

機関番号：12401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570197

研究課題名（和文）脊椎動物胚の脳原基領域化を支配するシグナルセンターの形成制御機構

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of the formation of the signaling center for regionalization of the brain primordium in vertebrate embryos.

研究代表者

弥益 恭 (YAMASU KYO)

埼玉大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：60230439

研究成果の概要（和文）：脳形成シグナルセンターである前方神経境界（ANB）と中脳後脳境界（MHB）の形成及び誘導機能に関わる調節遺伝子のエンハンサーをゼブラフィッシュにおいて同定、その制御機構を結合因子解析とレポーター解析等により検討した。また MHB 形成における *pou2* 遺伝子の機能について熱誘導性抑制型 Pou2 を用いて解析し、*pou2* の働く時期と標的遺伝子を示した。並行して新規脳形成異常変異体の表現型解析と原因遺伝子の特定を進めた。

研究成果の概要（英文）：The enhancers of the regulatory genes for the two signaling centers, anterior neural boundary (ANB) and midbrain-hindbrain boundary (MHB), were identified in zebrafish, and their regulation was analyzed by binding assays and reporter assays. In addition, the role of *pou2* in MHB formation was examined by using heat-inducible repressive Pou2, showing the stages of *pou2* function and the downstream genes. Furthermore, the phenotypes of a novel developmental mutant was analyzed and its causative gene was explored, resulting in identifying a limited number of candidate genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	0	0	0
2012年度	0	0	0
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：脳形成、脳部域化、遺伝子発現調節、ゼブラフィッシュ、発生・分化、発生遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の胚発生において、脳原基は中軸中胚葉からのシグナルにより外胚葉から神経板として誘導される。その後、神経板の内部に生じるシグナルセンターにより脳原基の部域化が進行することが、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュ等において明らかとされており、その機構は基本的に脊椎動物において共通とされる。代表的な部

域化シグナルセンターとして、前方神経境界（Anterior Neural Boundary, ANB；マウスでの ANR）と中脳後脳境界（Midbrain-Hindbrain Boundary, MHB）があり、各々終脳（大脳）と間脳、中脳と小脳の誘導とパターンニングにかかわる。ANB 形成については *Otx2*、*Emx* 等のホメオドメイン転写因子、MHB については *Otx2* と *Gbx2* の発現境界で活性化される各種制御因子が

主要な役割を果たし、いずれの場合も主要シグナル因子は FGF ファミリー成長因子の一つ、Fgf8 とされる。しかしこれらシグナルセンターの形成機構の詳細には不明な点が多く、これに関わる遺伝子制御ネットワークの解明が課題となっていた。

## 2. 研究の目的

本研究では脳形成のシグナルセンター形成機構について、脊椎動物脳形成のモデル系であるゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いて以下の研究を行った。

(1) ANB 領域の形成を行うホメオドメイン転写因子 Emx (ゼブラフィッシュでは Emx3) と ANB 及び MHB シグナルの本体である Fgf8 (ゼブラフィッシュでは Fgf8.1) について、シグナルセンター特異的な転写制御機構の解明を目指した。

(2) 脳の部域化の際に FGF シグナルを細胞内に伝達する受容体 (FGFR) について、初期発生での発現とその調節機構を検討した。

(3) MHB 形成への関与が示唆されているクラス V 型 POU 転写因子 Pou2 について、その胚発生及び脳形成での機能の検討を進めた。

(4) 新たな脳形成遺伝子の変異体として以前に単離した *aa6k* 変異体について、発生遺伝学的研究を行い、新たな脳形成遺伝子の同定とその機能の解明を試みた。

(5) 最終的には、脳形成シグナルセンターの形成とその機能に関わる遺伝子制御ネットワークを様々な視点で理解することをめざした。

## 3. 研究の方法

(1) シグナルセンター特異的な転写調節機構の解析: ゼブラフィッシュ *fgf8.1*, *emx3* の周辺ゲノム領域について、プロモーター制御下にある GFP 遺伝子 (*egfp*) とつなぐ、あるいは混合した上、ゼブラフィッシュ受精卵に微小注入し、適切な発生時期に GFP タンパク質の発現を蛍光実体顕微鏡で観察した。あるいはゲノム DNA をホタル luciferase 遺伝子につないだ上、神経分化能を持つ未分化胚性がん細胞 P19(C6) に transfection し、溶解液中の Luciferase 活性をルミノメーターにより測定した。必要に応じ、各種脳形成遺伝子を CMV エンハンサーにつないだ上で共導入した。

(2) 比較ゲノムの解析: Ensembl Genome Browser データベースより、様々な脊椎動物種のゲノム塩基配列を入手し、VISTA 解析により大規模配列比較を行うことで非翻訳保存配列 (Noncoding Conserved Sequence, NCS) を同定した。

(3) 抑制型 *pou2* の熱誘導強制発現: ゼブラフィッシュ Pou2 にショウジョウバエ Engrailed Repressor domain をつないだ EnR-Pou2 に

heat-shock promoter をつないだ上で (HEP) ゼブラフィッシュ胚に導入し、transgenic 系統を作製した (HEP-Tg)。熱誘導の際は、HEP-Tg 胚について飼育温度を通常の 28.5°C から 37°C にシフトして 1 時間保温した。

## 4. 研究成果

(1) ANB 領域に特異的な転写制御機構

① ゼブラフィッシュ胚の前脳領域で経時的に発現する遺伝子の検討

まず、様々な脊椎動物種胚において、ANB あるいは終脳に特異的な発現が知られる既知遺伝子について、ゼブラフィッシュ胚で発現を経時的に比較したところ、原腸形成後期から体節形成初期にかけて、*six3b*, *sfrp1a/zic1*, *emx3*, *neurog1/foxg1a/fgf8.1*, *sfrp5/sp8a* の順で ANB 領域特異的な発現が始まるのが観察された。異なる遺伝子の段階的な発現の活性化から、ANB、そして終脳の形成に関わる遺伝子カスケードの存在が予想された。

② *fgf8.1* の ANB/終脳領域における転写制御機構の検討

次に、*fgf8.1* について、ANB/終脳特異的な転写調節 *cis* 領域の候補を見出すため、様々な脊椎動物種の遺伝子周辺塩基配列について VISTA 解析により大規模配列比較を行ったところ、ゼブラフィッシュ *fgf8.1* では転写開始点下流+70 kb から+100 kb にかけての領域において、5 ヶ所の NCS が見つかった (NCS#1/#211/#213/#214/#216)。

各保存配列をゼブラフィッシュゲノム DNA より PCR で増幅した上、*fgf8.1* プロモーターをつないだ GFP レポーター遺伝子 (*zf8-EGFP*) とともにゼブラフィッシュ胚に共導入し、レポーターの蛍光発現を検討した結果、受精後 24 時間 (24 hpf) において、NCS#213 と NCS#214 に終脳エンハンサー活性が見られた。終脳形成への関与が予想される各種転写因子との *in vitro* での結合活性をゲルシフト解析により調べた結果、NCS#213 と NCS#214 には神経板の形成に関わる Sox19a、脳形成に関わる Zinc finger 転写因子の Zic1 と Sp8a、Wnt シグナル伝達因子である Lef1 と Tcf712/Tcf4、そして前脳形成転写因子 Pax6a が結合しうることを明らかにした。

③ *emx3* の ANB/終脳領域における転写制御機構の検討

また、*emx3* についても *fgf8.1* と同様に、複数の脊椎動物種 *emx3* 周辺のゲノム配列について大規模配列比較を行った結果、*emx3* では上流約 2 kb に 1 ヶ所 (Emx3 Conserved Sequence, ECS1)、下流+30 kb、+35 kb、+60 kb、+63 kb に計 4 ヶ所 (ECS2-5) の NCS が見出された。最も *emx3* に近接する ECS1 の転写活性化能を調べるため、EGFP レポーター

遺伝子とともにゼブラフィッシュ胚に共導入した結果、ECS1 を含む *emx3* 上流-2.9 kb から-2.0 kb の DNA 領域 (-2.9/-2.0 領域) が、24 hpf において *emx3* の終脳での発現を再現する終脳エンハンサー活性を示した。ゲルシフト解析の結果、Zic1、Sp8a、Pax6a のほか、やはり前脳形成制御因子である Six3b、Emx3、Foxg1a、プロニューラル因子である Neurog1 が ECS1 に特異的に結合することを明らかにした。

以上の研究は、ANB、そして終脳を形成する制御遺伝子の領域特異的発現が複雑な遺伝子ネットワークにより制御されていることを示唆する。また、比較ゲノム的手法を利用することで、脊椎動物前脳形成の制御機構を、高度に保存された転写制御領域とこれに結合する転写因子の面から明らかにできることを示したものである。

#### (2) *fgf8.1* の MHB enhancer による転写制御機構の解析

既に我々は *fgf8.1* の MHB における発現を体節形成中期以降で再現しうる MHB エンハンサーとして S4.2 領域を遺伝子下流に同定しており (Inoue et al., 2006)、この内部に各種脊椎動物の *fgf8.1* 下流に広く保存されている配列 DCR3 が存在すること、DCR3 内にある Pax 結合配列 (PBS) がエンハンサー機能に必須であること、MHB での発現には *pax2a* が必要であるが、これと別に DCR3 内に存在する 2c 領域が中脳、後脳での異所的発現を抑制することが MHB 特異的転写の活性化に必要であることを示してきた (Inoue et al., 2008)。

#### ① MHB 特異的発現における他の Pax 転写因子の関与の検討

S4.2 領域を EGFP レポーターにつないだコンストラクト (S4.2-EGFP) から 2c 領域及びその内部にある 2c 領域を欠失させると (S4.2Δ2-EGFP、S4.2Δ2c-EGFP)、レポーターは中脳全域から前方後脳にかけて異所的に活性化される。S4.2Δ2-EGFP からさらに PBS 配列 (PBSII) を欠失させたコンストラクト (S4.2-Δ2/PBSII-EGFP) を作製し、導入胚での発現を解析したところ、脳での発現が異所的なものを含めて消失した。従って、2c 領域の欠失による中脳・後脳での異所的発現も、PBS 及び Pax に依存することが示唆された。また、S4.2Δ2c-EGFP Tg 系統と *pax2a* 機能欠失変異体 (*noi*) を掛け合わせたところ、S4.2Δ2c-EGFP の中脳・後脳での体節形成期における異所的発現は *noi*<sup>-/-</sup> でもやはり観察された。従って、S4.2Δ2c-EGFP の異所的発現について Pax2a は不可欠ではなく、S4.2Δ2c-EGFP の発現には、Pax2a 以外の PBS 結合因子が必要と予想された。

これに関し、Pax ファミリー転写因子遺伝

子の *pax3* および *pax7* が中脳および後脳で広く発現することが報告されているため (Feng et al., 2006)、体節形成期における *pax3* および *pax7* の脳における発現を ISH により詳細に再検討した。まず、*pax3* は間脳から後方の脊髄にかけて広く神経管背側で発現が見られた。*pax7* は 10 体節期には中脳全体、20 体節期になると中脳視蓋の背側側方と後脳腹側 (r1-5) で発現が見られた。*noi*<sup>-/-</sup> における発現を検討したところ、*pax3* の発現量には大きな異常はなく、*pax7* の発現のみ中脳視蓋および後脳 r1 において低下していた。つまり *pax3* の発現は *pax2a* を必要としないが、*pax7* の中脳視蓋および r1 における発現は *pax2a* に部分的に依存する。以上のように、*pax3*、*pax7* の遺伝子発現と S4.2Δ2c-EGFP の発現とは似ており、特に中脳と r1 での *pax7* の発現が *pax2a* に依存する点、S4.2Δ2c-EGFP の *noi*<sup>-/-</sup> における発現の変化と対応する。加えて、Pax3 と Pax7 が PBS 配列と特異的に結合しうることを EMSA により確認した。以上から、中脳・後脳における S4.2Δ2c-EGFP の異所的な活性化は Pax3 および Pax7 によるものであり、2c 領域は中脳後脳での Pax3/7 による異所的転写活性化を抑制するものと推定した (図 1)。

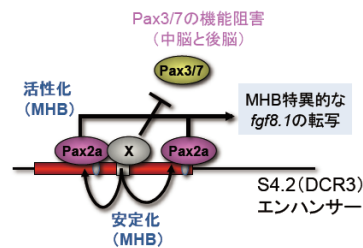


図 1. MHB 特異的な転写の活性化

#### ② 培養細胞系による MHB エンハンサーの機能の検討

MHB の神経板における位置は *otx2* と *gbx* という二つのホメオボックス遺伝子の相互作用によって決定される。我々はこれまでに MHB 特異的エンハンサーとして、上述した *fgf8.1* の S4.2 領域に加え、*gbx2* の PBI 領域を同定している。これらの MHB エンハンサーの転写調節能を定量的手法で詳細に測定し、さらに各種脳形成遺伝子の関与を明らかにすることで脳形成における遺伝子制御機構をさらに理解するため、本研究では、従来から進めてきたゼブラフィッシュ胚での *in vivo* 系解析に加え、培養細胞系 (*in vitro*) でのレポーター解析を行った。

まず、*fgf8.1* の MHB エンハンサー (S4.2) に蛍ルシフェラーゼレポーター遺伝子をつないだ上で (S4.2-Luc)、胚性がん細胞の一種であり、神経への分化能を持つ多能性未分化細胞 P19 (C6) 細胞に導入し、一晚培養後、細胞溶解液中の Luciferase 活性を測定した。また、様々な脳形成遺伝子 (*pax2a*、*lef1*、

*otx2*, *gbx2*, *fgf8*) をCMVエンハンサー制御下においた発現プラスミドをエフェクターとして共導入した。

S4.2-LucはP19で転写が検出されたが、これより2c領域を欠失させると (S4.2Δ2c-Luc) その発現が2倍近く上昇しており、*in vivo*で見られた2c領域の抑制活性が再現された。各種脳形成遺伝子を各々単独でS4.2-Lucと共導入した場合、*pax2a*に活性化能、*gbx2*に抑制能が見られたが、一般に効果は弱い。しかし、*pax2a*と*otx2*, *lef1*, *fgf8*の共導入で顕著な相乗的活性化が見られており、*gbx2*は相乗的に強い抑制能を示した。さらにこれらの転写調節能は、2c領域の欠失により観察されなくなった。

一方、*gbx2*のMHBエンハンサーであるPBI領域についても、Luciferaseにつないだコンストラクト (PBI-Luc) のP19細胞における発現を同様に検討した。その結果、*pax2a*は活性化、*lef1*, *otx2*, *gbx2*が抑制能を示したが、やはり単独の共導入効果は弱かった。*pax2a*の活性化能は*gbx2*により抑制された。

以上の結果は、MHBエンハンサーの機能を胚性がん細胞P19において検討することが可能であることを示しており、今後のMHBエンハンサー研究における新たな研究手法を開発できたと考える。

### (3)ゼブラフィッシュ胚での FGF 受容体の発現の検討

脳の領域化において、Fgf を初めとする種々の Fgf が制御因子として働く。これらの役割を理解する上ではこれらの受容体である FGFR の胚における発現を知る必要があるが、これまでゼブラフィッシュの初期発生において、4 種有る FGFR の発現を系統的に調べた報告はない。我々は以前に4種の遺伝子の後期発生における発現を既に報告しており (Tonou-Fujimori et al., 2002)、本研究では初期体節期までの初期胚における発現を明らかにした。

#### ①ゼブラフィッシュ初期胚での FGFR の発現

4 種有る FGFR 遺伝子 (*fgfr1-4*) の中で、*fgfr1* のみが胚盤全域で母性発現をしており、その後神経板前方及び末分節中胚葉で核遺伝子の発現が始まった。*fgfr4* の発現は後期胞胚で始まり、徐々に脳に限局した。*fgfr2* と *fgfr3* の発現は各々初期、後期原腸胚で始まる。*fgfr2* は前方神経板と体節中胚葉で発現するが、*fgfr3* は中軸中胚葉で活性化され、その後は中脳と体節中胚葉で発現した。体節形成期になると、各 *fgfr* は各々脳内において特有の発現パターンを示した。

#### ②FGFR 遺伝子の発現への FGF シグナルの関与

FGF シグナルの胚発生における役割を理解する上で、FGF シグナル自身の FGFR 発現に対する影響を知る必要がある。そこで、

FGFR 阻害剤 (SU5402)、ドミナントネガティブ FGFR、そして *fgf8.1* 変異 (*acerebellar*) の FGFR 発現への影響を検討し、各 *fgfr* の発現が原腸形成期、体節形成後期において直接、あるいは間接的に FGF シグナルの制御を受けていることを示した。

### (4)クラス V POU 転写因子 Pou2 の脳形成における機能の検討

哺乳類のクラス V POU 転写因子である Oct3/4 は、初期胚において細胞及び胚性幹細胞の分化多能性と未分化状態の維持に働くことがよく知られるのに対し、ゼブラフィッシュにおける最近縁転写因子である Pou2/Pou5f1 については、機能欠失変異体を用いた研究により原腸形成 (epiboly)、背腹パターンニング、内胚葉分化、脳原基での中脳後脳境界 (MHB) 及び後脳の形成に関与することが示唆されている。しかしながら、Pou2 が実際に胚内のどの細胞でどの発生時期に働くことで以上の発生制御機能を発揮するのかについては未だ不明である。本研究では誘導性抑制型 Pou2 (HEP) の強制発現により、脳形成における Pou2 の機能の詳細な解析を行った。

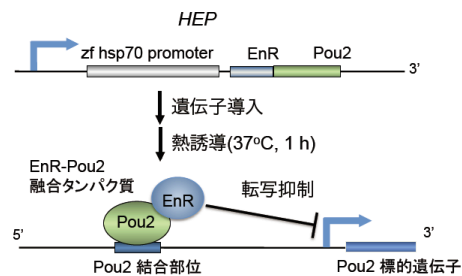


図2. 抑制型 Pou2 の熱融合による強制発現実験

### ①抑制型 Pou2 の強制発現系を利用した各発生段階での pou2 の機能解析

HEP-Tg魚の子孫胚に熱誘導を行い、胚発生の異なる時期に HEP の誘導による Pou2 標的遺伝子の発現阻害を行い (図2)、結果として観察される発生異常を検討した結果、発生時期ごとに Pou2 は異なる発生制御機能を持つことを明らかとした。

特に、原腸形成後期 (9 hpf) 及び初期体節期 (11 hpf) での HEP 誘導は MHB において各々峡部欠失と峡部変形という異なる異常を引き起こすことから、MHB 形成における Pou2 の機能自体、発生時期により変化することを示した。なお、峡部欠損は *pou2* の機能欠失変異体でも観察されることから、HEP は内在 Pou2 を抑制すること、従って野生型 Pou2 は本来転写活性化因子であることを示した。

### ②原腸形成期終了前後での HEP 発現による峡部形成異常

HEP を原腸形成終了前後で誘導し、直後の MHB 特異的遺伝子の発現を経時的に検討し

た結果、基本的に発現抑制が見られたが、*pax2a* に対する抑制効果が最も速やかかつ顕著に見られることから、*pax2a* が MHB における *pou2* の直接下流制御遺伝子であると推定された。なお、9 hpf での HEP 誘導は *pax2a* の発現を不可逆に抑制するが、11 hpf での誘導による *pax2a* の発現低下は一過的であり、その後回復するなど、*pou2* の作用は両時期で違いがあることを示した。

#### (5) 脳形成および顎形成に異常を示す変異体 *aa6k* についての発生遺伝学

以前にゼブラフィッシュを用いて行った ENU 誘発突然変異体スクリーニングにより、脳、顎等において様々な異常を示す劣性致死頭部異常突然変異体 *aa6k* を同定していた (図3)。本変異体では、28 hpf 以降、中脳から後脳にかけて広範な扁平化が見られ、受精後 5 日 (5 dpf) 以降では顎の咽頭弓軟骨の形成不全と眼の矮小化が顕著だった。その他、囲心腔の膨潤と血液の滞留、そして運動性異常が観察された。本変異体の表現型をさらに検討し、原因遺伝子を明らかにすることで、新規脳形成遺伝子を明らかにすることを目指した。



図3. 発生異常変異体 *aa6k* の表現型。上は野生型、下はホモ接合体を示す。

#### ① *aa6k* 変異体で見られる表現型

まず初期体節形成期において、*aa6k* 変異体での脳領域マーカーの発現を調べたが、尾芽期から後期体節形成期まで異常は認められず、本変異体でも脳原基での初期パターンは正常といえる。しかしアポトーシスをアクリジンオレンジ染色で検討したところ、24 hpf 以降で中脳、後脳前方、そして眼胞で増大が観察された。咽頭弓軟骨の起源である神経堤細胞の発生を *crestin* の発現により調べたところ、変異体ではすでに 11 hpf において発現低下が見られ、52 hpf では咽頭弓での *dlx2* の発現パターンの異常が観察された。以上から、*aa6k* 胚では神経堤細胞の初期分化とその後の発生に異常があると考えられる。その他、咽頭嚢上皮及び筋細胞の分化も異常を示した。

#### ② *aa6k* 変異の連鎖解析と候補遺伝子の検討

原因遺伝子の特定を目指して行った連鎖解析により、第3染色体上で密接に連鎖した SSLP マーカー (0 組換え/ 1640 減数分裂) を同定し、近傍遺伝子 16 個を原因遺伝子候補として配列と発現の解析を進めている。並行して、表現型のレスキューが可能かについ

て、mRNA あるいは BAC クローンの導入による検討も行っている。

#### (6) 結語

本研究では、初期脳形成における脳原基、すなわち神経板における部域化に焦点をあて、その際に中心的な役割を担うシグナルセンターの形成制御機構の解明を試みた。

① MHB エンハンサーについては国際的にも我々の研究が先行しており、Fgf8.1 の MHB エンハンサーについての今回の研究で新たな制御因子として Pax3/7 を見出すなど、MHB における遺伝子ネットワークの詳細について一層の進展が実現した。また、胚性がん細胞 P19 が、脳原基の部域化に関わる遺伝子の転写制御機構の解析系として有望であることを初めて示した。この実験系により、MHB エンハンサーについて、より定量的、効率的、多角的な解析が可能になると期待される。

② 今回新たに前方脳の部域化を制御する *emx3* と *fgf8.1* の ANB、終脳での転写制御機構について、比較ゲノム的手法を導入した解析を行い、両遺伝子について終脳エンハンサーの同定と結合因子を明らかにした。エンハンサーへの転写因子の結合の解析から ANB での転写制御が多数の脳形成転写因子、そして多数のシグナル因子による複合的、協調的な働きに依存することを示唆した。

③ FGFR の発現は初期胚における脳部域化で重要とされる FGF シグナルの検討において基盤となるものであり、今回の網羅的解析は本分野での研究に大きく貢献するものである。また、FGFR の発現自体 FGF シグナルの制御下にあることは従来指摘されておらず、重要な知見と言える。

④ クラス V 型 POU 転写因子である Pou2 が峡部形成において、*pax2a* に対する転写活性化因子として働くことを示唆した。この可能性は変異体を用いた遺伝学的解析から示唆されていたが、生化学的に示されたのは初めてである。また、哺乳類の相同遺伝子 *Oct3/4* の作用機能の理解にも寄与しうると言える。

⑤ 突然変異体 *aa6k* について、脳、神経堤、顎、筋の形成異常を見出した。これらの異常は全身的に独立して発症しており、*aa6k* 遺伝子は多面的機能を持つと予想している。今後原因遺伝子を同定することで、新たな発生制御機構が明らかになると期待している。

最後になりますが、本研究の遂行にご協力いただいた藤森典子さん、井上詞貴博士、太田聡博士、岡本俊君、田井美也子さん、中本アンドルー君、齊藤慎二君、吉村麻美さん、黒柳友里さん、吉川公人君、伊藤佐貴君、その他の研究室メンバーに感謝いたします。

#### 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5件)

- 1) A. Ishioka, T. Jindo, T. Kawanabe, K. Hatta, M. S. Parvin, M. Nikaido, Y. Kuroyanagi, H. Takeda, and K. Yamasu. Retinoic acid-dependent establishment of positional information in the hindbrain was conserved during vertebrate evolution. *Dev. Biol.* (査読有) 350, 154-168 (2011)
- 2) S. Ota, N. Tonou-Fujimori, Y. Nakayama, Y. Ito, A. Kawamura, and K. Yamasu. FGF receptor gene expression and its regulation by FGF signaling during early zebrafish development. *Genesis* (査読有) 48, 707-716 (2010)
- 3) S. Ota, N. Tonou-Fujimori, and K. Yamasu. The roles of the FGF signal in zebrafish embryos analyzed using constitutive activation and dominant-negative suppression of different FGF receptors. *Mech. Dev.* (査読有) 126, 1-17 (2009)
- 4) M. S. Parvin, N. Okuyama, F. Inoue, M. E. Islam, A. Kawakami, H. Takeda, & K. Yamasu. An autoregulatory loop and retinoic acid repression regulate *pou2/pou5f1* gene expression in the zebrafish embryonic brain. *Dev. Dyn.* (査読有) 237, 1373-1388 (2008)
- 5) F. Inoue, M. S. Parvin, & K. Yamasu. Transcription of *fgf8* is regulated by activating and repressive *cis*-elements at the midbrain-hindbrain boundary in zebrafish embryos. *Dev. Biol.* (査読有) 316, 471-486 (2008)

[学会発表] (計30件)

- 1) 弥益 恭. ゼブラフィッシュ胚発生におけるクラスV型POU転写因子Pou2/Pou5f1の時期特異的かつ多様な制御機能. 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7日(神戸)
- 2) 黒柳 友里. ゼブラフィッシュ胚の前方神経境界(ANB)の形成に関する遺伝子群の解析. 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7日(神戸)
- 3) 竹本 一政. ゼブラフィッシュClass V POU型転写因子による中脳後脳境界の形成制御機構. 日本動物学会第81回大会、2010年9月25日(東京)
- 4) Y. Kuroyanagi. Transcriptional regulatory mechanism underlying the formation of the anterior neural boundary (ANB/ANR) in vertebrate embryos. 日本発生生物学会第43回大会、2010年6月21日(京都)
- 5) Y. Kuroyanagi. Molecular mechanism for the formation of the anterior neural

boundary (ANB/ANR) in vertebrate embryos. 第32回日本分子生物学会年会、2009年9月11日(横浜)

- 6) K. Yamasu. Regulatory mechanism of the *fgf8* gene expression and its implication in vertebrate evolution. The 4<sup>th</sup> Asia-Oceania Zebrafish Meeting. 2009年9月1日(Jeju, South Korea, 2009)
- 7) Y. Nakayama. Transformation of the midbrain to the cerebellum by overexpression of modified *gbx2*. 42<sup>nd</sup> Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists 2009年5月28日(Niigata, 2009)
- 8) 弥益 恭. 脊椎動物の脳の進化とエンハンサー. 2009 NIG Zebrafish Meeting、2009年3月18日(三島)
- 9) 太田 聡. Fgf8サブファミリー成長因子の初期発生における機能: 改変FGF受容体を用いたアプローチ. 第31回日本分子生物学会年会、2008年12月10日(神戸)
- 10) 吉村 麻美. 頭部構造及び逃避反応に異常を示すゼブラフィッシュ突然変異体 *aa6k* の解析. 第31回日本分子生物学会年会、2008年12月12日(神戸)
- 11) 中山 由紀子. ゼブラフィッシュ脳形成におけるGbx2転写因子の作用機構. 日本動物学会第79回大会、2008年9月5日(福岡)
- 12) M. S. Parvin. Transcriptional regulation of the zebrafish class V POU gene, *pou2*, in the midbrain-hindbrain region during early development. 日本発生生物学会第41回大会、2008年5月28日(徳島)

[図書] (計1件)

- 1) 石原勝敏、末光隆志総編集(弥益 恭、編集者計7名の一人であり一部執筆)、朝倉書店、生物の事典、2010、542 ページ(編集、177-264: 執筆、250-252)

[その他]

ホームページ等

<http://devbiol.seitai.saitama-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

弥益 恭 (YAMASU KYO)  
埼玉大学・理工学研究科・教授  
研究者番号: 60230439

### (2) 研究分担者

川村 哲規 (KAWAMURA AKINORI)  
埼玉大学・理工学研究科・助教  
研究者番号: 10466691