

「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。頭部オーガナイザーと予定脳領域に特異的に発現するに発現する遺伝子の体系的検索では、頭部オーガナイザーの結果は既にデータベースとして公開し、予定脳領域に特異的に発現する遺伝子の体系的検索結果(1819 ESTsと806クローンの発現パターン)については公開を準備中である。当年度に機能解析が進展した遺伝子はXror2とXMAN1である。Xror2はレセプターチロシンキナーゼをコードしその過剰発現により背側中胚葉と神経外胚葉の収斂伸張が阻害され、この活性はXwnt11とWntレセプターXfz7との共発現で相乗的に強まった。またXror2はXwnt11と複合体を形成することが示された。これらの結果はXror2がXwnt11とXfz7による細胞平面極性経路の活性を制御することで原腸陥入時の細胞の収斂伸張運動に関わっていることを示唆している。発現クローニングによる神経化因子の検索で見出されたクローンMAN1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。アンチセンスモルフォリーノオリゴを用いた機能低下実験では予想通り神経組織の形成不全をもたらした。これらの結果はMAN1はBMPシグナル伝達の新たな制御因子であることを示唆している。

2. 研究実施内容

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、各遺伝子の機能と役割を明らかにすることを目的とする。

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ライブラリーの体系的

遺伝子検索は部分塩基配列 (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を、当研究室で開発したデータベースXEXTDBに登録し分析した。遺伝子の機能解析は、合成mRNAの初期胚への顕微注入法で行い、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全胚in situハイブリダイゼーション法と切片観察で検討した。mRNAを注入した細胞の系譜を調べる場合は核局在型の β -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。遺伝子発現量はノーザン・ブロットあるいはRT-PCR、real-time RT-PCRで測定した。蛋白質間の複合体形成は、mRNA注入でタグ付蛋白質を発現させた胚の抽出液による共免疫沈降法を用いた。

結論

(1) ESTsと発現パターンの関連データベースの構築と解析

予定脳領域に特異的に発現する遺伝子の1819個のESTsをクラスタリングしたところ1479個のクラスターにまとめられた。それらを公共データベースに対してblast検索した結果、690個のESTs (450個のクラスター) は既知の蛋白質と有意の相同性を示し、これらについては機能分類 (クラスA~C) を行った。機能が予想できない991個のESTs (904個のクラスター) は新規遺伝子候補とした。主として新規遺伝子候補を含む806クローン (806クラスターに対応) について全胚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を行った。その結果、主として神経組織に発現するクラスターは多数見い出され、中でも興味深い領域特異的発現が見られたものは26個 (3.2%) であった。一方、神経板の詳細な運命予定地図に対応するような発現を示す遺伝子はほとんど見出されなかったのに対し、脳のオーガナイジングセンターである中脳後脳境界領域と前部神経稜、背腹軸に沿ったパターン形成のシグナリングセンターとなる底板と側方の神経稜 (後の蓋板と神経冠)、そして予定網膜領域に発現する遺伝子が多数得られた。このことは初期神経胚期では未だ詳細な脳の領域化は行われておらず、この時期はオーガナイザーからの誘導により神経外胚葉にオーガナイジングセンターとシグナリングセンターが形成される時期であることを予想させる。

(2) レセプターチロシンキナーゼXror2の収斂伸張運動における役割

オーガナイザー領域と神経外胚葉に発現するXror2の機能解析をmRNA顕微注入法を用いて検討し、以下の結果を得た。(1) Xror2の過剰発現は中軸中胚葉と神経外胚葉の収斂伸長細胞運動を阻害するが細胞分化には影響を与えない；(2) この活性はFrizzled様ドメインを必要とするが細胞内ドメインは必要としない；(3) WntのPCP経路の下流で活性化されるCdc42のドミナントネガティブ型でXror2の活性が緩和される；(4) Xror2はXwnt11、WntレセプターXfz7と相乗的に作用して収斂伸長運動を阻害する；(5) 共免疫沈澱法でFLAGタグ付Xror2の細胞外ドメインとMycタグ付Xwnt11が複合体を形成する。以上の結果はXror2の未知のリガンドはWntであること、またXfz7と協調的に働きPCP経路を活性化することを示唆しており、収斂伸長運動を行う後方の体軸中胚葉と外胚葉にXror2が発現していることと良い対応を示す。

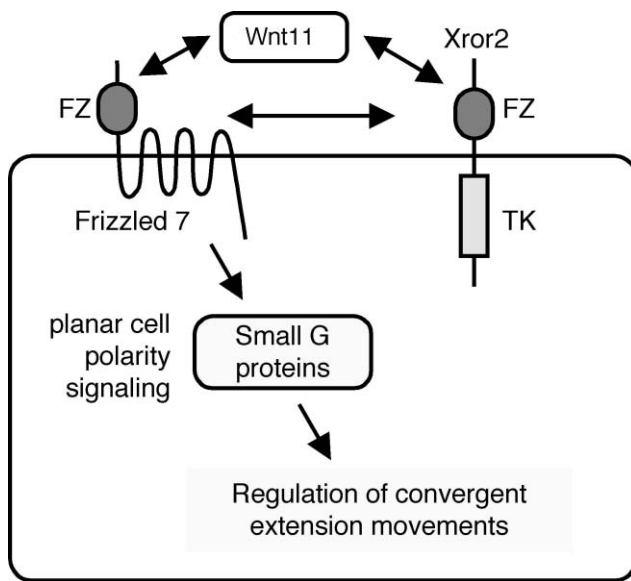


図 Wntの平面極性 (PCP) 経路におけるXror2の役割のモデル図。Xror2はWnt11、Frizzled 7と協調的に作用しアフリカツメガエル胚の収斂伸長運動を阻害することより、3者の機能的関連性が示唆される。またXror2はWnt11と複合体を形成する。Wnt11/Frizzled 7のPCP経路は小型Gタンパク質を介して細胞極性を制御することで収斂伸長運動を調整されている。FZ、Frizzledドメイン；TK、チロシンキナーゼドメイン。

(3) 核内膜蛋白質XMAN1の神経組織の形成における役割

アフリカツメガエルの発現クローニング法を用いて、前方神経外胚葉cDNAライブラリーから、予定外胚葉組織 (アニマル・キャップ) を神経化する因子を探索した結果、膠原病患者の抗核膜抗体により認識される核膜蛋白MAN1のオーソログ、XMAN1を単離した。XMAN1のmRNAは母性mRNAとして存在し、原腸胚初期には外胚葉領域全体に発現しているが、神経胚期には前方神経領域に、尾芽胚期には中枢神経系に局在して発現した。免疫染色の結果、Mycタグ標識のXMAN1の核膜への局在が確認された。XMAN1は、アニマル・キャップに中胚葉の誘導なしに、前方の神経マーカーを誘導し、また、腹側中胚葉を背側化して二次軸を形成した。XMAN1とBMP経路の関連を検討した結果、XMAN1はアニマル・キャップにおいてBMPの標的遺伝子Xhox3, Xmsx-1, Xvent1の発現を抑制し、更にBMP依存的なXvent2-レポーターの活性化を抑制した。XMAN1はC末領域に神経化活性を持ち、この領域のRRM (RNA recognition motif)を介してSmad1のMH2領域に結合することが判明した。アンチセンス・モルフォリーノにより内在性のXMAN1の機能を低下させたところ、眼を含む前方の神経組織の形成が阻害され、前方神経マーカーの発現領域の縮小が見られた。この表現型はXMAN1 mRNAの共注入により回復した。以上の結果により、核膜蛋白質XMAN1がBMP応答性Smadと結合することによりBMP経路を阻害し、神経化に関わることが明らかになった。これは、これまで「シグナル伝達の制御」という観点から研究されることがなかった核膜蛋白質にその関わりを示した最初の例である。

3. 研究実施体制

平良グループ

- ① 研究分担グループ長：平良眞規 (東京大学大学院理学系研究科、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

木村グループ

- ① 研究分担グループ長：研究分担グループ長名：木村博（滋賀医科大学、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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Cebria, F., Kobayashi, C., Umesono, Y., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Itoh, M., Taira, M., Alvarado, A. S., and Agata, K.: FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature* **419**, 620-624 (2002).
- Fujita, M., Itoh, M., Shibata, M., Taira, S., and Taira, M.: Gene expression pattern analysis of the tight junction protein, Claudin, in the early morphogenesis of *Xenopus* embryos. *Gene Expression Patterns (A section of Mech. Dev.)* **2**, 23-26 (2002).
- Hikasa, H., Shibata, M., Hiratani, I., and Taira, M.: The *Xenopus* receptor tyrosine kinase *Xror2* modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development* **129**, 5227-5239. (2002).
- Osada, S.-I., Ohmori, S.-y., and Taira, M.: XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in *Xenopus* embryos. *Development* **130**, 1783-1794 (2003).

（2）特許出願

H14年度特許出願件数：1件（研究期間累積件数：1件）