「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

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と、遺伝学的解析が可能な哺乳動物であるマウスを用いて、アフリカツメガエルにおいては脳の形態形成に関わる発生制御遺伝子の体系的な検索と解析を、マウスにおいては前脳領域に発現している遺伝子の遺伝子破壊による解析を行っている。アフリカツメガエルでは、予定脳組織である前部神経板とその発生運命を決定する頭部オーガナイザー領域（前部内中胚葉）の領域特異的cDNAライブラリーから無作為に単離したクローンに関し、５'側から塩基配列の決定とin situ全胚ハイブリダイゼーションによる発現領域の検討を行い、新規遺伝子の検索を行っている。これまで多数の前脳領域あるいは頭部オーガナイザー領域に特異的に発現する遺伝子を同定した。それらの中から特に興味深い遺伝子XHR1などに関して現在機能解析を行っている。また脳誘導に関与すると考えられているオーガナイザー特異的ホメオドメイン蛋白質Xlim－1の標的遺伝子の解析を行った結果、脳誘導因子Cerberusの発現がXlim-1により直接制御されていることが示唆された。マウスでは、前脳に発現するEmx2とOtx2遺伝子の２重遺伝子破壊による機能解析を行っており、その結果、両遺伝子は終脳背側部と間脳の形成に協調的に関わっていることが明かとなった。今後は、カエルで見い出された新規発生制御遺伝子に関し、カエルでの機能解析と共にそのマウス・オーソログの遺伝子破壊による機能解析を行い、脳の初期発生の分子メカニズムを明らかにする予定である。

２．研究実施内容

グループＡ

アフリカツメガエルの脳の形態形成に関わる発生制御遺伝子の体系的な検索を行うため、前部神経板と前部内中胚葉の領域特異的cDNAライブラリーから、胚胴部に強く発現するクローンをプラーク・ハイブリダイゼーションにより除いた後、無作為に単離したクローンに関し、５'側から塩基配列の決定とin situ全胚ハ

イブリダイゼーションによる発現領域の検討を行った。この検索により多数の脳特異的遺伝子、および前部内中胚葉特異的遺伝子を見い出した。それらの中から特に興味深い遺伝子を選び機能解析を行っている。またオーガナイザー特異的ホメオドメイン蛋白質Xlim-1の機能解析として、その標的遺伝子の解析を行った。以下、検索結果と機能解析の結果である。

1. 前部神経板、前部内中胚葉（頭部オーガナイザー領域）に発現する遺伝子の体系的収集：これまで約1000個のクローンの塩基配列を決定し、約650個のクローンを手動あるいは自動in situハイブリダイゼーション装置を用いて発現パターンの解析を行なった。その結果、前部神経板・前脳領域に発現しているクローン97個と脊索前板・脊索に発現しているクローン９個を見いだした。これらの中で前脳中脳領域に発現するクローンN9G8（XHR1）は機能解析中（後述）であり、N2A4、N4D1、N4D3、N4E12、N4H12は構造解析中である。脊索前板に特異的に発現するクローンP4F1はニワトリcrescentのオーソログであり機能解析中である。なお検索データーは、国立遺伝学研究所の小原雄治博士が開発した線虫のESTと発現パターンをリンクさせたデータベースをアフリカツメガエル用に改変したものに保存しデーターベース化した。
2. 後脳中脳境界領域（isthmus）と目の原基に発現するXHR1の機能解析：XHR1はシュジョウバエのプレパターン遺伝子hairyと類似したbHLH型転写抑制因子である。XHR1をトレーサーのβ-Galと共に外胚葉に異所発現させると、β-Galの発現領域で神経組織の消失と表皮の肥厚が認められた。一方ドミナントネガティブ型XHR1を発現させると、β-Galの発現領域およびその近傍において神経組織の拡大が見られ、目の形成が阻害された。これらの結果はXHR1が目の形成と神経組織の領域化に関与していることを示唆している。
3. Xlim-1の標的遺伝子候補goosecoidとcerberus遺伝子のプロモーター解析：(a) 頭部オーガナイザー特異的ホメオボックス遺伝子goosecoidのプロモーター解析を行った結果、goosecoidプロモーター領域にXlim-1が活性化しかつ結合する部位を見いだした。したがってgoosecoidはXlim-1の標的遺伝子と考えられる。(b) 脳誘導因子Cerberusの遺伝子がXlim-1により発現誘導されることを見いだした。そこでcerberus遺伝子のプロモーター解析を行いcerberusの転写開始部の上流にXlim-1反応エレメントの存在することを見いだした。このことはcerberusがXlim-1の標的遺伝子であることを支持している。
4. Xlim-1の新規標的遺伝子の同定と機能解析：Xlim-1の標的遺伝子をサブトラクション法でスクリーニングし候補遺伝子の１つとしてはレセプター・キナーゼXror2を見だした。機能解析のためXror2を背側に過剰発現させると背側中胚葉と神経板の収斂・伸展が阻害された。Xror2は原腸胚期ではオーガナイザー領

域に、神経胚期には神経板に発現していることよりXror2は両組織の収斂・伸展運動に関与することが示唆された。このレセプターの未同定のリガンドに関しても検討中である。

グループB

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、前脳ー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、昨年度より、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てきた。その結果、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。発生初期（領域形成期）での、各種分子マーカーを用いた解析の結果、E9.5 ではWnt1 遺伝子発現領域の終脳背側部への拡大、Otx2 遺伝子の終脳背側部での発現領域の縮小、En2、 Pax5遺伝子の終脳背側部における異所的発現の誘導が認められた。E8.5（6 somite stage)では、既にOtx2遺伝子発現の減少かつ領域の縮小が認められた。更に、発生初期のE8.0 （4 somite stage） でEmx2、Otx2遺伝子発現を検討したところ、Otx2遺伝子は headhold stage から頭部神経上皮で発現し、4 somite stage では前脳領域全体から中脳にかけて発現するのに対し、Emx2遺伝子は4 somite stageより前脳領域でのみ発現してくることが明らかとなった。以上の結果より、脳形態形成において、Emx2遺伝子はOtx2が発現する原脳全体の中で、前脳となる領域を規定している遺伝子であることが示唆された。両遺伝子は前脳領域形成に協働していることが明らかとなったが、最も単純にはEmx2遺伝子がOtx2遺伝子発現を制御していることが予想される。そこで、Otx2遺伝子の吻側神経上皮での発現を制御するシス領域の同定を進め、大まかな領域を確定した。またOtx2遺伝子座にEmx2遺伝子を導入した変異マウスを作成し、その表現型の解析を進めた。平成12年度はこれらについての解析を進める。

グループC

1. アフリカツメガエルを用いて得られた脳の領域特異的に発現する遺伝子のマウスオーソログを単離し、そのプロモーター解析をトランスジェニック（TG）マウスを用いて行うことで、脳の領域化のメカニズムを明らかにすることを目指している。本年度はアフリカツメガエルの系から得られた領域特異的な発現を示す遺伝子のマウスオーソログの単離を試みた。現在、既知の類似遺伝子とのホモロジーから保存されていると考えられるアミノ酸配列を推定して degenerate primers を作成し、PCR 法によるマウスオーソログの単離を試みている。

2.　領域特異的な遺伝子発現の解析を行うために導入遺伝子に用いるシスエレメントの機能をできるだけ正確にTGマウスにおいて再現するシステムの確立を試みている。すなわち、遺伝子の組み込み部位がそれぞれのTGマウス間で異なることによる発現の変化（ポジションエフェクト）をなくす試みである。昨年度においはインシュレーター（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解消すると考えられるDNA配列）を利用することにより、マウスの胚盤胞において、ポジションエフェクトを解消し、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。本年度はさらに胎仔期においてインシュレーターの効果を検討した。その結果、胎仔期においては導入遺伝子の発現に関して、効果のみられた個体も存在したが、胚盤胞期において観察されたようなインシュレーターの顕著な効果は認められなかった。すなわち今回使用したウニ由来のインシュレーターは胚盤胞期と胎仔期においてはその機能が異なり、インシュレーターの利用にはさらなる検討が必要であると考えられる。

3．主な研究成果の発表（論文発表）

○平良眞規: LIMホメオドメインタンパク質. 実験医学 17, 320-329 (1999).

○平良眞規: ゲノムサイエンスと発生学. 細胞工学 19, 618-629 (2000).