

平成 21 年 6 月 2 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19570217

研究課題名（和文） 脊椎動物の脳の部域化決定における分子メカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanism in vertebrate brain regionalization

研究代表者

氏名（アルファベット）道上 達男（Tatsuo MICHIEU）

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号 10282724

研究成果の概要：

脊椎動物の初期胚は、受精後様々な細胞内シグナリングの作用による体軸形成・三胚葉分化を経て胚の基本的なボディパターンが規定される。これまで、Wnt、FGF、RA などのシグナリングの前後軸に沿った仮想的濃度勾配が脳や脊髄の部域を規定していることが示されてきたが、本課題では、特にどのような遺伝子の関与が脳、特に脳の部域既定に必要であるかを明らかにするため、以下の3点について解析を行った。既存の脳マーカー遺伝子間の発現制御メカニズム解明を目指し、間脳特異的遺伝子 Rx/Rax の、脳遺伝子 Otx2 と神経化因子 Sox2 による制御機構について研究を行った。その結果、Otx2 蛋白と Sox2 蛋白は直接結合し、更に Rx/Rax のプロモーター領域に結合して転写を制御することを見出した。頭部で特異的に発現しかつ Wnt シグナルに制御を受ける新規遺伝子をマイクロアレイ解析によって約 50 同定した。その中で、ツメガエルの神経器官の一つであるセメント腺のみで特異的に発現する遺伝子として XgalectinVIa、Xnrx3.1 などを見出し、Wnt シグナリングによる制御などを明らかにした。また、RA 代謝酵素 XCyp26c がやはり Wnt シグナルに制御され、かつ一部のロンボメア特異的に発現することを見出した。更に、ヒストンメチルフェラーゼをコードする PRDM12 遺伝子が、口蓋プラコードで特異的に発現し、神経誘導能を有することを明らかにした。予定神経外胚葉に存在する位置情報の根拠となる因子の同定を目指した。腹側割球由来の細胞と背側由来の細胞間で神経誘導能に差があることを見出した上で、これらの組織における遺伝子発現の差をマイクロアレイで解析した結果、いくつかの候補遺伝子を同定した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：形態形成

## 1. 研究開始当初の背景

細胞が個性を持つためには、それぞれ決められたセットの遺伝子を発現する必要がある。細胞内シグナル伝達経路は、細胞外の因子を感知してその刺激を核内に伝え、特定の遺伝子発現のみを誘導する分子機構である。発生は、単一の細胞である胚から様々な個性を持つ細胞を生み出す作業であることから、発生の分子メカニズムを研究するためには、細胞内シグナル伝達経路の解析は必要不可欠である。Wntシグナル伝達経路(Wnt経路)は、数多くのシグナル伝達経路の中で最もよく知られるものの一つであり、線虫からヒトに至る様々な生物種で共通に存在し、形態形成、細胞極性、細胞分裂など、多くの重要な生命現象に参与する。初期胚の発生においては、胚のパターニングや神経誘導、器官形成などに関与することが明らかになってきていた。研究代表者はこれまで、ツメガエルをモデル生物に用いてWnt経路のキー因子であるdishevelledと相互作用する因子(CK1e, GBP, Axinなど)がシグナル伝達にどのように関与するかについて分子的な解析を行うと同時に、新規因子( Idax, duple-like, ELL, nucleoredoxin )の同定を行って、初期胚の軸形成(胚の方向付け:背腹方向や前後方向)においてどのような機能を持つかについて解析を行ってきた。その過程で、シグナル伝達機構の関与が明らかなのにも関わらず不明な点が多い脳の部域決定メカニズムに、Wnt経路がどのような役割を果たすか、という点に着目した。

ツメガエルを含む脊椎動物は、原腸陥入時、前後に沿ってWntシグナルが仮想的な

濃度勾配を形成することにより、どちらが頭部に、どちらが尾部になるかが決定されると考えられている。具体的には、Wnt阻害を受けた神経外胚葉領域は脳を含む頭部に、阻害を受けずWntシグナルが伝わった神経外胚葉領域は脊髄を含む尾部へと分化する。しかし、ここで規定されるのは大まかな「頭の部分」と「尾の部分」であり、濃度勾配のみによって、より細かい脳の部域(どの領域が前脳になり、どの領域が後脳になるか)を規定することは出来ないと思われる。一方、先行研究の結果から、脳の部域も原腸陥入期に決められ、分化が進むことが知られている。つまり、前後方向の規定と脳の部域規定は、多少の前後はあるものの、同時期に進行していくと思われる。これまでに、前述のIdax, nucleoredoxinなどWnt関連因子が脳のパターニングにも関与している知見を得ていることから、脳の部域決定にもWnt経路が関与していることが示唆されている。ところが、脳の部域決定メカニズムに対する知見は現状では驚くほど少ない。そこで、Wnt経路との関連にも注目しながら、最終的には脳の部域決定メカニズム解明を目的とした解析を行いたいと考えた。

## 2. 研究の目的

研究目的は、以下の3点を設定した。

### (1) 間脳特異的遺伝子の空間的な発現領域を決定する分子メカニズムの解明

脳の部域規定機構を解明する最初のアプローチとして、脳特異的遺伝子の発現を空間的に制御する分子機構を明らかにすることを考えた。特に本課題では、間脳特異的

な遺伝子発現に注目した。以前に行った解析の結果から、Wnt経路に応答し、間脳領域のみで特異的に発現する遺伝子、Rx1, Six3などを既に同定していた。過去の知見から、両遺伝子とも脳マーカー遺伝子として知られるOtx2, eye-fieldマーカー遺伝子ETなどの制御を受けているらしいことは分かっているものの、発現制御の分子メカニズムは不明である。Six3やRx1遺伝子が間脳領域特異的な発現が、両遺伝子の制御領域(エンハンサー配列など)がどのような因子と相互作用し、どのような制御を受けることによって決められているかを検討することによって、この場合では間脳領域の規定メカニズム解明の一助にしたいと考えた。

## (2)脳部域に関与すると考えられる新規因子の脳部域規定への役割の解析

(1)で示したような、遺伝子の空間的な発現制御メカニズムが全ての脳特異的遺伝子について理解できれば、脳の部域決定メカニズムに直接的に迫ることが可能だと思われる。ところが、現状では脳部域の規定に関与すると思われる遺伝子、特に上述のRx1/Six3のような部域特異的に発現する遺伝子の数が少なく、部域決定メカニズムの解析に支障をきたしている。すでに我々は、マイクロアレイを用いた予備実験の結果から、脳の部域特異的に発現する新規因子を数種類同定していた。本課題では、これらの候補遺伝子の過剰発現・欠損解析、更には他の遺伝子への効果を観察することによって、実際に脳の部域規定に関与する機能を持つかどうか検討した。

## (3)神経外胚葉における新しい脳部域決定メカニズムの解析

上述の、前後軸に沿ったWntシグナルの仮想的濃度勾配は、原腸陥入によって外胚

葉の内側に裏打ちされる内胚葉組織から分泌されるWntシグナル阻害因子によって形成される。一方、予備実験の結果から、脳の部位決定には、脳の誘導される側である神経外胚葉が持つ位置情報も重要であることが示唆された。具体的には、神経外胚葉において腹側に近い細胞群と背側に近い細胞群の境界が終脳と間脳の境界を規定していると考えている。そこで、交換移植、マーカー遺伝子の発現変化の解析、細胞系譜の追跡など、さまざまな解析を行うことにより、神経外胚葉の位置情報が脳領域の規定にどのように寄与しているかについて検討した。

## 3. 研究の方法

研究には、主にツメガエル胚を用い、生化学的なアッセイには培養細胞の系も用いた。

### (1) ツメガエル胚への遺伝子操作

ツメガエル胚ツメガエルの受精胚は研究室内で飼育された雌個体から人工受精によって得た。胚における遺伝子の過剰発現実験は、*in vitro* 合成した mRNA を用い、マイクロインジェクター(平成19年度に本課題の予算により購入)を用いて胚に微量注入することによって行った。また、欠損実験には、モルフォリノアンチセンスオリゴを同様に胚に微量注入することによって行った。

### (2) 遺伝子発現の調査

空間的な発現パターンの調査には、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション(WISH)を主に行った。WISH に用いたプローブは、ディコキシジェニン(Roche 社)でラベルされた RNA を *in vitro* 合成して作製した。半定量的な遺伝子発現の調査のためには、RT-PCR を主に用いた。胚、あるいは培養細胞から得た RNA は superscriptII (Invitrogen 社)によって逆転写反応に用い、

その後 PCR 反応することによって遺伝子発現の量を検証した。

### (3) 発現制御領域の解析

ルシフェラーゼアッセイは、エンハンサー配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターを用意し、これらをツメガエル胚に微量注入、あるいは培養細胞にトランスフェクションし、Glomax(Promega)ルミノメーターによって測定した。また、タンパク質の DNA 結合の有無については、ゲルシフトアッセイ(RI、あるいは非RIラベルしたDNA断片を使用)、あるいはクロマチン IP 法を用いた。

### (4) タンパク質—タンパク質相互作用の解析

タンパク質の結合の解析には、免疫沈降実験を行った。Sox2、Otx2 については特異的抗体を用いた。また、場合によっては myc, HA タグなどを連結した融合タンパク質を卵または培養細胞に発現させ、各特異的抗体を作用させた。それらの検出には、蛍光基質、あるいは通常の発色基質を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) Otx2 と Sox2 の直接的な相互作用による Rx 遺伝子の発現制御機構

Otx2 と Sox2 遺伝子は、これまで原腸胚期において予定神経外胚葉に発現する神経マーカーとしてよく知られていた。これらの遺伝子はそれぞれ予定脳領域、神経板領域で強く発現する。一方、Rx1(Rax)は初期神経胚期から予定間脳領域で発現が始まる。しかし、お互いの遺伝子発現の制御関係についてはこれまで不明な点が多く残されていた。そこで、Rx1(Rax)の発現調節機構の解明を目指し、Otx2 と Sox2 との相互作用について、ツメガエル胚、及び哺乳動物の

培養細胞(HEK293T)を用いて調べた。まず、XRx1 遺伝子上流配列約 10Kb について、他の生物種との相同性を in silico(VISTA 解析)で調べたところ、転写開始点の約 8kb 上流に高度に各生物種で高度に保存されている領域(CNS 領域; 図 1(A))を見いだした。そこで、これらの領域に転写活性があるかどうかを調べるため、ゲノム領域を単離した上でルシフェラーゼを下流に連結したコンストラクトを作製し、ツメガエル胚、あるいは培養細胞に導入したところ、予想通りルシフェラーゼ活性の上昇が観察された(図 1(B))。CNS 領域中に転写因子結合配列が存在するかどうかを調べると、Otx 結合配列、及び HMG ドメイン蛋白結合配列が見いだされたことから、これらの遺伝子のうち、ツメガエルの神経板領域に発現する Otx2 と Sox2 タンパク質に注目し、DNA 結合能をゲルシフトアッセイ、及び ChIP アッセイによって調べたところ、実際にこれらのタンパク質が CNS 領域に結合するこ

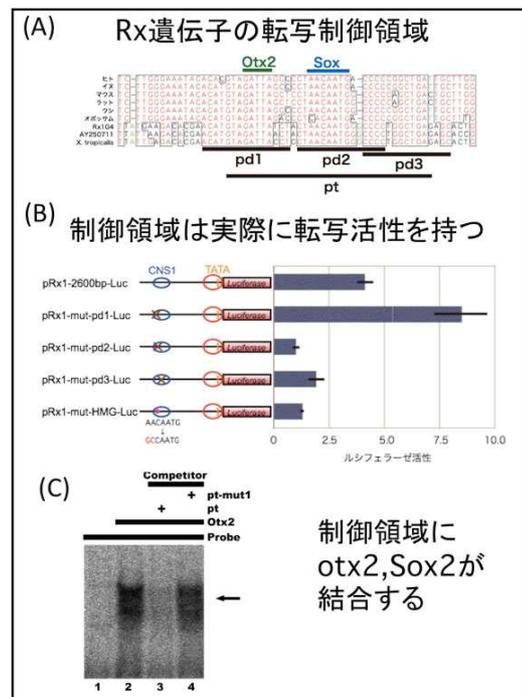


図1 Otx2とSox2による Rx遺伝子の発現制御機構

とを見いだした(図1(C))。また、それぞれの転写活性は、Otx2 と Sox2 によって活性化された。Otx2、Sox2 結合配列は非常に近接していたことから、Otx2 と Sox2 は直接相互作用するのではないかと考え、これらの相互作用を免疫沈降実験で確かめたところ、実際に結合能があることが確かめられた。以上の結果から、Otx2-Sox2 複合体が Rx1 エンハンサー領域に結合することにより、Rx1(Rax)の転写を正に調節していることを明らかになった(Danno et al., 2008)。この結果は、間脳特異的に発現する遺伝子の新しい発現制御機構に迫るものであり、非常に重要であると考えられる。

## (2) 頭部領域で特異的に発現する新規遺伝子の同定と機能解析

背景にも記述したとおり、脊椎動物初期胚における前後神経パターンニングは、Wnt シグナルの正中線に沿った仮想的な濃度濃度勾配によって規定されると考えられている。そこで、Wnt 促進因子である  $\beta$  カテニンの

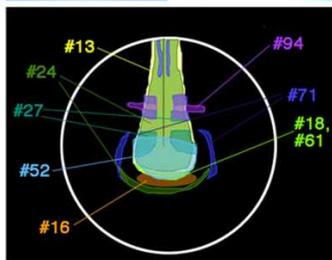
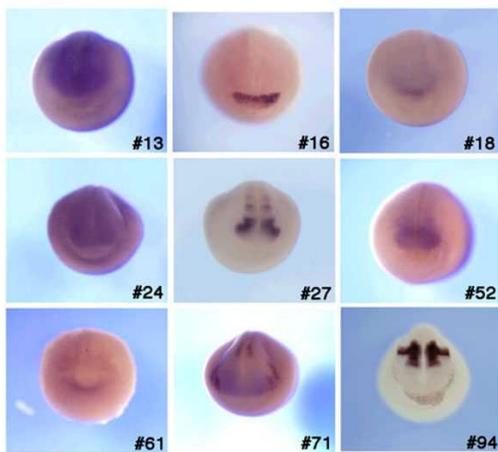


図2  
マイクロアレイによって得られた新規遺伝子の発現パターンの例。

注入によって発現が下がり、かつ胚の後方に比べて前方で強く発現する遺伝子を、アジレント社の 22K マイクロアレイを用いて探索した。その結果、約 100 の遺伝子が、頭部/尾部 > 5, normal/bcat > 5 を満たす発現量を示した。うち、50 遺伝子については既に頭部領域での発現が明らかであったため、残り約 40 遺伝子(重なりを含む)について空間的な発現パターンを in situ ハイブリダイゼーションによって調べた結果(図2(一部))、いずれも中脳や後脳の限定された領域で発現するなど、興味深い発現パターンを示すものを得ることが出来た。

まず、セメント腺(神経器官)特異的に発現する遺伝子を 2 つ同定した。一つは、ガラクトシド特異的に結合するレクチン

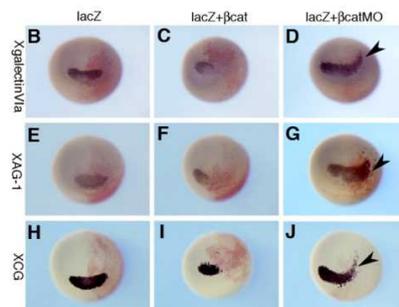
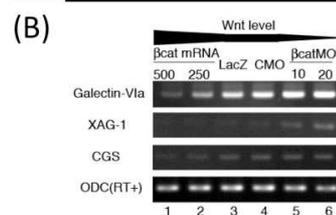
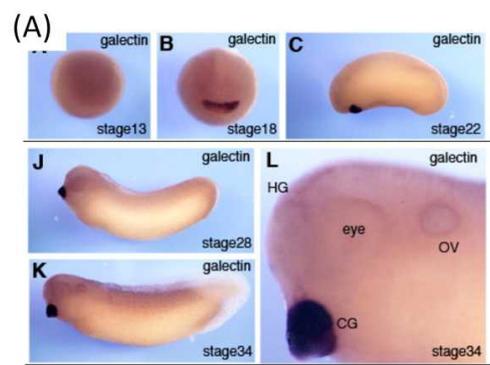


図3 GalectinVlaの解析

GalectinVla であった。これに関しては、b-catenin 注入による遺伝子発現の変化を解析したところ、予想通り b-catenin 注入胚では発現が減少し、逆に b-cateninM0 によって Wnt シグナルを更に抑制することによって発現領域が拡大した(図 3 (B))。ただ、脳の部位規定という当初目的とは少しはずれたため、この段階で論文に公表した (Michiue et al., 2007)。もう一つはホモボックス遺伝子 NKX3.1 であった。これ

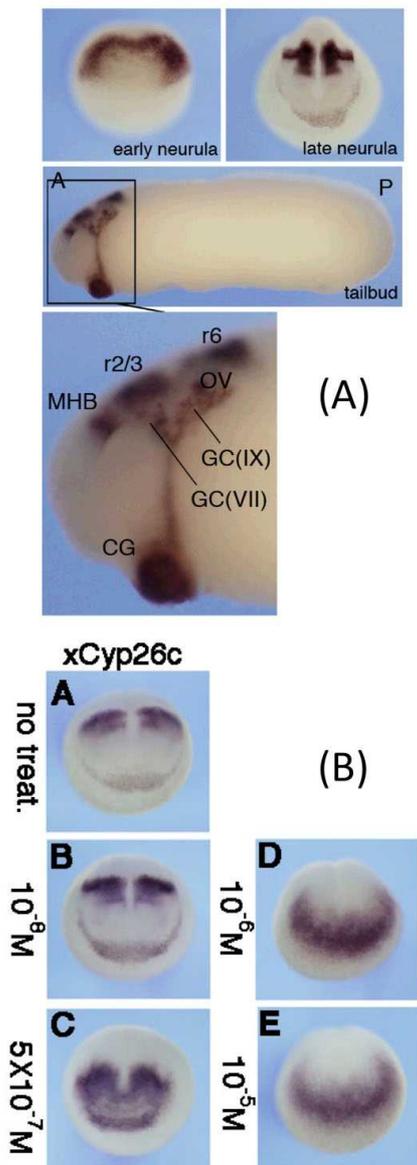


図4 xCyp26c1の解析

については、発現パターンの解析を行ったにとどめた。

xCyp26c1 は、レチノイン酸不活化酵素 Cyp26 ファミリーに属する遺伝子の一つである。In situ ハイブリダイゼーションの結果、xCyp26c1 は神経胚期の後脳領域、特にロンボメア 2、4、6 で特異的に発現することが分かった(図 4(A))。xCyp26c1 を過剰発現すると、実際に頭部の構造に異常が引き起こされた。また、xCyp26c1 の発現様式のレチノイン酸依存性を調べたところ、低中濃度のレチノイン酸 (<math>10^{-6}</math>M) に対しては、後方化の影響を受け発現領域の縮小が見られたが、それ以上の高いレチノイン酸で胚を処理したところ、頭部領域特異的であった発現パターンの限局性が解除され、予定頭部領域全体で強い発現が認められた(図 4 (B))。これらの結果は、xCyp26c の発現制御が 2 段階に行われていることを示唆している。以上の結果について、論文に公表した (Tanibe et al., 2008)。また、レチノイン酸合成酵素 xRalDH2 についても解析を行い、発現の Wnt シグナリング依存性を見出した。

PRDM12 遺伝子は、予想されるアミノ酸配列の中に PR ドメインを有することから、ヒストンメチルトランスフェラーゼの機能を持つと考えられる。PRDM12 遺伝子は PRDM ファミリーを構成する遺伝子ファミリーの一つであるが、これまで初期胚の脳形成に関してはほとんど何も明らかになっていなかった。発現パターンを調べると、spinal cord 領域と、頭部神経板と思われる領域の外側で特異的に発現していることが分かった。特に、後者の発現パターンがどこに対応するかが興味深かったため、神経板マーカー Sox2、汎脳マーカー Otx2、神経堤マーカー Slug との double in situ ハイブ

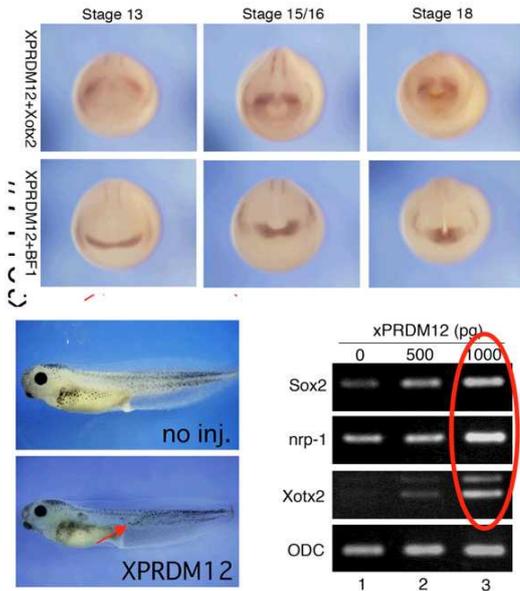


図5 XPRDM12の解析

リダイゼーションを行った。その結果、PRDM12の初期神経胚期における発現領域は、前部神経冠細胞の更に外側、いわゆる口蓋プラコードと呼ばれる領域で発現しているらしいことが明らかになった(図5)。これまでの知見と併せると、PRDM12の発現領域はプラコード領域の中でも三叉神経プラコードを含む領域であることが示唆された。次に、過剰発現・発現欠損によるツメガエル胚での影響を調べた。興味深いことに、PRDM12mRNAを腹側割球に注入すると、ごく弱いものの軸構造を誘導した。また、動物極に注入すると、3日胚において、頭部領域の背側に神経堤細胞と思われる色素の強い沈着が見られた。さらに、PRDM12の過剰発現は、アニマルキャップに神経マーカー遺伝子の発現を誘導した(図5)。以上の結果から、PRDM12は神経誘導能を有することが示唆された。逆に、PRDM12MOを注入すると色素に由来する体色が薄くなったことから、実際にPRDM12は神経発生に関与することが期待された。ただ、PRDM12MOを注入しても神経板の領域の拡大など

が見られなかったことから、当初期待した神経領域の境界規定への関与は少ないと思われる。

### (3) 予定神経外胚葉に元来存在する位置情報の有無とその分子機構に関する解析

これまでの知見から、脳の誘導には外胚葉に裏打ちされた中内胚葉の相互作用が必要であることが考えられている。しかし、脳の部域といったより細かいパターンの規定には、それらのシグナルのみでは不十分だと思われる。そこで、脳組織が誘導される側、すなわち前方神経外胚葉に、原腸陥入以前から何らかの位置情報(因子の偏り)があり、それらが脳の部域規定に何らかの関与をしているのではないかと、という作業仮説を立てた。これらを検証するため、まず外胚葉の腹側割球由来領域、背側割球由来領域、その境界、この3つを外科的に切り出し、それぞれの特性を調べた。まず、BMP阻害因子(ドミナントネガティブ型BMPレセプター)を注入した胚からそれぞれの領域を切り出し、それぞれの神経マーカー誘導能を調べたところ、明らかに背側領域

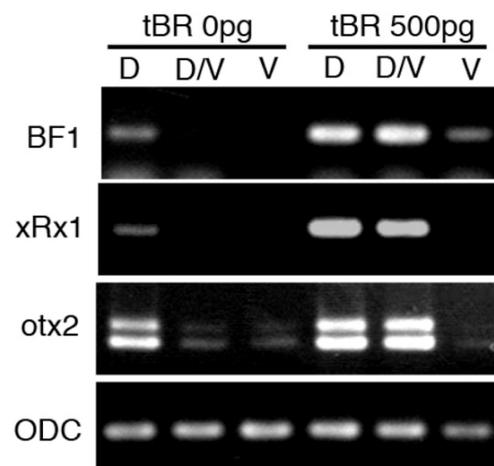


図6 背腹領域の違いによる神経誘導能の差

のみに強い神経誘導が観察された(図6)。そこで、前方神経外胚葉に元来備わる位置情報を決める具体的な遺伝子の同定を目指し、マイクロアレイにより背側外胚葉、腹側外胚葉、その境界部で発現に差がある遺伝子の同定を行った。その結果、いくつかの遺伝子について、背腹境界を境に明らかな差を見いだした。しかしながら、残念ながら現時点では過剰発現等による明確な脳領域の乱れは確認できていない。そのため、解析すべき発生ステージを少し変えて再度マイクロアレイを行った。その結果、背腹領域で大きな差があるもの、背・腹境界領域のみで発現が上昇する膜タンパク質など新たな候補遺伝子を単離することが出来た。

## 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10件)

1. Asashima M, Ito Y, Chan T, Michiue T, Nakanishi M, Suzuki K, Hitachi K, Okabayashi K, Kondow A, Ariizumi T. (2009). In vitro organogenesis from undifferentiated cells in Xenopus. *Dev Dyn.* in press.
2. Kojima T, Shimazui T, Hinotsu S, Joraku A, Oikawa T, Kawai K, Horie R, Suzuki H, Nagashima R, Yoshikawa K, Michiue T, Asashima M, Akaza H, Uchida K. (2009). Decreased expression of CXXC4 promotes a malignant phenotype in renal cell carcinoma by activating Wnt signaling. *Oncogene.* **28**:297-305.
3. Michiue T\*, Tanibe M\*, Yukita A, Danno H, Ikuzawa M, Ishiura S, Asashima M. (2008). Retinoic acid metabolizing factor xCyp26c is specifically expressed in neuroectoderm and regulates anterior neural patterning in Xenopus laevis. *Int. J. Dev. Biol.* **52**: 893-901.
4. Funato Y, Michiue T, Terabayashi T, Yukita A, Danno H, Asashima M, Miki H. (2008). nucleoredoxin regulates the Wnt/planar cell polarity pathway in Xenopus. *Gene Cells.* **13**: 965-975.
5. Kaneko, K., Sato, K., Michiue, T., Okabayashi, K., Ohnuma, K., Danno, H., Asashima, M. (2008). Developmental Potential for Morphogenesis in Vivo and in Vitro. *J. Exp. Zool.* **310**: 492-503.
6. Yamamoto H, Sakane H, Yamamoto H, Michiue T, Kikuchi A. (2008). Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of  $\beta$ -catenin signaling. *Dev. Cell.* **15**: 37-48.
7. Asashima, M., Michiue, T., Kurisaki, A. (2008). Elucidation of the role of activin in organogenesis using a multiple organ induction system with amphibian and mouse undifferentiated cells *in vitro*. *Dev. Growth Differ. Suppl 1*: S35-S45 (Review).
8. Danno, H., Michiue, T., Hitachi, K., Yukita, A., Ishiura, S., Asashima, M. (2008). Molecular links among the causative genes for ocular malformation: Otx2 and Sox2 coregulate Rax expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**: 5408-5413.

9. Michiue, T., Danno, H., Tanibe, M., Ikuzawa, M., Asashima, M. (2007). *Xenopus* galectin-VIa shows highly specific expression in cement glands and is regulated by canonical Wnt signaling. *Gene. Expr. Patterns* 7:852-857.
10. Yukita, A., Michiue, T., Danno, H., Asashima, M. (2007). XSUMO-1 is required for normal mesoderm induction and axis elongation during early *Xenopus* development. *Dev. Dyn.* 236: 2757-2766.

〔学会発表〕(計5件)

1. Danno, H., Michiue, T., Hitachi, K., Yukita, A., Ishiura, S., Asashima, M. Molecular relationship among the responsible genes for ocular malformation. The 41th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (2008.5.28, 徳島)
2. Danno, H., Michiue, T., Ishiura, S., Asashima, M. 2008. Transcriptional control of eye and brain development: Otx2 and Sox2 coregulation. The 12th International *Xenopus* Conference. (2008.9, Leiden, Germany)
3. Danno, H., Michiue, T., Ishiura, S., Asashima, M. Exploration of transcriptional networks controlling head development by comparative genomics approach. *Frontiers in Developmental Biology*. (2008.9, Hyeres, France)
4. 團野宏樹, 道上達男, 石浦章一, 浅島誠. ヒトの眼の発生プログラム解明へのアプローチ, 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム (2008.9.23, 東京)

5. 團野宏樹, 道上達男, 石浦章一, 浅島誠. 眼形成不全原因遺伝子間の分子的关系, 第1回 XCIJ 首都圏支部会研究集会 (2008.10.18, 東京)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

道上 達男 (Tatsuo MICHIEU)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授  
10282724

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし