

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007-2008
課題番号：19570215
研究課題名 (和文) Cdx-Hox コードによる神経管前後軸形成機構の分子生物学的研究
研究課題名 (英文) The molecular analysis of the formation of anterior-posterior axis by Cdx-Hox code
研究代表者
清水 貴史 (SHIMIZU TAKASHI)
独立行政法人理化学研究所・体軸形成研究チーム・研究員
研究者番号：50324760

研究成果の概要：

生物の発生過程においては、同じ遺伝子経路が、胚体のいろいろな部位で異なった組織の形成に関与している。ゼブラフィッシュの神経系においては、Cdx-後方 Hox 遺伝子経路によって後方脊髄が作られる。また、Cdx 遺伝子の発現しない前方領域においては、前方 Hox 遺伝子が菱脳を形成する。この過程において、Fgf シグナルが Cdx 遺伝子の転写活性を制御して組織のシグナル伝達物質に対する応答性を変更していることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞分化

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の初期発生においては、様々なシグナル伝達因子が複雑に相互作用して細胞分化や形態形成を行っている。ひとつのシグナル伝達経路が複数の組織形成に関与していることが多々観察される。例えば Fgf シグナルの場合、前脳、小脳、菱脳節、体節や尾

の形成に関与していることが知られている。脊椎動物の神経管は、前後軸や背腹軸に沿って異なった機能を持つ神経細胞で構成されており、その発生過程は様々なシグナル伝達経路や転写因子によって制御されている。脊椎動物において神経管の前後軸は、まず最初に背側オーガナイザーからのシグナル（前方

化、抗BMPと抗Wntシグナル)と非中軸中胚葉からの後方化シグナル(Wnt、FGF、レチノイン酸(RA))によって決定される。さらに神経管の詳細な前後軸形成には、神経領域最前端、中脳後脳境界/峡部オーガナイザーや第4菱脳節からのFGFシグナルが重要な役割をしていることが明らかとなっている(二次オーガナイザー)。また、後方菱脳節から脊髄の前後軸における領域化は、Wntシグナルのほかに尾芽、未分節中胚葉からのFgfシグナルと体節からのRAシグナルとの拮抗的な働きによってパターンニングされると考えられている。また、これらのシグナル因子と協調して、あるいは下流でHox遺伝子が神経管前後軸に沿ったパターンニングに関与している。Hox遺伝子は、染色体上の配置(3' -5')と発現領域(前後)、発現開始時期(早い遅い)が、リンクしていることが知られている。

Hox遺伝子群の制御因子である *caudal* 関連遺伝子は、脊椎動物の後方組織の形成に重要な機能をしていることが報告されている。我々は神経後方化シグナルであるWntとFgfの下流で機能するゼブラフィッシュ *caudal* 関連遺伝子、Cdx1aとCdx4を同定した。Cdx1a/4は第四体節以後に発現し、体幹部から尾部の形成に必須であった。Cdx1a/4機能阻害胚では、神経系における第4体節より後方のHox遺伝子(*hoxb7a*、*hoxa9a*、*hoxb9a*など)の発現が消失していた。これらの欠損胚では後方神経領域において、本来の前後軸とは反対に、尾側から吻側に向かって菱脳節(r)4-7・前方脊髄が形成されていた。ゼブラフィッシュ胚後方では、尾側からFgfの、体幹部からRAの濃度勾配が本来の菱脳節、前方脊髄とは前後反対に形成される。Cdx1a/4機能阻害胚では、後方神経が形成される代わりにFgfとRAの濃度勾配を感知して、新たな菱脳節が尾側に形成されると考えられた。そこでCdx1a/4機能阻害胚においてRA合成及びFgfシグナルの阻害実験を行ったところ、本来の菱脳節と同様に後方組織においても阻害剤の濃度依存的にRA合成阻害の場合r7から、Fgfシグナル阻害の場合r5から欠損していった。さらにCdx機能阻害胚における異所的な菱脳形成は、後方Hox遺伝子(*hoxb7a*、*hoxa9a*、*hoxb9a*)の過剰発現によって阻害された。以上の結果から、Cdx1a/4が後方Hox遺伝子などを誘導して、後方組織のパターンニングを制御するとともに、FgfやRAに対する応答性を変化させることによって後方領域における菱脳節や前方脊髄の形成を阻害し、後方脊髄の形成に重要な役割をしていることが明らかとなった。以上のことから、ゼブラフィッシュにおける後方菱脳節から後方の神経管前後軸パターニ

ングにおいては、Cdxが発現する後方領域ではCdx-後方Hox経路が、シグナル因子に対する組織応答性の決定において重要な役割を果たしていると考えられた。しかしながら、どのような分子メカニズムによってCdx1a/4-後方Hox経路が菱脳節形成を阻害して脊髄をシグナル伝達分子に応答して形成するのかは明らかではない。

2. 研究の目的

生体においては、共通のシグナル伝達分子(Wnt、FGF、RAなど)が様々な発生過程に係わるが、それらの因子に対する応答性(コンピテンス)はそれぞれの組織によって異なる。この応答性の違いについての分子生物学的解析は、生命現象を理解する上で非常に重要なテーマであり、ゼブラフィッシュ Cdx-Hoxコードによる神経系パターンニングの形成過程は、そのモデルケースとなると考えられた。そこで本研究では、

(1) 後方組織形成における Cdx を介する経路の分子メカニズムの解明、

(2) Cdx1a/4、Hox 遺伝子による Fgf や RA シグナルに対する組織応答性の変化の分子機構の解明、

(3) 後方組織の形成、神経管パターンニング、細胞運動に関与する突然変異体の同定と解析を通じた体軸形成機構の解明、を目的に研究を行った。

そこで、以下のことを明らかにすることを重点に研究を遂行した。

(1) Cdx1a/4 欠損胚における後方組織形成阻害機構

(2) Cdx1a/4 および後方 Hox 遺伝子の発現調節機構、

(3) Cdx1a/4-Hoxb9a/b9b の下流遺伝子の同定、

(4) Cdx1a/4 および Hoxb1a/b1b による FGF、RA に対する応答性変化機構。

3. 研究の方法

(1) Cdx1a/4 による後方組織形成機構の解析

尾形成過程を蛍光色素によって細胞をラベルして細胞移動を調べる。尾芽における細胞増殖を正常胚、Cdx 欠損胚において調べる。

(2) Wnt、Fgf シグナルによる *cdx* 遺伝子の発現制御機構についての解析

Cdx 遺伝子のプロモーター、エンハンサー領域を同定する。シグナル伝達経路下流にある転写因子の結合領域を決定する。

(3) Cdx 蛋白による *hoxb7a/a9a/b9a* 遺伝子の発現調節

Cdx 遺伝子の部分欠損分子を作製し、転写活性を調べる。*Hoxb7a*、*hoxb9a* のプロモーター、エンハンサー領域をクローニングする。エンハンサー領域に GFP 遺伝子やルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトで、ゼ

ブラフィッシュにおける強制発現や培養細胞を用いたルシフェラーゼアッセイによって Cdx 蛋白と Fgf シグナルによる転写制御機構を調べる。転写活性化領域に結合する転写因子を同定する。

(4) Cdx 遺伝子の下流遺伝子の同定

Cdx 遺伝子の下流因子をサブトラクション法を用いて検索する。また、その生体内での機能をゼブラフィッシュ胚を使って mRNA の過剰発現による機能獲得実験やアンチセンスモルフォリノによる機能阻害実験を行う。

(5) 後方組織形成及び神経管前後軸形成に関与する変異体の単離

突然変異剤に ENU を使用して、通常の F3 世代における表現型の解析によって尾の形成ならびに神経系のパターンニングに異常のある変異体を探索する。ポジショナルクローニングによって責任遺伝子の同定を行う。また、その遺伝子の分子機能と表現型の関連を解析する。

4. 研究成果

これまでの我々の研究から、ゼブラフィッシュの神経管前後軸形成には、Wnt、Fgf、RA シグナルと Hox 遺伝子群が重要な役割をしていることが明らかになっている。さらに、これらを繋げる分子としてホメオボックス遺伝子 Cdx を同定した。さらに Cdx 蛋白は、後方 Hox 遺伝子を Fgf 依存的に誘導し、細胞を後方組織に Fgf シグナルと協調して変換する。本研究では、さらに Cdx 遺伝子の分子機能を重点的に解析し、シグナル分子に対する組織応答性の変化メカニズムについて考察を行った。

Cdx 遺伝子は、Wnt、Fgf シグナルによって発現が誘導されることが分かっている。ゼブラフィッシュ Cdx1a と Cdx4 の発現調節機構を探る目的でプロモーター、エンハンサー領域の塩基配列を調べるところ、Wnt シグナルの核内メディエーターである転写因子 TCF の結合配列が存在した。これらの配列は、マウスにおいても保存されており、Cdx 遺伝子の発現に重要であることが報告されている。現在、ゼブラフィッシュ Cdx 遺伝子について詳細な解析を行っている。

Cdx 遺伝子は、ホメオボックスを持つ転写因子であり、後方 Hox 遺伝子を Fgf シグナル依存的に誘導する (図 1)。Cdx 遺伝子の転写

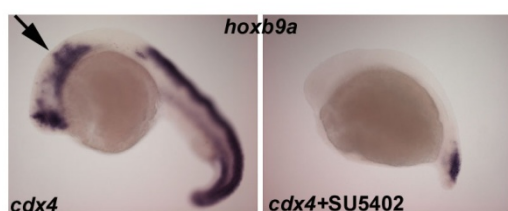


図 1 Cdx4 による Fgf シグナル依存的な Hoxb9a の発現誘導

活性化機構を解析するために、各種の部分欠損分子を作製し、ゼブラフィッシュ胚に過剰発現して hoxb7a や hoxb9a の異所的な発現誘導の有無を観察した。さらに Cdx 結合配列を用いた培養細胞におけるルシフェラーゼアッセイを行った。Cdx1a、Cdx4 の N 末端約 50 アミノ酸領域に顕著な転写活性化領域が存在していた。また、Cdx 蛋白には転写因子 Pbx の結合部位が存在するが、この領域は Hox 遺伝子の発現誘導には関与しないことが明らかとなった。また、Fgf シグナルは Cdx 蛋白の転写活性を制御していた。Cdx 蛋白は、Fgf シグナルの細胞内伝達因子である MAP キナーゼによってリン酸化される配列を有しているが、この部位に変異を入れた Cdx 蛋白によっても後方 Hox 遺伝子の異所的な発現誘導が起こった。また、インビトロキナーゼアッセイにおいても Cdx 蛋白の MAP キナーゼによる直接のリン酸化は観察されなかった。以上のことから、Fgf シグナルは MAP キナーゼによる直接な作用ではなく、間接的に、あるいは何らかの協調因子に作用して Cdx 蛋白の転写活性を制御していることが示唆された。

Cdx 遺伝子による後方 Hox 遺伝子発現制御機構を調べるために、Hoxb9a 遺伝子の 5' 上流領域、約 4kbp と第 1 イントロン配列をクローニングした。これらの配列は、ゼブラフィッシュ内在性の Hoxb9a 遺伝子の発現パターンを再現できた。さらにこれらのプロモーター/エンハンサー領域は、Cdx 遺伝子の過剰導入による異所的な発現誘導を引き起こした。以上のことから、この領域に Cdx 遺伝子による転写調節部位が存在することが明らかとなった。

Cdx-後方 Hox 遺伝子経路が、Fgf や RA シグナルと協調して後方領域のパターンニングを行っているが、より前方領域では、どのような分子メカニズムが働いているのか明らかではない。我々の研究により、頭部 (後方菱脳節) におけるシグナル因子に対する応答性には、前方 Hox 遺伝子 (hoxb1a、hoxb1b など) が関与していることが明らかとなった。ゼブラフィッシュ胚に異所的にこれらの遺伝子を発現させると、Fgf シグナル依存的に前脳中脳領域に菱脳節マーカー遺伝子が誘導された (図 2)。

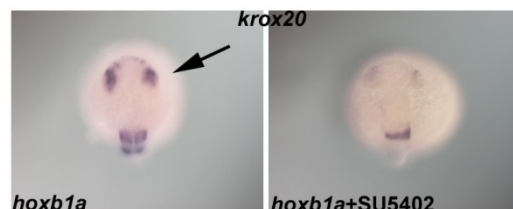
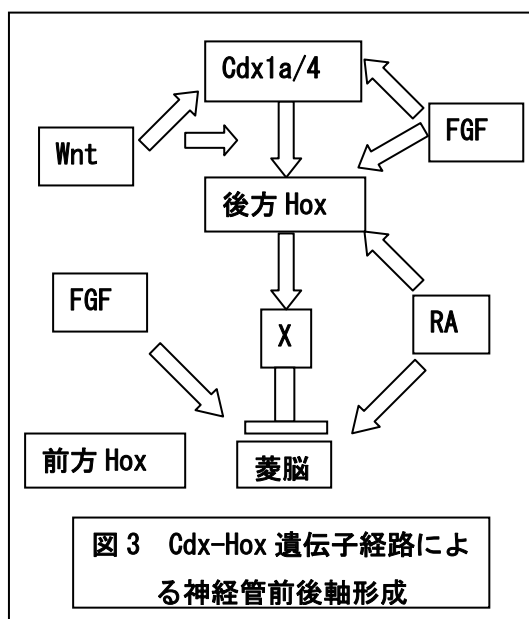


図 2 Hoxb1a による Fgf シグナル依存的な菱脳マーカーの発現誘導

これらのことから、Cdx 遺伝子は Fgf シグ

ナルの組織応答性を Hox 遺伝子を介して制御していると考えられた。また、菱脳領域では前方 Hox 遺伝子が、Cdx 遺伝子の発現する第 4 体節より後方では Cdx-後方 Hox 遺伝子経路が、Fgf シグナル依存的に領域を決定していることが示唆された (図 3)。

以上の研究成果は、胚におけるシグナル因子に対する組織応答性の違いを生み出す機構の一端を明らかにすることにより、様々な細胞を創生するための再生医学の基礎研究として重要であると考えられた。



さらに中枢神経系のパターンニングに関する変異体をスクリーニング (826 ゲノム) したところ、小脳形成に異常のある変異体を 9 種同定できた。そのうち、一種はこれまでに報告のあった中脳後脳境界が形成されない変異体 *pax2a(no isthmus)* であった。また、プルキンエ細胞の数の減少、樹状突起の形成不全と顆粒細胞の重篤な欠損を生じる変異体を 5 種単離した。そのうち、2 種については責任遺伝子を同定したところ、mRNA のスプライシングに関与する遺伝子 *p110/SART3* とヒトのコロイデレミアの原因遺伝子 *REP1* であった。これらの変異体は、ヒト疾患モデルとして疾病の発症機構の解明や治療薬のスクリーニングに役立つものと考えられる。今後、これらの変異体の詳細な解析と他の変異体の責任遺伝子の同定を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 清水貴史 (6 名中 3 番目)
Initial specification of the epibranchial placode in zebrafish embryos depends on the fibroblast growth factor signal.
Developmental Dynamics, 236, 564-571, 2007、査読有
- ② 清水貴史 (8 名中 3 番目)
Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development.
Developmental Biology, 印刷中、2009 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 清水貴史
Anterior-posterior patterning of neural tissue by fgfs, retinoic acid and cdx-hox codes
5th European zebrafish genetic and Development meeting
2007 年、7 月 12 日—17 日
アムステルダム、オランダ
- ② 可児修一
Genetic and histological analysis cerebellar neurogenesis
8th International Conference on Zebrafish Development and Genetics
2008 年、6 月 25 日—29 日
マディソン、ウィスコンシン、アメリカ

[その他]

ホームページ
<http://www.cdb.riken.go.jp/vaf/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 貴史 (SHIMIZU TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・体軸形成研究
チーム・研究員

研究者番号：50324760