

「脳を知る」

平成10年度採択研究代表者

平良 眞規

(東京大学大学院理学系研究科 助教授)

「脳の初期発生制御遺伝子群の体系的収集と機能解析」

1. 研究実施の概要

高等動物の脳はどのような構造をしていて、その機能はどのような構造に基づいているであろうか。このような疑問に答えるべく、脳の構造と機能を発生学的に解析し、その分子メカニズムを明らかにしたいと考えている。

ヒトの脳は他の生物に比べると非常に大きく複雑であるが、その形態形成の過程は他の脊椎動物と基本的には同じであり、前脳、中脳、後脳という3脳胞構造が初期発生段階の基本構造となっている。そこで脊椎動物の初期発生の解析に適しているアフリカツメガエルを用い、脳の形態形成に関わる遺伝子、すなわち発生制御遺伝子の体系的な解析を行う。そこから見いだされた重要な遺伝子に関してはマウスを用いてさらに詳細に解析し、ヒト脳の構造と機能の分子レベル、遺伝子レベルでの理解に役立てたい。

2. 研究実施内容

(1) 発生制御遺伝子群の体系的収集と機能解析

脳の領域特異的遺伝子の体系的検索：神経板形成から脳胞形成に関与する新規遺伝子を探索するために、当研究室で作成したアフリカツメガエル前部神経板のcDNAライブラリーよりランダムに選んだクローンについて全胚 *in situ* ハイブリダイゼーションにより発現パターン・スクリーニングを行った。その結果、原腸胚後期から尾芽胚期にかけて脳の領域特異的に発現する新規遺伝子を数クローン見出した。その中の一つは、中脳・後脳境界に発現する転写因子であり、これまで知られていた脳の領域特異的に発現する遺伝子の中で最も早く発現を開始するものの一つであることが判明した。現在合成 mRNA 微量注入実験により、機能解析を行っているところである。

脳の誘導に関与する頭部オーガナイザーの解析：前部内中胚葉（頭部オーガナイザー領域）のcDNAライブラリーを作成し同様に発現パターン・スクリーニングを行い、脳の誘導に関与する遺伝子の探索を進行させている。間もなく新規遺伝子の同定が期待される。また頭部オーガナイザーに発現する転写因子 Xlim-1 の新規

標的遺伝子の検索を行い、活性型 Xlim-1 で発現が増大するクローンの中から、オーガナイザー特異的に発現するクローンを多数得、その全長 cDNA の構造解析を行った。その中の一つはキナーゼドメインをコードする遺伝子であり、現在オーガナイザー活性との関連において機能解析を進行中である。

(2) 胚発生制御遺伝子のマウスにおける機能解析

平成 10 年度は主としてマウス前脳形態形成における Otx, Emx 遺伝子の機能について解析した。Otx, Emx ファミリーの遺伝子は、体幹部での Hox 遺伝子群に類似して、前脳-中脳領域の形成に際し入れ子式の発現パターンを示し、その形態形成に深く関わっている可能性が想定される。我々は Otx1, Otx2, Emx1, Emx2 欠損マウスを作成し、脳の領域形成におけるその役割を解析してきたが、10 年度は、Otx2/Emx2 ダブル欠損マウスを作製、終脳形成における Otx2 遺伝子と Emx2 遺伝子との協働機能の解析を試みた。発生後期の胚の組織学的検討より、終脳背側部および間脳領域の欠損が明らかとなり、両者が前脳の形成に協働していることが明らかとなった。そこで現在、発生初期（領域形成期）での、分子マーカーを用いた解析を進めている。平成 11 年には、この解析を終了して、平良グループによりアフリカツメガエルで同定された新規遺伝子についての変異マウス作成を開始し、脳の領域化の機構を更に明らかにする計画である。

(3) 脳の領域特異的遺伝子の発現様式の解析

当研究機関においては、哺乳動物の脳形成過程において、領域特異的に発現する特定の遺伝子の発現様式の解析を目的とする。方法としては、アフリカツメガエルを用いて同定された新規脳領域特異的遺伝子のマウスオーソログを単離し、そのゲノム遺伝子のプロモーターにレポーター遺伝子 (Lac Z) を連結したトランスジェニック (TG) マウスを作製し、それを解析する。その際、導入遺伝子に用いるプロモーターの機能をできるだけ正確に評価する事が本研究の非常に重要なポイントとなる。しかしながら TG マウス作製においては、遺伝子の組み込み部位による発現の変化（ポジションエフェクト）が大きな問題となっている。最近、クロマチン境界を形成して隣接する遺伝子間の相互作用をなくし、ポジションエフェクトをなくすと考えられる DNA 配列（インシュレーター）の存在が明らかになってきた。そこで 10 年度は準備段階として、まず哺乳動物の初期胚においてインシュレーターが、遺伝子組み込みの際、ポジションエフェクトを解消することができるかどうかを調べた。哺乳動物由来のインシュレーターはほとんど研究が進んでいないため、ウニのアリルスルファターゼ遺伝子の 5' 上流領域に最近発見されたインシュレーターを使用した。導入遺伝子として、EF-1 α プロモーター制御下にレポーター遺伝子として、ルシフェラーゼ遺伝子を用いて解析した。その結果、ウニ由来のインシュレーターがマウス初期胚においても機能し、ポジションエフェクトを解消して、

導入遺伝子の正確な発現が行えるという結果を得ることができた。ウニ由来のインシュレーターは本研究遂行上、利用価値が高いことが明らかとなった。今後この系を用いることで脳領域特異的遺伝子の発現メカニズムを解析し、脳の発生の基本メカニズムを明らかにしたいと考えている。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

なし