発色反応させた。十分発色させた上, 胚を PBST で 2 回洗浄し, 1 mL 0.1 M glycine-HCl, pH 2.2 中で 20 分間以上処理して発色を停止した。単色染色の場合はこの段階で処理胚を 30% glycerol, 50% glycerol, 75% glycerol に段階的に置換して胚を透明化した。胚は 75% glycerol 中で-20°C にて保存した。

(6) 抗 FLU 抗体処理及び発色反応

2 色染色の場合, 0.1 M glycine-HCl, pH2.2 を除去し, MABT で 5 分間ずつ 2 回洗浄したのち, 固定胚に blocking solution を加え, 室温で 1 時間静置した。その後, Anti-FLU-AP, Fab fragments (Roche)を blocking solution で 5000 倍に希釈して加え (基本的には用時調製), 4°C で一晩反応させた。翌日抗体液を除いた上, 固定胚を室温にて MABT で 15 分間ずつ 6 度洗浄した。

発色反応に用いる Fast Red 発色液は, Fast Red Tablet (SIGMA)と付属の staining buffer Tablet を 1 錠ずつ 1 mL の DW に溶かして調製した。胚を室温にて 5 分間ずつ 2 度洗浄した後, 1 mL 発色液に移し, 遮光条件下, 室温で 30 分間から 3 時間発色反応させた。十分発色させた上, 胚を PBST で 2 回洗浄し, 1 mL 0.1 M glycine-HCl, pH 2.2 中で 20 分間以上処理して発色を停止した。処理胚を 30% glycerol, 50% glycerol, 75% glycerol に段階的に置換して胚を透明化した。胚は 75% glycerol 中で-20°C にて保存した。

### Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法

ゼブラフィッシュ胚における *gbx2* 転写産物の局在を 2 色 FISH で検討するため, Tyramide Signal Amplification Kits (#2 Alexa Fluor 488 及び#6 Alexa Fluor 647)(Thermo Fisher Scientific Inc.)を用い, 基本的には添付プロトコルに従って以下のように染色を行った。

ゼブラフィッシュの胚は前述したように固定し, DIG/FLU 標識 RNA プローブとのハイブリダイズゼーションを行った。十分に胚を洗浄した後, 上述の blocking solution を用いて胚を処理した後, Anti-Digoxigenin-POD antibody, Fab fragments (Roche) (1:1000 に希釈) と振とうしつつ一晩 4°C で保温した。MABT で 15 分間ずつ 6 度洗浄した後, 0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を増幅緩衝液で 1:200 に希釈), Alexa Fluor 647 Tyramide 原液を添付の増幅緩衝液で 1:100 に希釈して調製した。染色液を加え, 胚を 37°C で 3 時間染色した。これをさらに PBST で 5 分間ずつ 3 度洗浄した後, 0.1 M glycine-HCl, pH2.2 中に移した。

引き続き, 胚を MABT で 5 分間ずつ 2 度洗浄した後, 1% blocking reagent (Roche) in MABT 中で 1 時間振とうしつつ室温で保温した。その後, Peroxidase-Conjugated IgG Fraction Monoclonal Mouse Anti-Fluorescein (FITC)(Jackson Immuno Research laboratories, Inc.) (blocking solution で 1:1000 に希釈) と振とうしつつ一晩 4°C で保温した。この胚を MABT で 15 分間

ずつ6度洗浄した後、Alexa Fluor 488 Tyramide 原液を上述のように希釈して調製した染色液により胚を37°Cで3時間染色した。この胚をさらにPBSTで5分間ずつ3度洗浄した後、2% 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), 50% glycerol 中に移し、4°Cで保存した。

#### gbx2-ERT2 と vp-gbx2-ERT2 の mRNA 合成

mRNA の合成は、SP6 MEGAscript Kit (Ambion)を用いて以下のように行なった。まず、Proteinase K 処理した直線化プラスミド 1 µg に 2 µL 10x reaction buffer, 2 µL 10x ATP, 2 µL 10x CTP, 2 µL 10x UTP, 2 µL 2x GTP, 2 µL CAP analog [m7G (5') ppp (5') G], 2 µL Enzyme Mix 及び DEPC-DW を加えて 20 µL とした。これを 37°C で 2-4 時間保温した後、1 µL の RNase free DNaseI を加え、さらに 37°C で 15 分間保温した。その後、30 µL Nuclease-free Water, 30 µL LiCl precipitation soln.を加えて-20°C で 30 分以上冷却し、4°C, 15,000 rpm で 20 分間遠心して沈殿を得た。これを 70% ethanol で洗浄し、20 µL Nuclease-free Water に溶かした。1% Agarose/TAE での電気泳動、吸光度の計測から濃度を算出し、3本のマイクロチューブに分注して-80°C で保存した。

なお、gbx2-ERT2 mRNA 合成の際は pCS2+ gbx2-ERT2 (Nakayama et al., 2017), vp-gbx2-ERT2 mRNA 合成には pCS2+vp-gbx2-ERT2 (本研究作成) を *NotI* で直線化したものを鋳型とした。

#### ゼブラフィッシュ胚への mRNA の導入 (顕微注入)

顕微注入用の針として、ガラス管(G-1, 1x90 mm.NARISHIGE)をマイクロピペット製作器(PG-7, NARISHIGE)でキャピラリーにし、実体顕微鏡下で先端を剃刀で切断したものをを用いた、これをホルダーに固定した上で注入針の先端から注入液を充填し、顕微注入用のマイクロマニピュレーターに装着した。1細胞期の段階で、mRNA の場合は割球または卵黄に 1 nL/胚ずつ注入した。なお、通常注入液には Pheno red 溶液を加えた(最終濃度 0.1%, Gibco BRL)。

#### Gbx2-ERT2 と VP-Gbx2-ERT2 の tamoxifen 処理による活性化

特定発生段階の胚で Gbx2/VP-Gbx2 を活性化するためには、gbx2-ERT2/vp-gbx2-ERT2 mRNA 導入胚を、sphere 期において 1/3 Ringer 液中に移し、14 somite の時期(16 hpf)から 18 somite 期(18 hpf)の期間において、5 µM 4-hydroxy-tamoxifen (TAM, Sigma)で処理した。この際、TAM について、100% ethanol を溶媒として調製した 25 mg/ml ストック液を 1/3 Ringer 液で希釈して用いた、対照については、1/3 Ringer 液で同様に胚を処理した。

#### 顕微鏡観察及び写真撮影

WISH で染色した胚は、75% glycerol 中にある状態でスライドガラス上に移し、蛍光実体顕微鏡(MZ FLIII, Leica)と落射照明を用いて観察した(対物レンズの倍率は 2.5 倍または 10 倍)。撮影は、デジタルカメラ DFC300FX (Leica)と Leica Application Suite V3.30 (Leica)ソフトウェアを用いて行った。

FISH 染色胚については、2% 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), 50% glycerol 中にある状態でスライドガラス上に移し、共焦点レーザー走査顕微鏡(FV-1000D, Olympus)を用い、10 倍の倍率(対物レンズ)で観察した。撮影においては、FV10-ASW 3.1 (Olympus)ソフトウェアを用いた。まず、DyeList パネルで蛍光試薬を指定し(Alexa 488, 647), 2色の画像の HV (high voltage, 感度の設定値), Gain (明るさの倍率)と Offset (背景の暗さ)を波長ごとに調節し、Microscope パネルで画像を取り込み範囲の上限と下限を設定した。StepSize は Z 光学分解能に応じた推奨値を入力し、連続断面画像を撮影した。

Time-lapse 写真撮影を行う場合、下面はガラスのディッシュを用いて胚をアガロースゲル

中にマウントし、共焦点レーザー走査顕微鏡(FV-1000D)により 10 倍の倍率 (対物レンズ) で観察した。撮影については、FV10-ASW 3.1 (Olympus)ソフトウェアを用いて以下のように行った。まず、DyeList パネルで蛍光試薬を指定し(EGFP)、画像の画像の HV (感度の設定値)、Gain (明るさの倍率) と Offset (背景の暗さ) を調節し、Microscope パネルで画像取り込み範囲の上限と下限を設定した、さらに時間間隔を 20 分に設定し、時系列的な連続断層画像を撮影した。

#### 染色胚の画像解析

WISH 染色胚での染色領域の面積と強度に関する定量解析は ImageJ (National Institutes of Health, <http://imagej.nih.gov/ij/>)によって行った。メニュー「Image」にある「Adjust」の中で「Threshold」パネルにおいて、MaxEntropy 方法で染色領域を選択し、その面積と強度をメニュー「Analysis」の「Measure」により数値化した。得られた数値は (ImageJ 中の色は 0=黒, 255=白)、強度を「背景 Mean-染色領域 Mean」で計算し、強度と面積を各々、対照胚を基準として相対値で示した。

#### gbx2 遺伝子の加温誘導

特定発生段階の胚で *gbx2* を一過的に発現誘導するためには、*hsp-gbx2* をヘテロで持つ Tg 魚 (*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*) と野生型魚を交配し、得られた胚を 20 mL 飼育容器 (タッパー容器) 中において、適切な発生段階まで 25°C で培養した。誘導時、飼育水を除去した上、事前に 37°C に保温した飼育水を素早く加え、30 分間、ウォーターバス中で 37°C に保温した。その後、飼育水を除去して速やかに 25°C の飼育水と交換し、さらに 25°C で胚を培養した。なお、飼育容器内では胚がなるべく重層しないように注意した。

#### 単一胚からの DNA 及び RNA の分別抽出

*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)* と野生型魚の交配で得られた胚を加温誘導後、個別に 1.5 mL マイクロチューブに移し、飼育水を完全に除去した上で 50  $\mu$ L ISOGEN (Wako)を加えて 1 分間激しくボルテックスした。得られた溶解液は室温で 5 分間静置後、以下の処理を加えたが、場合によりこの段階で -80°C において長期保存した。まず、溶解液に 10  $\mu$ L chloroform/isoamyl alcohol (49:1)(CIA)を加え、30 秒間ボルテックスした上、室温で 2 分間静置した。これを 15,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心し、その後、RNA を含む水層を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移した。なお、この段階でも必要な場合は -80°C で保存した。

残った中間層と下層には 15  $\mu$ L 99.5% ethanol を加え、タッピングで混和した上、室温で 2 分間静置し、15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心した。上清を除去後、沈殿したゲノム DNA 画分に 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol 1 mL を加え、室温で 30 分間、シェイカーで緩やかに洗浄し、15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心した。上清を除去した後、再度 1 mL 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol を沈殿に加えて同様にシェイカー上で洗浄し、15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心した。上清を除去後、沈殿に 1.5 mL 冷却 70% ethanol を加え、室温で 30 分間、緩やかに振とうし、15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心した上、上清を除去した。得られた DNA の沈殿を 5-10 分間風乾し、20  $\mu$ L TE に溶解した。

#### 胚中の *hsp-gbx2* 配列の検出(Genotyping)

上述のように胚から個別に抽出したゲノム DNA 液 1  $\mu$ L に 4  $\mu$ L 5 X Go Taq Buffer (Promega), 2  $\mu$ L dNTPs (2.5mM each, Takara), 2  $\mu$ L 25mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2  $\mu$ L Taq polymerase (研究室で調製; Engelke et al., 1990) と 10.6  $\mu$ L DW を加え、*hsp-gbx2* 配列に特異的なライマーペア

の液(FT-gbx2-s, FT-gbx2-as; 100 pmol/μL; Table 5)を各々0.1 μL を加え、94°C で2分間加熱した上、PCRを行った(94°C, 1分間, 54°C, 30秒間, 72°C, 30秒間 X 40サイクル; 最後のサイクルは72°C でさらに5分間保温)。同じDNA抽出液について、ゼブラフィッシュゲノム内配列(第3染色体)に対するライマーペア(fe37B04-f, fe37B04-r; Table 5)を用いてPCRを同様に行い、内部コントロールとした(94°C で2分間; 94°C, 1分間; 54°C, 30秒間; 72°C, 30秒間; 40サイクル, 最後のサイクルでは72°C でさらに5分間保温)(Khan et al., 2012a)。

得られたPCR産物は2% agarose ゲル/Tris-Acetate-EDTA (TAE, 4.84 g/L Tris, 1142 μL/L glacial acetic acid, 2 mL/L 0.5 M EDTA)上で電気泳動し、各胚抽出液ごとにゲノムDNA及び導入遺伝子の有無を判定した(各々196 bp と180 bp のバンドが期待される)。

#### Genotyping に基づいてプールした胚からのRNAの精製とcDNAの合成

*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*と野生型魚の交配で得られた胚について、個別に抽出したRNA液を、Genotypingの結果に基づいて*hsp-gbx2* ポジティブ胚とネガティブ胚にプールし(8胚由来RNA/プール)、各々に150 μL isopropanol を加えた。これを室温で5分間静置した後、15,000 rpm, 4°C で10分間遠心し、上清を除去した。沈殿に冷却70% ethanol を1 mL 加え、15,000 rpm, 4°C で10分間遠心し、沈殿を壊さないように上清を除去した。得られた沈殿を5-10分間風乾し、20 μL DEPC-DW に溶解し、-80°C で保存した。

各プールより精製したRNA液1 μg (液量を定量したRNAの濃度から算出した)に2 μL 5 x FirstStand buffer (Invitrogen), 3 μL dNTPs (2.5 mM each, Takara), 1 μL 0.1 M DTT (Invitrogen), 0.5 μL 100 μM Random Primer (hexadeoxyribonucleotide mixture; pd (N)<sub>6</sub>) (Takara)を加え、さらにDEPC-DWを加えて8.5 μLとした。この混合液を70°C で5分間加熱した上で徐々に30°C まで冷やし、0.5 μL Ribonuclease inhibitor (40 U/μL, ToYoBo) 及び1 μL M-MLV reverse transcriptase (200 U/μL, Invitrogen)を加えた。これを37°C で1時間保温した後、98°C で10分間加熱して酵素を失活させた。

#### 胚中の*gbx2*変異配列の検出(Genotyping)

*gbx2<sup>th253</sup>* 変異体のヘテロ接合体魚(*gbx2<sup>+/th253</sup>*)同士を交配し、得られた胚について、前述したように個別にゲノムDNAを抽出し、得られたDNA液1 μLに4 μL 5 X Go Taq Buffer (Promega), 2 μL dNTPs (2.5 mM each, Takara), 2 μL 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μL Taq polymerase (研究室で調製; Engelke et al., 1990) と10.6 μL DWを加え、*gbx2* 配列に特異的なプライマーペアの液(dcap28, dcap29; 100 pmol/μL; Table 5)を各々0.1 μLを加え、94°C で2分間加熱した上、PCRを行った(94°C, 1分間, 60°C, 30秒間, 72°C, 30秒間 X 35サイクル; 最後のサイクルは72°C でさらに5分間保温)(Khan et al., 2012a)。

得られたPCR産物を制限酵素 *MseI* により処理し、2% agarose ゲル/Tris-Acetate-EDTA (TAE, 4.84 g/L Tris, 1142 μL/L glacial acetic acid, 2 mL/L 0.5 M EDTA)上で電気泳動し、各胚抽出液ごとに*gbx2* 変異配列の有無を判定した(野生型では240 bp, 変異体では210 bp のバンドが期待される)。

#### Real time PCR (定量的PCR)

Tg胚(11個体)あるいは*gbx2*機能欠損変異体胚(11個体)から調製したRNA液を鋳型としてcDNA液を前述したように合成した。これらを各々DWで10倍希釈し、この希釈液1 μLに各遺伝子に特異的なプライマーペア(各々10 μM, 0.2 μL, Table 1, 2), 5 μL Master Mix (Thunderbird SYBR qPCR Mix, ToYoBo), DEPC-DWを加えて10 μLとした。なお、用いるプラ

イマーペアは、NCBI/Primer-BLAST 使用して設計した (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; Table 1,2). この際、PCR 産物の長さは 150-200 bp, イントロンは 500 bp 以上に設定した.

得られた混合液を 96-Well Reaction Plate (MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate, ABI)の各ウェルに加え (10  $\mu$ L/ウェル), スピンドアウンして混合した. これを 95°C で 10 分間加熱した後, THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いて PCR を行い (95°C, 15 秒; 64°C, 30 秒; 40 サイクル), サイクルごとに SYBR の蛍光を測定した. さらに 1 サイクル反応させた後 (95°C, 15 秒; 64°C, 30 秒), 徐々に 95°C に加熱し, 0.3°C ごとに SYBR の蛍光を測定することで PCR 産物の溶解曲線を作成し, PCR の特異性を確認した. 以上の反応において, 各サンプルは triplicate で測定した. 内部コントロールとしては 18S rRNA を用いた (18S rRNA, Table 1). 内在 *gbx2* の発現の定量については *gbx2* 3'UTR 領域に対するプライマー (*gbx2* 3'UTR)を使って PCR を行った (Table 1).

測定の結果は StepOne Software v2.1 を用いて解析し,  $\Delta\Delta$ CT (comparative threshold cycle)の平均値と標準誤差 ( $\Delta\Delta$ CTSEM (comparative threshold cycle, standard error of the mean))を求めた. なお, triplicate の中でデータが一つだけ極端に異常な場合はこれを排除した. 得られた数値より, 遺伝子ごとに, *hsp-gbx2* 誘導後の遺伝子発現の野生型胚での発現に対する相対値 (RQ,  $2^{-\Delta\Delta$ CT})を算出した. 得られた数値は Prism 5 (GraphPad software Inc.) (<http://www.graphpad.com/>)に導入して, グラフを作成した. 測定区間で統計的有意差があるかについては  $\Delta\Delta$ CT 値をもと二標本 t 検定 (unpaired t-test)を行った. RQ 値のエラーバーの範囲は  $2^{-(\Delta\Delta$ CT $+\Delta$ CTSEM)} $\cdot$ RQ と  $2^{-(\Delta\Delta$ CT $-\Delta$ CTSEM)}で示した.



## 結果

### ゼブラフィッシュ胚の脳原基における *gbx1* と *gbx2* の発現の検討

マウス胚では、*gbx2* はまず E10.5 で終脳の基底核および視床の原基に発現しており (Rhinn et al., 2004). E12.5 でも同様に基底核、視床の原基で発現が見られたている (Bulfone et al., 1993; Waters et al., 2002). 実際、*gbx2* は、視床の形成と視床皮質軸索の分化 (Li et al., 2012; Mallika et al., 2015), そして線条体のコリン作動性介在ニューロンの分化に必要とされる (Chen et al., 2010). ゼブラフィッシュにおいても、*gbx2* の発現は 24 hpf では終脳 (Su and Meng, 2002), 36 hpf では視床 (Kikuta et al., 2003) で見られることが報告された. しかし、ゼブラフィッシュ前脳の発生におけるこの遺伝子の発現の詳細とその役割は明らかされていない. 本研究ではまず、epiboly 期終了後、48 hpf までのゼブラフィッシュ胚前脳における *gbx2* の発現の再検討を行った.

すでに序論で述べたように、*gbx2* の発現は epiboly 終了期において後脳前方・峡部や内耳原基 (耳胞) で観察され、さらに体節形成期から咽頭胚期にかけて、脳の腹側にある咽頭弓でも *gbx2* の発現が見られている (Kikuta et al., 2003). 今回、原腸形成終了以降の前脳における *gbx2* の発現に注目したところ、16 hpf までこの領域では発現は検出されなかったが、18 hpf から 24 hpf にかけて終脳の脳室側で発現していた (Fig. 1A-E, A'-E'). この発現は 36 hpf では終脳後方に限局し (Fig. 1F, F'), 48 hpf では消失する (Fig. 1G, G'). 一方、間脳では、*gbx2* の発現は 36 hpf までに視床原基で出現し、この発現は少なくとも 48 hpf まで持続した (Fig. 1 F, F', G, G'). 以上のように、ゼブラフィッシュ胚の前脳の場合、*gbx2* は、体節形成後期胚では一過的に終脳の脳室側で発現し、咽頭胚後期になると視床原基で発現する.

もう一つの *gbx* 遺伝子である *gbx1* は、マウス胚の場合、後脳の r3 と r5, 眼胞, そして MGE で発現が観察された (Waters et al., 2003 ; Rhinn et al., 2004). 特に MGE では E12.5 において発現が見られており、前脳基底部分におけるコリン作動系ニューロンの発生に参与するとされる (Asbreuk et al., 2002). 一方、ゼブラフィッシュの場合、原腸形成期に後脳領域で広く発現し、*gbx2* とともに MHB・峡部の発生に貢献する他 (Kikuta et al., 2003; Su et al., 2014), 24 hpf では後方 r2-3, r5-7, 48 hpf では脊髄の運動神経, そして 36 hpf においては basal telencephalon で発現が見られている (Rhinn et al., 2003). しかし、魚類の場合、終脳と間脳における *gbx1* の発現の詳細とその役割は不明だった.

そこで *gbx1* についても体節形成期以降のゼブラフィッシュ胚における発現を検討した. ゼブラフィッシュの場合、原腸形成期では上述したように (Rhinn et al., 2003) 神経板の後方で発現が広く見られるが 16 hpf になると、後脳の r1 領域と r4 領域で発現が低下したが、それ以外の後脳菱脳節 (r2, r3, r5-7) では引きつづき発現が見られた (Fig. 2A-F). 前脳と中脳では、24 hpf まで *gbx1* の発現は検出されなかったが、36 hpf になると、腹側終脳の最前端部位で発現が出現し、同様の発現が 48 hpf でも観察された (Fig. 2E, F, E', F'). この発現領域は以前に 36 hpf の胚について観察され、basal telencephalon と報告されたものと一致すると考えられる (Rhinn et al., 2003).

脳内における *gbx1* と *gbx2* の発現を比較するため、18 hpf, 24 hpf, そして 36 hpf で 2 色 WISH を行ったところ、後脳については全ての時期で *gbx2* は後脳 r1 の前端領域、*gbx1* は後方菱脳節 (r2, r3, r5-7) で発現が見られており、両者の発現に重なりは見られていない (Fig. 3). 前脳、中脳については、18 hpf と 24 hpf では *gbx2* は上述のように終脳脳室側で発現するが、*gbx1* は検出されなかった (Fig. 3). 36 hpf になると *gbx2* の発現は視床では見られる一方で終脳では検出されなかったのに対し、*gbx1* は腹側終脳の前端に発現した (Fig. 3). 従って、初

期体節期以後の前脳においても2つの *gbx* 遺伝子の発現は異なっている。以上より、MHB 発生の場合と異なり、前脳の発生において、*gbx1* と *gbx2* の機能に重複はないと考えられる。

引き続き、体節形成後期における *gbx2* の終脳における発現部位を特定するため、終脳、間脳において、*otx2*, *emx3*, *dlx2a*, *six3b*, *shha*, *pax6a* の発現を *gbx2* の発現と2色 FISH により比較した。その結果、*gbx2* の終脳での発現は、両側部の脳室側領域に限定されていた、特に腹側終脳脳室側では *dlx2a* の発現領域(Mueller et al., 2008; MacDonald et al., 2013)の近傍であり、背側終脳では *emx3* の発現領域(Viktorin et al., 2009)の脳室側領域で見られた。終脳中央部での *pax6a* (Kleinjan et al., 2008)、間脳での *otx2* の発現領域(Scholpp et al., 2007)と比べてもやはりその脳室側であり、終脳腹側前方での *six3b* の発現(Gestri et al., 2005; Carlin et al., 2012)に接してその後方に見られた。視床下部における *shha* 発現(Sousa et al., 2010)は *gbx2* 発現の下方にある。

これらの遺伝子の発現と *gbx2* の発現は密接な関係みあり、しばしば相補的であるといえる (Fig. 4A, B)。以上の結果は、体節形成後期の終脳において、*gbx2* は脳室側で発現することを示しており、さらに *gbx2* が他の前脳形成遺伝子の発現に、主として抑制的に関与することで、前脳部域化に関与していることを示唆する。

#### リアルタイムイメージングによる脳内 *gbx2* 発現細胞のダイナミックな挙動の追跡

所属研究室では *gbx2* の脳領域特異的エンハンサーの制御下で EGFP を発現する Tg 魚系統を確立した [*Tg(gbx2:egfp)* 魚]。この魚では実際に EGFP が視床と終脳で発現することが確認されている (Islam et al., 2006)。本研究では、胚発生における *gbx2* 発現領域の動態を追跡するために、*Tg(gbx2:egfp<sup>+</sup>)* 魚と野生型魚を交配し、得られた子孫胚における EGFP 蛍光の発現パターンを追跡した (Fig. 5)。

まず 17 hpf から 24 hpf までについて、EGFP の蛍光を背側から観察、追跡したところ、すでに観察されたように (Islam et al., 2006)、全ての段階において後脳前端における内在 *gbx2* 発現が EGFP 蛍光で再現された。MHB より前方の脳原基については、18 hpf までは蛍光はほとんど検出されなかったが、19 hpf に前方で出現し、この発現は 22-23 hpf で最も強く観察された (Fig. 5C,F,G)。21 hpf 以降、EGFP の蛍光は間脳領域、恐らく視床原基でも見られるようになった (Fig. 5E)。

*Tg(gbx2:egfp<sup>+</sup>)* による蛍光の発現を 23 hpf 以降 48 hpf まで側面から観察すると (Fig. 5I-O)、18 hpf では前脳の腹側領域に蛍光が観察され (Fig. 5I)、その後 21 hpf から 28 hpf では、眼泡内で発現部位が複数観察されたが (Fig. 5J-N)、その一方で終脳では発現が見られてなかった。26 hpf から 48 hpf では、蛍光の発現は前方の脳では視床のみで観察された (Fig. 5M-S)。

以上の Tg 胚における EGFP 蛍光発現は、*gbx2* の視床での発現は再現する一方、終脳の発現について必ずしも再現しておらず、今後さらに検討する必要があるといえる。

#### Heat shock promoter を利用した *gbx2* 誘導実験の有効性の確認

峡部形成における *gbx2* の機能は、これまで主としてゼブラフィッシュ胚への mRNA 顕微注入法によって調べられている (Kikuta et al., 2003)、しかし、この方法は、発生のより後期での脳発生における遺伝子機能の解析には適していない。所属研究室の中山は、胚の加温処理により *gbx2* の発現を誘導することが可能な Tg 魚系統 [*Tg(hsp70l:gbx2)*] を樹立した (Fig. 6)。さらに、この Tg 系統魚の胚を用いることで、*gbx2* の一過的な誘導が峡部欠損を誘発すること、発現脳原基の MHB 領域が *gbx2* 活性に対して示すこの応答能が原腸形成終了期 (Bud 期) で最も高いことが見出されている (Nakayama et al., 2013)。本研究では、この Tg 系統を、前脳の発生に対する *gbx2* の作用を明らかにすることを目的として使用した。

まず、この Tg 魚の胚に加温処理をすることで実際に *gbx2* を誘導することが可能かについて確認を行った (Fig. 6). *hsp-gbx2* をヘテロで持つ Tg 魚 [*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*] と野生型魚を交配して得られた子孫胚について、*gbx2* が MHB 形成に関わる shield 期, bud 期, 終脳や視床の領域で発現する時期である体節形成期 (6 somite, 18 somite, 24 hpf) そして咽頭胚期 (36 hpf, 48 hpf) にかけての計 7 発生段階において、加温処理 (37°C, 30 分間) を行った上で直ちに固定した。なお、これらの子孫胚では 50% の胚が *hsp-gbx2<sup>+/+</sup>*, 残りの胚は *hsp-gbx2* を持たない (*hsp-gbx2<sup>-/-</sup>*) と予想される。これらの加温処理胚における *gbx2* の発現を WISH で染色した結果、調べたすべての段階において、約半分の胚では MHB, 視床, 内耳原基などで *gbx2* の内在発現のみが見られるのに対し、残りの胚では胚全域で広範な異所的発現が観察された (Fig. 7)。

加温処理で見られた *gbx2* の異所的な発現増大が実際に *hsp-gbx2* の誘導によるかを確認するため、各染色胚から個別にゲノム DNA を抽出し、*hsp-gbx2* 配列の有無を PCR で確認したところ (Genotyping), 7 つの発生段階のいずれについても *hsp-gbx2* 配列は、*gbx2* が異所的に誘導された胚のみで検出され、発現誘導のなかった胚では検出されなかった (Fig. 8)。なお、内部コントロールである内在ゲノム DNA 配列の PCR では、検討した全ての胚でバンドが検出されており、各胚からのゲノム DNA 抽出及び PCR 反応に問題はないといえる。従って、用いた *Tg(hsp70l:gbx2)* 系統魚は、少なくとも shield 期以降咽頭胚期まで、*gbx2* の特異的な誘導に有効であることが確認された。

次に、*Tg(hsp70l:gbx2)* 魚胚の加温処理による *gbx2* 発現量の変化を定量的に解析するため、*hsp-gbx2* をヘテロで持つ [*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*] 魚と野生型魚を交配して得られた子孫胚、そして同時に準備した野生型胚について、やはり Shield 期から咽頭胚期にかけての 7 発生段階において、37°C で 30 分間加温誘導し、処理直後に胚を回収した。Tg 子孫胚、別に用意した野生型胚を各々ブールし、全 RNA を精製した上、これを鋳型に cDNA を合成し、*gbx2* の発現を qPCR により解析した。その結果、7 発生段階の全てにおいて、野生型胚と比べて 62 から 309 倍の発現誘導が見られた (Fig. 9A,A')。なお、内在 *gbx2* の発現は、shield 期 (6 hpf), Bud 期 (10 hpf) と 18 hpf ではほとんど変動しないが、24 hpf 以降有意に変化していたが (24 hpf, 2.5 倍; 36 hpf, 1.6 倍; 48 hpf, 1.3 倍)。ただし、誘導された *gbx2* の全量に比べると無視できるレベルといえる (Fig. 9B)。従って、*Tg(hsp70l:gbx2)* 魚は、epiboly 期から咽頭胚期までの胚において、*gbx2* の発現誘導にも有用であることが定量的にも確認された。

さらに、誘導終了後の *hsp-gbx2* の発現レベルの経時的な変動について検討した。まず、*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)* 魚と野生型魚を交配して得られた子孫胚及び別に準備した野生型胚について、*gbx2* が MHB 領域で活性化される原腸形成終了期に 37°C で 30 分間加温誘導し、処理直後 (0 時間), 1 時間後, 2 時間後, 3 時間後に Tg 子孫胚、そして野生型胚各々のブールより全 RNA を精製した。これより合成した cDNA を鋳型とし、*gbx2* の発現を qPCR により解析したところ。Tg 子孫胚の場合、処理直後には *gbx2* の発現レベルが野生型と比べて 102 倍だったが、1 時間後には 35 倍, 2 時間後で 16 倍, 3 時間後で 11 倍, 4 時間後で 9 倍と、急激に低下した。従って、*hsp-gbx2* の発現誘導は一過的であると言える (Fig. 9C)。

以上の WISH および定量 PCR の解析により、原腸形成初期から前脳領域で *gbx2* が発現する体節形成以降の発生段階で、この遺伝子誘導系は *gbx2* 機能の解析のために有効であることが確認された。

#### *gbx2* の発現誘導が終脳の発生に及ぼす効果 (WISH による解析)

終脳の発生に対する *gbx2* の役割を知るために、*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)* 魚と野生型魚を交配して得られた子孫胚を、終脳で *gbx2* が発現する直前である 16 hpf に加温処理して *gbx2* の過剰発現を行った。18 hpf において、前脳形成に関与する制御遺伝子の発現を WISH によって染色

した後、Genotypingによってこれら染色胚が *hsp-gbx2* 遺伝子を保有するかを確認した(Fig.14).

まず、転写調節因子をコードする前脳領域マーカー遺伝子(*otx2*, *emx3*, *dlx2a*, *six3b*)に対する *gbx2* 過剰発現の効果を検討した. 視蓋前域と中脳における *otx2* の発現は、以前に示されたように(Nakayama et al., 2013), *gbx2* 誘導胚において、領域が小さくなった (Fig. 10A). 背側終脳での *emx3* の発現については前方で抑制される結果、領域が後方に後退した (Fig. 10B). 腹側終脳と腹側視床での *dlx2a* については、特に腹側終脳での発現が *gbx2* 誘導により強く抑制された (Fig. 10C). 終脳と眼胞での *six3b* の発現はいずれも顕著に抑制された (Fig. 10D).

脳領域での遺伝子発現への *gbx2* 誘導の効果については半定量的に検討するため、ImageJ に画像を取り込み、各画像上で発現領域を決定した上、発現領域の面積、発現レベル各々を数値化した. この解析の結果、視蓋前域と中脳における *otx2* の発現領域の面積が実際に減少していた (0.54 倍) (Fig. 11A). 一方、背側終脳での *emx3* の発現領域の面積も減少した (0.83 倍) (Fig. 11B). *dlx2a* については、腹側終脳での発現面積が *gbx2* 誘導により顕著に低下し (0.57 倍)、発現レベルも減少した (0.80 倍) (Fig. 11C). 終脳と眼胞での *six3b* の発現領域は大幅に縮小し (0.04 倍)、発現レベルも顕著に減少した (0.59 倍) (Fig. 11D). 以上の結果は、WISH の染色に関する上述の定性的観察を確認したといえる.

同様に、脳の発生への関与が知られている分泌因子(BMP, Wnt, Hedgehog/HH, FGF)の遺伝子(*bmp2b*, *wnt1*, *wnt3a*, *shha*, *fgf8a*, *dla*, *notch1a*)について、発現に対する *gbx2* 誘導の効果を調べた. まず、背側網膜における *bmp2b* の発現 (Scholpp and Brand, 2001), そして背側間脳, 背側中脳と MHB での *wnt1* (Navarro-Garberi et al., 2015)と *wnt3a* (Mattes et al., 2012)の発現が *gbx2* 誘導により顕著に低下した (Fig. 12A-C). 一方、腹側前脳と底版での *shha* の発現は *gbx2* 誘導胚で上昇した (Sousa et al., 2010) (Fig. 12D). 腹側終脳と間脳での *dla* の発現は *gbx2* 誘導胚で上昇した(Tallafuss et al., 2009; Dyer et al., 2014) (Fig. 12F). *fgf8a* の背側終脳における発現 (Hoch et al., 2015)はほとんど影響を受けなかった (Fig. 12E). *notch1a* の腹側終脳と間脳での発現(Dyer et al., 2014)はほとんど影響を受けなかった (Fig. 12G). これら分泌因子遺伝子の脳領域での発現についても、ImageJ により、写真上での領域を決定した上で、発現領域の面積と発現レベルを定量した結果、背側網膜における *bmp2b* の発現がやはり消失しており (Fig. 13A), 背側間脳, 背側中脳, MHB での *wnt1* と *wnt3a* の発現領域の面積、発現レベルも有意に減少した(*wnt1*, 各々0.57 倍, 0.65 倍; *wnt3a*, 各々0.49 倍, 0.64 倍) (Fig. 13B,C). 一方、腹側前脳と底版での *shha* の発現については発現面積、発現レベルとも有意に上昇した(各々1.37 倍, 1.16 倍) (Fig. 13D). *fgf8a* の背側終脳における発現領域の面積、発現レベルはほとんど影響を受けなかった(各々0.99 倍, 0.93 倍) (Fig. 13E). 以上のように、*gbx2* の脳形成遺伝子に対する WISH での染色で見られた傾向が半定量的にも確認された.

#### *gbx2* の発現誘導が終脳の発生に及ぼす効果 (qPCR による定量的解析)

終脳形成に対する *gbx2* 過剰発現の効果をより定量的に検討するため、*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*魚と野生型魚を交配して得られた子孫胚を、上述したように腹側終脳で *gbx2* が発現する直前である 16 hpf に加温処理して *gbx2* の過剰発現を行った上、18 hpf において各種脳形成遺伝子の発現を、Sibling 胚と Tg 胚の各々について qPCR により測定した.

その結果、転写制御因子遺伝子である *otx2*, *emx3*, そして *six3b* の発現は *gbx2* により抑制され (各々0.79 倍, 0.56 倍, 0.37 倍), 特に *six3b* の発現低下が顕著であった (Fig. 15A). これらの結果は基本的には WISH による結果と対応する. なお、これらの遺伝子の発現はこの時期、前脳、あるいは終脳に限定されており、qPCR の結果自体は胚全体での発現レベルを示すものの、実質的には脳ので発現変動を反映すると考えられる. 一方、WISH の結果とは対照的に、*dlx2a* の発現は *gbx2* によって活性化された (1.71 倍) (Fig. 15A). ただし、*dlx2a* は間

脳, そして特に咽頭弓などで強く発現しており, これらでの発現を反映していると考えられる. さらに, 終脳, 間脳, 眼胞, 及び脊髄で発現する *pax6a* の発現を検討したが, 特に変動は見られていない (Fig. 15A). 比較のため, この時期には主として後脳で発現する *gbx1* についても検討したところ, *gbx2* による発現の抑制が見られた (Fig. 15A). *gbx1* と *gbx2* の発現が後脳で入れ子であることを考えると興味深い.

分泌因子遺伝子についても同様の定量的解析を行った. まず Wnt 遺伝子の場合, *wnt1* 及び *wnt3a* のいずれも発現が *gbx2* により抑制された (各々0.72倍と0.34倍) (Fig. 15B). ただし, *wnt3* については特に変動が見られていない (1.06倍) (Fig. 15B). 一方, *shha* の発現は *gbx2* の過剰発現により増大した (1.54倍). *fgf8a* の発現については変動が見られなかった (1.02倍) (Fig. 15B). 以上の結果は基本的には WISH によりみられた傾向と対応する. ただし, *bmp2b* の発現は *gbx2* によって活性化されており (1.37倍) (Fig. 15B), WISH での結果とは異なっている. これについては, この時期に *bmp2b* は背側網膜, 咽頭内胚葉, 耳胞, 頭部表皮など, 様々な胚領域で発現するために qPCR では脳での状況を示さないためと思われる.

以上のように, WISH によって得られた結果は, *bmp2b* および *dlx2a* を除いて, 定量 PCR により確認されたといえる. なお, 興味深いことに *gbx2* の過剰発現は, 神経分化の制御に関わる Notch シグナル関連遺伝子の *dla* および *notch1a* の発現を顕著に活性化しており (各々1.30倍と1.70倍) (Fig. 15B), *gbx2* は前脳の領域化に加えて神経発生の調節にも関わることが示唆された (Fig. 15B).

#### Tamoxifen-ERT2 System による Gbx2 の活性化が終脳発生に及ぼす効果 (WISH による解析)

*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)* 魚による *gbx2* 発現誘導実験の結果を異なるアプローチで確認するために, 1細胞期の野生型胚に野生型 *gbx2* と *ERT2* を繋いだ人工遺伝子 *gbx2-ERT2* の mRNA を注入し, 終脳で *gbx2* が発現する直前である 16 hpf に Tamoxifen 処理により Gbx2 タンパク質の転写調節能の活性化を行った上 (Fig. 16), 18 hpf において, 前脳形成に関与する制御遺伝子の発現を WISH によって染色した.

まず, 転写調節因子をコードする前脳領域マーカー遺伝子 (*dlx2a*, *six3b*) の発現に対する *gbx2* 過剰発現の効果を検討した. 腹側終脳と腹側視床での *dlx2a* については, いずれの領域でも発現が Gbx2 活性化により強く抑制された (Fig. 17A). 一方, 終脳腹側, 視床下部, 眼胞での *six3b* の発現は特に終脳と眼胞で顕著に抑制された (Fig. 17B). 脳の発生への関与が知られている Hedgehog/HH 分泌因子遺伝子である *shha* については, 視床下部, 底板, そして *zona limitans intrathalamica (zli)* での発現が全て Gbx2 活性化で上昇した (Sousa et al., 2010) (Fig. 17C). 以上のように, *Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)* 魚による結果がこの手法でも確認された.

次に, 活性化型 Gbx2 遺伝子 (*vp-gbx2*) (Nakayama et al., 2017) と *ERT2* を繋いだ人工遺伝子 *vp-gbx2-ERT2* の mRNA を卵に顕微注入し, 18 hpf において, 前脳形成に関与する制御遺伝子の発現を WISH によって染色した. Gbx2 は基本的に転写抑制因子と考えられており, 転写活性化ドメイン VP16 をもつ *vp-gbx2* 産物 VP-Gbx2 は dominant-negative に *gbx2* の機能を抑制するとされる (Nakayama et al., 2013).

まず, 転写調節因子をコードする前脳領域マーカー遺伝子 (*dlx2a*, *six3b*) に対する VP-Gbx2 活性化の効果を検討したところ. 腹側終脳と腹側視床での *dlx2a* の発現, 終脳と眼胞での *six3b* の発現のいずれについても顕著な異常は見られなかった (Fig. 18A,C). これらの発現を ImageJ により画像としてを取り込み, 各画像上で発現領域を決定した上, 発現領域の面積, 発現レベル各々を数値化した. この半定量的解析の結果, *dlx2a* については, 腹側終脳での発現面積が *gbx2* 誘導によりやや減少し (0.92倍), 発現レベルも低下した (0.41倍) (Fig. 18D). 終脳と眼胞での *six3b* の発現領域は若干ながら有意に拡大し (1.14倍), 発現レベルについて有意

ではないが、やはり上昇の傾向が見られた (1.09 倍) (Fig. 21E). 同様に, Hedgehog/HH 分泌因子遺伝子の *shha* について, 発現に対する VP-Gbx2 活性化の効果を調べたところ, 視床下部, *zli*, 底板での発現は *gbx2* 誘導胚で明らかに抑制された(Sousa et al., 2010) (Fig. 21G). ImageJ により写真上での *shha* 領発現域を決定した上で, 発現領域の面積と発現レベルを定量した結果, *shha* の発現は面積, レベルとも顕著に低下しており(各々0.49 倍, 0.64 倍) (Fig. 21F). 上述の観察結果が数値的にも確認された.

以上のように, *vp-gbx2* の効果は *six3b* と *dlx2a* については野生型 *gbx2* と異なって不明瞭であり, これらの遺伝子に対して *gbx2* が抑制的に働くことを示す. これに対し, *shha* については野生型 Gbx2 が活性化, VP-Gbx2 が抑制に働いている. 従って, この遺伝子に対して Gbx2 は, 介在する転写抑制因子の発現抑制に働くことで, 結果的に転写活性化を行うことが示唆された.

### *gbx2* 機能欠損の終脳発生に及ぼす効果の検討 (WISH による解析)

以上の gain-of-function 実験と平行して, *gbx2* の機能欠損変異体を用いた loss-of-function 実験を行った. ここで用いた *gbx2* 変異体では(*gbx2*<sup>th253</sup>; Su et al., 2014), *gbx2* の Coding Region 内の Homeodomain 領域直前に 1 塩基置換により Stop Codon が生じており, Null 変異体とされる(鹿毛, 2015). まず, ヘテロ接合体(*gbx2*<sup>+th253</sup>)同士を交配し, 得られた子孫胚を終脳で *gbx2* の発現が始まった後の 24 hpf で固定した上, WISH により終脳形成遺伝子の発現を検討した. さらに, 染色胚各々について PCR を用いた Genotyping を行い, *gbx2* 変異の有無を決定した (Fig. 20).

その結果, *emx3* の終脳背側での発現は, WISH 染色ではやや前方に拡大していた (Fig. 19A), ImageJ 解析により *emx3* の発現を検討すると, 発現領域の面積は 1.18 倍, 発現レベルは 1.10 倍に上昇していた (Fig. 19A). また, 終脳腹側での *dlx2a* の各々について定量した結果, 発現領域の面積は 1.27 倍, 発現レベルは 1.10 倍に上昇していた (Fig. 19B). 一方, 終脳と眼胞での *six3b* の発現, 終脳と視床下部での *nkx2.1* の発現, 視蓋前域と中脳における *otx2* の発現 (Fig. 19C) には明瞭な変化が見られなかった. また, 前脳神経分化マーカー遺伝子である *lhx5*, *lhx6*, *otpb*, そして *nkx2.1* の 48 hpf 胚終脳での発現にも明瞭な異常は見られなかった (Fig. 19D-G). さらに, 終脳でのニューロン分化を調べるため, 三叉神経節でのコリン作動性ニューロンマーカー *chata* の発現を 72 hpf で, 終脳における GABA 作動性ニューロンマーカー *gad1b* の発現を 48 hpf で検討したが, *chata* は終脳では検出できず, *gad1b* の終脳腹側での発現にも明瞭な変化が見られなかった (Fig. 19H, I).

### *gbx2* 機能欠損の終脳発生に及ぼす効果の検討 (qPCR による解析)

次に, *gbx2* 機能欠損の終脳形成に及ぼす効果を, やはり 24 hpf において qPCR 分析により定量的に調べた. まず転写因子遺伝子に関しては (Fig. 21A), この時期視蓋と中脳で発現する *otx2* の発現がやや低下した (0.77) (Fig. 21A). 終脳背側で発現する *emx3* の発現についてはやや上昇傾向が見られるものの有意差は見られていない (Fig. 21A). 一方, *dlx2a* と *six3b* の発現が有意に低下していた (各々0.78 倍と 0.54 倍) (Fig. 21A). *dlx2a* については WISH データとは異なっているが, この遺伝子は腹側視床, そして咽頭弓でも発現することに注意が必要である. そのほか, *pax6a*, *gbx1*, *gbx2* について発現が低下する傾向が見られた (Fig. 17A).

分泌因子遺伝子に関しては (Fig. 21B), *wnt* 遺伝子の場合, *wnt1* の発現が低下した (0.78 倍) (Fig. 21B). ただし, *wnt3* と *wnt3a* については顕著な変動は見られていない (Fig. 21B). *shha* の発現はやや低下したが (0.92 倍), 有意ではないのに対して, *fgf8a* の発現は有意に低下した (0.82 倍) (Fig. 21B). なお, *bmp2b*, *dla*, *notch1a* の発現については明らかな変動は見られな

かった (Fig.21B).

#### 終脳において *gbx2* の発現を制御する分泌因子の検討

終脳の発生は様々な分泌因子によって制御されることが明らかとなっている(Takahashi and Liu, 2006). そこで, Wnt, HH, BMP, Nodal, FGF, Notch, そして RA の各シグナルの伝達を阻害または活性化する薬剤で胚を処理し, *gbx2* 及び他の終脳形成遺伝子の終脳での発現におけるこれらのシグナルの役割を検討した.

まず, 終脳における *gbx2* の発現制御に関わる各種分泌因子の関与を検討するため, ゼブラフィッシュ胚の飼育液に, 14 hpf の時期において, 各種シグナルの阻害剤または活性化剤を添加した上, *gbx2* の発現が開始する 18 hpf において胚を回収し, 頭部における *gbx2* の発現を WISH により検討した. なお, この時期の頭部において, *gbx2* は終脳脳室側の他, MHB と内耳原基 (耳胞) で発現する.

まず, Wnt シグナルを活性化する BIO で処理した胚では, *gbx2* の発現は終脳特異的に抑制されており, 耳胞での発現は影響を受けず, MHB での発現はむしろ亢進した (Fig. 22B). 意外なことに, Wnt シグナル阻害剤である IWR-1 の処理では *gbx2* の発現に異常は見られていない. FGF シグナルが SU5402 によって阻害された胚の場合, *gbx2* の発現は終脳と MHB において消失するが, 耳胞では影響を受けなかった (Fig. 22B). RA で処理した胚では, *gbx2* の発現は終脳特異的に抑制され, MHB, 耳胞での発現は影響を受けなかった (Fig. 22B).

一方, HH, BMP, Nodal, 及び Notch 各シグナルの阻害剤 (各々 cyclopamine, dorsomorphin, SB431542, DAPT) の処理胚では, いずれの領域でも *gbx2* の発現は影響されなかった (Fig. 22B). なお, これらの化学薬剤の有効性は, ゼブラフィッシュ発生に対する形態学的効果によって確認した(data not shown, Takahashi & Yamasu), さらに, これらの薬剤処理の効果については, 各シグナルの下流にある遺伝子(*axin2* (Yan et al., 2001; Jho et al., 2002), *etv5b* (Raible et al., 2001), *pax2a* (Parvin et al., 2008), *ptch2*, (Motoyama et al., 1998), (Tsarovina et al., 2004), *ta (no tail)* (Bennett et al., 2007), *ebf2* (Pozzoli et al., 2001))の発現への効果により確認している (Fig. 22C).

上述したように, BIO 処理で見られた *gbx2* の発現異常と対照的に Wnt シグナル阻害剤である IWR-1 の処理では異常は見られていない, その原因として Wnt シグナルの欠損の効果を他のシグナルが補っていることが考えられる. そこで, Wnt 阻害剤の IWR-1 を他のシグナル (HH, BMP, Nodal 及び Notch)の阻害剤(cyclopamine, dorsomorphin, SB431542, DAPT)と組み合わせ胚を処理し, *gbx2* の頭部での発現を検討したいが, 終脳, MHB, 耳胞での発現のいずれについても異常は見られなかった (Fig.22D).

以上のように, BIO による Wnt シグナルの活性化, SU5402 による FGF シグナルの抑制, RA での処理より *gbx2* の発現が終脳で顕著に阻害された. そこで, 実際にこれらのシグナルが働く時期を絞り込むために, 14-18 hpf の時期内の異なる時期において薬剤処理を行い, 18 hpf で *gbx2* の発現を調べた (Fig. 22A). まず, BIO 処理の場合, 完全な *gbx2* の抑制には 14-18 hpf の期間全体で行う必要があり, それより短くなるにつれて抑制効果は弱くなり, 特に感受性の高い時期は見られなかった (Fig. 23A). 従って, *gbx2* の終脳での発現は, 14-18 hpf の 4 時間を通じて Wnt シグナルの制御下にあると言える. SU5402 処理の場合も, *gbx2* 発現への抑制効果は処理時間が短いほど弱く, 特に重要な時期は見られなかった (Fig. 23B). 従って, FGF シグナルは *gbx2* の終脳での発現にとって 14-18 hpf の 4 時間を通して必要と言える.

RA 処理についても, 完全な *gbx2* の抑制には 14-18 hpf の期間全体で行う必要があり, それより短くなるにつれて抑制効果は弱くなり, 特に感受性の高い時期は見られなかった (Fig.

23C). 従って, *gbx2* の終脳での発現は, 14–18 hpf の 4 時間を通じて RA シグナルの制御下にあると言える.

#### *gbx2* の発現誘導が視床の発生に及ぼす効果 (WISH による解析)

引きつづき, 視床の発生における *gbx2* の役割を知るために, *Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)* 魚と野生型魚を交配して得られた子孫胚, を視床で *gbx2* が発現する直前である 34 hpf で加温処理し (37°C, 30 分間), *gbx2* の過剰発現を行った. 2 時間後の 36 hpf において, 視床形成に関与する制御遺伝子の発現を WISH によって染色した後, Genotyping によってこれら染色胚が *hsp-gbx2* 遺伝子を保有するかを確認した.

まず, 転写調節因子をコードする視床領域マーカー遺伝子 (*irx1b*, *dbx1a*, *olig2*) の発現に対する *gbx2* 過剰発現の効果を検討した. *irx1b* は *otx2* 遺伝子と共に *zli* を決定し, 視床形成にも関わる遺伝子である (Scholpp et al., 2007; Scholpp et al., 2010). *dbx1a* も視床の形成に重要な役割を果たす (Fjose et al., 1994; Scholpp et al., 2010). *olig2* は腹側視床の形成を制御し, 視床皮質投射軸索の投射でも重要である (Ono et al., 2014). 視床と後脳における *irx1b* の発現はいずれも *gbx2* 誘導胚において若干低下した (Fig. 24A), 視床, 中脳, 後脳での *dbx1a* の発現もすべて顕著に抑制された (Fig. 24B). 視床と腹側視床での *olig2* については, 特に視床での発現が *gbx2* 誘導により強く抑制された (Fig. 23C).

これら *gbx2* 誘導胚での遺伝子発現については, ImageJ に画像を取り込み, 各画像上で発現領域を決定した上, 発現領域の面積と発現レベルを各々数値化した. この半定量的解析の結果, 視床における *irx1b* の発現領域の面積はやはり有意に減少し (0.65 倍), 発現レベルも低下した (0.80 倍) (Fig. 24A), 一方, *dbx1a* の視床での発現領域についても面積が縮小し (0.57 倍), 発現レベルも低下した (0.65 倍) (Fig. 24B). *olig2* の視床での発現についても, *gbx2* 誘導により領域面積が減少し (0.64 倍), 発現レベルも低下した (0.72 倍) (Fig. 24C). 従って, 上述した染色像での傾向が半定量的に確認された.

#### *gbx2* の発現誘導が視床の発生に及ぼす効果 (qPCR による定量的解析)

次に, 視床形成遺伝子の発現に対する *gbx2* 過剰発現の効果を定量的に検討するため, *Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)* 魚と野生型魚を交配して得られた子孫胚を, 上述したように終脳で *gbx2* が発現する直前である 34 hpf に加温処理して *gbx2* の過剰発現を行った上, 36 hpf において胚から RNA を抽出し, 各種脳形成遺伝子の発現を Sibling 胚と Tg 胚各々について qPCR により測定することで Tg 胚での変動を検討した. その結果, 転写制御因子遺伝子である *irx1b*, *dbx1a*, *olig2* の発現はいずれも *gbx2* により顕著に抑制された (各々 0.31, 0.25 倍, 0.41 倍) (Fig. 25). これらの結果は基本的には WISH による結果と対応する. *Zli* により誘導されて腹側視床発現する *dlx2a* (Akimenko et al., 1994) と *lhx5* (Toyama et al., 1995) についても発現は *gbx2* により顕著に抑制された (各々 0.34, 0.30 倍).

#### *gbx2* 機能欠損の視床発生に及ぼす効果の検討 (WISH による解析)

以上の gain-of-function 実験と平行して, *gbx2* の機能欠損変異体 (*gbx2<sup>ih253</sup>*) を用いた loss-of-function 実験により視床形成での *gbx2* の役割の検討をおこなった. まず, *gbx2* 変異ヘテロ接合体同士を交配し, 得られた子孫胚を, 視床で *gbx2* の発現が始まった後の 48 hpf と 72 hpf の時期に固定した上, WISH により視床形成遺伝子の発現を検討した. さらに, 染色胚各々について PCR を用いた Genotyping により *gbx2* 変異についての genotype を決定した (Fig. 28).

その結果, 48 hpf 胚 WISH の染色像で, 視床と後脳における *irx1b* についてわずかながら低下が見られた (Fig. 26), ImageJ に画像を取り込み, 各画像上で発現領域を決定した上, 発現



領域の面積，発現レベル各々を数値化した結果，視床における *irx1b* の発現について，領域の面積には有意差が見られないが，発現レベルについて若干の低下が見られた（0.85 倍）（Fig. 26）.

72 hpf 胚についても脳形成遺伝子の発現を WISH で検討したが，視床と後脳における *irx1b* の発現，視床と中脳での *dbx1a* の発現，視床と腹側視床での *olig2* の発現のいずれについても，ホモ変異体において明瞭な異常はみられなかった（Fig. 27）.

## 考察

### 脊椎動物における *gbx* サブファミリー-homeobox 遺伝子

*gbx* 遺伝子は当初、PCR で同定された homeobox 遺伝子であり、脊椎動物では様々な種で広く同定されている。これまで、*gbx1* についてはヒト(Matsui et al., 1993)、マウス(Murtha et al., 1991; Waters et al., 2003)、ニワトリ(Obinata et al., 2001)、ゼブラフィッシュ(Kikuta et al., 2003; Rhinn et al., 2003)で同定、研究されており、*gbx2* に関しては、ヒト(Matsui et al., 1993)、マウス(Murtha et al., 1991)、ニワトリ(Fainsod & Grenbaum, 1989)、*Xenopus* (von Bubnoff et al., 1996)、ゼブラフィッシュ(Kikuta et al., 2003; Rhinn et al., 2013; Su & Meng, 2002)などで研究されている。

*gbx2* の胚発生における働きについては、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュで、詳細な Gain/Loss-of-function 実験が行われ、MHB 及び峡部の発生における役割について研究が進んでいる。四足類の場合、*gbx2* は原腸形成初期から後方神経外胚葉で広く発現し、*otx2* の抑制的相互作用を介して MHB の位置の決定を行うことが明らかとなっている(Broccoli et al., 1999; Katahira et al., 2000; Millet et al., 1999)。その一方で、*gbx1* は、マウスの場合、発生初期の E7.75 に後脳に発現し、その後、後脳 r2-7、脊椎、腹側終脳に発現が見られ、MHB では発現せず、峡部形成には関与しないと考えられている(Rhinn et al., 2004)。

魚類の場合、ゼブラフィッシュ *gbx2* の機能解析のため、ノックダウン実験や強制発現実験などが行われており(Kikuta et al., 2003)、*gbx2* が前脳及び中脳の形成を抑制すること、マウスやニワトリと同様 MHB・峡部の形成に関わることがわかっている。しかし、四足類の場合とは異なり、*gbx1* はすでに原腸形成初期に後方神経外胚葉で広く発現しており、原腸形成後期以降に後脳前方で発現する *gbx2* とともに峡部形成において働くと考えられる。すなわち、*gbx1* は主として初期での MHB の位置決定、*gbx2* は MHB の維持とその後の峡部形成に必要とされた(Kikuta et al., 2003; Rhinn et al., 2003)。ゼブラフィッシュ胚での mRNA 強制発現では、*gbx1* と *gbx2* はいずれも前方脳領域の抑制というよく似た効果を示しており(Kikuta et al., 2003)、両者の脳形成における機能の違いは、発現する発生時期と領域の違いに依ると考えられる。ただし、峡部が決定すると考えられる原腸形成後期には両 *gbx* 遺伝子はいずれも後方神経板前方で発現しており、近年行われた *gbx1* と *gbx2* の変異体解析でも、これらの *gbx* 遺伝子はいずれも峡部形成において重複した機能を持つことが確認されている(Su et al., 2014)。従って、ゼブラフィッシュの *gbx1* と *gbx2* は、峡部形成に関し、時間的分業はあるものの、機能的に相補う関係にあると考えられる。

原腸形成が終了した後の脊椎動物胚でも *gbx1* と *gbx2* は引きつづき、様々な脳原基内領域で発現しており、各脳領域、そして神経系の発生制御に関与することが予想されている。前述したように、マウス *gbx1* は、後脳では r1 よりも後方で発現するほか、眼胞や MGE で発現する(Waters et al., 2003; Rhinn et al., 2004)。マウス胚の前脳基底部では、*lhx7* と *gbx1* がコリン作動系ニューロンの発生に重要とされる(Asbreuk et al., 2002)。また、*gbx1* 欠損マウスは、大規模な運動能力の欠損、脊髄内の固有受容感覚回路の異常、そして腹側の *ISL1*<sup>+</sup>運動ニューロンの減少などの表現型を示すことから(Buckley et al., 2013)、マウス *gbx1* は脊髄での神経ネットワークの形成にも関わると考えられている。一方、マウス *gbx2* は視床及び大脳基底核で発現することが報告され(Bulfone et al., 1993)、遺伝子破壊実験などにより、*gbx2* は視床の発生(Li et al., 2012)、そして前脳基底部でのコリン作動性ニューロンの形成に関与することが示されている(Chen et al., 2010)。

原腸形成終了以降のゼブラフィッシュの *gbx1* の発現部位もマウス *gbx1* のものと類似して

おり、後脳の r2, 3 と r5 で発現するほか、36 hpf の時期に外套下部と考えられる脳領域(basal telencephalon)で発現が観察されている(Rhinn et al., 2003). ゼブラフィッシュ *gbx2* もやはりマウス胚と同様に視床で発現が観察されており(Kikuta et al., 2003), そして終脳で発現するという報告もある(Su & Meng, 2002), さらに、*Tg(gbx2:egfp)* 胚における発生中の脳原基での *gbx2* 発現細胞の動態観察では、r1, 視床のみならず、終脳においても内在 *gbx2* の発現も EGFP 蛍光により再現された(Islam et al, 2006). しかし、これらゼブラフィッシュ *gbx* 遺伝子に関する発現の詳細は不明であり、さらに、前脳形成における *gbx* サブファミリー遺伝子の役割については全く調べられていない。

本研究では、体節形成期以降のゼブラフィッシュ胚脳原基における *gbx1* と *gbx2* の発現を詳細に検討し、さらに、過剰発現誘導系および機能欠損突然変異の利用により、*gbx2* の前脳形成における役割を検討した。また、*gbx2* の発現を指標に、終脳形成を制御する分泌シグナルの検討も行った。

### ゼブラフィッシュ胚での脳発生における *gbx* の発現

上述したように、ゼブラフィッシュ胚の MHB・峡部領域では、原腸形成期において、時期にずれがあるにせよ、*gbx1* と *gbx2* のいずれもが発現する。本研究ではまず、体節形成期以降、咽頭胚期までのゼブラフィッシュ胚において (*gbx1* は 16 hpf-48 hpf, *gbx2* は 16 hpf-48 hpf), *gbx1* と *gbx2* の頭部での発現を詳細に比較した。

後脳の場合、調べた全ての発生段階において、*gbx1* の発現は r1 より後方の菱脳節(r2, r3, r5-7)で観察されたのに対し、*gbx2* の発現は r1 の前方領域に限定されていた。中脳ではいずれの遺伝子についても発現が見られていない。一方、前脳の場合、*gbx1* の発現は 36 hpf に終脳前端で出現し、48 hpf でも同様であった。以前に、36 hpf の胚の終脳において同様の部位で *gbx1* の発現が観察されており、basal telencephalon とされたが(Rhinn et al, 2004), これに対応しており、この部位はゼブラフィッシュの MGE に相当する(Manoli & Driever, 2004). 一方、*gbx2* の発現は体節形成後期(18~24 hpf)に終脳で一過的に検出され、36 hpf 以降は視床原基で観察された。視床での同様の発現がやはり以前に観察されており(Kikuta et al., 2003), これに対応する。従って、前脳に注目すると、*gbx2* が体節形成後期に終脳の形成に関わり、咽頭胚期になると、視床形成を制御するのに対し、*gbx1* は MGE の発生に関与することが示唆された。なお、これらの遺伝子の発現領域は、前脳の発生を通じて異なっており、峡部形成の場合とは対照的に、機能的な重複はないと考えられる。咽頭胚における *gbx2* の視床での発現と *gbx1* の MGE での発現はマウスの場合と対応するが(Manoli & Driever, 2004), マウスの場合と異なり(Waters et al., 2003), *gbx2* の MGE での発現は見られていない。

2色 FISH を行った胚の共焦点レーザー顕微鏡による検討では、体節形成後期における *gbx2* の終脳での発現は、終脳の腹側から背側にかけての両側部の狭い領域であることを明らかにした。加えて、終脳におけるこの *gbx2* の発現は、終脳形成に関わる他の転写因子(*dlx2a, emx3, pax6a, six3b, shha*)の発現とは密接であった。

終脳腹側の外套下部において、*gbx2* は、*dlx2a* が発現する脳室側領域において特異的に発現される(Mueller et al., 2008). 脳室側領域における *gbx2* 発現は、さらに *emx3* 発現する終脳背側の外套領域に広がる。従って、*gbx2* は外套および外套下部を含む終脳全体の脳室側領域で発現されるといえる。実際、*gbx2* のこうした発現は、終脳の背側、中側、および下位側終脳背側の *emx3*, 終脳中央部の *pax6a*, および終脳腹側の *six3b* の発現とは接近し、さらに部分的に重複している。その一方で、これらの終脳形成遺伝子の発現は *gbx2* の発現としばしば相補的であることから、相互に発現を抑制している可能性がある。

哺乳動物では、MGE は *Dlx2, Lhx6/7*, および *Nkx2.1* の発現によってマークされ、LGE は、

E13.5 前後に *Pax6* を特異的に発現する(Hernández-Miranda et al., 2010). マウスおよびゼブラフィッシュ胚の前脳では、神経発生に関与する遺伝子について非常に類似の発現パターンが知られている(Wullmann, 2009). 実際、ゼブラフィッシュ受精後 2~3 日(dpf)胚においても、*dlx2a* そして *nkx2.1* (旧称 *nk2.1b*) が外套下部に発現し、*lhx6* そして *lhx8a* (*lhx7*)は、哺乳類 MGE の相同領域である背側外套下部の腹側小領域に発現するが、哺乳類 LGE の相同領域である背側小領域では発現しない(Karlstrom et al., 2003; Mueller et al., 2008). *pax6a* は、外套と外套下部境界に対応する終脳の間で発現された(Varga et al., 2001). *eomesa* (*tbr2*)は、ゼブラフィッシュの外套全体および腹側外套下部の一部領域で発現しており、この発現は哺乳動物における既知の中隔での発現と類似する(Mueller et al., 2008).

以上の観察は、*gbx2* と他の前脳形成遺伝子の間には、上述してように抑制的な相互作用があり、これにより前脳の領域化、そして結果的に終脳が確立することを示唆している. なお、後述するように、本研究において、実際に *gbx2* は他の前脳形成遺伝子の発現に抑制的であることが確認されている.

今回の研究ではさらに、*Tg(gbx2:egfp)*胚を使用することで、発生中の脳原基における *gbx2* 発現細胞の動態の観察に成功した. この Tg 魚胚では、r1 および視床における内在 *gbx2* の発現が EGFP 蛍光により再現される(Islam et al, 2006). 以前の研究で、r1 領域と耳胞では GFP の蛍光が 4-somite 期(11.5 hpf)から 28 hpf まで観察されていたが、今回、17 hpf から咽頭胚後期(48 hpf)まで継続的に同じ領域で観察された. また、28 hpf と 36 hpf において、視床での発現も見られていた.

今回、Tg 胚を用いた Time-laps 観察により、体節形成後期では脳の前方領域で蛍光が見出された. 背側から見ると、この GFP 発現は、18 hpf で出現し、20 hpf から 23 hpf でピークとなった後、徐々に低下した. つまり、この GFP 発現は体節形成後期において一過的に観察される. EGFP の蛍光発現は mRNA の出現より遅れること、EGFP は一般に安定と考えられることを考慮すると、発現のピークはこれより早いと考えられる. ただし、側方から見ると、前方での蛍光発現領域は終脳ではなく、むしろ前脳の腹側領域であり、*gbx2* の終脳発現を再現することが出来なかった. この蛍光発現が実際に内在 *gbx2* 発現をどの程度反映するのかについてはさらなる検討が必要と考えられる. 一方、明瞭な視床での発現は 26 hpf から 48 hpf まで観察されていた. 従って、この Tg 魚は視床の *gbx2* の発現細胞の動態を追跡する上で適しており、今後さらなる活用が期待できる. なお、上述したように EGFP の蛍光発現は mRNA の出現より遅れることから、遺伝子発現の開始は実際にはさらに発生早期にさかのぼると予想される.

### *gbx2* 遺伝子の一過的発現誘導系の有効性の確認

*Tg(hsp70l:gbx2)*系統魚を用いた *gbx2* の加温誘導実験系により、原腸形成終了期において *gbx2* の過剰発現は峡部形成の欠損を引き起こすことが示された. この系において、野生型胚は加温処理後もほぼ正常であることから、加温処理操作そのものが異常の原因となる可能性は低く、観察された峡部異常は誘導された *gbx2* 遺伝子の作用に依るといえる(Nakayama et al., 2013). 本研究ではこの Tg 系統魚を、前脳の発生における *gbx2* の役割を知るために使用した.

まず、この Tg 胚で、原腸形成初期から咽頭胚期にかけて *gbx2* の発現誘導が可能かについて検討を行った. その結果、調べたすべての発生時期 (Shield 期, Bud 期, 6 体節期, 18 hpf, 24 hpf, 36 hpf, 48 hpf など) で、大幅で広範な *gbx2* の発現誘導が qPCR (62-309 倍) 及び WISH により Tg 胚のみで観察された. 従って、この *gbx2* 遺伝子発現誘導系の有効性が確認された. なお、内在の *gbx2* については若干誘導されるが、内在の *gbx2* の発現変化は *gbx2* 誘導全体 (62-309 倍) の一部にすぎず、内在の *gbx2* の発現変化は無視できると考えられる. ま

た、この加温処理により Bud 期で誘導された *gbx2* mRNA はその後急激に発現レベルが低下することから、強制発現は一過的と考えられる。ただし、タンパク質レベルでの *gbx2* の安定性は確認できておらず、加温誘導による過剰発現の効果の解釈において留意する必要がある。

#### *gbx2* の過剰発現が体節形成期の終脳発生に及ぼす効果の検討

終脳の発生における *gbx2* の役割を知るために、本研究では、終脳での *gbx2* の発現(18 hpf)に先だつ 16 hpf において、*Tg(hsp70l:gbx2)* 胚の加温処理により *gbx2* の過剰発現を行った上、18 hpf において、まず転写因子をコードする前脳形成遺伝子(*otx2, emx3, dlx2a, six3b*)の発現を WISH および qPCR により検討した。まず、視蓋前域と中脳における *otx2* の発現領域が、*gbx2* 誘導胚で若干縮小したが、原腸形成終了期で以前に観察された抑制効果に比べると比較的弱い(Nakayama et al., 2013)、以前の観察でも *gbx2* による *otx2* 発現の抑制効果は体節形成期では低下することが示されている。なお、qPCR でも *gbx2* による *otx2* の抑制が観察された (Fig. 15A)。従って、今回の結果は以前の観察を再現したといえる(Nakayama et al., 2013; Nakayama et al., 2017)。終脳での *emx3* については、背側では大きな発現異常がないのに対し、腹側領域で弱い発現低下が見られており、qPCR でも抑制が観察された。*dlx2a* の発現については、外套下部で *dlx2a* の発現が強く抑制されたのに対し、腹側視床では発現低下は見られるものの軽微であった。qPCR の結果は WISH の結果とは対照的で、*dlx2a* の発現は *gbx2* によって上昇したが、これについては *dlx2a* が終脳以外に腹側視床や咽頭弓で強く発現しているために終脳での発現変化が隠れた可能性がある。終脳腹側と視床下部、そして眼胞での *six3b* の発現はすべて *gbx2* の過剰発現により顕著に低下しており、この抑制は qPCR でも観察された。以上のように、*gbx2* は前脳形成に関わる転写因子遺伝子の発現に対して抑制的であり、特に外套下部への効果が顕著といえる。*gbx2* はこれらの遺伝子の発現制御を介して終脳部域化、特に大脳基底核の形成に関与すると推定される。

これらの転写因子遺伝子に加え、qPCR では *pax6a* と *gbx1/gbx2* についても *gbx2* 誘導胚での発現を検討した。まず、*pax6a* の発現については *gbx2* の過剰発現に応答していないが、この遺伝子も前脳とは別に脊髄でも広く発現していることに起因するかもしれない。WISH での解析が必要であろう。*gbx1* の発現も *gbx2* により抑制されているが、実際、*gbx2* が峡部で発現する時期以降、後脳前端において *gbx1* の発現は低下する。この原因の 1 つが、*gbx2* による抑制かもしれない。

次に、脳の発生に関与する分泌因子遺伝子(*bmp2b, wnt1, wnt3a, shha, fgf8a, dla, notch1a*)の発現に対する *gbx2* 過剰発現の効果を WISH と qPCR で検討した。WISH の結果、一般的には背側神経管の形成を行う *bmp2b, wnt1* と *wnt3a* の発現が *gbx2* 誘導により抑制される一方、視床下部や終脳腹側で発現し(Miyake et al., 2017; Carlin et al., 2012)、終脳腹側の形成を誘導する *shha* が逆に活性化された。終脳前方における *fgf8a* (Shanmugalingam et al., 2000)の発現はほとんど影響を受けていない。qPCR による定量的解析では、WISH の結果とは対照的に *bmp2b* は *gbx2* によって活性化されている。一方で、WISH と同様、*wnt1* と *wnt3a* の発現低下が確認され、*shha* の発現上昇と *fgf8a* の非応答も同様に見られた。なお、他の Wnt 遺伝子とは異なり、*wnt3* がほとんど影響を受けなかった。*bmp2b* の発現制御に関する食い違いについても他の領域での発現を考慮する必要がある。*bmp2b* は胚全域で発現しており、qPCR の結果は脳での発現変化を反映していないと考えられる。

以上より、*gbx2* は神経管背側形成シグナル(BMP, Wnt)を基本的には抑制する一方で腹側形成シグナル(HH)を活性化すると考えられる。この作用は、*gbx2* が終脳腹側形成遺伝子を抑制することとは一見矛盾しており、その整合性については後ほど議論する。なお、興味深いことに、*gbx2* の過剰発現により、*dla* と *notch1a* の発現が活性化された。同様の *gbx2* 過剰発現

が proneural 遺伝子の発現を活性化することが所属研究室で観察されており (中山, 未発表), 今回の結果は, *gbx2* は脳原基のパターニングに加えて神経発生へも関与することを示唆したと考える.

本研究では, *Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)* 魚による *gbx2* 発現誘導実験の結果を異なるアプローチで確認するために, 1 細胞期の野生型胚に野生型 *gbx2* と *ERT2* を繋いだ人工遺伝子 *gbx2-ERT2* の mRNA を注入し, 終脳で *gbx2* が発現する直前である 16 hpf に Tamoxifen 処理により Gbx2 タンパク質の活性化を行った上, 18 hpf において, 前脳形成に関与する制御遺伝子の発現を WISH によって検討した. 結果として, 外套下部と腹側終脳と腹側視床での *dlx2a* の発現が強く抑制され, 外套下部や視床下部での *six3b* の発現はすべて *gbx2* の過剰発現により顕著に低下したが, その一方で, *shha* の発現上昇が見られた. これらの結果は, *Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)* 魚による *gbx2* 発現誘導実験の WISH 及び qPCR 結果は *gbx2-ERT2* の mRNA を注入胚による *gbx2* 発現誘導実験をほぼ再現したと言える.

さらに, 活性化型 Gbx2 遺伝子(*vp-gbx2*)(Nakayama et al., 2017)と *ERT2* を繋いだ人工遺伝子 *vp-gbx2-ERT2* の mRNA を卵に顕微注入し, 18 hpf において, 前脳形成に関与する制御遺伝子の発現を検討した. Gbx2 は基本的に転写抑制因子と考えられており, 転写活性化ドメイン VP16 をもつ *vp-gbx2* 産物 VP-Gbx2 は dominant-negative に *gbx2* の機能を抑制するとされる (Nakayama et al., 2017). この結果, 外套下部での *dlx2a* の発現, 外套下部と視床下部での *six3b* の発現の変動はいずれも軽微であり, *hsp-gbx2* の誘導効果とは対照的であった. 一方で, *shha* の発現は *vp-gbx2* によって顕著抑制された. このように, VP-Gbx2 の効果は上述した Gbx2 の効果とは基本的に逆であり, その dominion-negative 作用から予想されるものである.

以上のように, *gbx2* は前脳形成に関わる転写因子遺伝子の発現に対して抑制的であり, 特に外套下部での効果が顕著といえる. *gbx2* はこれらの遺伝子の発現制御を介して終脳部域化, ときに大脳基底核に相当する外套下部の形成に関与すると推定される.

### *gbx2* 変異体における終脳発生の異常

以上の gain-of-function 実験と平行して, 本研究では *gbx2* の機能欠損変異体を用いた loss-of-function 実験を行った. この際には, TILLING 法により *gbx2* の Homobox より上流に塩基置換が導入され, stop コドンが生じた変異体魚(*gbx2<sup>th253</sup>*)を用いた(Su et al., 2014). 所属研究室では, この *gbx2* 変異体魚(*gbx2<sup>th253</sup>*)の cDNA により合成された *gbx2<sup>th253</sup>* mRNA が野生型 *gbx2* mRNA と異なり, 発生異常を誘発しないことを見ておりこの変異は完全機能欠損変異, すなわち Null 変異と考えられる (鹿毛, 2015). 本研究では, この *gbx2* 変異体魚(*gbx2<sup>th253</sup>*)のヘテロ接合体(*gbx2<sup>+/th253</sup>*)同士を交配し, 得られた子孫胚において, WISH により終脳形成遺伝子の発現を検討した.

まず, 24 hpf において, 外套での *emx3* 発現が腹側へ拡大しており, 外套下部での *dlx2a* の発現も増大した (Fig. 19AB). しかし, *six3b*, *nkx2.1* 及び *otx2* については発現に明瞭な異常は見られず, 48 hpf における前脳神経分化マーカー遺伝子 *lhx5*, *lhx6*, *otpb*, *nkx2.1* の発現についても発現の異常を見られていない. また, 三叉神経節でのコリン作動性ニューロンマーカー *chata* の発現を 72 hpf で, 終脳における GABA 作動性ニューロンマーカー *gad1b* の発現を 48 hpf で検討したが, *chata* は終脳では検出できず, *gad1b* の終脳腹側での発現が見られたが, これらのいずれについても明瞭な発現異常は見られていない.

以上のように, *gbx2* の機能欠損は 24 hpf において, *emx3*, *dlx2a* の外套下部の発現のみが影響された. *gbx2* の機能欠損胚での *emx3* と *dlx2a* の発現上昇は *gbx2* 誘導で見られた効果と逆あり, *gbx2* がこれらの終脳形成遺伝子の発現制御抑制に働くことをさらに支持している. しかし, *gbx2* 変異体での終脳形成遺伝子の発現異常は *gbx2* の活性化効果に比べて比較的軽

微であった。また、*six3b*, *nkx2.1* 及び *otx2* については発現に異常がなく、これらのことは、終脳発生における *gbx2* の役割が不可欠はいえず、他の遺伝子作用をさらに調節、修飾するものであることを示唆する。また、48 hpf 以降の終脳には変異体で異常が見られないことから、*gbx2* 欠損に起因する脳形成異常は必ずしも不可逆的ではなく、その後の他の遺伝子の働きにより回復する可能性が想定される。ただし、今回後期胚の終脳の異常を見落としている可能性もあり、異なるマーカーを用いるなど、さらなる検討が必要であろう。

#### 終脳において *gbx2* の発現を制御する分泌因子の検討

終脳の発生の制御には様々な分泌因子が関与することが明らかとなっている。外套（大脳皮質）の発生の場合、FGF8 は前後パターンニングを制御し、BMP および Wnt シグナルは内外側軸に沿ったパターンニングを制御する(Takahashi and Liu, 2006; Aboitiz and Montiel, 2007)。特にマウスの場合、cortical hem から分泌される Wnt 分子は大脳皮質を後方化し、前方神経隆起で発現する Fgf8 および Wnt アンタゴニストと共に、皮質の前後極性の確立に貢献する(Caronia-Brown et al., 2014; Grove and Fukuchi-Shimogori, 2003)。さらに、マウスにおいて、連続的に働く Wnt シグナルと FGF シグナルが、背側終脳の特異化および分化に必要であることが示された(Gunhaga et al., 2003)。同様に、Shh と RA は、終脳の腹側および側方のパターンニングを調節する(Takahashi and Liu, 2006)。実際、マウスにおいて、*Gli3* は、HH シグナルの働く背側の範囲を限定するだけでなく、拮抗的に作用する Fgf シグナルセンターと Bmp/Wnt シグナルセンターを設定することによって、終脳の背側と腹側の特異化を調節する(Kuschel et al., 2003)。

本研究では、終脳形成に関連する分泌シグナルの *gbx2* 発現における役割を明らかにするため、終脳において *gbx2* の発現が始まる 18 hpf に先立つ発生時期(14-18 hpf)のゼブラフィッシュ胚において、様々なシグナル経路(Wnt, HH, BMP, Nodal, FGF, Notch, RA)を薬剤処理で活性化、あるいは阻害し、終脳における *gbx2* の発現を検討した。これらの薬剤処理の効果については、各シグナルの下流にある遺伝子の発現への効果により確認している。

まず、Wnt シグナルを活性化する BIO で処理した胚では、*gbx2* の発現は終脳のみで抑制されたが、おもしろいことに耳胞では影響を受けておらず、峡部での発現のみは活性化されている。従って、*gbx2* 発現の Wnt への応答能も領域により異なっており、*gbx2* の発現は終脳でのみ Wnt シグナルで抑制されることになる。しかし意外なことに、終脳での *gbx2* の発現は Wnt シグナル阻害剤(IWR-1)では活性化されるわけではなく、ほとんど影響されていない。これについては、終脳での *gbx2* の発現抑制には Wnt シグナルとは別のシグナルも関与しており、これらの機能が重複している可能性がある。実際、今回調べた他の多くのシグナル(HH, BMP, Nodal, Notch)についても阻害の効果が見られていないが、この中に Wnt シグナルと並行して *gbx2* の終脳での発現抑制に働くシグナルが存在する可能性があるため、本研究では Wnt シグナルの阻害剤(IWR-1)、そして別経路シグナルの阻害剤の組み合わせで処理実験を行ったが、終脳での *gbx2* の発現に異常は見られなかった。なお、Wnt シグナル活性化による MHB での *gbx2* 発現の上昇は、後脳前端における *gbx2* の発現が、その前方の中脳後端で発現する *wnt1* で維持されている可能性を示唆しており、興味深い。

なお、ゼブラフィッシュ胚において、*wnt7ba* と *wnt8b* が 24 hpf に終脳で発現する。その後、*wnt7ba* は外套で発現し、*wnt8b* は外套下部に発現する。加えて終脳のすぐ後方で、*wnt1*, *wnt8b*, そしてその他いくつかの *wnt* 遺伝子が視床上部で発現する(Duncan et al., 2015)。従って、終脳や視床上部から分泌される Wnt 分子が *gbx2* の発現を抑制的に調節する可能性がある。

調べたシグナル阻害剤の中では唯一、FGF シグナル阻害剤で処理した胚において *gbx2* の発現が終脳と MHB で抑制された。なお、耳胞での *gbx2* の発現はほとんど影響を受けておらず、*gbx2* 発現の FGF 依存性にも領域特異性があるといえる。峡部形成が *fgf8a* を必要とすること

はよく知られており(Liu et al., 2001), 実際, *gbx2* の MHB での発現は *fgf8a* の変異体胚では消失する(Rhinn et al., 2003). 今回観察された MHB での *gbx2* 発現の低下は予想通りであり, 用いた阻害剤(SU5402)の有効性をさらに保証シタイル. 今回 SU5402 処理胚で観察された終脳での *gbx2* 発現の低下は, *gbx2* の終脳での発現も峽部同様に FGF シグナルを必要とすることを明らかにしたものである. なお, *fgf8a* は終脳前端で発現し, 終脳のパターンニングに関わることが知られており(Shinya et al., 2001), この *fgf8a* が *gbx2* の発現維持に関わる可能性があると思われる. ただし, *gbx2* の発現がむしろ *fgf8a* の発現部位から離れている点については, この発現維持作用が Fgf8a の拡散に依るのか, 他の因子を介しては間接的なものであるにかは現時点では特定できない.

本研究では, RA 処理も *gbx2* の発現を抑制した. この物質は, *gbx2* 発現を抑制することで外套下部の発生に関与している可能性があると考えられる. *gbx2* が終脳に発現する時期に, RA 合成酵素遺伝子である *aldh1a2* (*raldh2*)(Begemann et al., 2001)が背側網膜において発現しており, これが *gbx2* での終脳発現制御に関わるのかもかもしれない.

なお, 前述したように, 今回用いた他のシグナル(HH, BMP, Nodal, Notch)阻害剤の処理では, 終脳での *gbx2* の発現に異常は見られていない. これらの化学物質の有効性は, ゼブラフィッシュ発生に対する形態学的効果やシグナルの下流遺伝子の発現検討によって確認されている. それにもかかわらず終脳での *gbx2* の発現に影響しないという今回の結果については, 実際にこれらのシグナルが終脳での *gbx2* 発現に関与しない可能性, すでに述べたように, シグナルの機能重複により阻害効果が見られない可能性が想定される. また, FGF シグナルの阻害は, 初期段階で行った場合には外套下部の発生異常を引き起こすが, 10 somite 期 (14 hpf に相当する 10 体節期) での投与では外套下部に影響は見られておらず(Shinya et al., 2001), 今回の薬剤処理条件は終脳発生に顕著に影響を及ぼすには不十分であった可能性がある. *gbx2* の終脳での発現制御に関わるシグナノレについては今後さらに検討する必要がある.

終脳における *gbx2* 発現の調節において, Wnt, FGF, そして RA シグナルが実際に働く時期を知るために, 本研究では, シグナル阻害剤による処理の時間を変えた上で *gbx2* の終脳での発現に対する効果を検討した. BIO による完全な *gbx2* の抑制については 14-18 hpf の期間全体での処理が必要であったことから, この 4 時間を通じて *gbx2* の終脳での発現は Wnt シグナルの制御下にあるといえる, また, FGF 阻害剤の効果について得られた結果から, FGF シグナルもまた 14-18 hpf の期間全体で *gbx2* の終脳での発現に必要であると推定された. さらに, RA による完全な *gbx2* の抑制についても 14-18 hpf の期間全体での処理が必要であり, この 4 時間を通じて *gbx2* の終脳での発現は RA シグナルの制御下にあるといえる.

### 終脳発生における *gbx2* の役割の機構

本研究において, *gbx2* が終脳の全域にわたって脳室側で発現すること, *gbx2* の強制発現・機能活性化や機能欠損が, 終脳の中でも腹側に位置し, 後には基底核を形成するとされる外套下部の形成に異常を誘発することを示した. このことは, *gbx2* が外套下層の形成に関与することを示す. ただし, *gbx2* の活性化では外套下部の分化が妨げられ, 変異体では外套下層分化が亢進しているように思われることから, *gbx2* は外套下部の形成には抑制的といえる. ぞれにもかかわらず, 外套下部の脳室側で発現していることより, *gbx2* は外套下部形成自体を阻害するのではなく, その進行を適切に調整している可能性がある. その意味で, 前述したように, *gbx2* の作用は他の遺伝子機能の調節, 修飾といえるかもしれない.

なお, 本研究では, *gbx2* が一方で腹側形成シグナル(HH)を活性化することを示唆した. この作用は, *gbx2* が終脳腹側形成遺伝子を抑制することとは一見矛盾するが, *gbx2* はまず外套下部誘導を促進し, その一方で進行を開始した外套下部形成の進行を調整するのかもしれない.



い。

なお、*gbx2* は外套下部のみならず、外套でも脳室側で発現する。近年、*gbx2* が神経発生に関与することが示されており(Nakayama et al., 2017)、終脳においても同様に、*gbx2* が神経発生制御に関わる可能性を今後検討する必要がある。

### 視床発生における *gbx2* の役割

マウスの場合、*gbx2* は異なる視床核の神経前駆細胞において特定の発生段階で発現し、各々の前駆細胞の分化を制御すると考えられている(Li et al., 2012)。 *gbx2* 突然変異体では、視床からの軸索は減少し、その伸長は外套下部で停止していた。一方、大脳皮質からの軸索 (*gbx2* を発現しなし) は外套下部には伸長したが、間脳には進入しなかった(Hevner et al., 2002)。また、*gbx2* が視床から皮質への視床皮質投射に関与することも示された(Chatterjee et al., 2012 ; Li et al., 2012)。さらに、*gbx2* は分裂後ニューロンから神経前駆細胞にフィードバックシグナリングすることで、手綱の形成を抑制すると同時に視床ニューロンのアイデンティティを維持するためにも必要とされている(Mallika et al., 2015)。

### *gbx2* の過剰発現及び機能欠損が視床の発生に及ぼす効果の検討

ゼブラフィッシュ胚での視床発生における *gbx2* の役割を知るため、本研究では、視床で *gbx2* の発現が始まる 36 hpf に先だつ 34 hpf において、*Tg(hsp70l:gbx2)* 胚の加温処理により *gbx2* の過剰発現を行った上、36 hpf において視床形成への関与が予想される転写因子遺伝子 (*irx1b*, *dbx1a*, *olig2*) の発現を WISH によって検討した。マウス胚の場合、*Irx1* は予定視床領域に発現し、*Fez* 遺伝子とともに *zli* の位置を決定するとされており (Scholpp and Lumsden, 2010)、*gbx2* により発現は抑制される(Mallika et al., 2015)。Homeodomain タンパク質 *Dbx1* および bHLH タンパク質 *Olig2* は視床内領域で発現し、これらは逆向きの発現勾配を示す(Vue et al., 2007)。ゼブラフィッシュにおいて、*irx1b* の発現は視床と後脳で発現が見られるが(Scholpp et al., 2007)、これらの発現は、いずれの脳領域でも *gbx2* 誘導胚において抑制された。*dbx1a* の発現(Fjose et al., 1994; Scholpp et al., 2010)も視床と中脳の両方で顕著に抑制された。視床と腹側視床で発現する *olig2* の場合(Ono et al., 2014)、特に視床での発現が強く抑制された。つまり、*gbx2* は視床の形成に抑制的に作用するといえる。ただし、*gbx2* による脳形成遺伝子の発現抑制は視床には限定されておらず、広範に見られているため、*gbx2* が視床の発生に実際に関与しているかは、この結果から明らかとはいえない。

そこで、本研究ではさらに、*gbx2* の機能欠損変異体において、視床形成遺伝子の発現を検討した。その結果、40 hpf 胚の変異体胚において、*irx1b* の視床と後脳での発現が若干低下していた、しかし、72 hpf の変異体胚では、*irx1b*, *dbx1a*, および *olig2* 遺伝子の視床、そしてその他の脳領域では発現には、ほとんど異常が認められていない。

これについて、*gbx2* は、ゼブラフィッシュの場合、必ずしも視床発生に必要ではないということが1つの解釈であろう。ただし、*gbx2* が視床特異的に発現すること、そしてマウスでの知見を考慮すると、全く関与しないという可能性は低いと考えられる。考えられるのは、1) 用いた視床マーカーが不適切であり、より視床に特異的なものを用いるべきかもしれない。実際、今回用いた視床マーカーは視床のみならず、様々な脳領域で発現する。2) *gbx2* と類似の機能を持った他の遺伝子が遺伝的に補償していることも考えられる。これに関し、*gbx1* については視床での発現は見られていないため、必ずしも有力ではない。3) ただし、*gbx1* が欠損した結果、*gbx1* が誘導されて機能的に補うこともありうる。いずれにしろ、視床形成における *gbx2* の役割についてはさらなる研究が必要であろう。

## 謝辞

本研究を行うにあたり，指導教官として終始適切且つ細やかなご指導をいただいた弥益恭先生，ならびに川村哲規先生と津田佐知子先生には，大変感謝しております．また，共同実験者として実際に実験を指導して及び pCS2+gbx2-ERT2 を御供与下さった中山由紀子先輩にも心より感謝申し上げます．*gbx2* 変異体(*gbx2<sup>h253</sup>*)をご提供いただいた Fred Hutchinson がん研究センターの Cecilia Moens 博士及び Chen-Ying Su 博士にも深く感謝いたします．

## 参考文献

- Aboitiz, F., Montiel, J., 2007. Co-option of signaling mechanisms from neural induction to telencephalic patterning. *Rev. Neurosci.*, 18 (2007), pp. 311–342
- Asbreuk, C.H.J., van Schaick, H.S.A., Cox, J.J., Kromkamp, M., Smidt, M.P., Burbach, J.P.H., 2002. The homeobox genes *Lhx7* and *gbx1* are expressed in the basal forebrain cholinergic system. *Neuroscience* 109, 287–298.
- Blackshaw, S., Scholpp, S., Placzek, M., Ingraham, H., Simerly, R., Shimogori, T., 2010. Molecular pathways controlling development of thalamus and hypothalamus: from neural specification to circuit formation. *J Neurosci.* 30, 14925-14930.
- Buckley, D.M., Burroughs-Garcia, J., Lewandoski, M., Waters, S.T., 2013. Characterization of the *gbx1*<sup>-/-</sup> Mouse Mutant: A Requirement for *gbx1* in Normal Locomotion and Sensorimotor Circuit Development. *PLoS ONE* 8.
- Bulfone, A., Puellas, L., Porteus, M.H., Frohman, M.A., Martin, G.R., Rubenstein, J.L., 1993. Spatially restricted expression of *Dlx-1*, *Dlx-2 (Tes-1)*, *gbx-2*, and *Wnt-3* in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *J Neurosci.* 13, 3155-3172.
- Byrd, N.A., Meyers, E.N., 2005. Loss of *gbx2* results in neural crest cell patterning and pharyngeal arch artery defects in the mouse embryo. *Dev Biol.* 2005 Aug 1;284(1):233-45.
- Carlin, D., Sepich, D., Grover, V.K., Cooper, M.K., Solnica-Krezel, L., Inbal, A. 2012. Six3 cooperates with Hedgehog signaling to specify ventral telencephalon by promoting early expression of Foxg1a and repressing Wnt signaling. *Development.* 2012 Jul;139(14):2614-24
- Chen, L., Chatterjee, M., Li, J.Y., 2010. The mouse homeobox gene *gbx2* is required for the development of cholinergic interneurons in the striatum. *J Neurosci.* 2010 Nov 3;30(44):14824-34.
- Chatterjee, M., Li, K., Chen, L., Maisano, X., Guo, Q., Gan, L., Li, J.Y., 2012. Gbx2 regulates thalamocortical axon guidance by modifying the LIM and Robo codes. *Development.* 2012 Dec;139(24):4633-43. doi: 10.1242/dev.086991. Epub 2012 Nov 7.
- Dyer, C., Linker, C., Graham, A., Knight, R., 2014. Specification of sensory neurons occurs through diverse developmental programs functioning in the brain and spinal cord. *Dev Dyn.* 2014 Nov;243(11):1429-39.
- Fjose, A., Izpisua-Belmonte, J. C., Fromental-Ramain, C. and Duboule, D., 1994. Expression of the zebrafish gene *hlx-1* in the prechordal plate and during CNS development. *Development* 120, 71 - 81.
- Gestri, G., Carl, M., Appolloni, I., Wilson, S.W., Barsacchi, G., Andreatzoli, M. 2005. Six3 functions in anterior neural plate specification by promoting cell proliferation and inhibiting Bmp4 expression. *Development.* 2005 May;132(10):2401-13.
- Hevner, R.F., Miyashita-Lin, E., Rubenstein, J.L., 2002. Cortical and thalamic axon pathfinding defects in *Tbr1*, *Gbx2*, and *Pax6* mutant mice: evidence that cortical and thalamic axons interact and guide each other. *J Comp Neurol.* 2002 May 20;447(1):8-17.
- Hoch, R.V., Clarke, J.A., Rubenstein, J.L., 2015. Fgf signaling controls the telencephalic distribution of *Fgf*-expressing progenitors generated in the rostral patterning center. *Neural Dev.* 2015 Mar 31;10:8.
- Inoue, F., Nagayoshi, S., Ota, S., Islam, M.E., Tonou-Fujimori, N., Odaira, Y., Kawakami, K., Yamasu, K., 2006. Genomic organization, alternative splicing, and multiple regulatory regions of the zebrafish

- fgf8* gene. *Dev. Growth Differ.*, 48 (2006), pp. 447-462
- Inoue, F., Parvin, M.S., Yamasu, K., 2008. Transcription of *fgf8* is regulated by activating and repressive cis-elements at the midbrain-hindbrain boundary in zebrafish embryos. *Developmental Biology* 316, 471–486.
- Islam, M.E., Kikuta, H., Inoue, F., Kanai, M., Kawakami, A., Parvin, M.S., Takeda, H., Yamasu, K., 2006. Three enhancer regions regulate *gbx2* gene expression in the isthmus region during zebrafish development. *Mech. Dev.* 123, 907–924.
- John, A., Wildner, H., Britsch, S., 2005. The homeodomain transcription factor *gbx1* identifies a subpopulation of late-born GABAergic interneurons in the developing dorsal spinal cord. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 234, 767–771.
- Joyner, AL., Liu, A., Millet, S., 2000. *Otx2*, *gbx2* and *Fgf8* interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Dec;12(6):736-741.
- Khan, A., Nakamoto, A., Okamoto, S., Tai, M., Nakayama, Y., Kobayashi, K., Kawamura, A., Takeda, H., and Yamasu, K., 2012. *Pou2*, a class V POU-type transcription factor in zebrafish, regulates dorsoventral patterning and convergent extension movement at different blastula stages. *Mech. Dev.* 129, 219-235
- Khan, A., Nakamoto, A., Tai, M., Saito, S., Nakayama, Y., Kawamura, A., Takeda, H., and Yamasu, K., 2012. Mesendoderm specification depends on the function of *Pou2*, the class V POU-type transcription factor, during zebrafish embryogenesis. *Develop. Growth Differ.* 54, 686-701
- Kikuta, H., Kanai, M., Ito, Y., Yamasu, K., 2003. *gbx2* Homeobox Gene Is Required for the Maintenance of the Isthmic Region in the Zebrafish Embryonic Brain. *Dev. Dyn.* 228, 433–450.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 203.
- Kleinjan, DA, Bancewicz, RM., Gautier, P., Dahm, R., Schonthaler, HB., Damante, G., Seawright, A., Hever, AM., Yeyati, PL., van Heyningen, V., Coutinho, P. 2008. Subfunctionalization of duplicated zebrafish *pax6* genes by cis-regulatory divergence. *PLoS Genet.* 2008 Feb;4(2):e29.
- Kowenz-Leutz, E., Herr, P., Niss, K., Leutz, A., 1997. The homeobox gene *GBX2*, a target of the *myb* oncogene, mediates autocrine growth and monocyte differentiation. *Cell* 91, 185–195.
- Li, B., Kuriyama, S., Moreno, M., Mayor, R., 2009. The posteriorizing gene *gbx2* is a direct target of Wnt signalling and the earliest factor in neural crest induction. *Dev. Camb. Engl.* 136, 3267–3278.
- Li, J.Y.H., Lao, Z., Joyner, A.L., 2002. Changing requirements for *gbx2* in development of the cerebellum and maintenance of the mid/hindbrain organizer. *Neuron* 36, 31–43.
- Li, K., Zhang, J., Li, J.Y.H., 2012. *gbx2* Plays an Essential but Transient Role in the Formation of Thalamic Nuclei. *PLoS ONE* 7, 1–11.
- Lin, X., Swaroop, A., Vaccarino, F.M., Murtha, M.T., Haas, M., Ji, X., Ruddle, F.H., Leckman, J.F., 1996. Characterization and sequence analysis of the human homeobox-containing gene *GBX2*. *Genomics* 31, 335–342.
- Liu, A., Joyner, AL., 2001. *EN* and *GBX2* play essential roles downstream of *FGF8* in patterning the mouse mid/hindbrain region. *Development.* 2001 Jan;128(2):181-191.
- Luu, B., Ellisor, D., Zervas, M., 2011. The lineage contribution and role of *gbx2* in spinal cord development. *PLoS ONE* 6.
- MacDonald, RB., Pollack, JN., Debais-Thibaud, M., Heude, E., Talbot, JC., Ekker, M. 2013. *Dev Biol.* 2013 The *ascl1a* and *dlx* genes have a regulatory role in the development of GABAergic interneurons in the zebrafish diencephalon. *Sep 1;381(1):276-85.*

- Mallika, C., Guo, Q., Li, J.Y.H., 2015. *gbx2* is essential for maintaining thalamic neuron identity and repressing habenular characters in the developing thalamus. *Dev. Biol.*
- Manoli, M. and Driever, W. 2014. *nkx2.1* and *nkx2.4* genes function partially redundant during development of the zebrafish hypothalamus, preoptic region and pallidum. *Front. Neuroanat.* 8, 145.
- Mattes, B., Weber, S., Chen, Q., Davidson, G., Houart, C., and Scholpp, S. 2012. *Wnt3* and *Wnt3a* are required for induction of the mid-diencephalic organizer in the caudal forebrain. *Neural Dev.* 7, 12.
- Millet, S., Campbell, K., Epstein, D.J., Losos, K., Harris, E., Joyner, A.L., 1999. A role for *gbx2* in repression of *Otx2* and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* 401, 161–164.
- Mueller, T., Wullmann, M.F., Guo, S. 2008. Early teleostean basal ganglia development visualized by zebrafish *Dlx2a*, *Lhx6*, *Lhx7*, *Tbr2* (*eomesa*), and *GAD67* gene expression. *J Comp Neurol.* 2008 Mar 10;507(2):1245-57
- Nakayama, Y., Kikuta, H., Kanai, M., Yoshikawa, K., Kawamura, A., Kobayashi, K., Wang, Z., Khan, A., Kawakami, K., Yamasu, K., 2013. *gbx2* functions as a transcriptional repressor to regulate the specification and morphogenesis of the mid-hindbrain junction in a dosage- and stage-dependent manner. *Mech. Dev.* 130, 532–552.
- Navarro-Garberi, M., Bueno, C., Martinez, S., 2015. *Wnt1* signal determines the patterning of the diencephalic dorso-ventral axis. *Brain Struct Funct.* 2015 Oct 9.
- Niss, K., Leutz, A., 1998. Expression of the homeobox gene *{GBX2}* during chicken development. *Mech. Dev.* 76, 151 – 155.
- Ono, K., Clavairoly, A., Nomura, T., Gotoh, H., Uno, A., Armant, O., Takebayashi, H., Zhang, Q., Shimamura, K., Itohara, S., Parras, C.M., Ikenaka, K., 2014. Development of the prethalamus is crucial for thalamocortical projection formation and is regulated by *Olig2*. *Development.* 2014 May;141(10):2075-84. doi: 10.1242/dev.097790.
- Rhinn M, Brand M. 2001. The midbrain--hindbrain boundary organizer. *Curr Opin Neurobiol.* 2001 Feb;11(1):34-42.
- Rhinn, M., Lun, K., Amores, A., Yan, Y.L., Postlethwait, J.H., Brand, M., 2003. Cloning, expression and relationship of zebrafish *gbx1* and *gbx2* genes to Fgf signaling. *Mech. Dev.* 120, 919–936.
- Rhinn, M., Lun, K., Werner, M., Simeone, A., Brand, M., 2004. Isolation and expression of the homeobox gene *gbx1* during mouse development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 229, 334–339.
- Scholpp, S., Brand, M., 2001. Morpholino-induced knockdown of zebrafish engrailed genes *eng2* and *eng3* reveals redundant and unique functions in midbrain--hindbrain boundary development. *Genesis* 30, 129–133.
- Scholpp, S., Foucher I, Staudt N, Peukert D, Lumsden A, Houart C. 2007. *Otx11*, *Otx2* and *Irx1b* establish and position the ZLI in the diencephalon. *Development.* 2007 Sep;134(17):3167-76.
- Scholpp, S. and Lumsden, A., 2010. Building a bridal chamber: development of the thalamus. *Trends Neurosci.* 2010 Aug; 33(8-2): 373–380.
- Shamim, H., Mason, I., 1998. Expression of *gbx-2* during early development of the chick embryo. *Mech Dev.* 1998 Aug;76(1-2):157-9.
- Shinya, S. Koshida, A. Sawada, A. Kuroiwa, H. Takeda. 2001. Fgf signalling through MAPK cascade is required for development of the subpallial telencephalon in zebrafish embryos. *Development*, 128 (2001), pp. 4153–4164
- Sousa, V.H., Fishell, G., 2010. Sonic hedgehog functions through dynamic changes in temporal competence in the developing forebrain. *Curr Opin Genet Dev.* 2010 Aug;20(4):391-399.

- Su, C.-Y., Kemp, H.A., Moens, C.B., 2014. Cerebellar development in the absence of *gbx* function in zebrafish. *Dev. Biol.* 386, 181–190.
- Sunmonu, N.A., Chen, L., Li, J.Y.H., 2009. Misexpression of *gbx2* throughout the mesencephalon by a conditional gain-of-function transgene leads to deletion of the midbrain and cerebellum in mice. *Genesis* 47, 667–673.
- Su, Y., Meng, A., 2002. The expression of *gbx-2* during zebrafish embryogenesis. *Mech. Dev.* 113, 107–110.
- Tallafuss, A., Trepman, A., Eisen, J.S., 2009. DeltaA mRNA and protein distribution in the zebrafish nervous system. *Dev Dyn.* 2009 Dec;238(12):3226-36.
- Takahashi, H., Liu, F.-C., 2006. Genetic patterning of the mammalian telencephalon by morphogenetic molecules and transcription factors. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 78, 256–266. doi:10.1002/bdrc.20077
- Tour, E., Pillemer, G., Gruenbaum, Y., Fainsod, A., 2001. The two *Xenopus gbx2* genes exhibit similar, but not identical expression patterns and can affect head formation. *FEBS Lett.* 2001 Oct 26;507(2):205-9.
- Veien, E.S., Rosenthal, J.S., Kruse-Bend, R.C., Chien, C.-B., Dorsky, R.I., 2008. Canonical *Wnt* signaling is required for the maintenance of dorsal retinal identity. *Development* 135, 4101–4111.
- Viktorin, G., Chiuchitu, C., Rissler, M., Varga, Z.M., Westerfield, M., 2009. *Emx3* is required for the differentiation of dorsal telencephalic neurons. *Dev Dyn.* 2009 Aug;238(8):1984-98.
- Von Bubnoff, A., Schmidt, J.E., Kimelman, D., 1996. The *Xenopus laevis* homeobox gene *Xgbx-2* is an early marker of anteroposterior patterning in the ectoderm. *Mech. Dev.* 54, 149–160.
- Vue, T.Y., Aaker, J., Taniguchi, A., Kazemzadeh, C., Skidmore, J.M., Martin, D.M., Martin, J.F., Treier, M., Nakagawa, Y., 2007. Characterization of progenitor domains in the developing mouse thalamus. *J Comp Neurol.* 2007 Nov 1;505(1):73-91.
- Wassarman, K.M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A.L., Rubenstein, J.L., Martinez, S., Martin, G.R., 1997. Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on *gbx2* gene function. *Dev. Camb. Engl.* 124, 2923–2934.
- Waters, S.T., Wilson, C.P., Lewandoski, M., 2003. Cloning and embryonic expression analysis of the mouse *gbx1* gene. *Gene Expr. Patterns GEP* 3, 313–317.
- 菊田 寛 (2000). ゼブラフィッシュ脳形成遺伝子 *gbx2* の構造および機能の解析. 埼玉大学大学院修士論文
- 菊田 寛 (2003). 脊椎動物胚発生において中脳後脳境界領域の形成を制御する分子的機構の研究. 埼玉大学大学院博士論文
- 中山 由紀子 (2009). 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. 埼玉大学大学院修士論文
- 中山 由紀子 (2013). 脊椎動物胚での峡部オーガナイザー形成制御機構の研究. 埼玉大学大学院博士論文
- 鹿毛 大地 (2015). 遺伝子破壊法を利用したゼブラフィッシュ胚の峡部形成機構の解析. 埼玉大学大学院修士論文

## 図の説明

### Figure 1. 体節形成期から咽頭胚期にかけてのゼブラフィッシュ胚脳原基における *gbx2* の発現

前脳領域における *gbx2* の発現を 18 hpf から 48 hpf までの野生型胚について、WISH により検討した。上段は背側 (A-G), 下段は側方 (A'-G') からの染色像であり、左側が前方、上が背側 (側方像) となる。Te, 腹側終脳; th, 視床; mhb, 中脳後脳境界; ov, 耳胞; pa, 咽頭弓。スケールバー, 100  $\mu$ m.

### Figure 2. 体節形成期から咽頭胚期にかけてのゼブラフィッシュ胚脳原基における *gbx1* の発現

16 hpf から 48 hpf までのゼブラフィッシュ胚における頭部での *gbx1* の発現を WISH により解析した。上段は背面像, 下段は側方像であり、左側が前方、上が背側 (側方像) となる。r2-7, 菱脳節 2-7; vTe, 腹側終脳。スケールバー, 100  $\mu$ m.

### Figure 3. ゼブラフィッシュ胚の脳原基における *gbx1* と *gbx2* の発現の比較

図の上に示した発生段階(18 hpf, 24 hpf, 36 hpf)のゼブラフィッシュ胚頭部における *gbx1* (紫) と *gbx2* (赤) の発現を 2 色 WISH によって比較した。上段は背面像, 下段は側方像であり、左側が前方、上が背側 (側方像) となる。染色胚は全てフラットマウントとして観察した。Te, 終脳; th, 視床; mhb, 中脳後脳境界; ov, 耳胞; pa, 咽頭弓; r2/r3, 菱脳節 2/3; r5-7, 菱脳節 2-7; vTe, 腹側終脳。スケールバー, 100  $\mu$ m.

### Figure 4. 2 色 FISH による前脳での *gbx2* 発現領域の検討

A.B 体節形成後期(21-somite, 19.5 hpf)胚の頭部における *gbx2* の発現と前脳形成遺伝子(*otx2*, *emx3*, *dlx2a*, *six3b*, *shha*, *pax6a*)の発現を 2 色 FISH で染色し、共焦点レーザー顕微鏡像で比較、検討した。A は水平断面像 (左が前方), B は傍矢状面像 (左が前方で上が背側) を示す。各々上段は *gbx2* の発現 (緑), 中段は他の脳形成遺伝子の発現 (赤), 下段は 2 色のマージ像を示す。全てフラットマウントで検鏡した。

C. *gbx2* (緑) と前脳領域化遺伝子 (赤) の発現の位置関係を模式図で示す。Te, 終脳; di, 間脳; ey, 目; dte, 背側終脳; vte, 腹側終脳; pth, 腹側視床; ht, 視床下部; fp, 底板; psd, 外套-外套下部境界; mb, 中脳; zli, zona limitans intrathalamica。スケールバー, 100  $\mu$ m.

### Figure 5. 発生中の前脳における *gbx2* の発現動態のタイムラプス解析

*Tg(gbx2:egfp)*胚の頭部における EGFP 蛍光の発現の発生に伴う変化を共焦点レーザー顕微鏡によりタイムラプス解析により追跡し、連続写真で示した。

A-H. 体節形成後期(17-24 hpf)での EGFP 蛍光の発現を背側から撮影した。画像は時系列に沿って並べており、実際の発生段階を右上に示す。矢印は前方脳領域における EGFP の発現を示す。

I-S. 体節形成後期から咽頭胚期(18-48 hpf)にかけての EGFP 蛍光の発現を側方からの撮影し、画像を時系列に沿って示した。白矢尻は *gbx2* の視床での発現を示す。Te, 終脳; mhb, 中脳後脳境界; eye, 目; th, 視床; fp, 底板; ov, 耳胞。スケールバー, 100  $\mu$ m.

### Figure 6. 加温誘導型 *gbx2* を保有する Tg 魚での *gbx2* の誘導

A. 加温誘導型 *gbx2* コンストラクト *Tg(hsp70l:gbx2)* の構造を模式図で示した. このコンストラクトでは *hsp70l* 遺伝子由来の Heat shock Promoter が Flag Tag 付きの *gbx2* 遺伝子上流に組み込まれている. このコンストラクトを生殖系列に導入した *Tg(hsp70l:gbx2)* 系統胚を 37°C で処理することにより, Heat shock Promoter の働きで *gbx2* の発現が誘導される(Nakayama et al., 2013).

B. 本研究では, *hsp-gbx2* をヘテロで持つ Tg 魚 (*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*) と野生型(WT)魚を交配し, 得られた子孫胚を特定の発生段階 (Shield 期, Bud 期, 6 体節期, 18 hpf, 24 hpf, 36 hpf, 48 hpf など) で加温処理 (37°C, 30 分間) した.

C. *hsp-gbx2* をヘテロで持つ Tg 魚 (*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*) と野生型魚を交配して得られた胚, そしてこれと別に準備した野生型胚の各々を, Shield 期(6 hpf), Bud 期(10 hpf), 18 hpf, 24 hpf, 36 hpf, 48 hpf で加温誘導 (37°C, 30 分間) した上, 直後に胚を回収した (30 胚/サンプル).

D. *Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)* と野生型魚を交配して得られた胚を Bud 期で加温誘導 (37°C, 30 分間) し, 室温に戻した上で横軸で示す培養時間し, 経時的に回収した (30 胚/サンプル) .

### Figure 7. *Tg(hsp70l:gbx2)* 胚における *gbx2* の加温誘導の WISH による確認

Fig. 6B で述べたように 6-48 hpf で加温処理した *Tg(hsp70l:gbx2)* 胚において, WISH により *gbx2* の発現を染色した. (上段) 染色胚を, 内在 *gbx2* 発現パターンを示す胚 (左) と発現上昇胚 (右) に分けて示した. (中段) *gbx2* の発現が正常に見られた胚. 峡部(mhb), 耳胞(ov)などで発現が観察される. (下段) *gbx2* の発現が広範に誘導された胚. 胚の全域で *gbx2* の発現が観察された. 中段と下段の写真において, 右下には対応する発現パターンのみられた胚の数と各 genotype の全染色胚数を示す. 矢印は mhb における内在 *gbx2* の発現を示す, ov, 耳胞. スケールバー, 100  $\mu$ m.

### Figure 8. 加温誘導処理を行った胚の Genotyping

*hsp-gbx2* をヘテロで持つ Tg 魚 [*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*] と野生型魚を交配し, 得られた胚を 6 hpf (A), 10 hpf (B), 12 hpf (C), 18 hpf (D), 24 hpf (E), 36 hpf (F), 48 hpf (G) で加温処理 (37°C, 30 分間) した上, WISH により *gbx2* の発現を染色した (Fig. 7), この際, 発現が増大した胚 (induced, 赤線) と正常発現胚 (not induced, 緑線) について, 胚ごとにゲノム DNA を抽出した上, 内在ゲノム配列 (genome, 180 bp; 各々下段) と *hsp-gbx2* 配列 (196 bp; 各々上段) の有無を PCR により検討した. 各レーン上の数字は genotyping を行った各胚を示している. M, サイズマーカー (Dyna Marker K bp); P, Tol2-*hsp-gbx2* プラスミドを鋳型とした際の PCR 産物; WT, 野生型胚由来 DNA を鋳型とした際の PCR 産物.

### Figure 9. *Tg(hsp70l:gbx2)* 胚の加温処理による *gbx2* の誘導についての qPCR による定量的確認

A, A', B. Fig. 6C で述べたように加温処理した. C. Fig. 6D で述べたように加温処理した. 各サンプルから RNA を抽出した上, これを鋳型として *gbx2* コード領域配列 (A, A', C), または *gbx2* mRNA の 3'-UTR 配列 (B) を qPCR により定量した. 縦軸は, *hsp-gbx2* 誘導後の各配列の発現を, 対応する野生型胚での発現に対する相対値で示す (Relative Quantity, RQ). 野生型胚との差については t 検定を行った. \*\*\*  $p < 0.001$ .

### Figure 10. *gbx2* の過剰発現が前脳形成転写因子遺伝子の発現に及ぼす効果

*hsp-gbx2* をヘテロで持つ Tg 魚 (*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*) と野生型魚を交配して得られた胚を 16 hpf で加温処理し, 18 hpf で前脳の発生に関与する転写因子遺伝子 (A, *otx2*; B, *emx3*; C, *dlx2a*;



D, *six3b*) の発現を WISH により検討した. 検討した遺伝子ごとに, 染色胚の背面像 (a, b; 左が前方) と側面像 (a', b'; 左が前方, 上が背側) を示した. 染色胚は全て *hsp-gbx2* の有無を genotyping で決定しており, 遺伝子ごとに, 野生型兄弟胚 (a, a') と *Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)* 胚 (b, b') の染色像が示されている. 写真中のブラケットは遺伝子の発現の範囲を示しており, *emx3* と *dlx2a* の場所は Tg 胚では狭まっていることを示す. 右下には示された発現パターンを示す胚の数と genotype ごとの染色胚総数が示されている. Te, 終脳; vte, 腹側終脳; pt, 視蓋; ht, 視床下部; ov, 耳胞. スケールバー, 100  $\mu$ m.

#### Figure 11. *gbx2* の過剰発現が前脳形成転写因子遺伝子の発現に及ぼす効果についての半定量的解析

Fig. 10 で示した染色胚について, 各々の画像を ImageJ に取り込み, 染色領域を確定した上 (写真中の黄色枠線), 面積(area)および染色レベル(intensity)を数値化した (各遺伝子の). スケールバー, 100  $\mu$ m. 野生型胚と Tg 胚いずれについても 5 個以上胚の画像を用いており, 実際の胚数は写真の右上に示した. 両者の間での違いについては独立 t 検定を行った. エラーバー, 標準誤差. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

#### Figure 12. *gbx2* の過剰発現が前脳形成分泌因子遺伝子の発現に及ぼす効果

*hsp-gbx2* をヘテロで持つ Tg 魚 (*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*) と野生型魚を交配して得られた胚を 16 hpf で加温処理し, 18 hpf で前脳の発生に関与する分泌因子遺伝子 (A, *bmp2b*; B, *wnt1*; C, *wnt3a*; D, *shha*; E, *fgf8a*) の発現を WISH により検討した. 検討した遺伝子ごとに, 染色胚の背面像 (a, b; 左が前方) と側面像 (a', b'; 左が前方, 上が背側) を示した. 染色胚は全て *hsp-gbx2* の有無を genotyping で決定しており, 遺伝子ごとに, 野生型兄弟胚 (a, a') と *Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)* 胚 (b, b') の染色像が示されている. 写真中でブラケットは遺伝子発現の範囲を示しており, Tg 胚では狭まっていることを示す. 右下には写真で示されたパターンを示す胚の数と genotype ごとの染色胚総数が示されている. Te, 終脳; mh, 中脳; re, 網膜; fp, 底板. スケールバー, 100  $\mu$ m.

#### Figure 13. *gbx2* の過剰発現が前脳形成分泌因子遺伝子の発現に及ぼす効果: 半定量的解析

Fig. 12 で示した染色胚について, 各々の画像を ImageJ に取り込み, 染色領域を確定した上 (黄色の枠線, 上段), 面積(area)および染色レベル(intensity)を半定量的に決定した (下段). スケールバー, 100  $\mu$ m. 野生型胚と Tg 胚いずれについても *shha* 以外では 4 個以上胚の画像を用いており, 実際の胚数は写真の右上に示した. 両者の間での違いについては独立 t 検定を行った. エラーバー, 標準誤差. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

#### Figure 14. 加温誘導処理を行った胚の Genotyping

*hsp-gbx2* をヘテロで持つ Tg 魚 [*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*] と野生型魚を交配して得られた胚を 16 hpf で加温処理 (37°C, 30 分間) し, 18 hpf で WISH により各遺伝子の発現を染色した際 (Fig. 10, 11), 正常発現胚(normal), 発現低下胚(downregulated), 発現増大胚(upregulated)ごとに, ゲノム DNA を抽出した上, *hsp-gbx2* 配列 (196 bp; 各々上段) の有無を PCR により検討した. 各レーン上の数字は genotyping を行った各胚を示している. M, サイズマーカー (Dyna Marker K bp); P, Tol2-*hsp-gbx2* プラスミドを鋳型とした際の PCR 産物; WT, 野生型胚由来 DNA を鋳型とした際の PCR 産物.

#### Figure 15. *gbx2* の過剰発現胚における脳形成遺伝子の発現についての定量的解析

*hsp-gbx2* をヘテロで持つ Tg 魚 (*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*) と野生型魚を交配して得られた胚を 16 hpf で加温処理し, 18 hpf において胚を回収した. Genotyping に基づいて兄弟胚と Tg 胚を各々プールし (7 胚/プール), 精製された RNA を鋳型として, 前脳の発生に参与する転写調節遺伝子 (A) または各種分泌因子遺伝子 (B) の発現を qPCR により定量的に解析した. Tg 胚での発現を兄弟胚での発現に対する相対値で示し, 両者の違いについては独立 t 検定を行った. エラーバー, 標準誤差. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01.

#### Figure 16. Gbx2 タンパク質の転写調節能の活性化実験

野生型胚に Tamoxifen 誘導性野生型 Gbx2 遺伝子 (*gbx2-ERT2*), または活性化型 Gbx2 遺伝子 (*vp-gbx2-ERT2*) の mRNA を注入し, 終脳で *gbx2* が発現する直前である 16 hpf に注入胚を Tamoxifen 処理し, 18 hpf で前脳の発生に参与する遺伝子の発現を WISH により検討した.

#### Figure 17. Gbx2 タンパク質の活性化が前脳形成因子遺伝子の発現に及ぼす効果

野生型胚に *gbx2-ERT2* の mRNA を注入し, 16 hpf に胚を Tamoxifen 処理した上, 18 hpf で前脳の発生に参与する遺伝子の発現を WISH により検討した. 検討した遺伝子ごとに, 染色胚の背面像 (a, b; 左が前方) と側面像 (a', b'; 左が前方, 上が背側) を示した. 無処理胚 (a, a') と Tamoxifen 処理胚 (b, b') の染色像が示されている. 右下には写真で示されたパターンを示す胚の数と染色胚総数が示されている. vte, 腹側終脳; pth, 腹側視床; ht, 視床下部; fp, 底板; zli, zona limitans intrathalamica. スケールバー, 100  $\mu$ m.

#### Figure 18. 活性化型 Gbx2 の活性化が前脳形成因子遺伝子の発現に及ぼす効果

(A-C) 野生型胚に *vp-gbx2-ERT2* の mRNA を注入し, 終脳で *gbx2* が発現する直前である 16 hpf に Tamoxifen 処理し, 18 hpf で前脳の発生に参与する制御遺伝子 (A, *dlx2a*; B, *six3b*; C, *shha*) の発現を WISH により検討した. 検討した遺伝子ごとに, 染色胚の背面像 (a, b; 左が前方) と側面像 (a', b'; 左が前方, 上が背側) を示した. 無処理胚 (a, a') と Tamoxifen 処理胚 (b, b') の染色像が示されている. 右下には写真で示されたパターンを示す胚の数と染色胚総数が示されている. (D-F) 染色胚ごとに画像を ImageJ に取り込み, 染色領域を確定した上 (黄色枠線, 上段), 面積 (area) および発現レベル (intensity) を半定量的に決定した (下段). スケールバー, 100  $\mu$ m. 無処理胚と Tamoxifen 処理胚いずれについても 4 個以上胚の画像を用いており, 実際の胚数は写真の右上に示した. 両者の間での違いについては独立 t 検定を行った. エラーバー, 標準誤差. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001. vte, 腹側終脳; pth, 腹側視床; ht, 視床下部; fp, 底板; zli, zona limitans intrathalamica. スケールバー, 100  $\mu$ m.

#### Figure 19. *gbx2* の機能欠損胚における前脳の部域化の異常

(A-C) *gbx2* 変異のヘテロ接合体同士で交配し, 得られた子孫胚が 24 hpf に達した時点で, 前脳形成に参与する転写因子遺伝子 (A, *emx3*; B, *dlx2a*; C, *six3b*, *nkx2.1*, *otx2*) の発現を WISH により染色した. (A, B) 染色胚ごとに画像を ImageJ に取り込み, 染色領域を確定した上 (黄色枠線, a'', b''), 面積 (area) および発現レベル (intensity) を数値化した (下段). 野生型胚と変異体胚いずれについても 4 個以上胚の画像を用いており, 実際の胚数は写真の右上に示した. 両者の間での違いについては独立 t 検定を行った. エラーバー, 標準誤差. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.

(D-G) *gbx2* 変異のヘテロ接合体同士で交配し, 得られた子孫胚が 48 hpf に達した時点で, 前脳部域化と神経分化に参与する転写因子遺伝子 (D, *lhx5*; E, *lhx6*; F, *otpb*; G, *nkx2.1*) の発現を WISH により染色した.

(H, I) *gbx2* 変異のヘテロ接合体同士で交配し、得られた子孫胚が 72 hpf に達した時点で、コリン作動性ニューロンおよび GABA ニューロンの最終分化に関する転写因子遺伝子(*H, chata; I, gad1b*)の発現を WISH により染色した。

(A-I) 染色胚からは個別に DNA を抽出した上、ホモ接合体を genotyping で同定した。検討した遺伝子ごとに、野生型兄弟胚 (a, a') またはホモ接合体胚 (b, b') の頭部について背面像 (a, b) と側面像 (a', b') を示す (上段)。右下は、写真で示すパターンを示した胚の数と対応する genotype の染色胚数を示す。dte, 背側終脳; vte, 腹側終脳; pth, 腹側視床; ht, 視床下部; di, 間脳; mb, 中脳。スケールバー, 100  $\mu$ m。

### Figure 20. *gbx2* 機能欠損胚の Genotyping

*gbx2* 変異をヘテロで持つ魚(*gbx2<sup>h253</sup>*)同士を交配して得られた胚を 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf で WISH により各遺伝子の発現を染色した際 (Fig. 19), 正常発現胚(normal), 発現低下胚(downregulated), 発現増大胚(upregulated)ごとに, *gbx2* 変異配列の有無を判定した (野生型胚では 240 bp と変異胚では 210 bp のバンドが期待される)。各レーンの下に示した数字は各胚を示しており, 赤字はホモ接合体と判断された胚を示す。M, サイズマーカー(Dyna Marker K bp); wt, 野生型胚由来 DNA を鋳型とした際の PCR 産物; mt, 野生型胚由来 DNA を鋳型とした際の PCR 産物。

### Figure 21. *gbx2* の機能欠損胚における前脳形成遺伝子の発現の定量解析

*gbx2* 変異のヘテロ接合体同士で交配し、得られた子孫胚を 24 hpf に達した時点で回収した。各胚より抽出したゲノム DNA を鋳型に個別に Genotyping を行い、これに基づいて兄弟胚とホモ接合体胚から精製した RNA を各々プールした (11 胚/プール)。これらを鋳型として、前脳の発現に関与する転写調節遺伝子 (A) または各種シグナル伝達因子遺伝子 (B) の発現を qPCR により定量した。ホモ接合体胚での発現を兄弟胚での発現に対する相対値で示し、両者の違いについては独立 t 検定を行った。エラーバー, 標準誤差。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ 。

### Figure 22. 細胞内シグナル伝達を阻害・活性化した胚の終脳における *gbx2* の発現

A. 終脳で *gbx2* の発現が活性化される 18 hpf に先立つ 4 時間の期間内の様々な時間帯 (矢印), 胚を細胞内シグナルに影響を与える様々な化学物質で処理し, 18 hpf において終脳での *gbx2* 発現に対する効果を WISH により検討した。

B. 14–18 hpf において, 胚を各種薬剤処理した上, WISH により頭部での *gbx2* の発現を検討した。処理薬剤ごとに, 染色胚頭部の背面像 (上段, 左が前方) と側面像 (下段, 左が前方で上が背側) を示す。

C. 14–18 hpf において, 胚を各種薬剤処理し, 18 hpf において各シグナルの下流遺伝子の発現への効果を WISH により検討した(*axin2, ptch2, gata3, etv5b, pax2a, tbx16, ta, ebf2, neurog1*)。用いた薬剤とその標的の下流遺伝子ごとに, 対象胚 (上段, 溶媒処理) と薬剤処理胚 (下段) の背面像 (左列, 左が前方) と側面像 (右列, 左が前方で上が背側) を示す。

D. 14–18 hpf において, Wnt, HH, BMP, Nodal 及び Notch 各シグナルの阻害剤 (各々 IWR-I, cyclopamine, dorsomorphin, SB431542, DAPT) で単独処理した胚, あるいは Wnt 阻害剤の IWR-1 と HH, BMP, Nodal 及び Notch 各シグナルの阻害剤 (各々 cyclopamine, dorsomorphin, SB431542, DAPT) のうちの 1 つとの組み合わせで処理した胚について, 18 hpf での終脳内 *gbx2* 発現を WISH により検討した。処理薬剤ごとに, 染色胚頭部の背面像 (上段, 左が前方) と側面像 (下段, 左が前方で上が背側) を示す。黒矢印は終脳, 黒矢尻は中脳後脳境界での *gbx2* の発現を

示す. mhb, 中脳後脳境界 ; Te, 終脳 ; ov, 耳胞. スケールバー, 100  $\mu\text{m}$ .

### Figure 23. FGF, Wnt および RA シグナルが終脳での *gbx2* の発現に関与する時期の特定

A-C. 写真の上を示した発生時期に BIO (A), SU5402 (B) または RA(C)により処理した胚の頭部における *gbx2* の発現を示す. 全て側面像であり, 左側が前方, 上が背側となる. 対称胚は 0.2% DMSO で処理した. 矢印は腹側終脳, 黒矢尻は MHB での *gbx2* の発現を示す. 右下は示された発現パターンを示す胚の数及び染色した胚の総数を示す. スケールバー, 100  $\mu\text{m}$ .

### Figure 24. *gbx2* の過剰発現が視床形成転写因子遺伝子の発現に及ぼす効果

(A-C) *hsp-gbx2* をヘテロで持つ Tg 魚 (*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*) と野生型魚を交配して得られた胚を 34 hpf で加温処理し, 36 hpf で視床の発生に関与する転写因子遺伝子 (A, *irx1b*; B, *dbx1a*; C, *olig2*) の発現を WISH により検討した. 遺伝子ごとに, 染色胚の背面像 (a, b; 左が前方) と側面像 (a', b'; 左が前方, 上が背側) を示した. 側面像は視床領域をさらに拡大している (a'', b''). 染色胚は全て *hsp-gbx2* の有無を genotyping で決定しており, 上段は野生型 sibling 胚 (a, a'), 下段は *Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)* 胚 (b, b') である. 写真中のブラケットは視床における各遺伝子の発現範囲を意味しており, Tg 胚では狭まっていることを示す. 右下は, 図で示した発現を示す胚の数と対応する genotype の染色胚総数である.

(A'-C') 染色胚ごとに画像を ImageJ に取り込み, 染色領域を確定した上 (左, 黄色枠線), 面積(area)および発現レベル(intensity)を半定量的に決定した (右グラフ). スケールバー, 100  $\mu\text{m}$ . 野生型胚と Tg 胚いずれについても 3 個以上胚の画像を用いており, 実際の胚数は写真の右上に示した. 両者の間での違いについては独立 t 検定を行った. エラーバー, 標準誤差. \*,  $p < 0.05$ . hb, 後脳 ; th, 視床 ; pth, 腹側視床 ; zli, zona limitans intrathalamica. スケールバー, 100  $\mu\text{m}$ .

### Figure 25. *gbx2* の過剰発現胚における視床形成遺伝子の発現の定量的解析

*hsp-gbx2* をヘテロで持つ Tg 魚 (*Tg(hsp70l:gbx2<sup>+/+</sup>)*) と野生型魚を交配して得られた胚を 34 hpf で加温処理し, 36 hpf において胚を回収した. Genotyping に基づいて sibling 胚と Tg 胚を各々プールし (7 胚/プール), 精製された RNA を鋳型として, 視床の発生に関与する転写調節因子遺伝子の発現を qPCR により定量的に解析した. Tg 胚での発現は sibling 胚での発現に対する相対値で示し, 両者の間での違いについては独立 t 検定を行った. エラーバー, 標準誤差. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

### Figure 26. *gbx2* の機能欠損胚における視床形成遺伝子 *irx1b* の 2 dpf 胚での発現検討

*gbx2* 変異のヘテロ接合体同士で交配し, 得られた子孫胚が 48 hpf に達した時点で, 視床と後脳における *irx1b* の発現を WISH により染色した. 各染色胚からは DNA を抽出した上, ホモ接合体を genotyping で同定した. 野生型 sibling 胚 (a, a'), またはホモ接合体胚 (b, b') の頭部について背面像 (a, b) と側面像 (a', b') を示す. 右下は, 写真で示すパターンを示した胚の数と対応する genotype の染色胚数を示す. 染色胚ごとに, 側面画像を ImageJ に取り込み, 染色領域を確定した上 (黄色枠線, a'', b''), 面積(area)および発現レベル(intensity)を半定量的に決定した (右グラフ). 野生型胚は 12 個, *gbx2* 変異胚は 4 個の胚画像を用いており, 両者の間での違いについては独立 t 検定を行った. エラーバー, 標準誤差. \*\*,  $p < 0.01$ . hb, 後脳 ; th, 視床. スケールバー, 100  $\mu\text{m}$ .

### Figure 27. *gbx2* の機能欠損胚における視床形成遺伝子の発現検討 (3 dpf 胚)

*gbx2* 変異のヘテロ接合体同士で交配し、得られた子孫胚が 72 hpf に達した時点で、視床と後脳における *irx1b*, 視床と中脳での *dbx1a*, 視床と腹側視床での *olig2* の発現を WISH により染色した。各染色胚からは DNA を抽出した上、ホモ接合体を genotyping で同定した。検討した遺伝子ごとに、野生型兄弟胚 (a, a') またはホモ接合体胚 (b, b') の頭部について背面像 (a, b) と側面像 (a', b') を示す。右下は、写真で示すパターンを示した胚の数と対応する genotype の染色胚数を示す。mb, 中脳 ; hb, 後脳 ; th, 視床。スケールバー, 100  $\mu$ m。

#### Figure 28. *gbx2* の機能欠損胚の Genotyping

*gbx2* 変異をヘテロで持つ魚(*gbx2*<sup>th253</sup>)同士を交配して得られた胚を 40 hpf, 72 hpf で WISH により各遺伝子の発現を染色した上 (Fig. 19), 胚ごとに *gbx2* 変異配列の有無を判定した。各レーンの下に示した数字は各胚を示しており、赤字はホモ接合体と判断された胚を示す。M, サイズマーカー(Dyna Marker K bp) ; wt, 野生型胚由来 DNA を鋳型とした際の PCR 産物 ; mt, 野生型胚由来 DNA を鋳型とした際の PCR 産物。

Table 1. qPCR に用いた転写因子遺伝子プライマー

Gene Symbol	Sense Primer	Anti-sense Primer	Tm	Size	Intron
<i>otx2</i>	CAACCACCTTACACGGTCAACG	GCGAATAAAGCCTCCAGCACAT	61/59	155	627
<i>emx3</i>	CCAGAGGGACACCTTGAAC	TCAGCTCCCACCACGTAAT	59/58	210	7553
<i>dlx2a</i>	ATCTCTGGGCCTCACGCAA	CAGTGTTCAATTCTCTGGCTGTG	58/59	188	1066
<i>six3b</i>	GCACAAGCCACTGGACTGACTC	GCAGCCCGATTCTGACATGGAG	62/62	147	898
<i>pax6a</i>	GCTGAGGATGCTGAACGGTCA	CTCGCCATTGGAGCTTATTGAGTT	60/58	151	3845
<i>gbx1</i>	GCCCCGATGACGAACTCAAAGG	AGGTGTTCCCGTCGGAGAAGCT	61/62	192	1279
<i>gbx2</i>	ATTCCGTCCTTCCACGATTC	TTCTTTCTGACACATGGCGT	58/58	174	1003
<i>gbx2 3'UTR</i>	TGGTCTCTGCTGAAGCACATGATA	GTGCCCGTGATGTCTTAAATGGTT	59/59	196	0
18s rRNA	CGAAAGTCGGAGGTTCAAG	AGCTTTGCAACCATACTCCC	56/58	Unkown	Unkown

注) 18s rRNA は qPCR 内部補正に用いた遺伝子。*gbx2 3'UTR* は内在 *gbx2* の発現を定量するために 3'UTR に対して作製したプライマー。Tm はプライマー配列の解離温度, Size は PCR 産物の長さ, Intron は Exon の間に含まれる Intron の長さ。

Table 2. qPCR に用いた分泌因子遺伝子プライマー

Gene Symbol	Sense Primer	Anti-sense Primer	Tm	Size	Intron
<i>bmp2b</i>	CCGAGGAGCACTATGGGAAA	CGCCAGGAATGGAGGTAAGG	58/60	154	1855
<i>wnt1</i>	TGTGTCCTCCTGGTGTCTCTC	TCTCTGGCGGCGACTTAGCA	62/60	165	1687
<i>shha</i>	AAGGATGAGGAGAACACGGGAG	TCTTCCCTCGTAGTGGAGTGATT	58/57	174	1421
<i>fgf8a</i>	AGCATGTGAGTGAGCAAAGTAAGGT	CGACTCCCAAATGTGTCTGTCTCTA	59/61	187	1618
<i>wnt3</i>	TCTCGGGTGCTTGGAGGCTAT	TTGACTCCTTCCGCTTACTACTGG	61/61	173	30581
<i>wnt3a</i>	GCATCCAGGAGTGTCTCAGCATCA	GCACGAACGCCGATTCTCTG	61/60	156	21153
<i>dltA</i>	TTCACCTGTGGAGAACGTGG	CTCATCACAGTAGCGCCCTT	58/58	165	
<i>notch1a</i>	CGAACCCGTGTCTGAACCAG	AGCCGGACAGTTACAGGAGA	60/58	188	

注) Tm はプライマー配列の解離温度, Size は PCR 産物の長さ, Intron は Exon の間に含まれる Intron の長さ。

Table 3. 視床及び視床下部形成に関わる遺伝子の cDNA クローニングに用いたプライマー

Gene Symbol	Sense Primer	Anti-sense Primer	Enzyme site
<i>lhx5</i>	GCGAATTCCAGGGCGGAATGATGGTG	GCTCTAGATAGAGTCTTATTGTCTCTGTCC	<i>EcoRI/XbaI</i>
<i>dbx1a</i>	GCGAATTCTAATAGCCGGGACCATGATG	GCTCTAGAGCAGCTCATGAATTTGCTTATG	<i>EcoRI/XbaI</i>
<i>foxb1.2</i>	GCGAATTCCTGACTTTCAACGCGATTAGG	GCTCTAGAAGTCCGCAGGTGTCAGTGC	<i>EcoRI/XbaI</i>
<i>irx1b</i>	GCGGATCCGACAGAGTTCCTCGG	GCGAATTCGCTGTTGCTGTATTGTCACA	<i>BamHI/EcoRI</i>

注)下線はライゲーションに利用した酵素切断部位。



Table 4. 脳領域特異的遺伝子の *in situ* 解析用プローブ合成用に用いたプラスミド

Gene Symbol	Plasmid Name	Linearization	Polymerase	Source
<i>olig2</i>	pBS-olig2	<i>Bgl</i> I	T3	日比 正彦博士
<i>gbx2</i>	pCS2+gbx2ΔUTR	<i>Not</i> I	T7	中山 由紀子博士
<i>lhx5</i>	pCS2+lhx5	<i>Hind</i> III	T7	本研究
<i>dbx1a</i>	pCS2+dbx1a	<i>Kpn</i> I	SP6	本研究
<i>foxb1.2</i>	pCS2+lhx7foxb1.2	<i>Hind</i> III	T7	本研究
<i>irx1b</i>	pTAC-2-irx1b	<i>Hind</i> III	T7	本研究

注) Linearization はプラスミドを直鎖化する際に利用した酵素切断部位。Polymerase はプローブ合成時に用いた酵素。

Table 5. Genotyping で *hsp-gbx2* DNA, *gbx2* 変異 DNA 配列とゲノム DNA 検出に用いたプライマー

Primer Name	Sequence	Tm
FT-gbx2-s	AATGAAACAATTGCACCATAAATTG	54
FT-gbx2-as	CTGCACTCCGAATTCCTCCC	54
dcap28	GAGCTTCTCCATGGACAGTGATTTAGATTA	60
dcap29	CTGTGAGGGACAGATATTTCTTACAGTGAA	60
fe37B04-f	GCAGCTTTTGTGTCTGCTTG	57
fe37B04-r	GGTTTGTCTGCATCAGATACG	57

注)Genotyping 時に胚ゲノム内での *hsp-gbx2* DNA 配列及び内部コントロールであるゲノム配列 fe37B04 の検出に用いたプライマー。  
Tm はプライマー配列の解離温度。

Table 6. *vp-gbx2-ERT2* 遺伝子クローニングに用いたプライマー

<b>Gene Symbol</b>	<b>Sense Primer</b>	<b>Anti-sense Primer</b>	<b>Enzyme site</b>
<i>vp-gbx2</i>	GTGCCTAATGGGAGGTCTAT	GCAGTTTGACCCGTTTCCA	<i>Call/</i>

注)下線はライゲーションに利用した酵素切断部位.

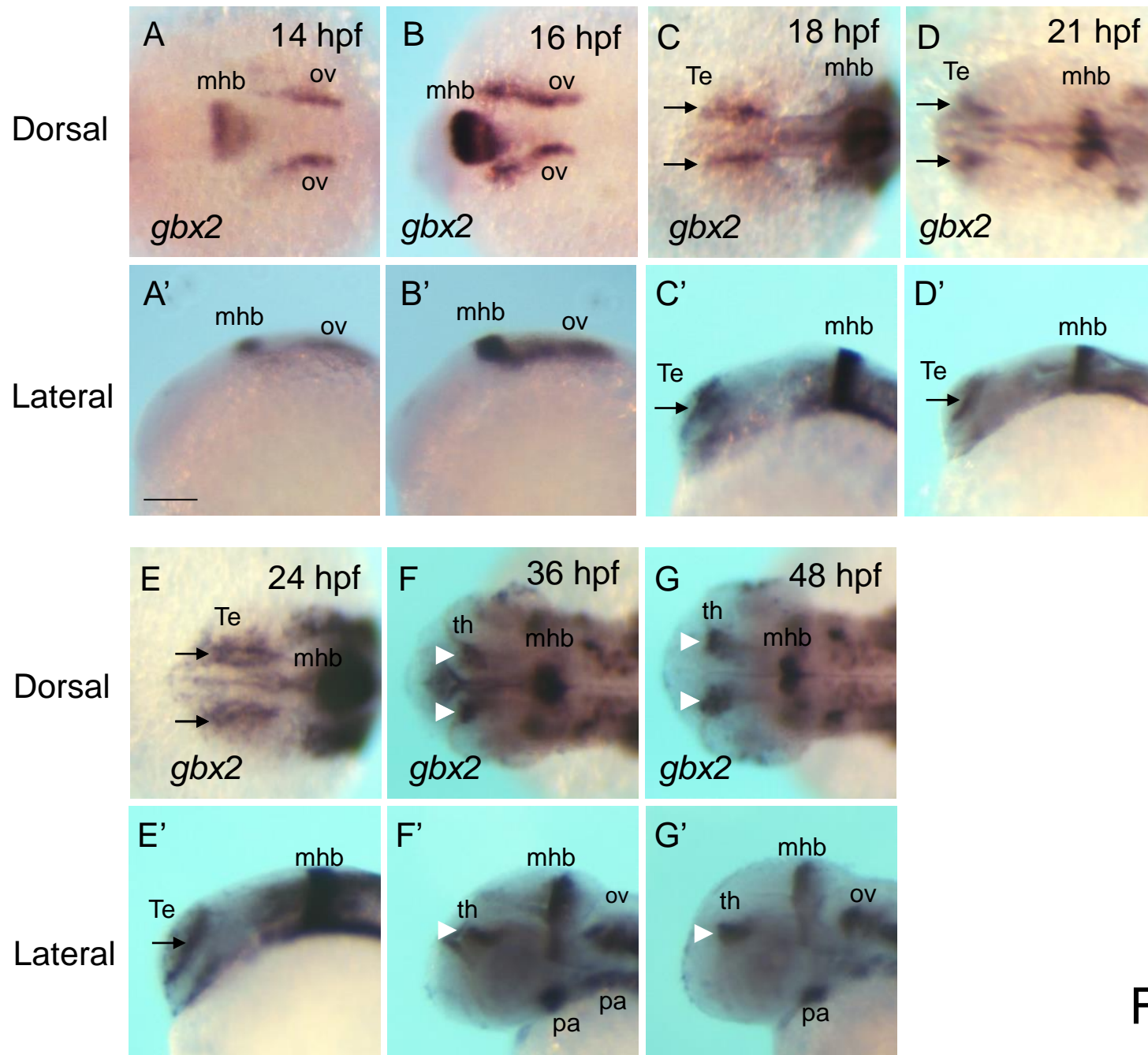


Figure 1

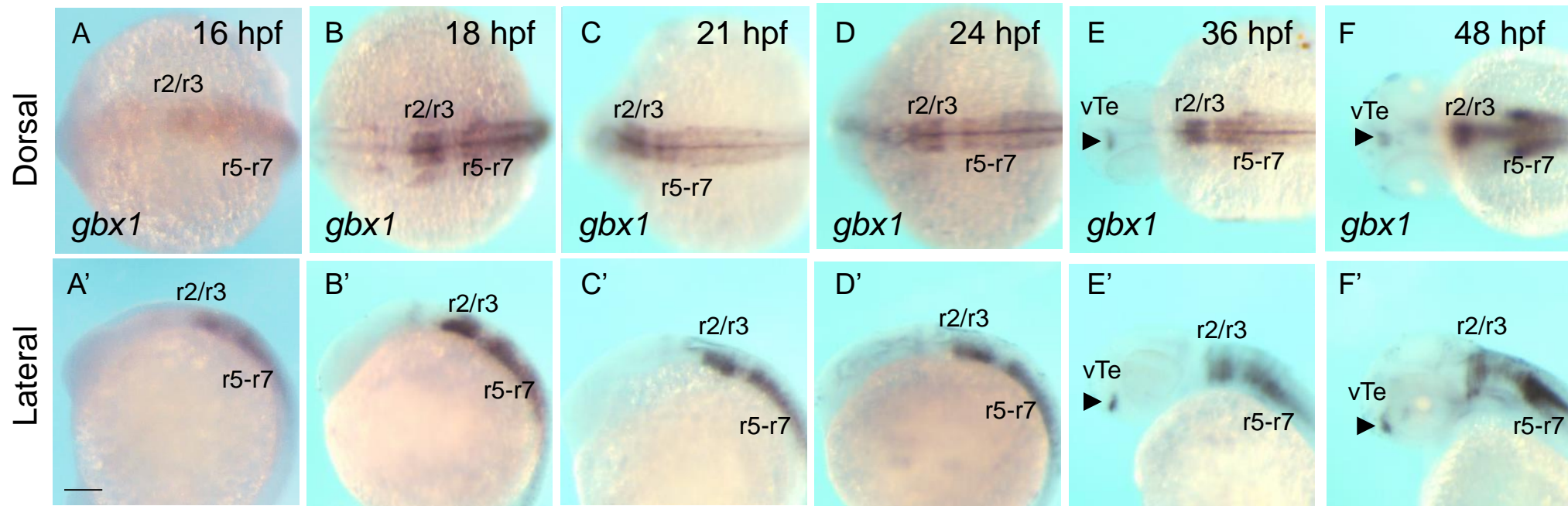


Figure 2

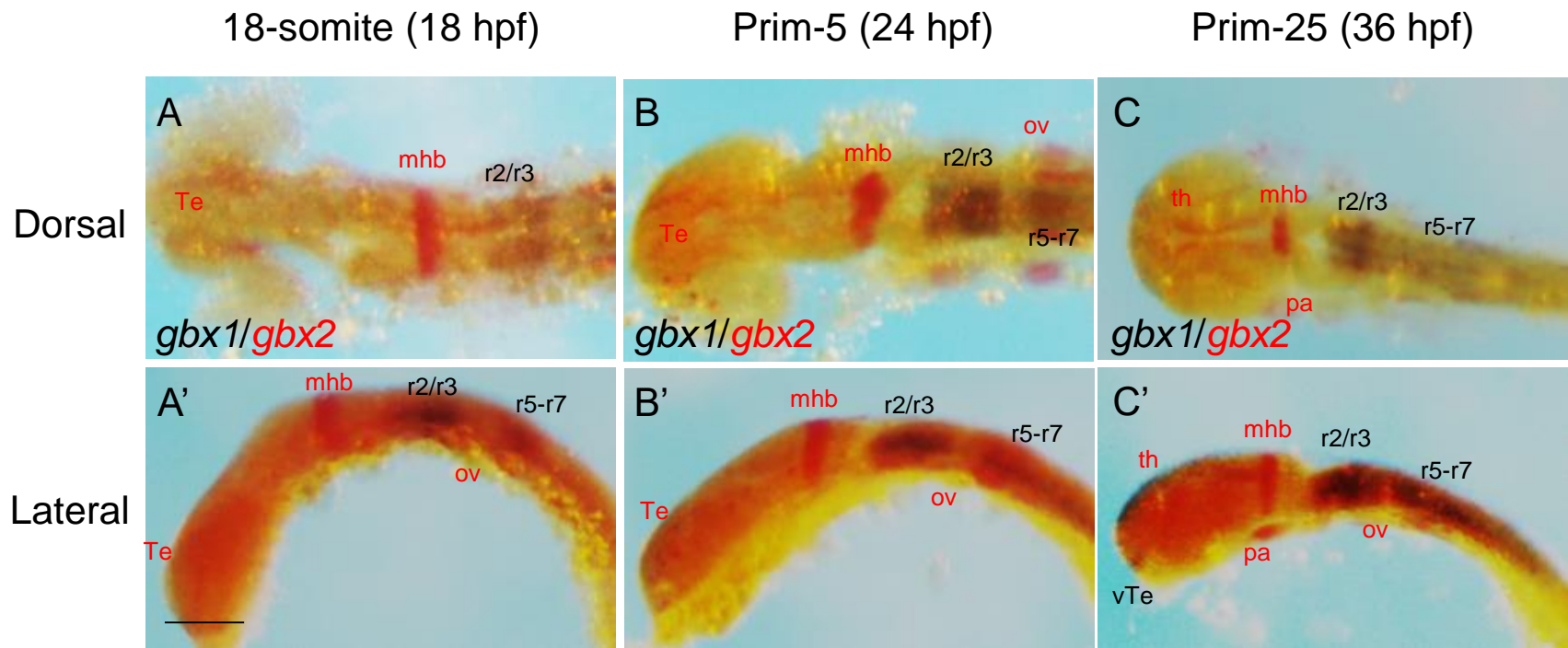


Figure 3

# A. Horizontal

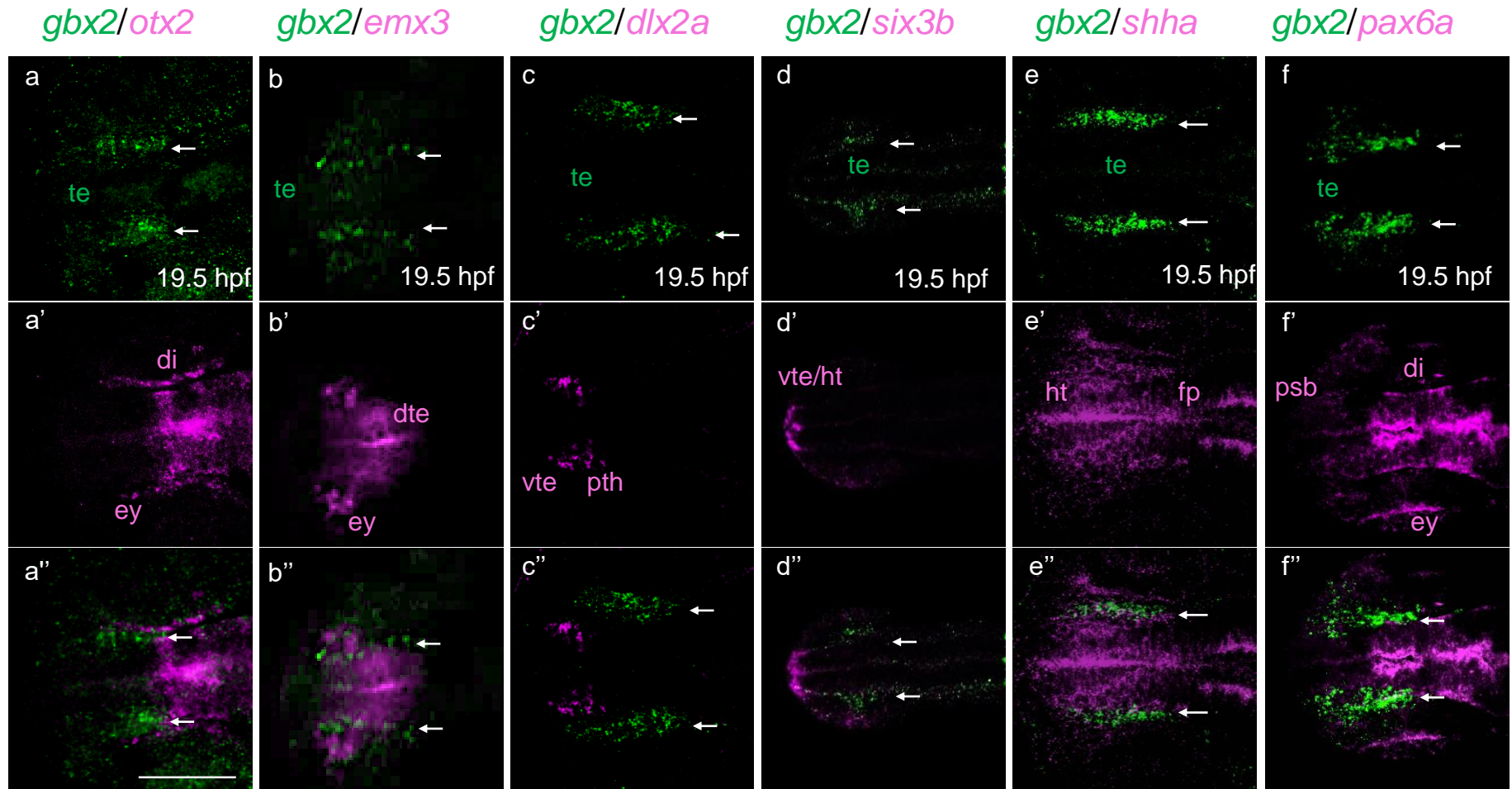


Figure 4

## B. Parasagittal

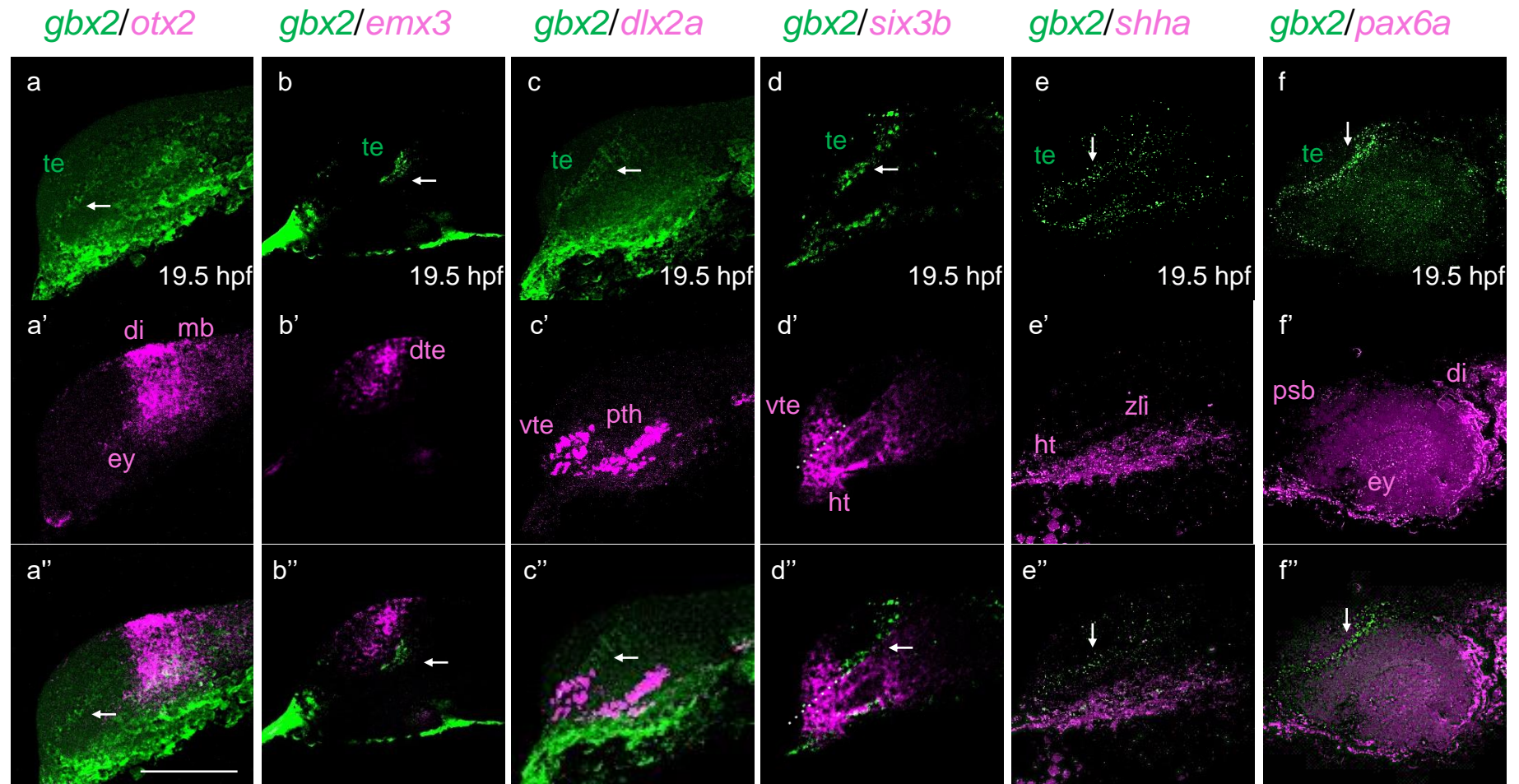


Figure 4



### C. Schematic views

■ *gbx2* ■ regional marker

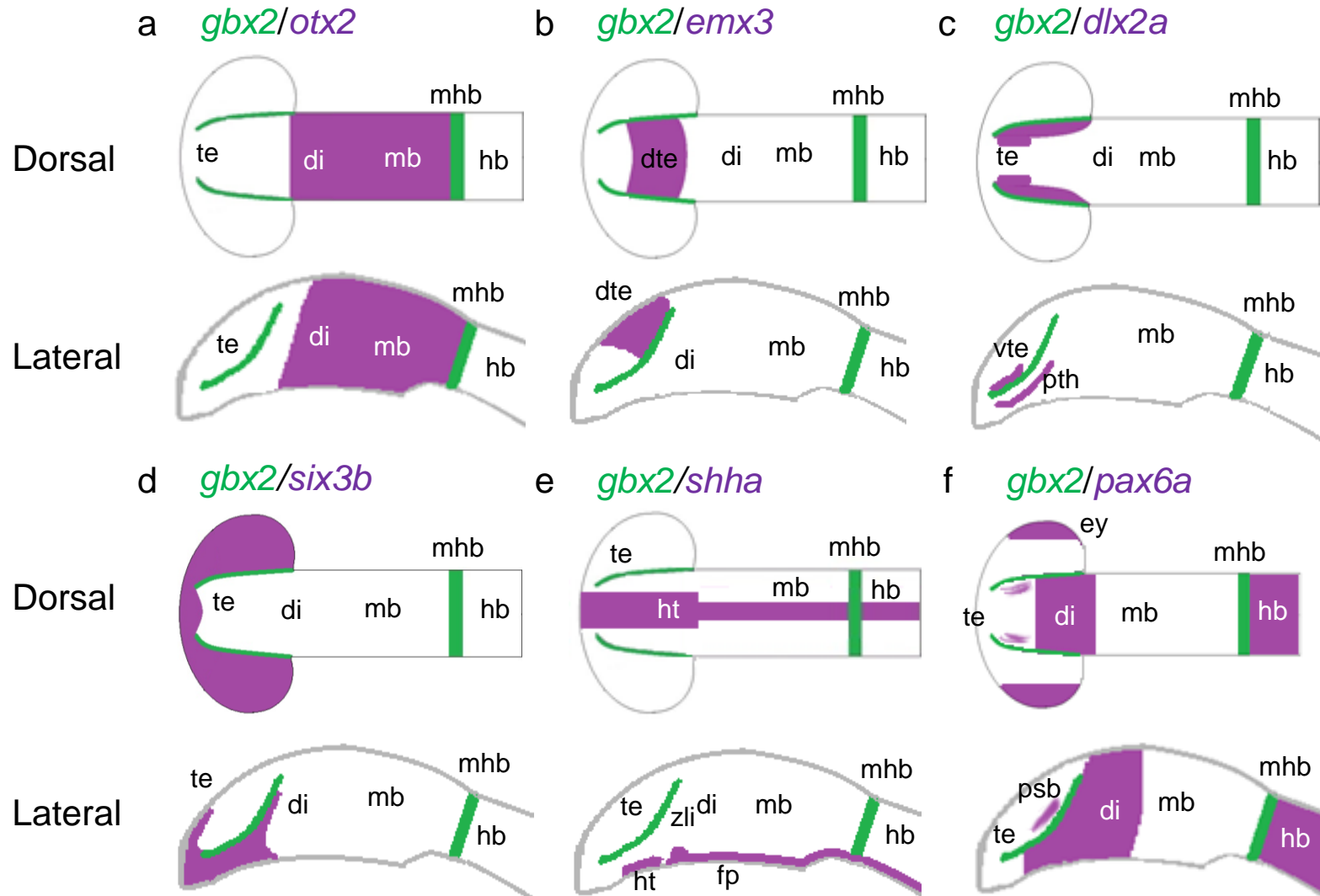


Figure 4

*Tg(gbx2:egfp)*

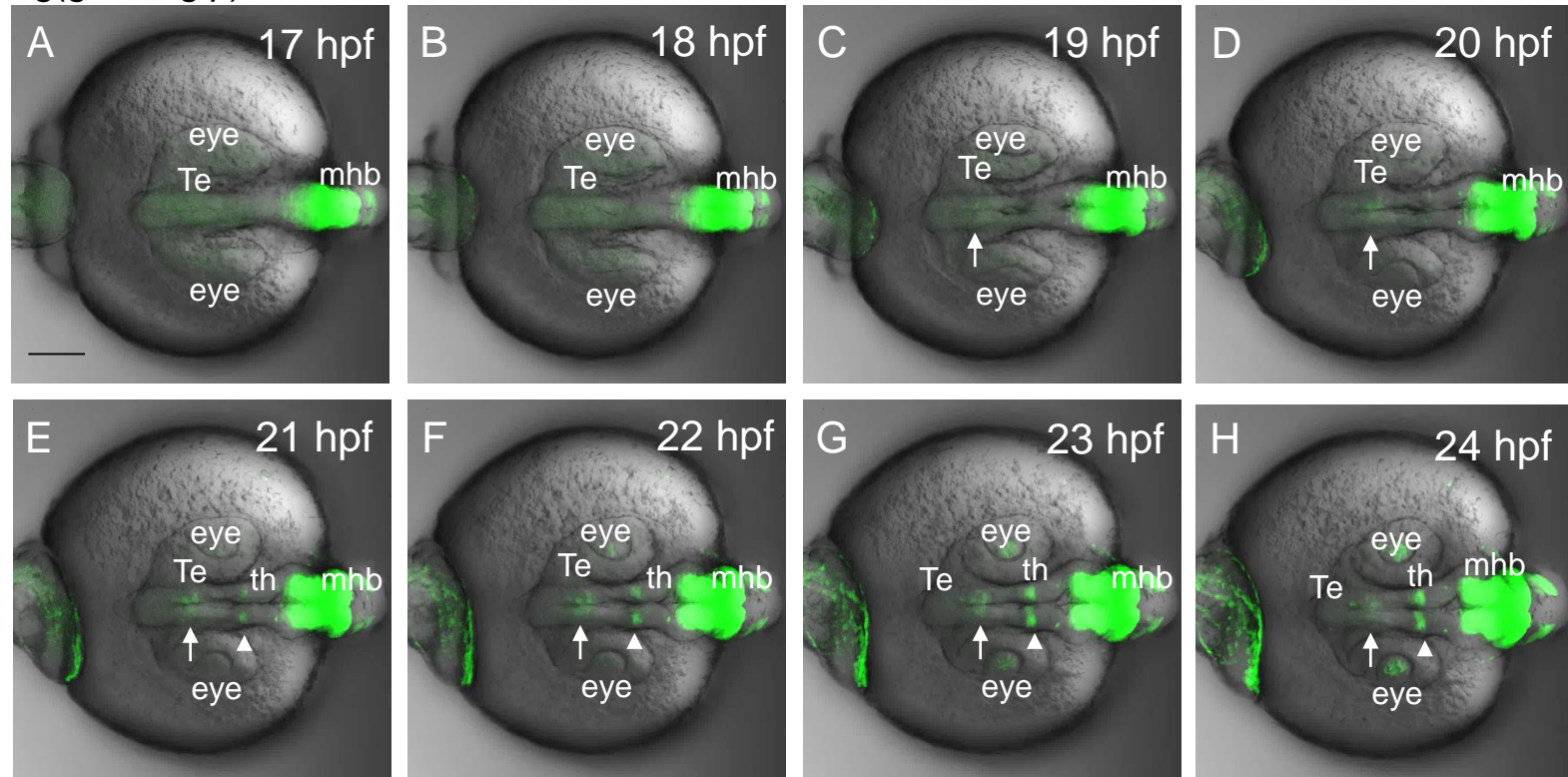


Figure 5

*Tg(gbx2:egfp)*

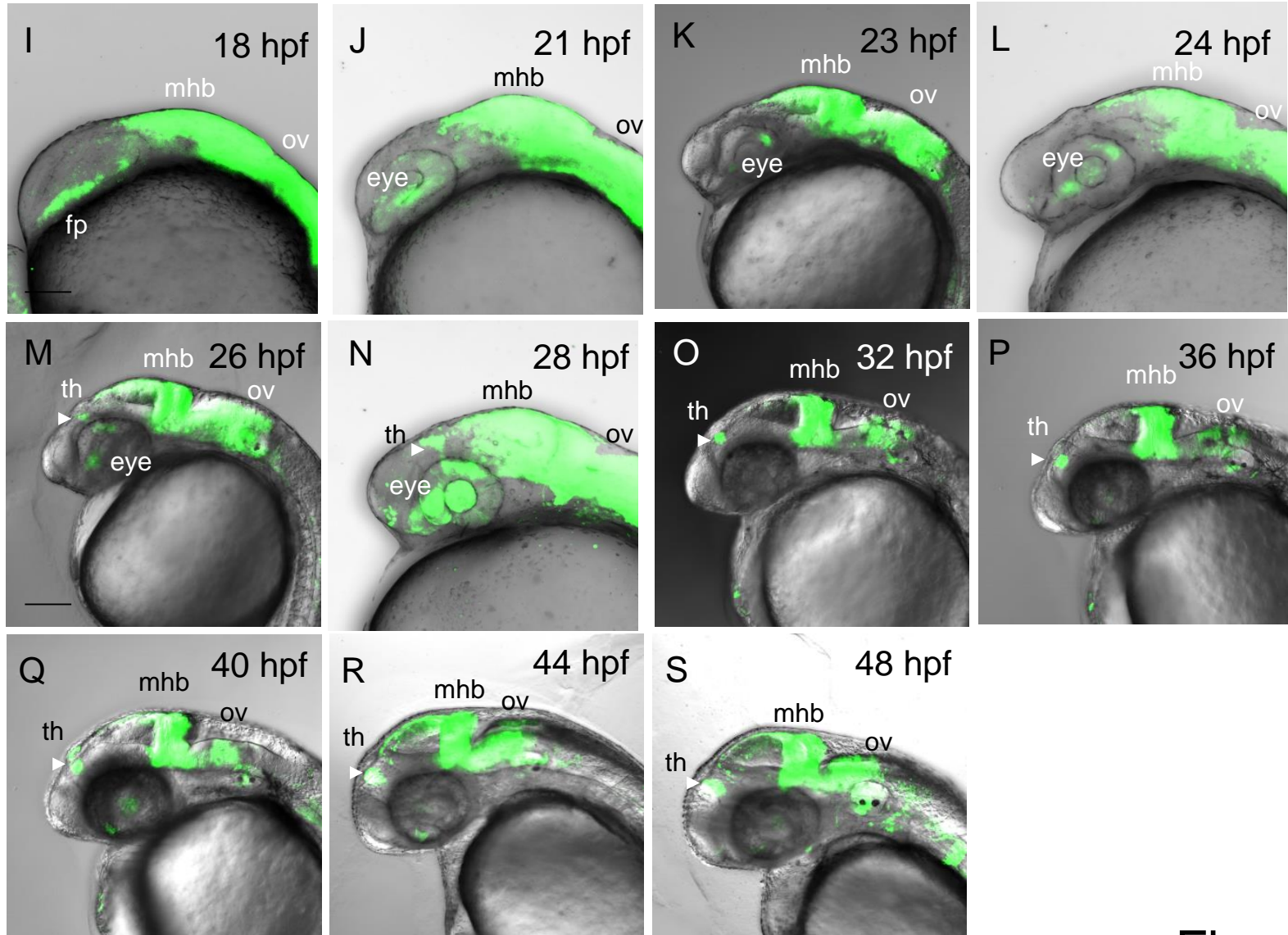


Figure 5

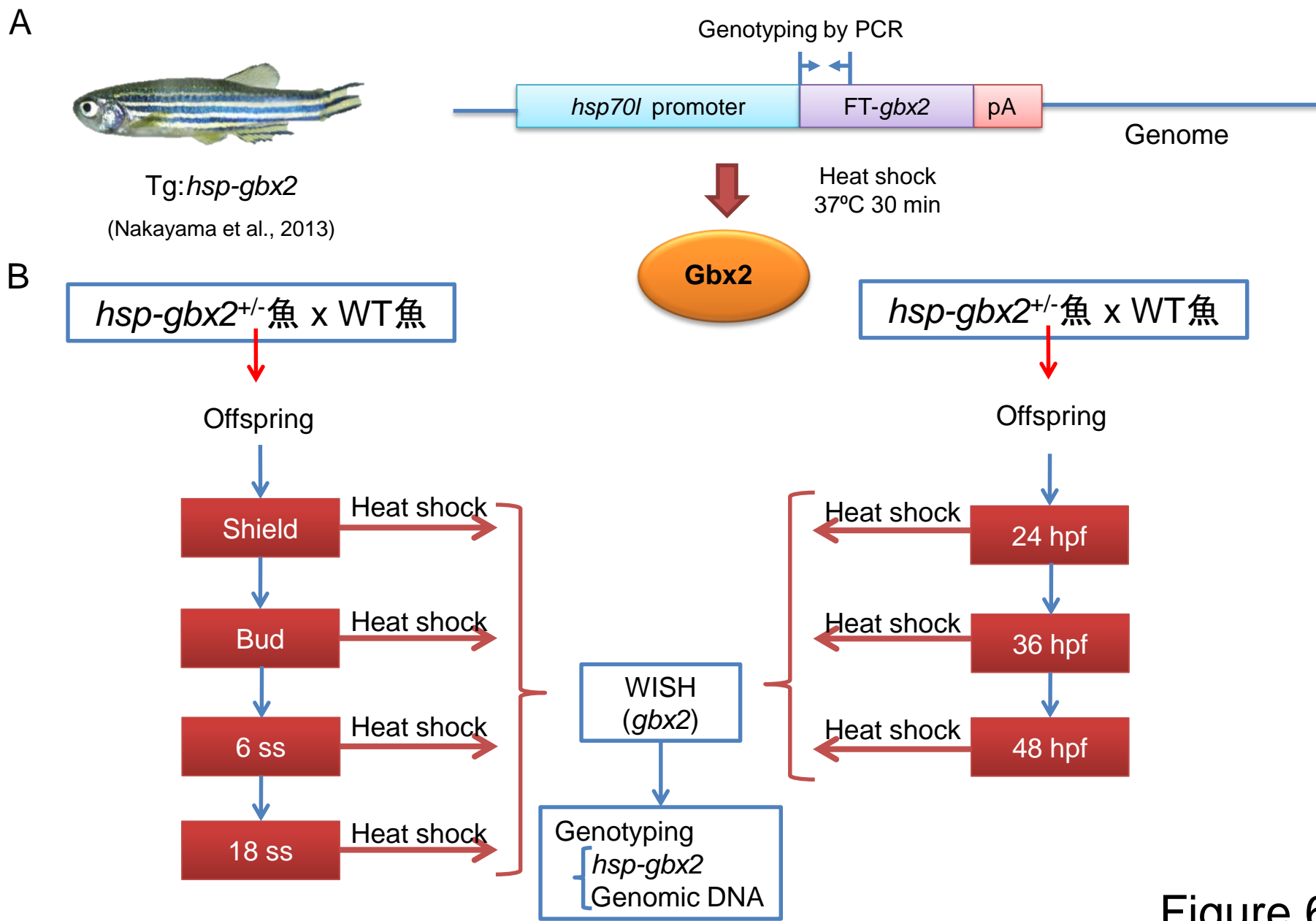
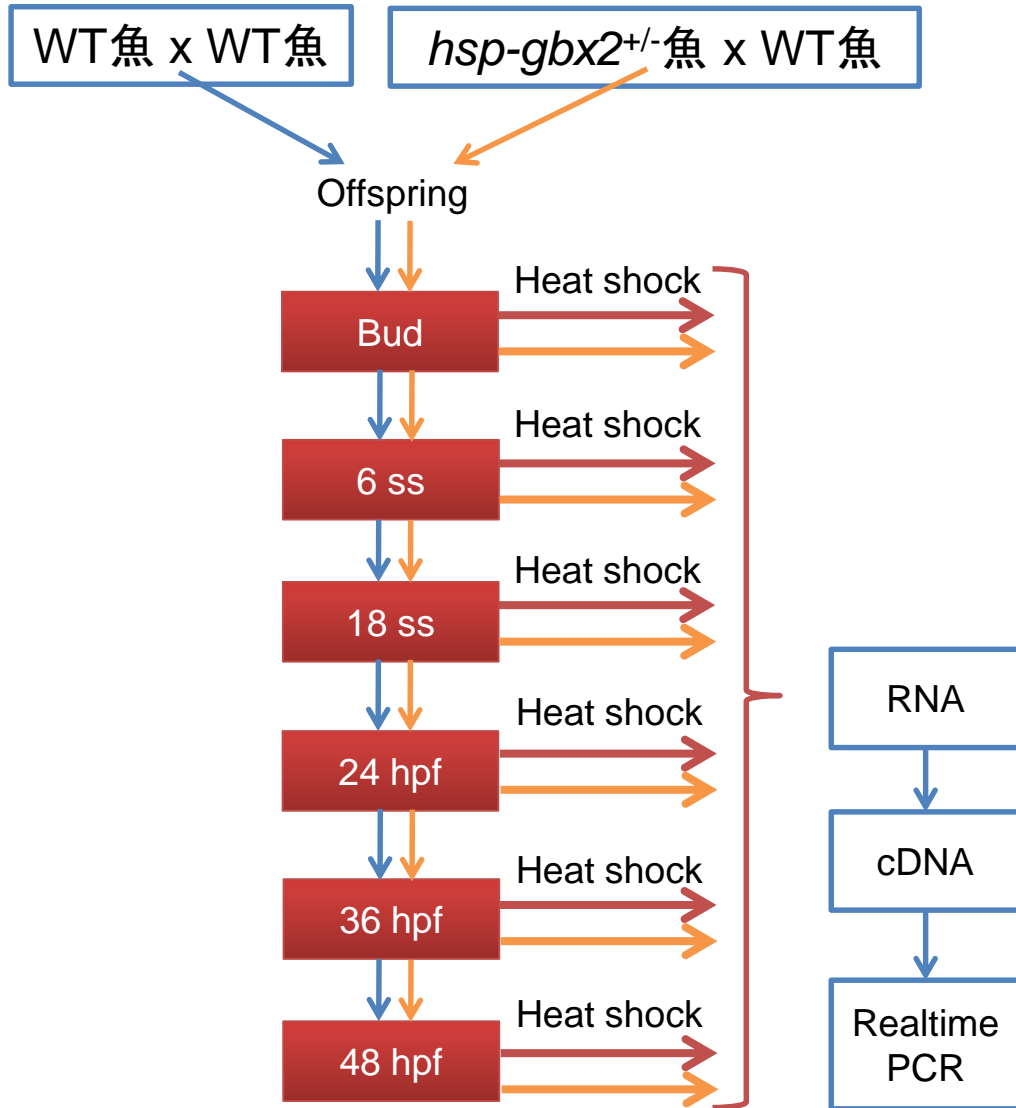


Figure 6

C



D

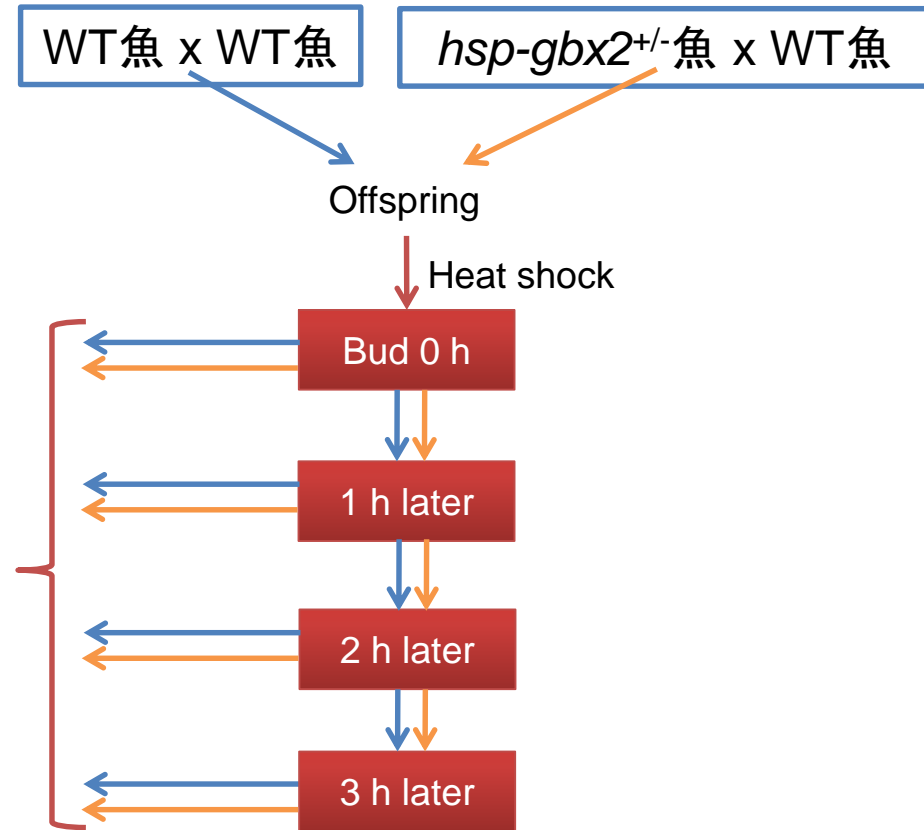


Figure 6

# Heat Shock Stage

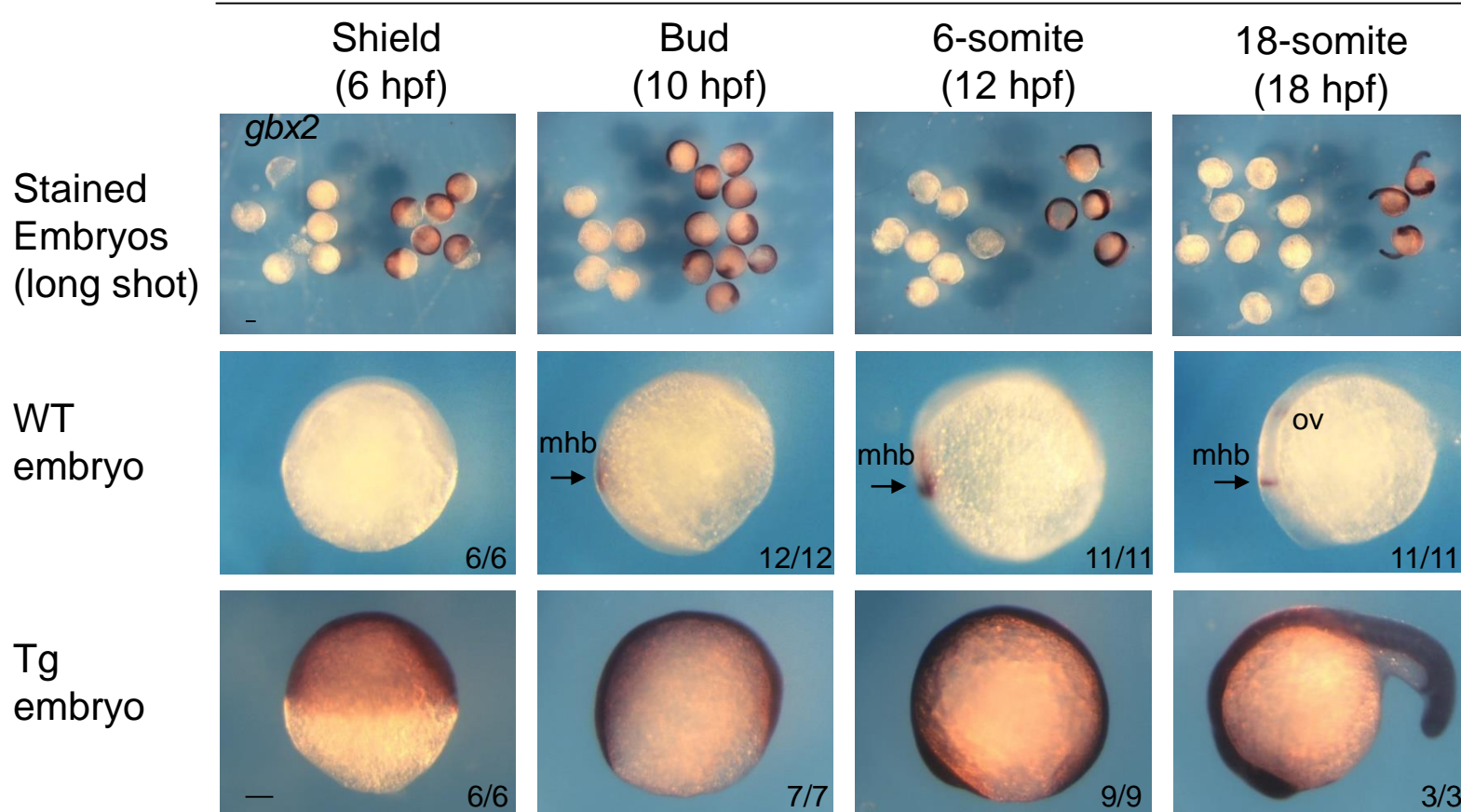


Figure 7

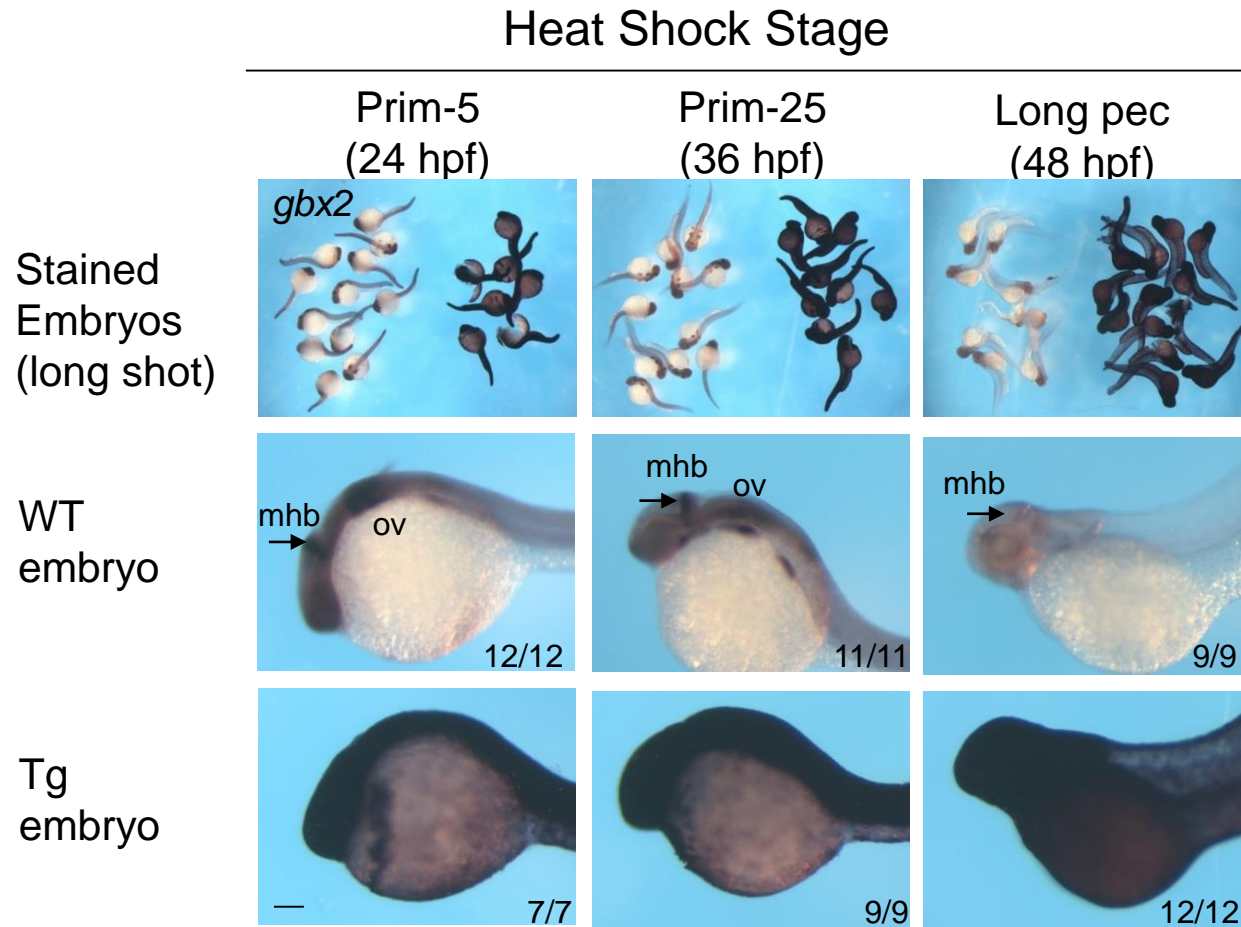
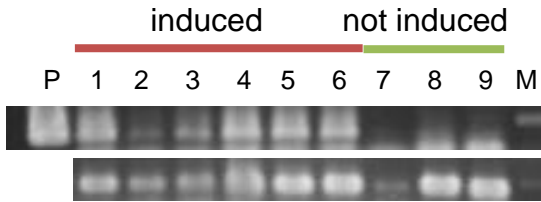
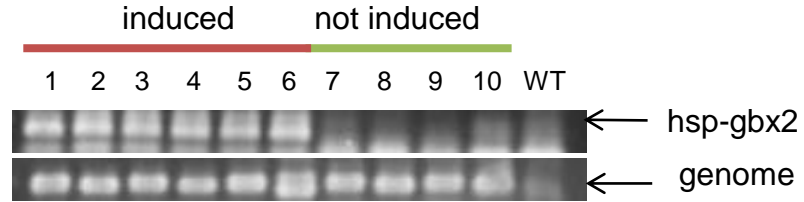


Figure 7

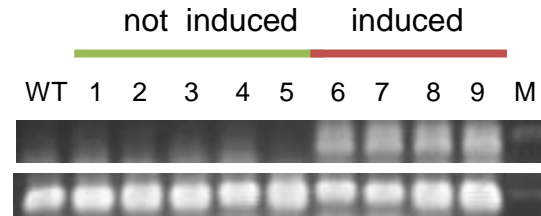
A. Shield (6 hpf)



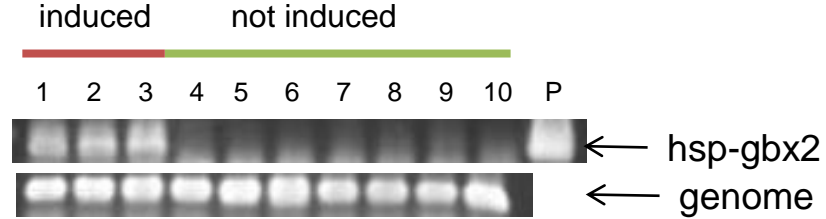
B. Bud (10 hpf)



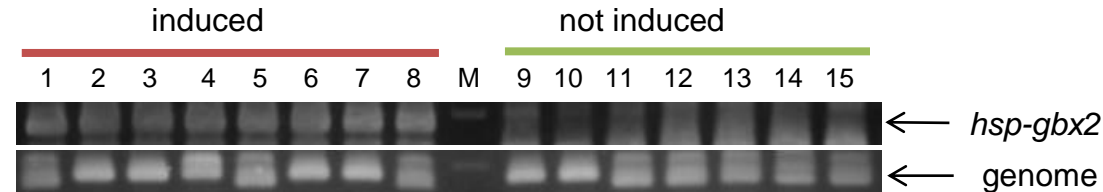
C. 6-somite (12 hpf)



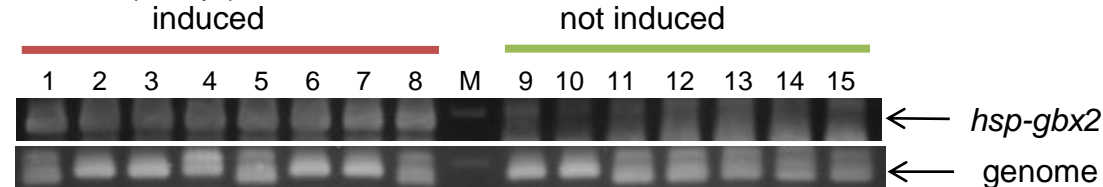
D. 18-somite (18 hpf)



E. Prim-5 (24 hpf)



F. Prim-25 (36 hpf)



G. Long pec (48 hpf)

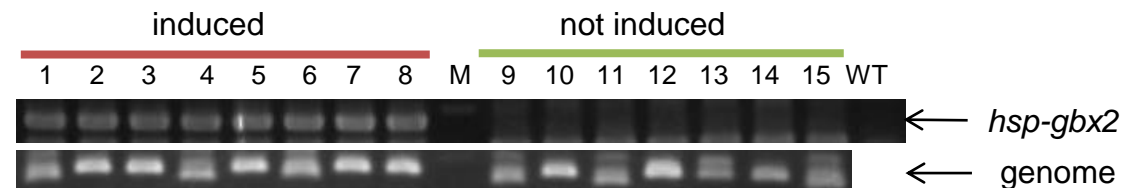


Figure 8



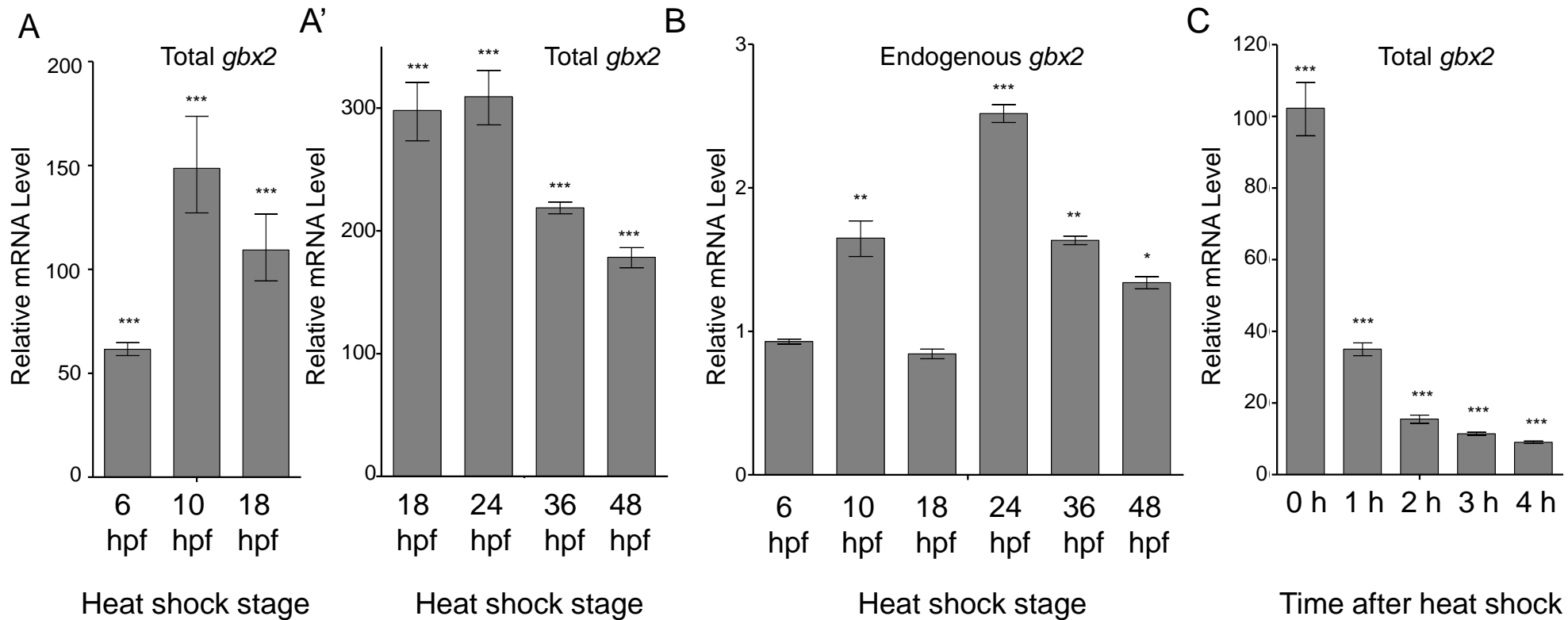


Figure 9

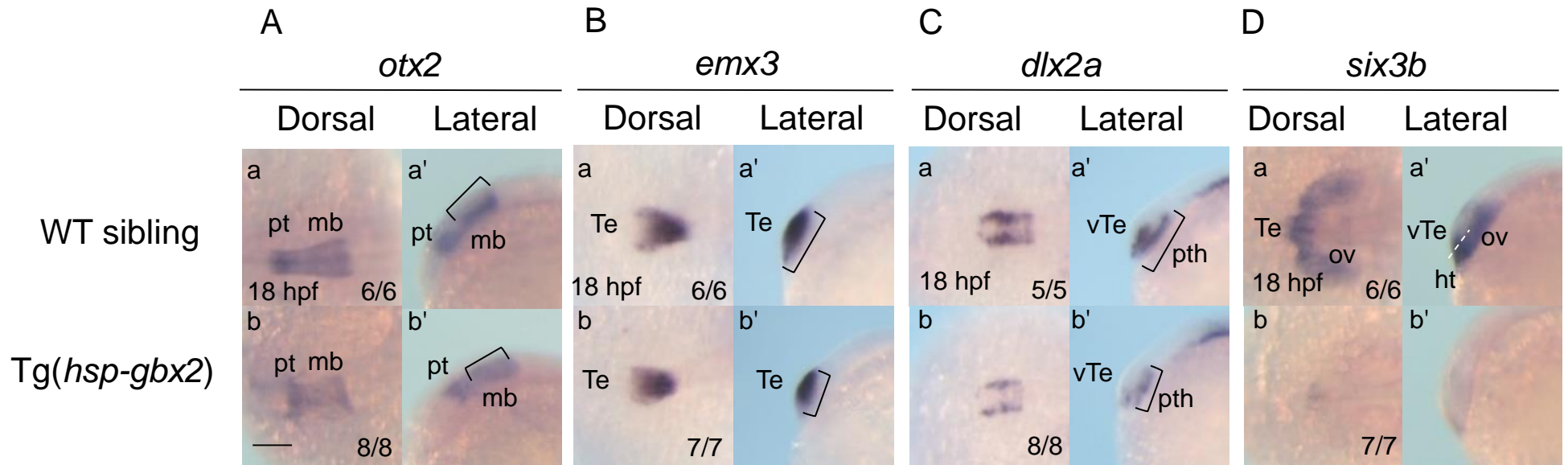
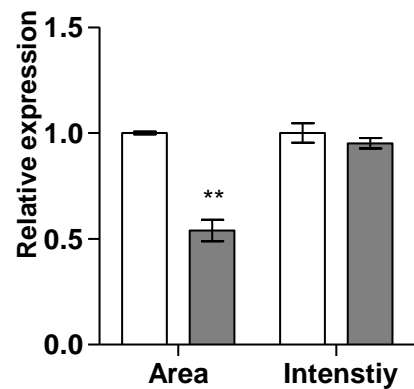
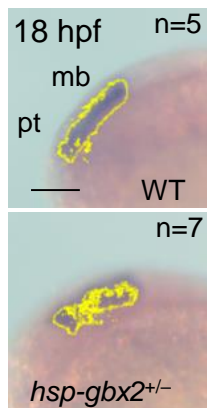
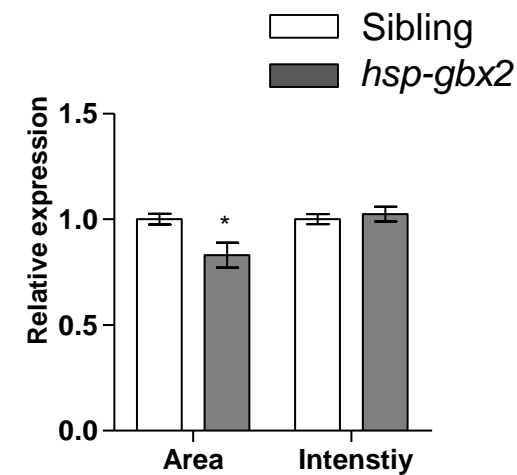
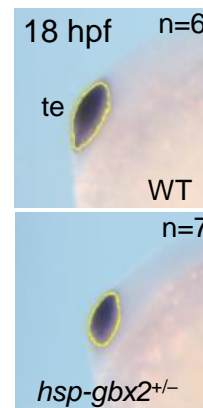


Figure 10

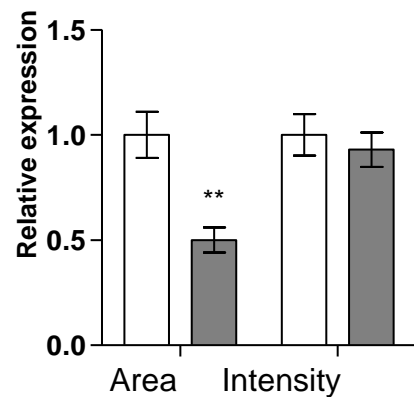
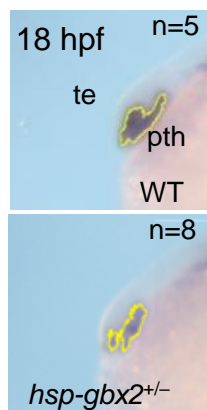
### A *otx2*



### B *emx3*



### C *dlx2a*



### D *six3b*

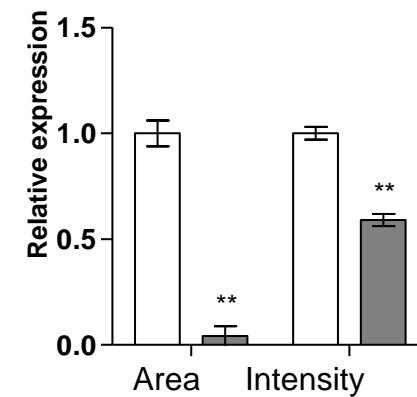
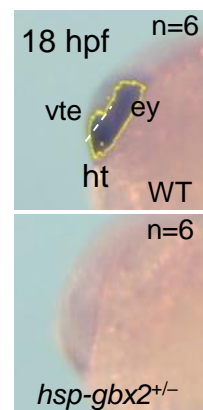


Figure 11

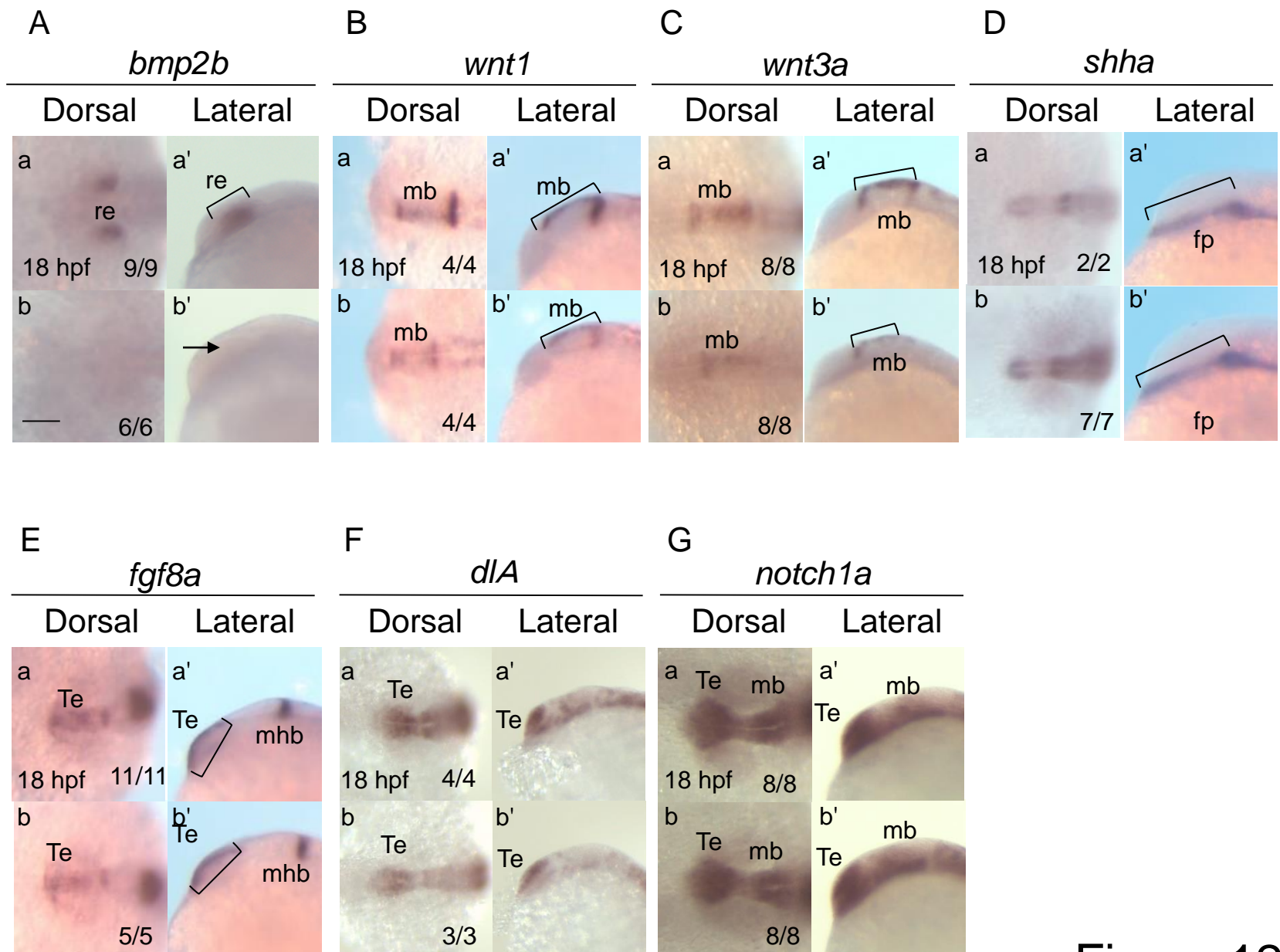
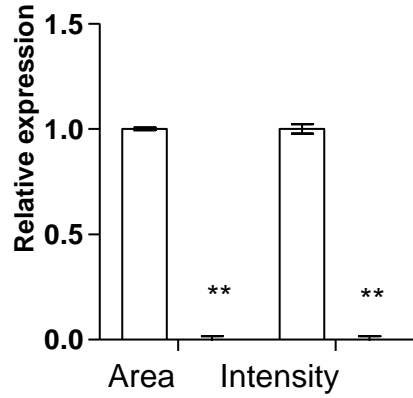
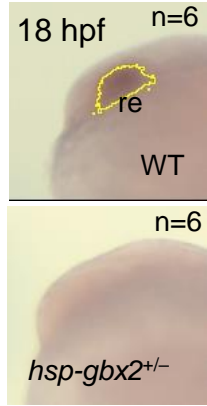
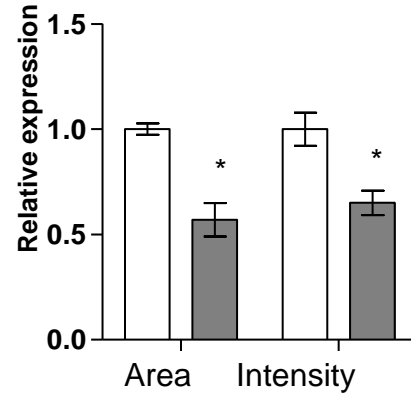


Figure 12

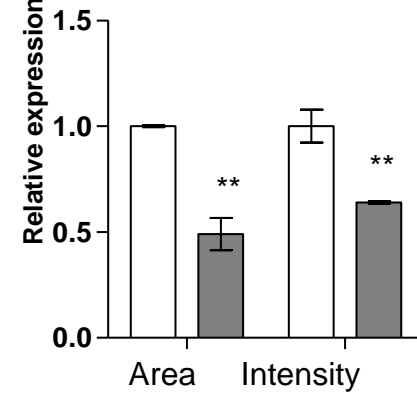
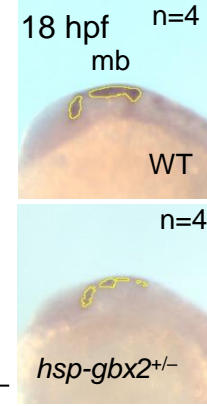
### A *bmp2b*



### B *wnt1*

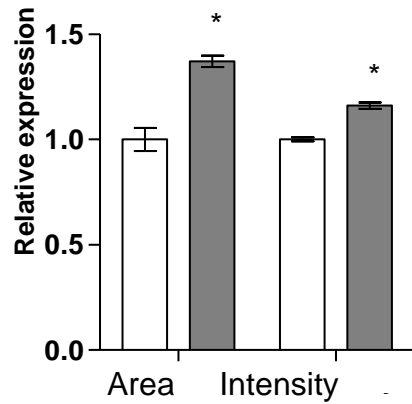
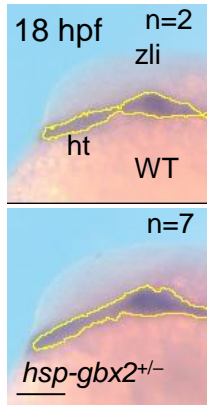


### C *wnt3a*



□ Sibling  
 ■ *hsp-gbx2*

### D *shha*



### E *fgf8a*

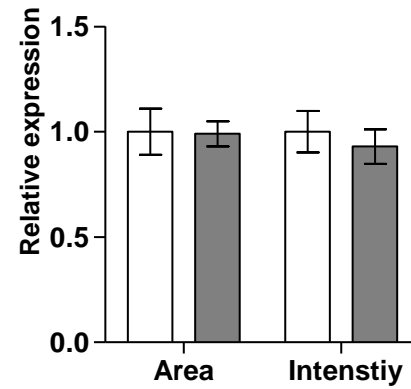
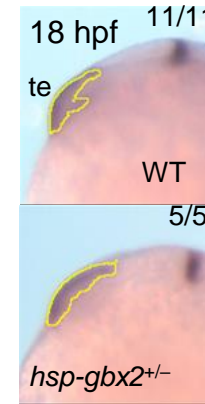


Figure 13

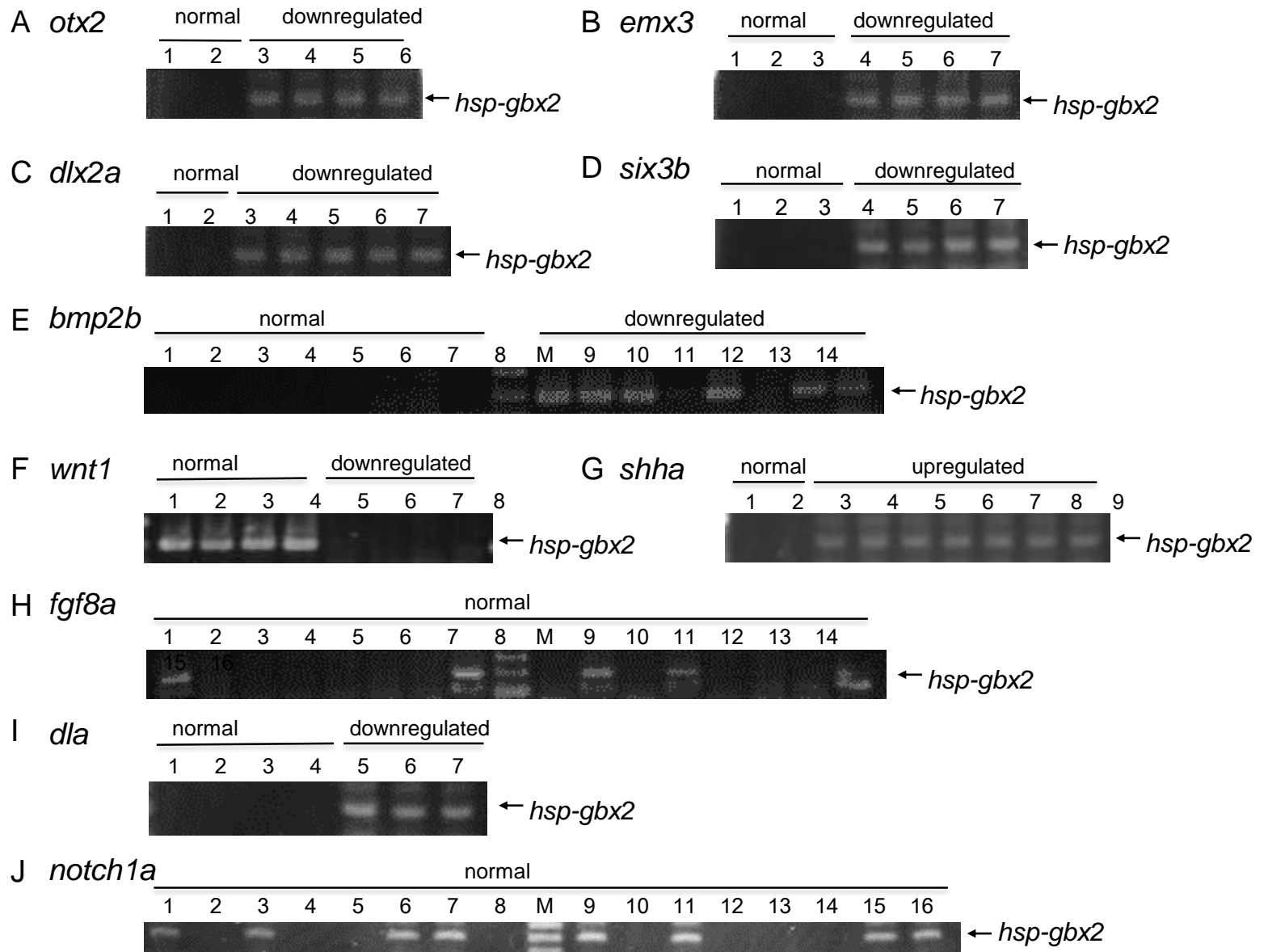


Figure 14

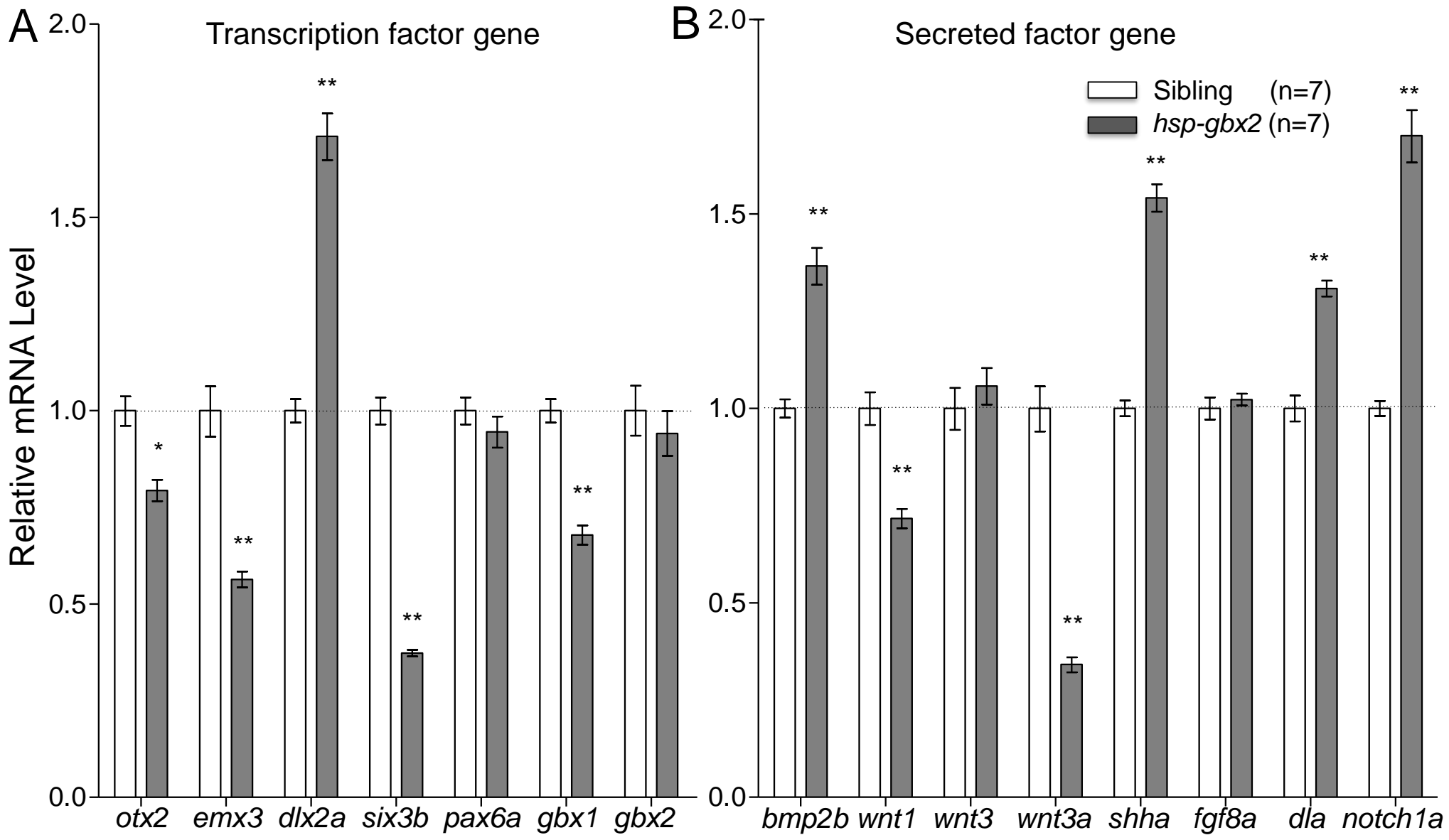


Figure 15

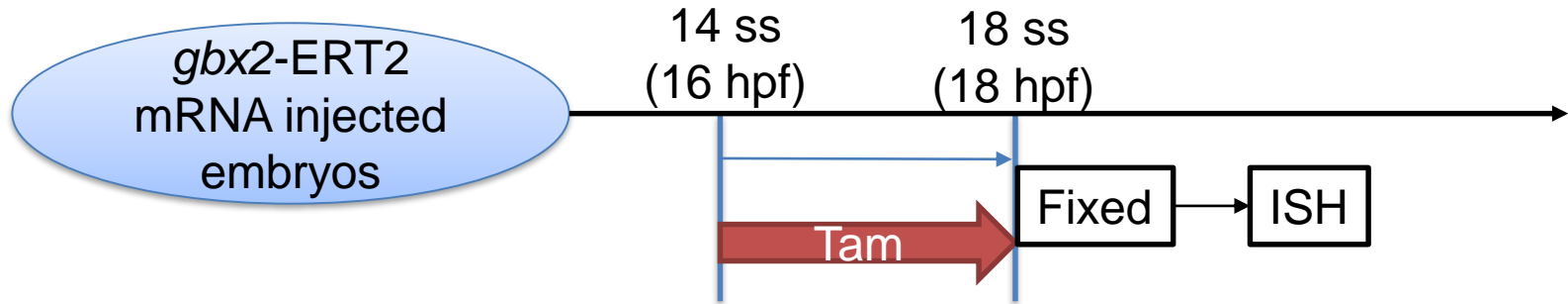
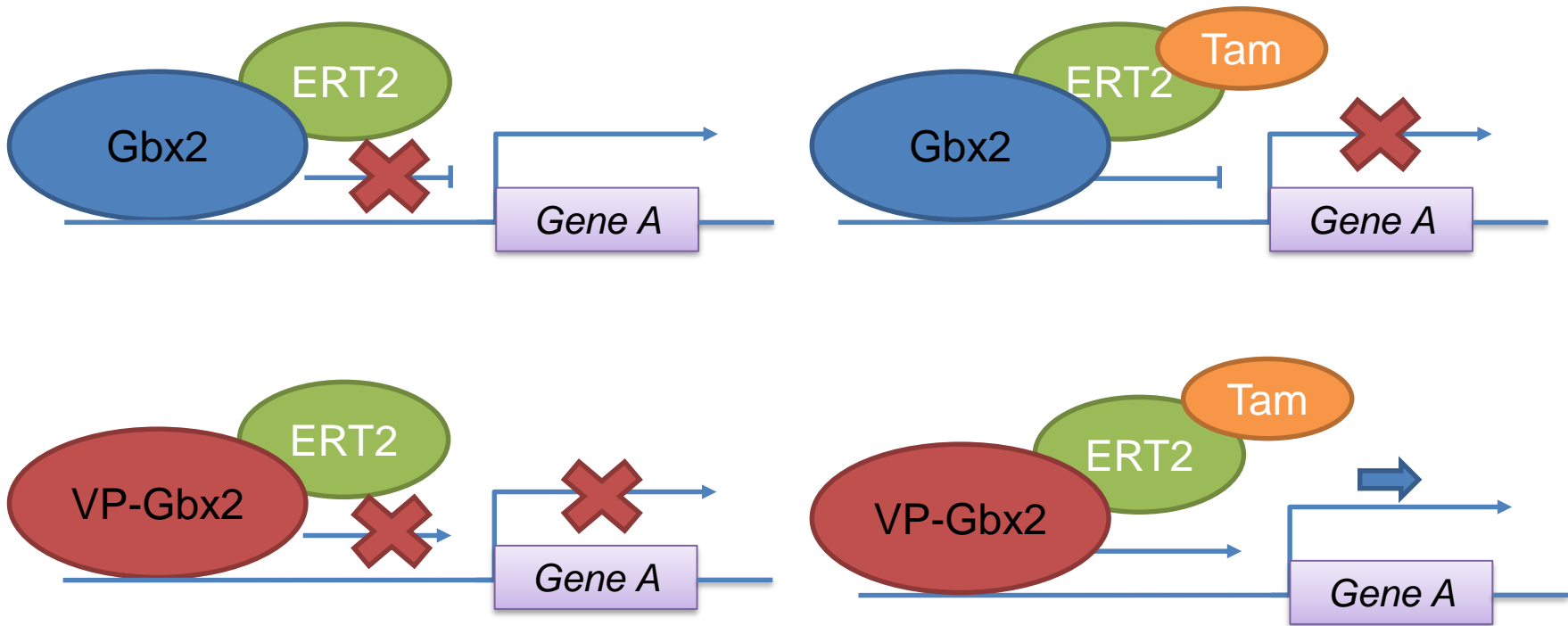


Figure 16



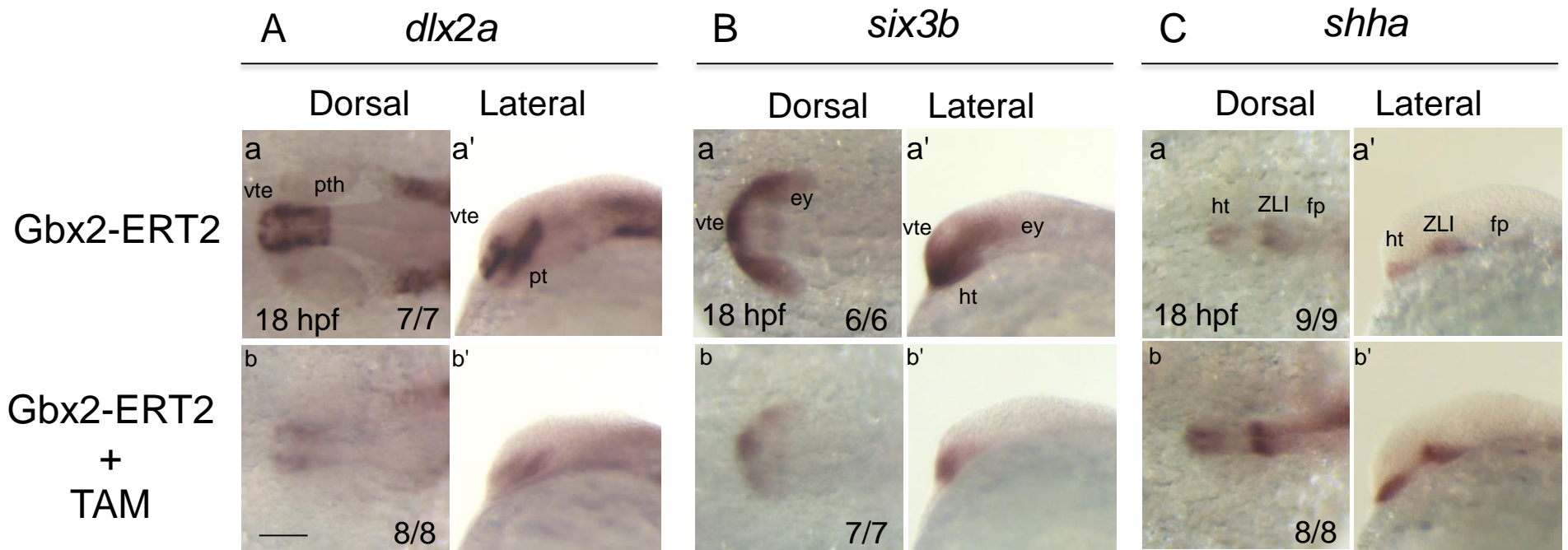
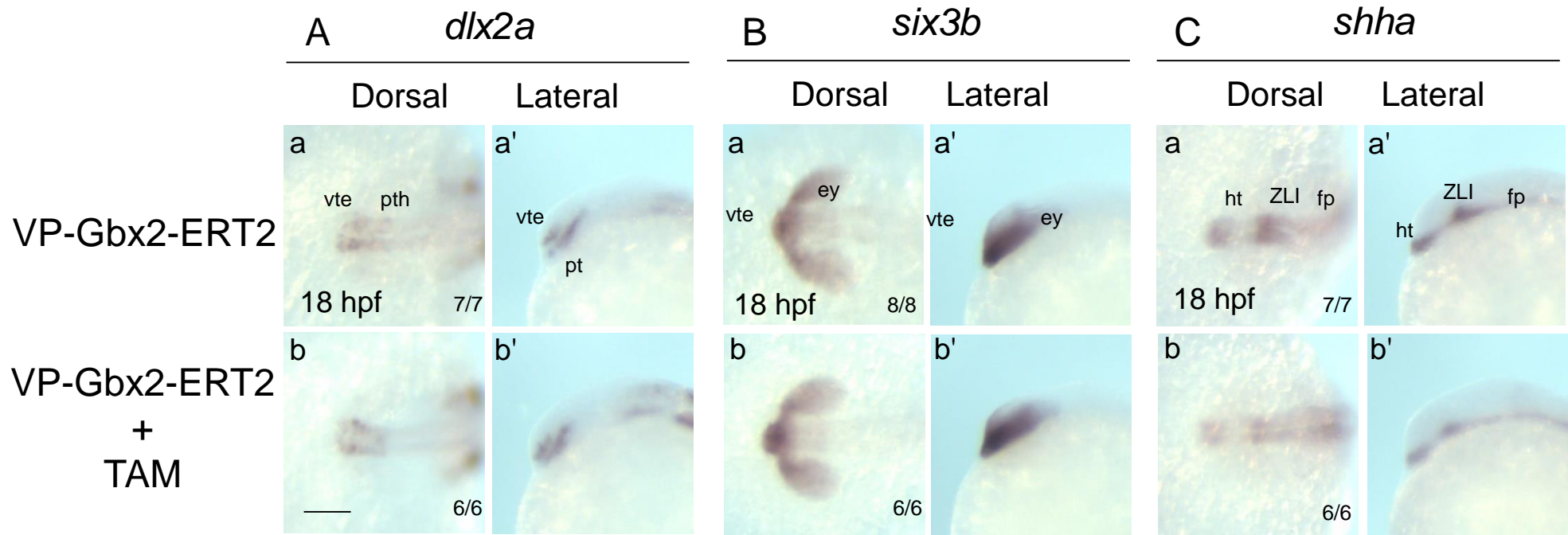
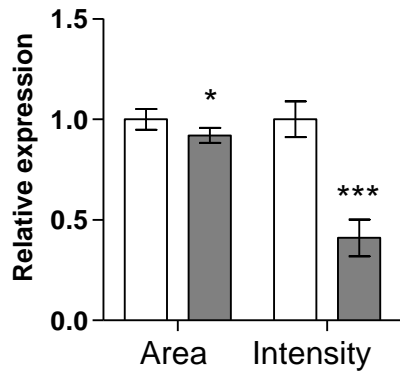
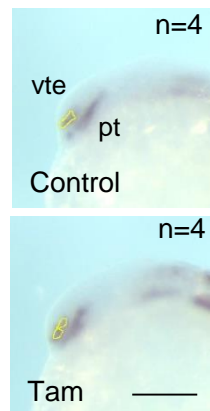


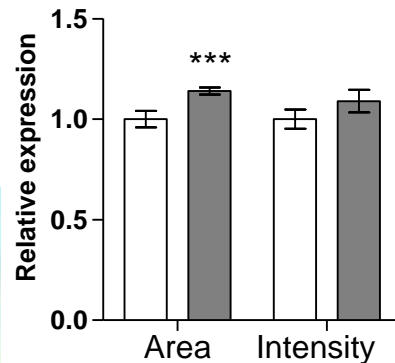
Figure 17



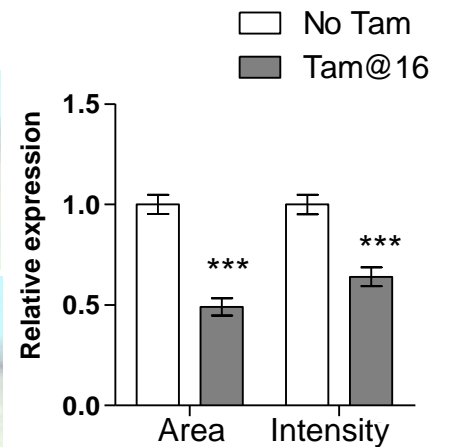
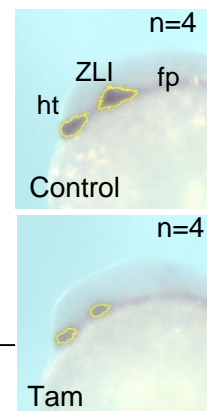
**D** *dlx2a*



**E** *six3b*



**F** *shha*



**Figure 18**

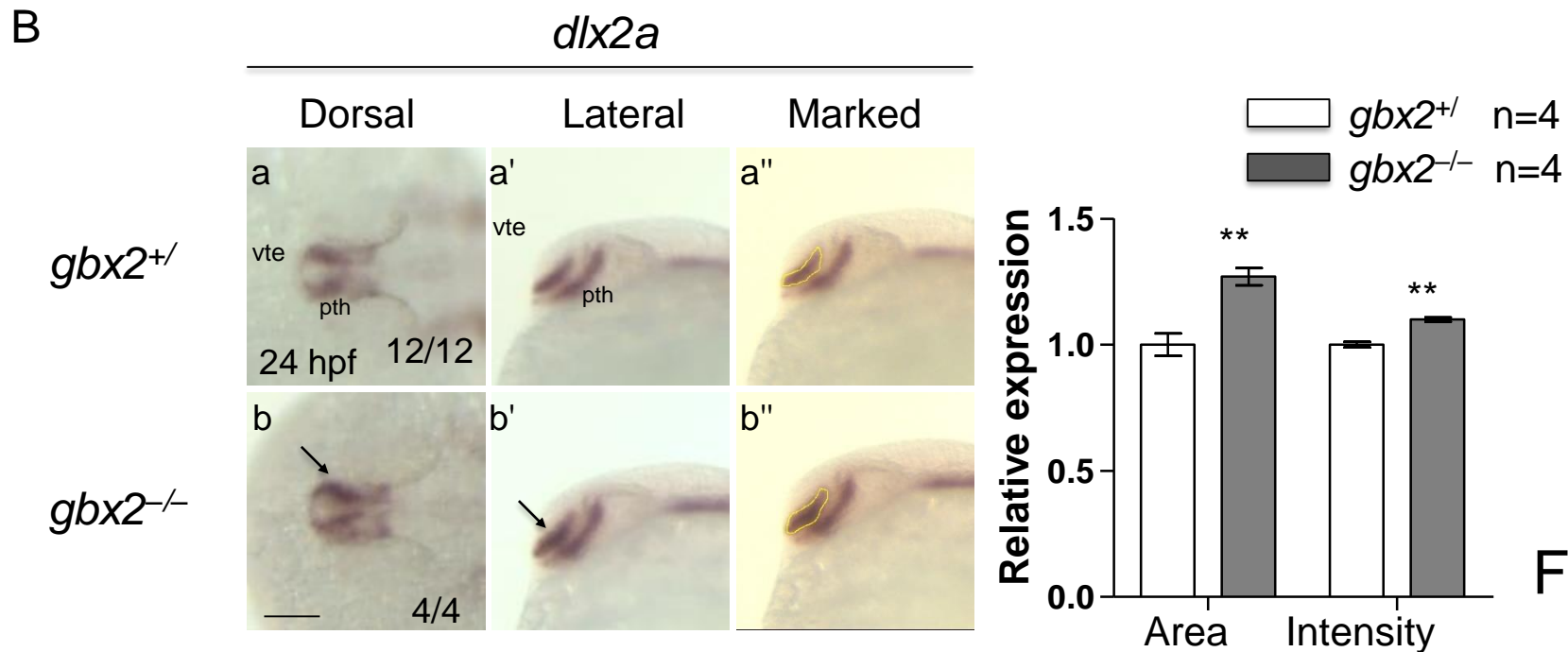
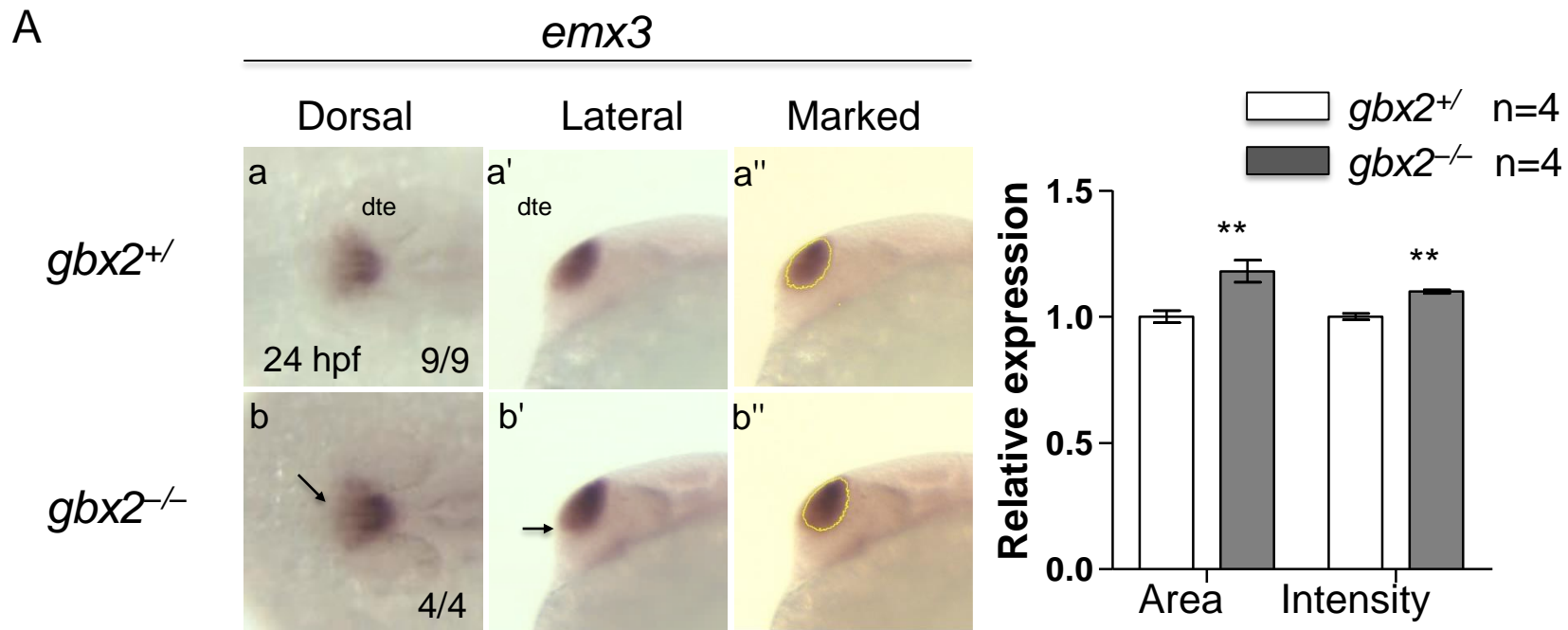


Figure 19

C

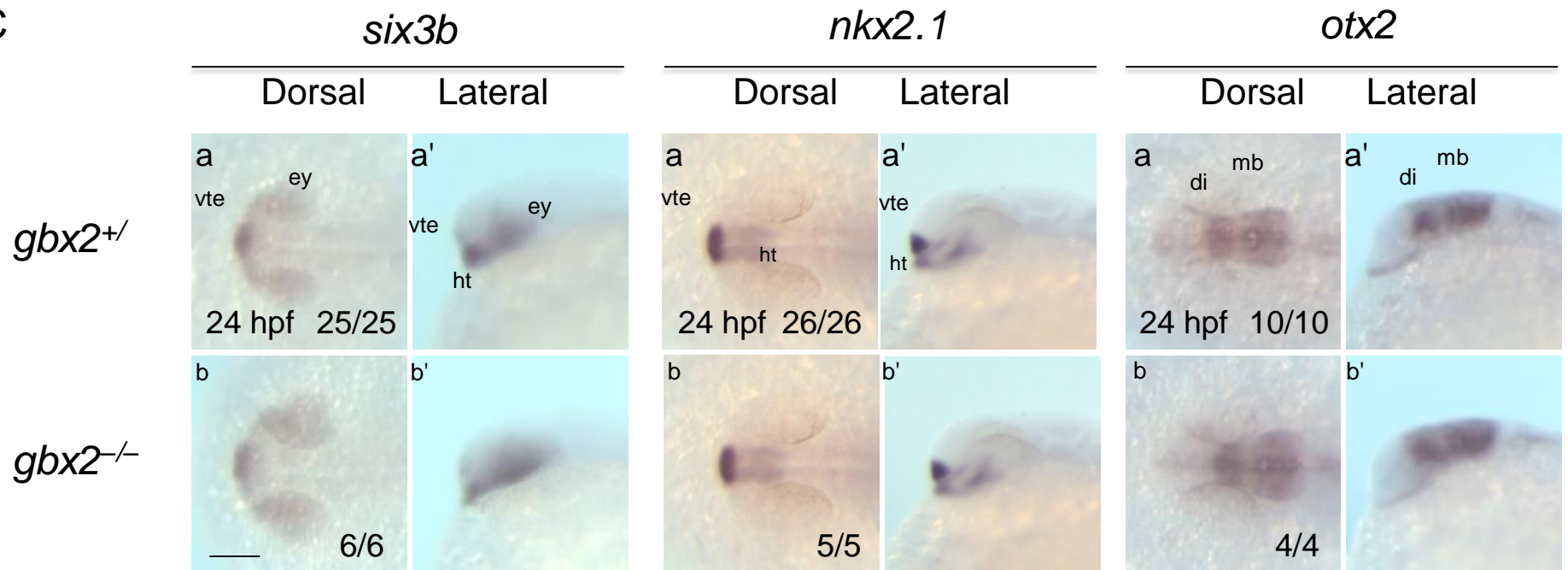


Figure 19

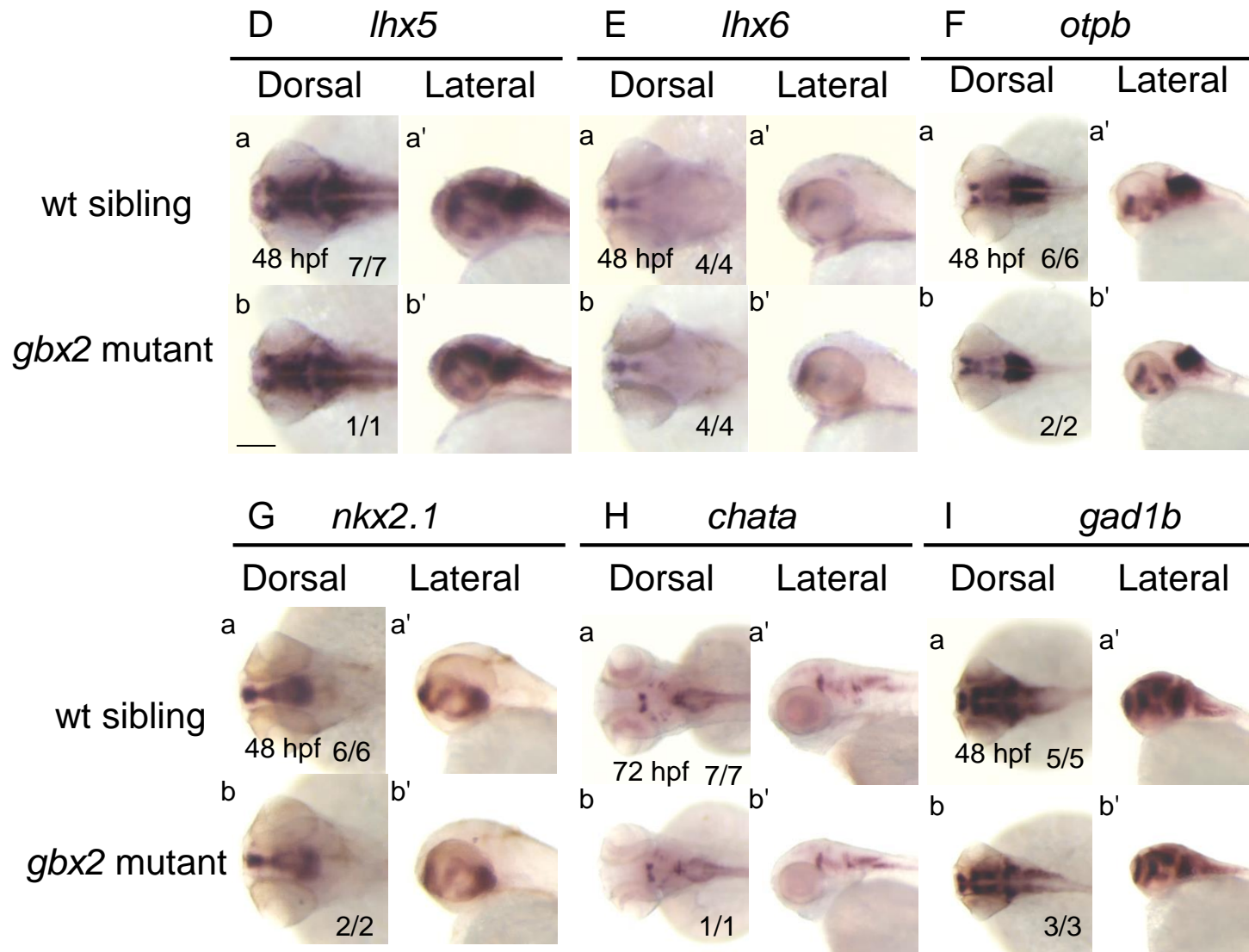
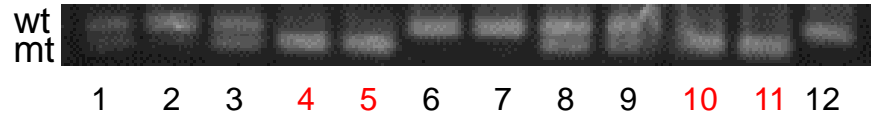
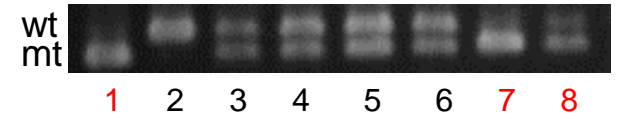


Figure 19

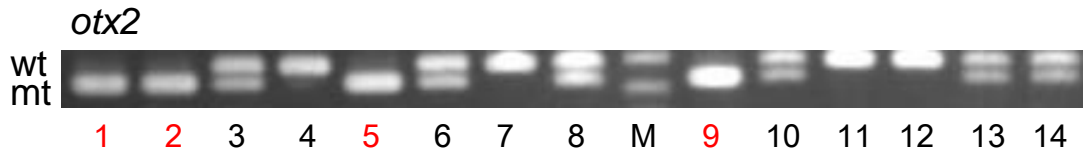
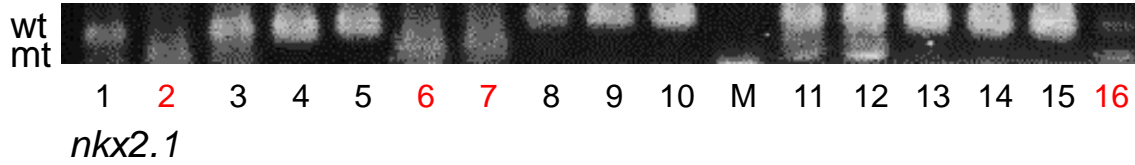
A *emx3*



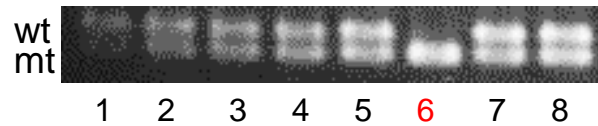
B *dlx2a*



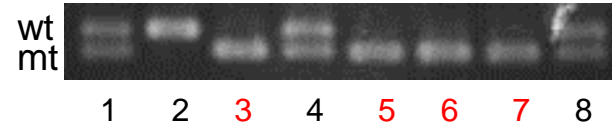
C *six3b*



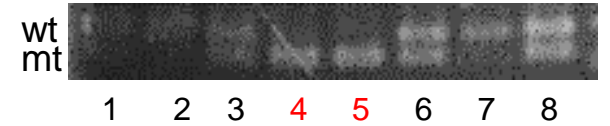
D *lhx5*



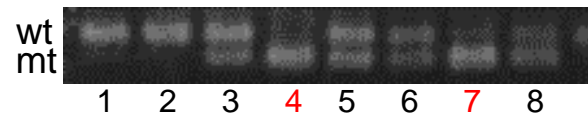
E *lhx6*



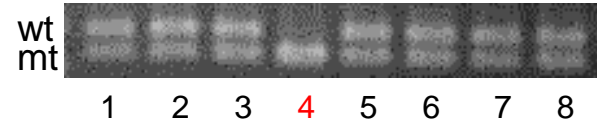
F *otpb*



G *nkx2.1*



H *chata*



I *gad1b*

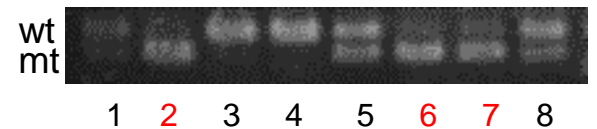


Figure 20

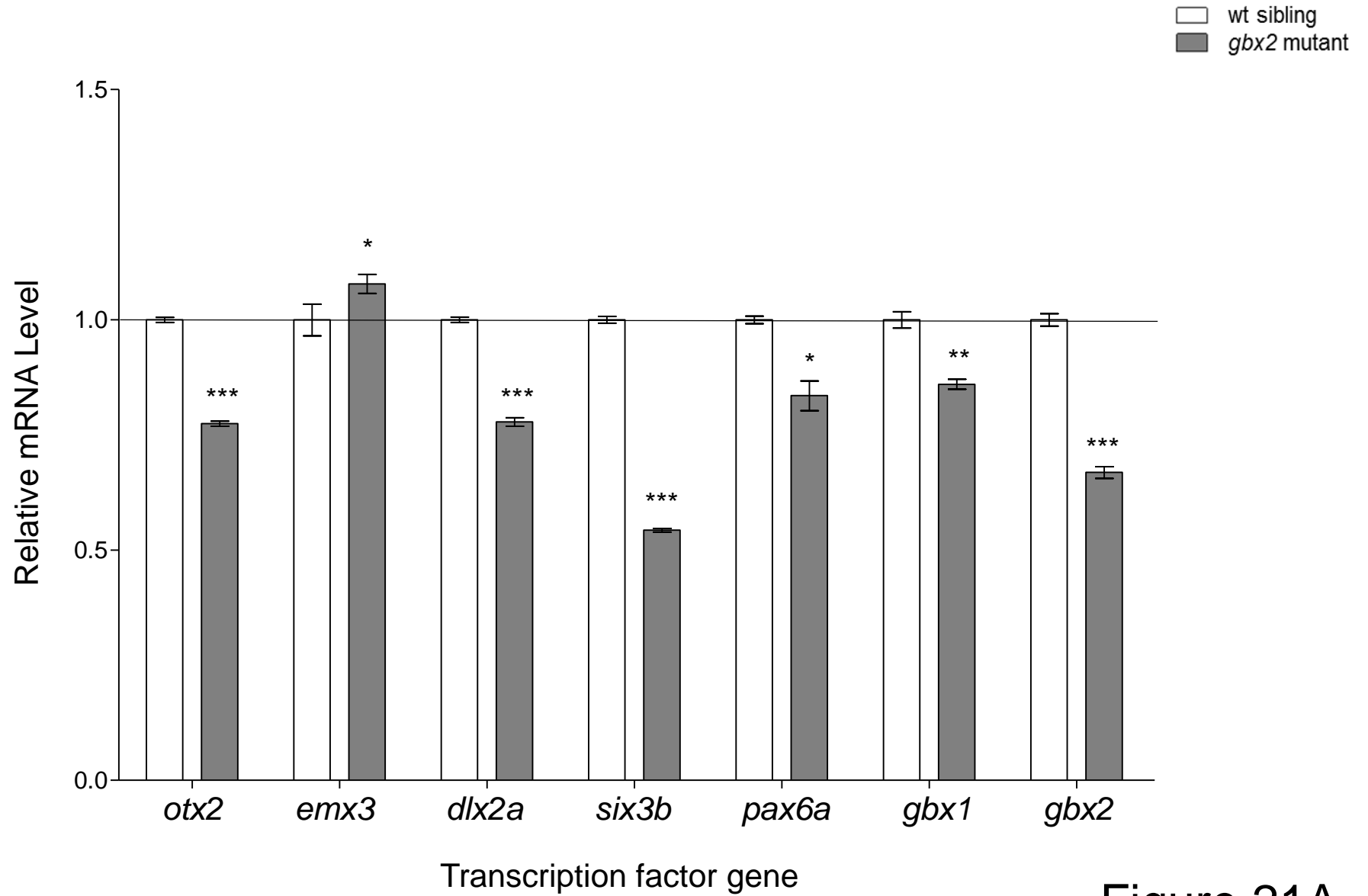


Figure 21A

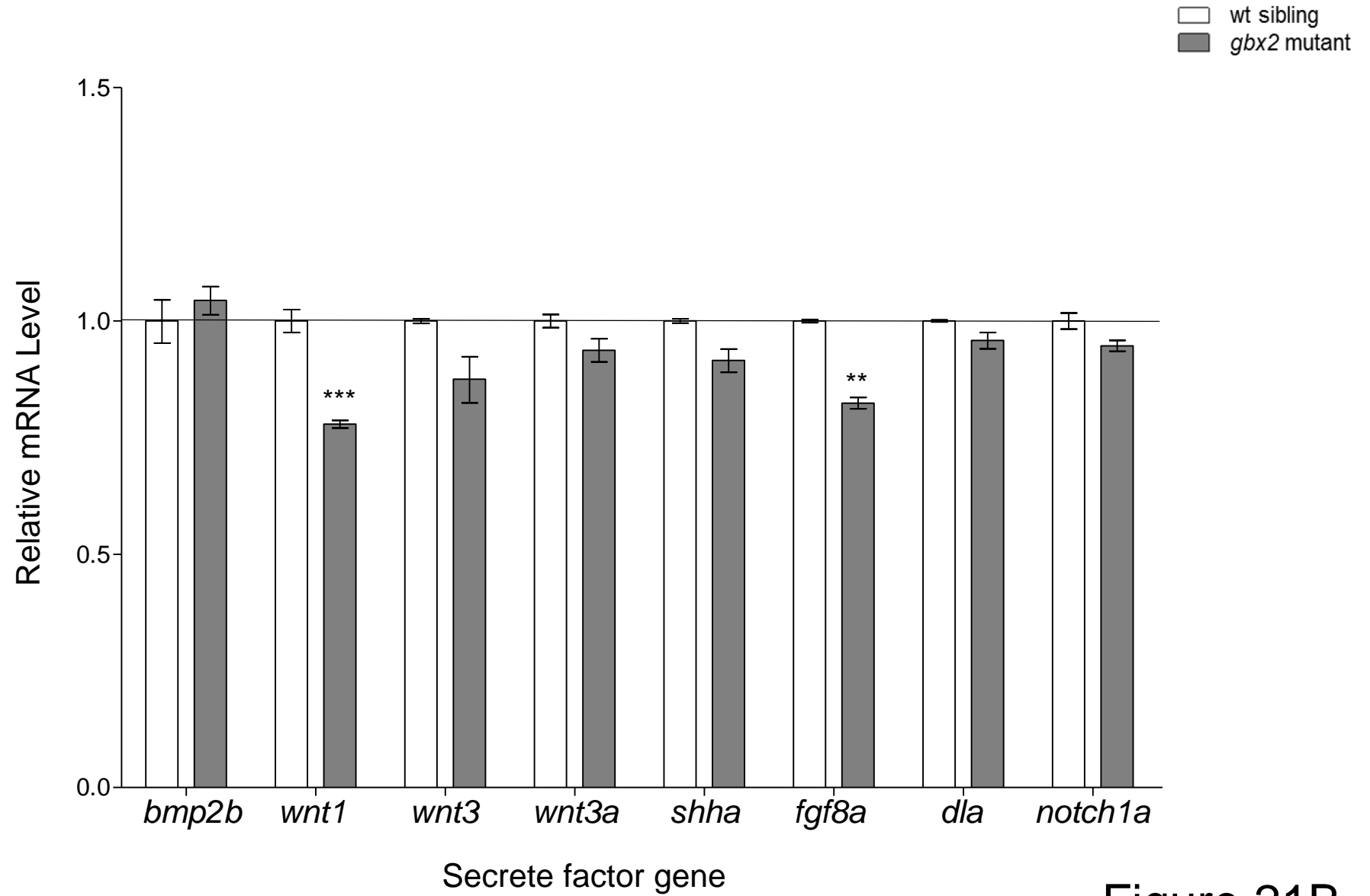


Figure 21B



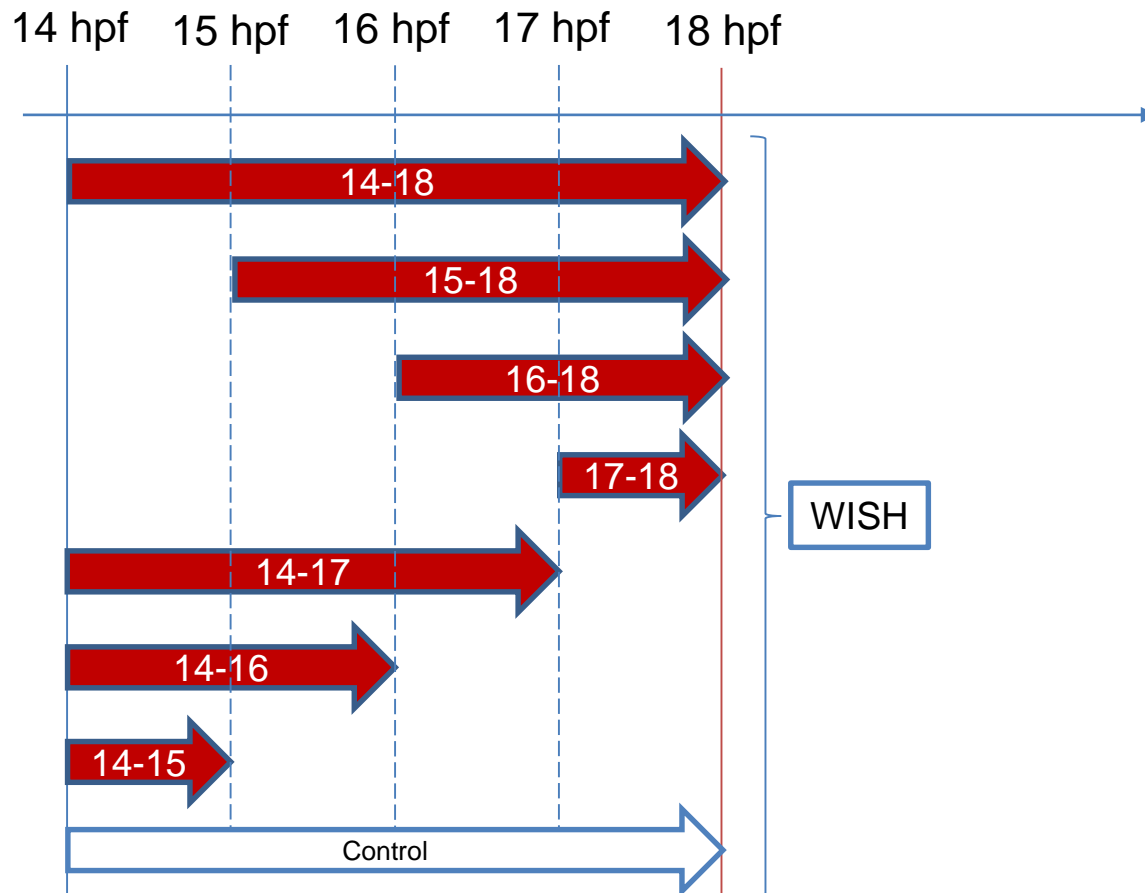


Figure 22A

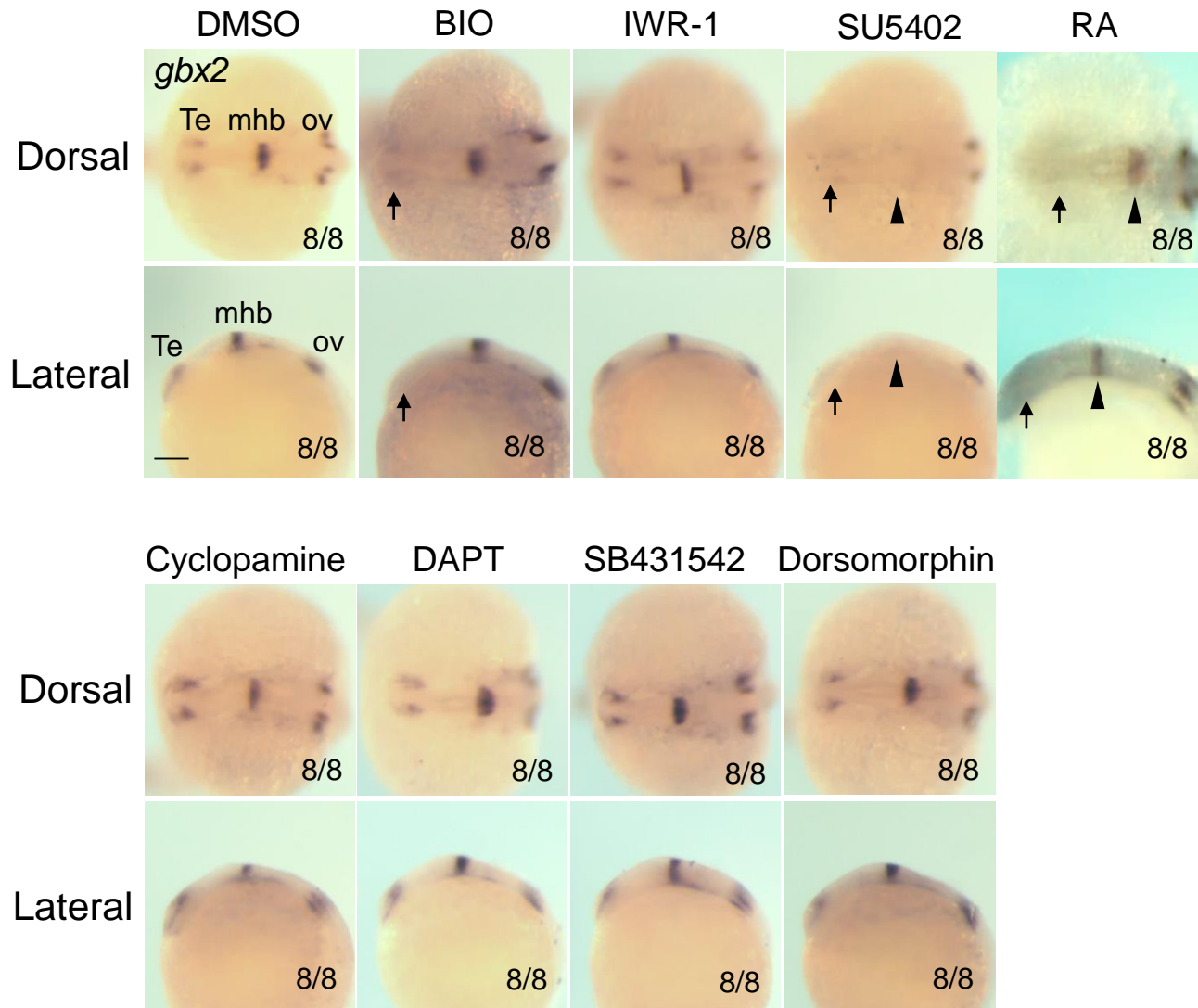


Figure 22B

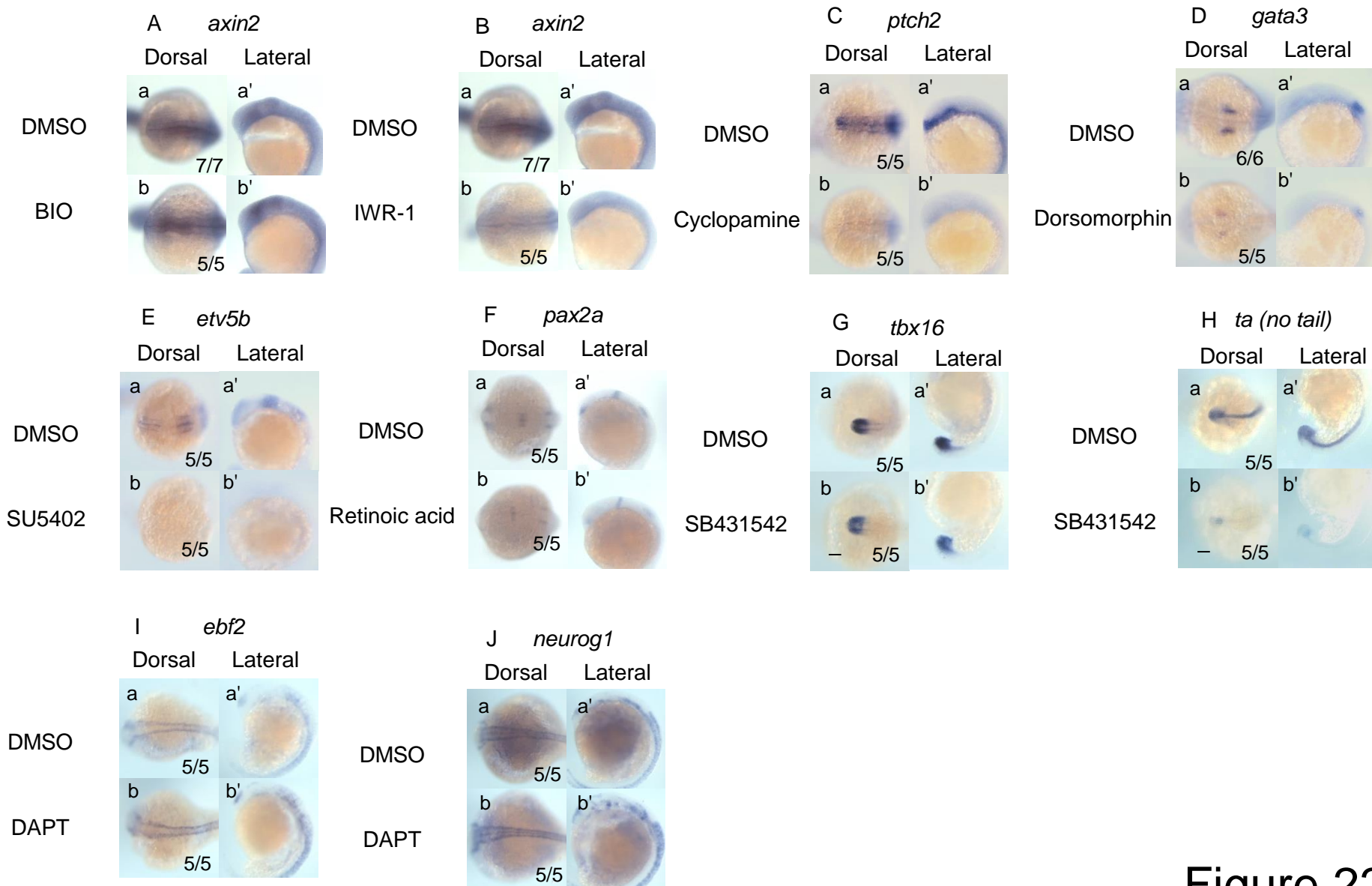


Figure 22C

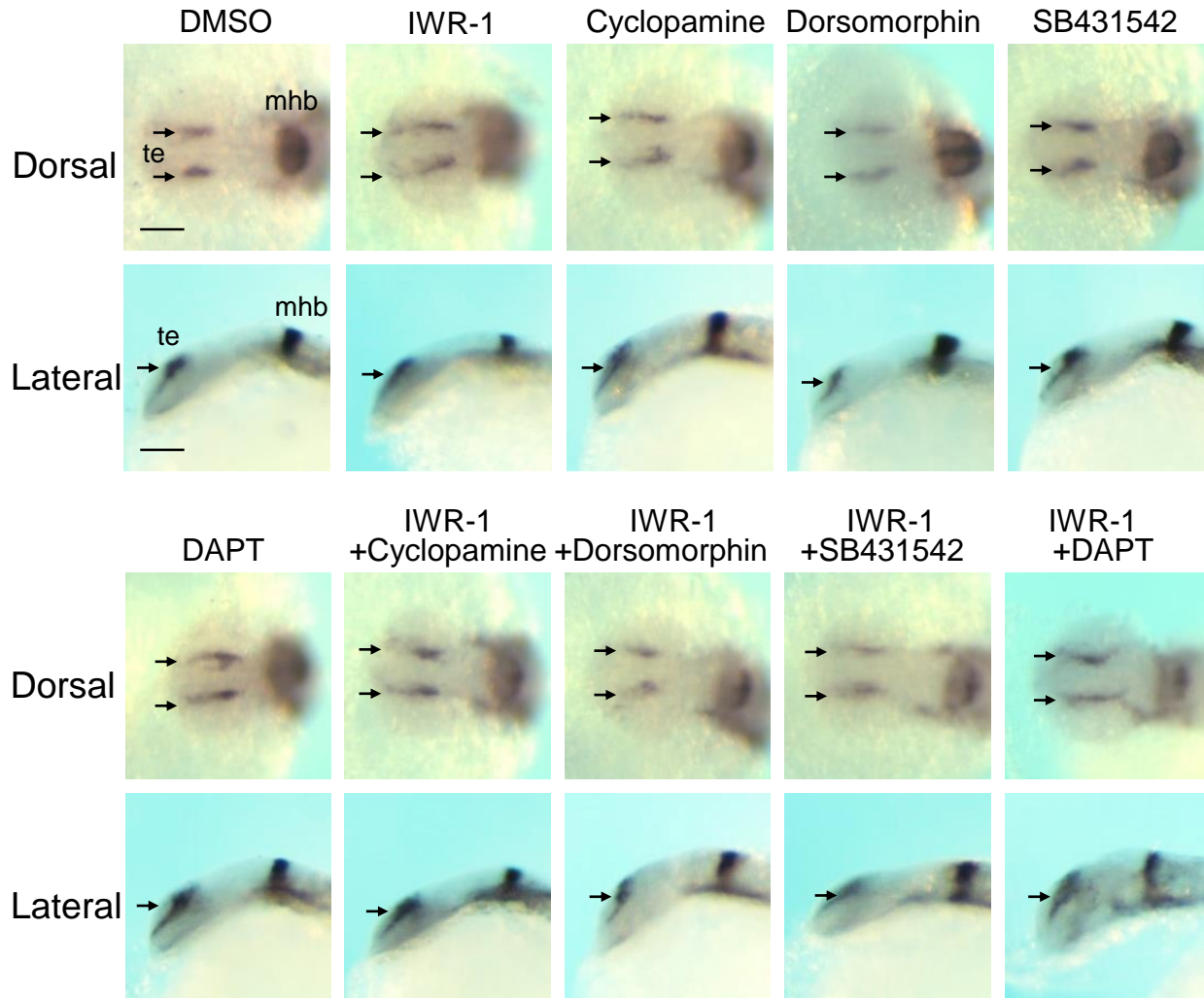


Figure 22D

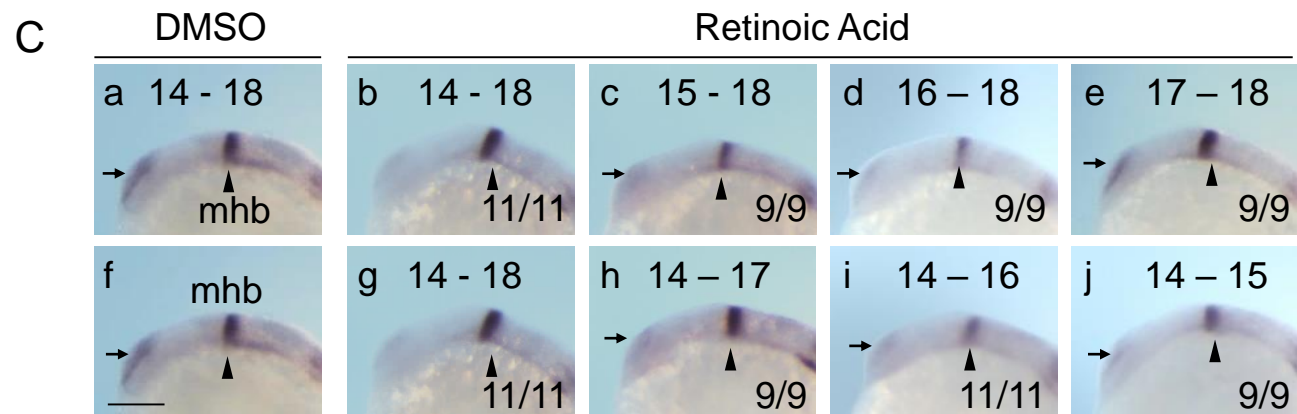
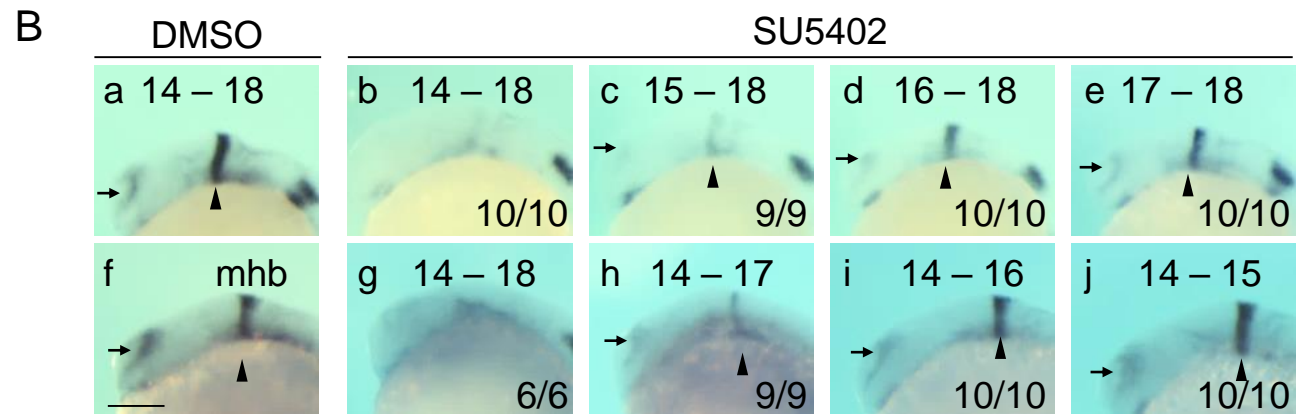
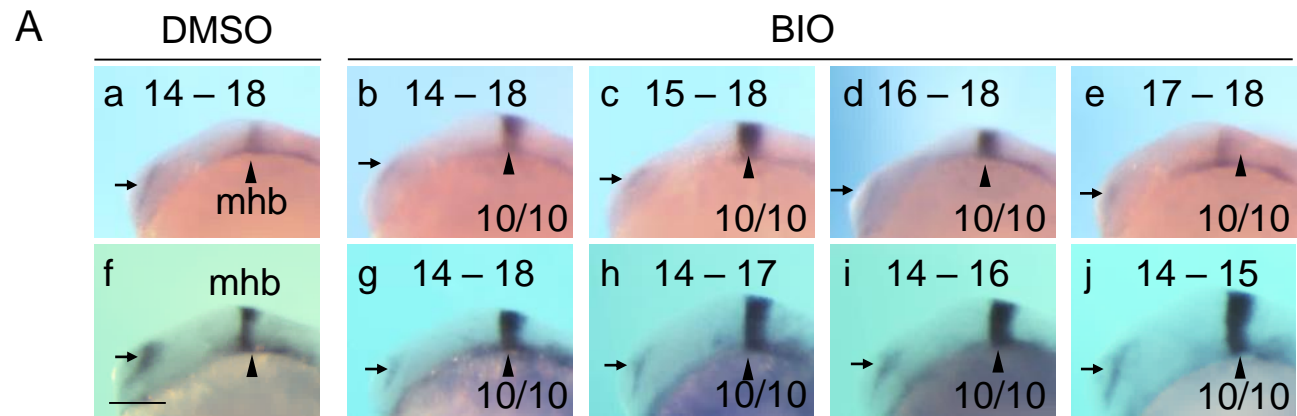


Figure 23

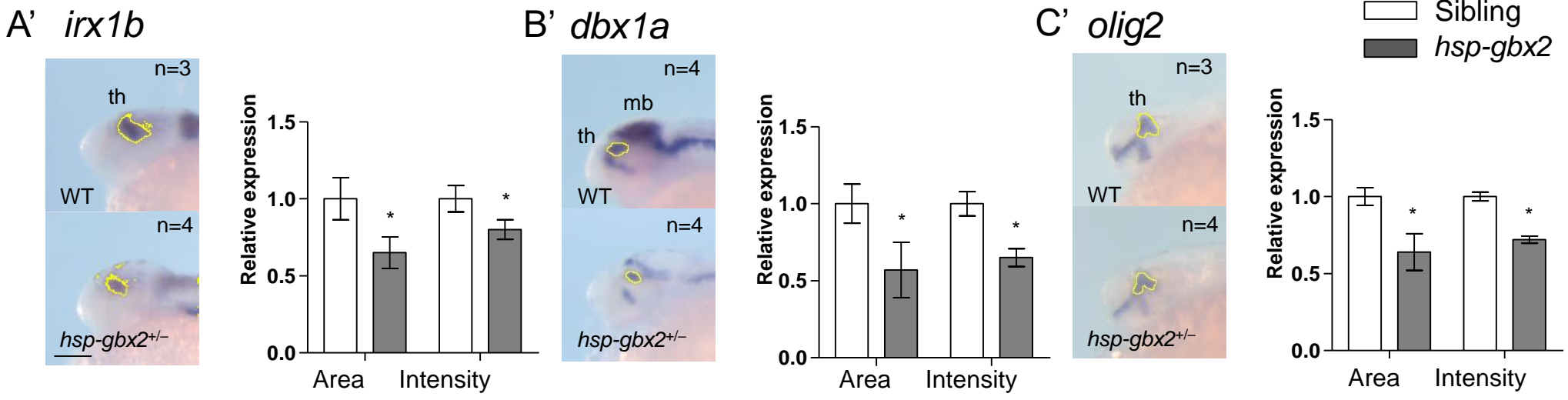
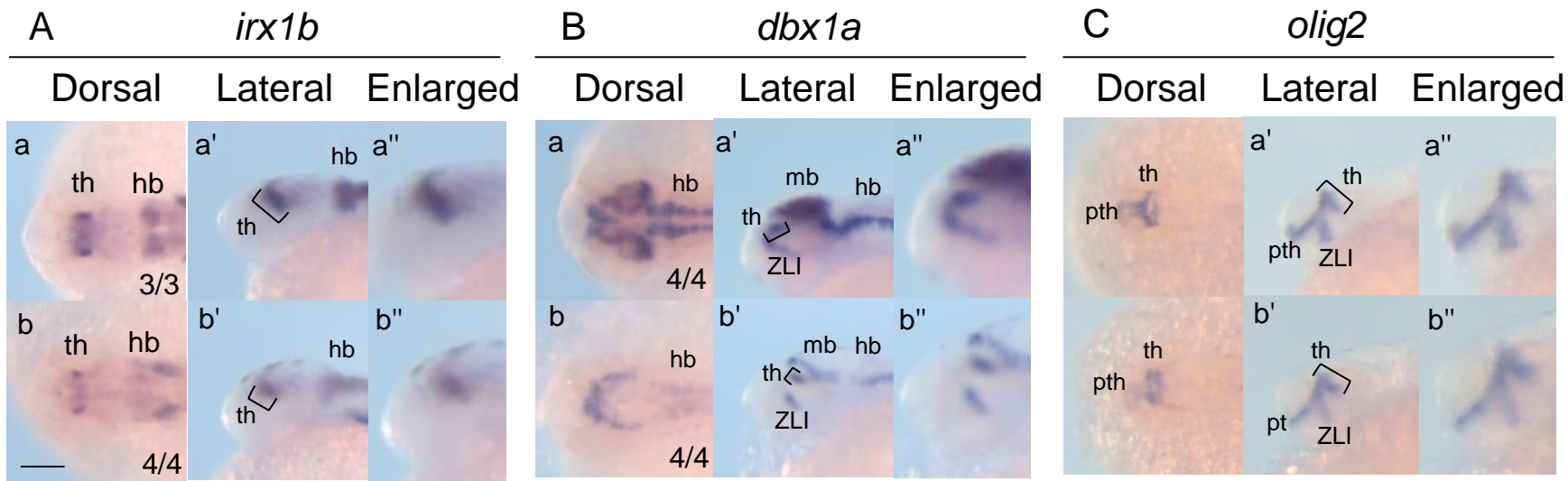


Figure 24

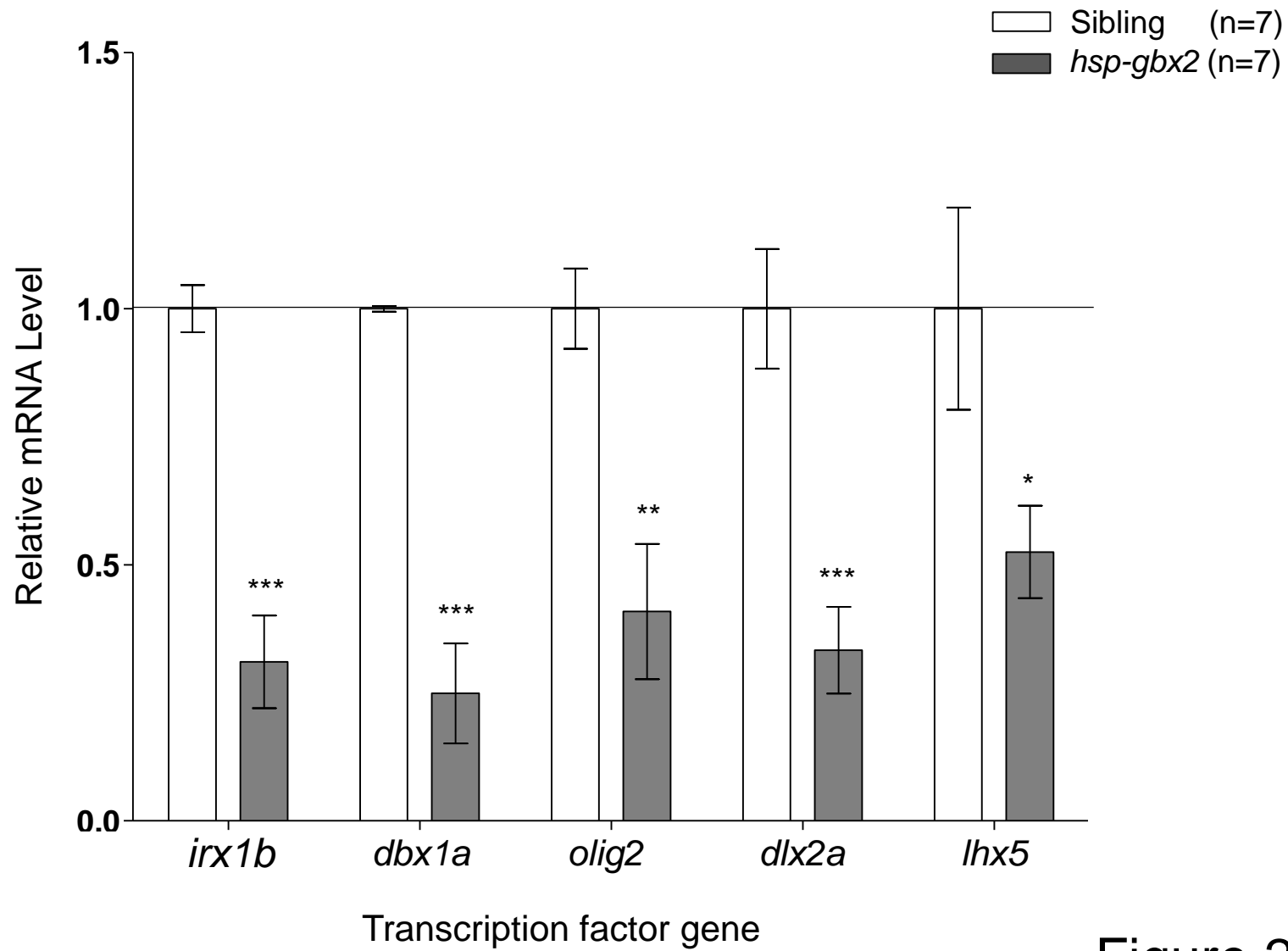


Figure 25

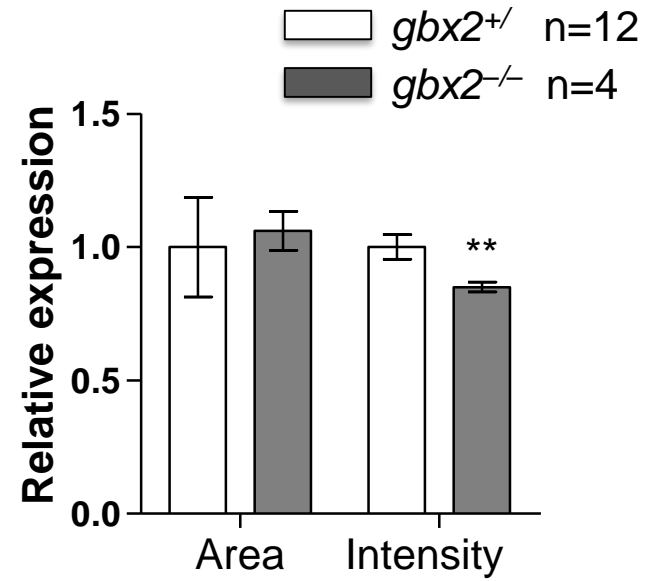
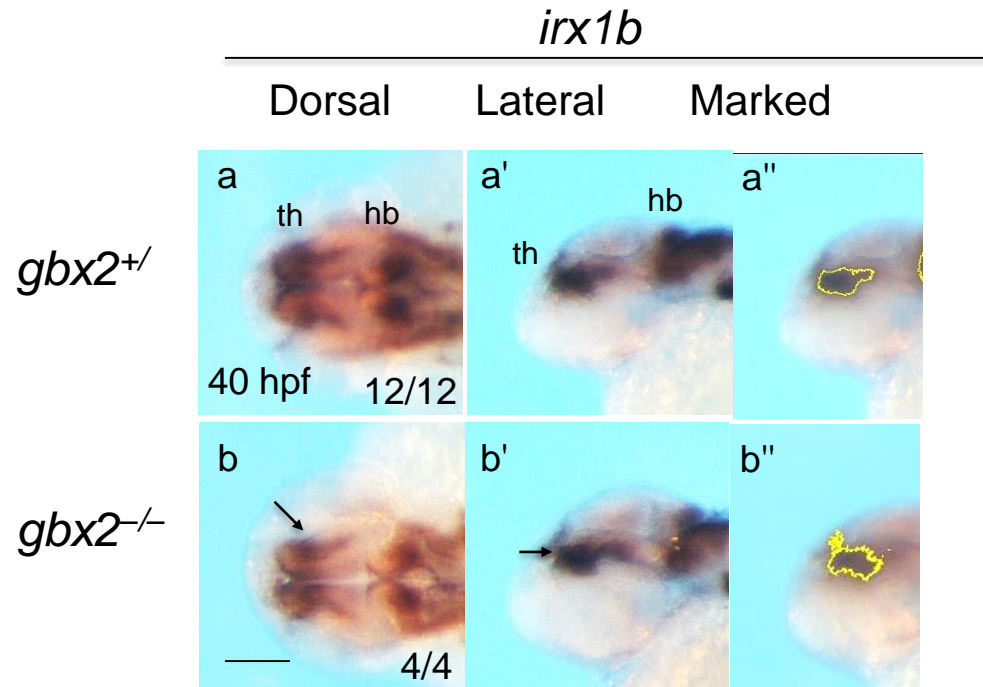


Figure 26



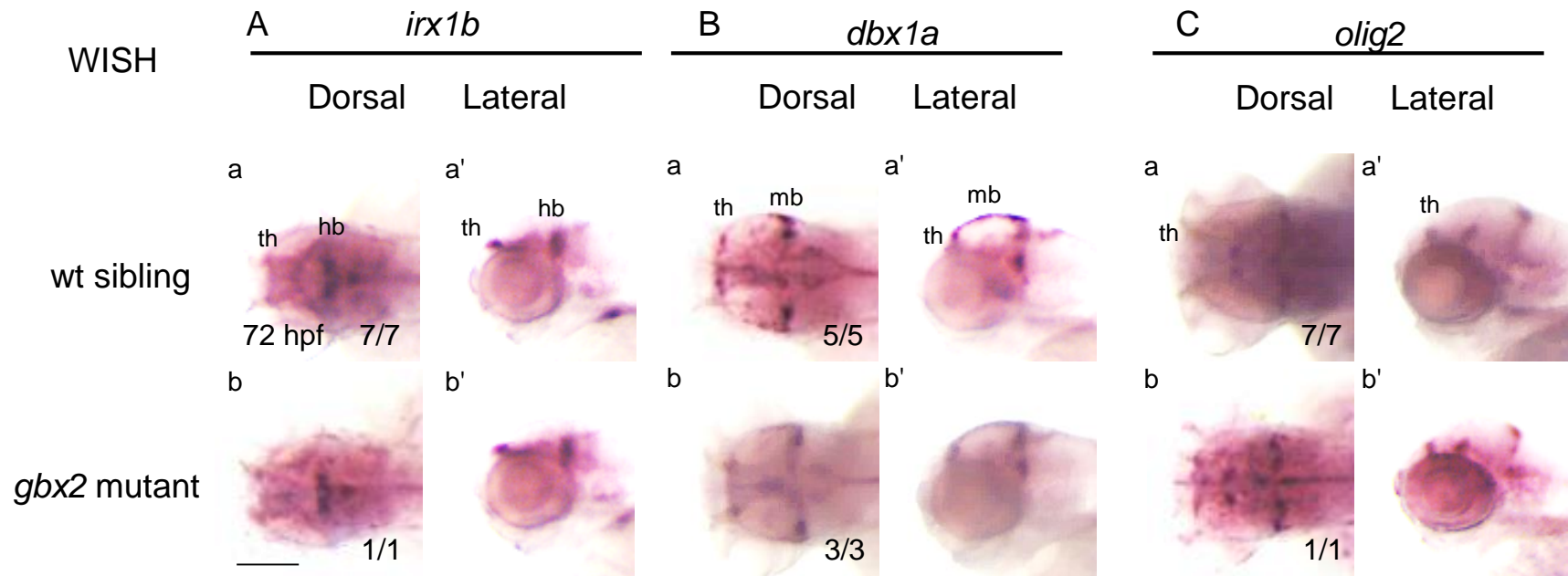
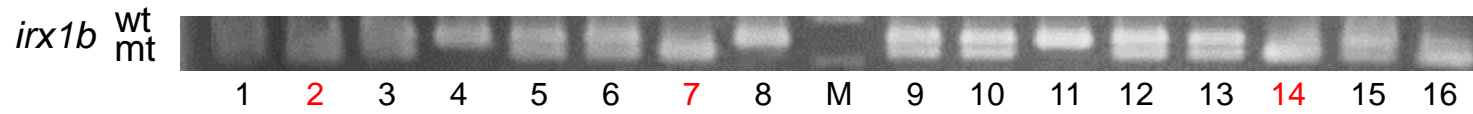


Figure 27

40 hpf



72 hpf

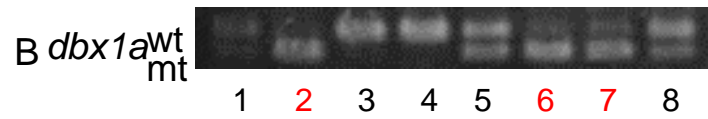
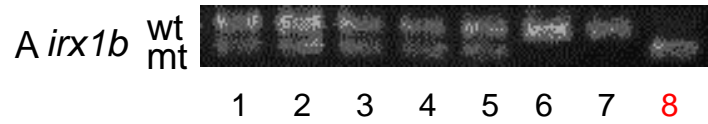


Figure 28