

「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

頭部オーガナイザーによる脳の誘導とパターン形成、および胴部オーガナイザーと後方神経組織の収斂伸長運動における細胞極性についての分子メカニズムの解明を目指す。本年度は、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、以下の点を明らかにした。(1)オーガナイザー特異的ホメオボックス遺伝子 *Xlim-1* の標的遺伝子を解析した結果、脳誘導因子の *cerberus* 遺伝子が直接の標的遺伝子であることが示された。(2)予定中脳後脳境界領域(MHB)に特異的に発現する bHLH 遺伝子 *XHR1* の詳細な発現パターンを解析した結果、予定前脳中脳領域が定まる以前の初期原腸胚期に既に予定 MHB の領域化が始まっていることが明かとなった。(3)レセプターチロシンキナーゼ *Xror2* は Wnt のシグナル伝達を修飾することにより収斂伸長運動を制御していることが示唆された。今後は、*cerberus* 遺伝子プロモーター上での *Xlim-1* と他の転写因子との相互作用、オーガナイザーによる予定 MHB 領域の決定機構、*Xror2* と Wnt あるいはそのレセプター *Frizzled* との相互作用を検討する。

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、胴部での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、などの役割を担っている。本研究はそれらオーガナイザーの役割ならびにそれによる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にお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ている。一方、遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析により前脳中脳の後期発生のメカニズムを探っている。

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領域特異的 cDNA ライブラリーについて、高発現クローンを除いた後に、EST α (expressed

sequence tags)と発現パターンにより体系的に遺伝子検索を行った。遺伝子の機能解析は合成 mRNA を初期胚に顕微注入し、領域特異的分子マーカーや細胞の分化マーカーの発現、あるいは形態に対する影響を調べることで行った。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・ブロットで検出した。また Otx と Emx の遺伝子ファミリーのノックアウトマウスの2重変異体を作成し前脳と中脳の発生に対する影響を検討した。

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。アフリカツメガエル頭部オーガナイザー cDNA ライブラリーから選択した1,039クローンの ESTs を元に754の独立クラスターが形成された。そのうちの198のクラスターについて発現パターン解析を行った結果、4つの頭部オーガナイザー特異的遺伝子が単離された。単離された遺伝子の一つは *Xenopus crescent* であり、frizzled 様ドメインを有する分泌性因子をコードしていた。前部神経板領域 cDNA ライブラリーから選択した1,824クローンの ESTs からは1466のクラスターが形成され、そのうち433について発現パターン解析を行った結果、前部神経板において比較的一様に発現する N3A9, N24E4、領域特異的に発現する N3B10, N9G8, N17A7, N17D12 などの遺伝子を得た。
- (2) オーガナイザー特異的転写因子による脳誘導因子 Cerberus の遺伝子発現制御機構。オーガナイザー特異的ホメオドメイン蛋白質 Xlim-1 の活性化型 (Xlim-1/3m) は頭部誘導因子 Cerberus の遺伝子発現を誘導することができることより cerberus は Xlim-1 の標的遺伝子と考えられた。そこで *cerberus* のプロモーター領域の解析を行った結果、1) 415bp プロモーター領域は Xlim-1/3m による活性化、および胚の背側での特異的発現に十分であること、2) 219/-116領域の欠失、およびこの領域内の TAAT 配列の変異により、Xlim-1/3m および胚の背側での発現が消失すること、3) Xlim-1/3m がこれら TAAT 配列に結合すること、が明らかとなった。また、野生型 Xlim-1 と Otx2、Siamois と Mix. 1 との共発現により、レポーターおよび内在性 *cerberus* 遺伝子が協調的に活性化されることを見い出した。これらの結果は、オーガナイザー特異的因子 Xlim-1、Otx2、Siamois が Mix. 1 と共に *cerberus* 遺伝子の背側内中胚葉での発現を制御し、頭部形成に関わっていることを示唆している。
- (3) bHLH 型転写抑制因子 XHR1 の中脳・後脳境界 (MHB) 形成における役割。前部神経外胚葉の cDNA ライブラリーのスクリーニングにより得られたク

ローン N9G8 は HES 型転写抑制因子をコードする遺伝子であり *XHR1* (*Xenopus Hes-related gene 1*) と命名した。*XHR1* は MHB 領域に特異的に発現しており、初期原腸胚期において、*Xotx2* と *Xgbx-2* の発現領域が接する以前から予定 MHB 領域ですでに発現が認められた。mRNA 顕微注入実験においてドミナントネガティブ型 *XHR1* の過剰発現により *XPax-2*, *En-2* の発現が減少し、野生型 *XHR1* を共発現することにより、それがレスキューされた。また MHB 領域への野生型 *XHR1* の異所的な発現は *En-2* の発現を拡大した。これらの結果から、予定 MHB の領域化は従来考えられていたモデルとは異なり、*Xotx2* と *Xgbx-2* の発現境界の形成以前から始まっていること、およびその領域化に *XHR1* が必要であることが示唆された。

- (4) 原腸胚の後方組織の収斂伸長運動における *Xror2* の役割。*Xror2* のオーガナイザーおよび後方神経外胚葉での機能を検討するため、mRNA 顕微注入法を用いて解析した。*Xror2* は活性型 *Xlim-1* によって外胚葉外植体で誘導されるが、その mRNA を予定腹側帯域に注入しても、活性型 *Xlim-1* が持つような 2 次軸誘導活性を示さなかった。そこで背側帯域に *Xror2* 野生型あるいはチロシンキナーゼドメインの変異体 TM を発現させたところ、野生型、TM により原腸胚での convergent extension が阻害され、また尾芽胚期では体軸の縮小と頭部形成の阻害が認められた。このことは *Xror2* は細胞外ドメインを介して細胞運動の調節に関与すること、およびオーガナイザー領域における *Xlim-1* の機能として、*Xror2* の発現を介した細胞運動への関与を示唆している。
- (5) マウス前脳形態形成における *Otx*, *Emx* 遺伝子の機能。前脳中脳領域で入れ子式発現パターンを示す *Otx*, *Emx* ファミリーの遺伝子について、*Otx1*, *Otx2*, *Emx1*, *Emx2* 欠損マウスを作成した。本年度は、*Otx2/Emx2* ダブル欠損マウスを作製し、終脳形成における *Otx2* 遺伝子と *Emx2* 遺伝子の役割を検討した。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、分子マーカーを用いた解析の結果、ステージ 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レベルの低下、*En2*, *Pax5* 遺伝子の終脳領域における異所的発現の誘導が認められた。E8.5 では、既に *Otx2* 遺伝子発現のレベルの低下かつ領域の縮小が認められた。

今後もこれらの解析を継続し、オーガナイザーの分子基盤と、脳の誘導とパターン形成のメカニズムの解明を目指す。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Nakano, H., Amemiya, S., Shiokawa, K., and Taira, M.: RNA Interference (RNAi)

for the Organizer-specific Gene Xlim-1 in *Xenopus* Embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 434-439 (2000)

Shibata, M., Ono, H., Hikasa, H., Shinga, J., and Taira, M.: *Xenopus* crescent encoding a Frizzled-like domain is expressed in the Spemann organizer and pronephros. *Mech. Dev.* 96, 243-246 (2000)

Tsuji, T., Sato, A., Hiratani, I., Taira, M., Saigo, K., and Kojima, T.: Requirements of Lim1, a *Drosophila* LIM-homeobox gene, for normal leg and antennal development. *Development* 127, 4315-4323 (2000)

Takada, T., Iida, K., Akasaka, K., Yasue, H., Torii, R., Tsujimoto, G., Taira, M., and Kimura, H.: Evaluation of Heterologous Insulator Function with Regard to Chromosomal Position Effect in the Mouse Blastocyst and Fetus. *Mol. Reprod. Dev.* 57, 232-237 (2000)