

「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

脊椎動物初期発生におけるオーガナイザー機能の分子基盤の解明、ならびに脳の誘導とパターン形成に関わる遺伝子の体系的検索と機能解析によりその分子メカニズムの解明を目指す。これまでに頭部オーガナイザーと予定脳領域に特異的に発現する遺伝子の体系的検索で、2,863 クローンの ESTs (expressed sequence tags) と、そのうちの 898 クローンについての発現パターンの解析が完了した。その一部はデータベースで公開されている。今年度行った遺伝子の機能解析のうち主なものは以下の通りである。(1)脳誘導因子 cerberus の遺伝子プロモーターはオーガナイザー特異的ホメオドメインタンパク質 Xlim-1、Siamois と内中胚葉転写因子 Mix.1 の三者複合体により活性化されることを見出した。これによりオーガナイザーにおける遺伝子カスケードの一端が示された。(2)頭部オーガナイザー因子 Crescent は細胞平面極性に関わる Xwnt-11 と強く結合し、収斂伸長運動を阻害することより、Crescent は頭部における細胞の収斂伸長運動を抑制することで頭部形成に関わっていることが示唆された。(3)発現クローニングによる神経化因子の検索で、クローン A124 に強い活性を見出した。A124 は核内膜タンパク質をコードし、その C 末側領域に神経化活性と BMP シグナル伝達因子 Xsmad1 との結合領域を見出した。したがって A124 は BMP シグナル伝達の新たな制御因子と考えられる。

### 2. 研究実施内容

#### 研究目的

脊椎動物の初期形態形成ではオーガナイザーがその中心的役割を果たす。すなわち、オーガナイザーは外胚葉に対して神経組織を誘導し、かつそのパターン形成を行うと共に、胴部オーガナイザーは細胞の収斂伸長運動を引き起こし頭部と胴部を分離する。本研究ではオーガナイザーの機能ならびに脳のパターン形成の分子メカニズムの解明のために、アフリカツメガエルを用いてオーガナイザーと予定脳領域に特異的に発現する遺伝子の体系的検索を行うと共に、各遺伝子の機能解析を行った。

#### 方法

アフリカツメガエルの頭部オーガナイザー領域と予定脳領域の cDNA ライブリーの体系的遺伝子検索は部分塩基配列決定 (ESTs) と全胚 in situ ハイブリダイゼーションによる発現パターンの解

析で行った。遺伝子の機能解析は、合成 mRNA を初期胚に顕微注入することで領域特異的分子マーカーや細胞の分化マーカーの発現や形態に対する影響を調べることで行った。レポーターアッセイはルシフェラーゼ遺伝子を用いた。mRNA を注入した細胞の系譜を調べる場合は核局在型の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ mRNA を共注入し、固定した胚を red-gal を用いて染色した。遺伝子発現は全胚 in situ ハイブリダイゼーションあるいはノーザン・ブロット、RT-PCR で検出した。

## 結論

- (1) 頭部オーガナイザー(背側前方内中胚葉)と予定脳領域(前部神経外胚葉)に特異的に発現する遺伝子の体系的収集で、今年度は予定脳領域を中心に行い 1,466 のクラスターからの約 700 クローンについて発現パターン解析を行った。その結果、クローン N30H6 は新規遺伝子であり、神経胚期では前方部と脊索に、原腸胚期にはオーガナイザー領域に発現することを見出した。そこで N30H6 をプローブにして cDNA ライブラリーをスクリーニングし翻訳領域全長を含む cDNA を単離し構造解析を行った。
- (2) 頭部オーガナイザーライブラリーより見い出された crescent の機能解析を行った結果、背側組織の後方領域で見られる収斂伸長運動を阻害すること、また共免疫沈降実験により crescent は Xwnt-11 と結合することを見出した。Xwnt-11 は収斂伸長運動に必要な細胞平面極性に関与することが知られていることより、crescent は頭部オーガナイザーに発現することでその領域の収斂伸長運動を抑制する役割を担っていると考えられる。
- (3) 脳誘導因子 cerberus の遺伝子プロモーター解析により、オーガナイザー特異的ホメオドメインタンパク質 Xlim-1、Siamois と内中胚葉転写因子 Mix.1 の三者により cerberus プロモーターが協調的に活性化されること、また cerberus プロモーター領域に三者が複合体を形成して結合することを見出した。Xlim-1 と Mix.1 は中胚葉誘導因子 Nodal により、また Siamois は背側化因子 Wnt により発現誘導を受ける転写因子であることより、オーガナイザー形成に必要とされる両シグナルがこれらの転写因子の発現を介して cerberus 遺伝子の発現を引き起こすというオーガナイザーにおける遺伝子カスケードが明かとなった。
- (4) 発現クローニングによる神経化因子の検索で、クローン A124 に強い活性を見出した。A124 は膜貫通ドメインを2つもつ核内膜タンパク質をコードする。機能ドメインの解析の結果、神経化活性は膜貫通ドメインの C 末側領域に存在すること、またその領域で BMP シグナル伝達因子 Xsmad1 と結合すること、およびレポーターアッセイにより BMP シグナルを阻害することを見出した。したがって A124 は BMP シグナル伝達の新たな制御因子と考えられる。

## 3. 研究実施体制

- (1) 平良グループ(東京大学大学院理学系研究科)
  - ① 研究分担グループ長名:平良眞規(助教授)
  - ② 研究項目;アフリカツメガエルにおける発生制御遺伝子群の体系的収集と機能解析
- (2) 木村グループ(滋賀医科大学)
  - ① 研究分担グループ長名:木村博(教授)

② 研究項目 ;マウスにおけるオーガナイザーと脳に発現する遺伝子の検索と領域特異的遺伝子の発現様式の解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Hiratani, I., Mochizuki, T., Tochimoto, N., and Taira, M.: Functional Domains of the LIM Homeodomain Protein Xlim-1 Involved in Negative Regulation, Transactivation, and Axis Formation in *Xenopus* Embryos. *Dev. Biol.* **229**, 456-467 (2001).
- Shibata, M., Itoh, M., Ohmori, S.-y., Shinga, J., and Taira, M.: Systematic screening and expression analysis of the head organizer genes in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* **239**, 241-256 (2001).
- Kodjabachian, L., Karavanov, A. A., Hikasa, H., Hukriede, N. A., Aoki, T., Taira, M., and Dawid, I. B.: A study of Xlim1 function in the Spemann-Mangold organizer. *Int J Dev Biol* **45**, 209-18. (2001).
- Hikasa, H., and Taira, M.: A *Xenopus* homolog of a human *p53*-activated gene, *PA26*, is specifically expressed in the notochord. *Mech. Dev.* **100**, 309-312 (2001).
- Shinga, J., Itoh, M., Shiokawa, K., Taira, S., and Taira, M.: Early patterning of the prospective midbrain-hindbrain boundary by the HES-related gene XHR1 in *Xenopus* embryos. *Mech. Dev.* **109**, 225-239 (2001).

(2) 特許出願

なし。