

平成 21 年 4 月 17 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19370090

研究課題名 (和文) Fgf8 シグナルによる小脳分化の制御

研究課題名 (英文) Fgf8 signaling for cerebellar differentiation

研究代表者

仲村 春和 (NAKAMURA HARUKAZU)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：90079690

研究成果の概要：

峡部オーガナイザー Fgf8 の強いシグナルにより、Ras-ERK 経路が活性化されると小脳が分化することを示したが、その活性はすぐに抑制される必要があり、ずっと活性化されると中脳胞の小脳への分化転換は起こらない。Fgf8b と DN-Sprouty2 の強制発現の後、DN-Sprouty2 の転写を Off にすると中脳胞は小脳へとその運命を変えた。本研究により、小脳が分化するためには、Fgf8b により Ras-ERK 経路が活性化され、その後負の制御因子 Sprouty2, Sef, MKP3 等により、その活性が抑制されることが必要であることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 7,500,000 | 2,250,000 | 9,750,000 |
| 2008 年度 | 6,700,000 | 2,010,000 | 8,710,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,200,000 | 4,260,000 | 18,460,000 |

研究分野：神経発生学

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、細胞内・細胞間情報伝達

1. 研究開始当初の背景

我々のニワトリ胚における研究、ノックアウトマウスでの研究により、1) Otx2, Pax2, En1 という転写因子の発現が重複した領域が中脳として分化し、Gbx2, Irx2 等の発現部位が後脳に分化すること、2) 中脳後脳境界部 (峡部) は中脳、後脳のオーガナイザーとして働き、前の方に中脳視蓋を、後ろの方に小脳を分化させること、3) オーガナイジング分子として最も重要なのは Fgf8 で、その Fgf8 にはいくつかのアイソフォームが存在し、峡部では Fgf8a と Fgf8b が発現していること、

4) Fgf8b の強制発現により、中脳胞での Otx2 の発現が抑制され、本来後脳胞で発現する Gbx2, Irx2 の発現が中脳胞で誘導され、中脳胞は発生運命を変えて小脳として分化すること、5) Fgf8a の強制発現では中脳胞、後脳胞の発生運命は変わらず、間脳に視蓋が誘導されるが、Fgf8b の濃度を 1/100 に希釈して強制発現すると Fgf8a タイプの作用にかかわることから、強い Fgf8 シグナルを受ける領域が小脳が分化として分化することが明らかとなった。さらに最近の我々の研究により、峡部で ERK がリン酸化されていること、Fgf8b

の強制発現により ERK のリン酸化が促進されること、ドミナントネガティブ型 Ras を強制発現すると本来の小脳領域で、小脳に置き変わって視蓋が分化することから Fgf8 の下流で Ras-ERK シグナル経路が活性化されると小脳が分化することが明らかとなった (図 2)。また Ras-ERK システムは厳密な制御を受けており、Fgf8 によって誘導される Sprouty2 がその経路を負に調節している。この Fgf8-Ras-ERK シグナルが流れすぎると中脳後脳境界が前により、少ないと境界は後による。(Sato et al., Development, 2001; Sato & Nakamura, Development, 2004; Suzuki-Hirano et al., Development, 2005)

2. 研究の目的

そこで、Fgf8-Ras-ERKシグナルの下流でどのような遺伝子が誘導あるいは活性化されて小脳が分化するのか、またFgf8の下流で視蓋の分化に働くシグナル経路は何かと言うことが大きな問題となる。他のシステムでERKの下流でEtsファミリーのPea3サブファミリーが働くことが報告されているので、これらの遺伝子が小脳分化にどのように関わっているか、もし関わっているとしたら単独で小脳の分化を誘導できるのか、あるいはIrx2等の分子と共同で働くのかについて、エレクトロポレーション法による強制発現、ドミナントネガティブ型、あるいはsiRNA導入による遺伝子ノックダウン法により追究する。

また小脳の分化には強いFgf8シグナルにより、Ras-ERK経路が活性化される必要がある。しかし、これまで予備実験により小脳分化にはいったん活性化されたERKの活性がまた抑えられる必要があることが示唆されている。そこで、Fgf8bとドミナントネガティブ型Sprouty2を共導入し、Ras-ERKシグナルを活性化し続けると、中脳後脳の領域化はどのようになるか、追究する。

また、中脳後脳部にはSprouty2を始め、Sef, MKP3などRas-ERK経路の負の調節因子がFgf8と重複した形で発現している。これらが中脳の領域化、小脳の領域化、あるいは中脳視蓋の極性形成にどのように関わっているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 小脳分化のために ERK の下流で働く分子として、他のシステムでの結果から、まず Pea3 遺伝子にターゲットを絞った。Pea3 サブファミリーには Pea3, Erm, Er81 という遺伝子が存在するが、それぞれの強制発現、共通のドミナントネガティブ型 DNA のエレクトロポレーションによる強制発現実験を行った。

(2) 小脳分化には Ras-ERK シグナル経路が活性化され、その後その活性が抑えられる

必要があるかということを見るために、Fgf8b とドミネガの Sprouty2 を強制発現し、中脳胞、小脳胞の発生運命を調べた。Fgf8b と DNSprouty2 を強制発現の後、MEK の阻害剤 U-0126 を染みこませたビーズを中脳胞に挿入した。最近、エレクトロポレーションによりトランスフェクトした遺伝子をテトラサイクリンにより、Tet-on, Tet-off を行うことができるようになったので、これらを利用し、DN-Sprouty2 をエレクトロポレーション 6 時間後より Tet-off により転写されないようにした。

(3) 峽部には Sprouty2 だけでなく、Sef, MKP3 といった Ras-ERK 経路の負の調節因子が複数発現しているため、それらの役割について検討した。

4. 研究成果

(1) ERK の下流で小脳分化に働く遺伝子

Pea3 遺伝子群の中では Pea3 が最も小脳分化に関係のありそうな発現をしている。実際、Fgf8 を強制発現すると Pea3, Erm の発現が誘導され、ドミナントネガティブフォーム変異型 (DN-) Ras を強制発現すると、Pea3 は細胞自律的に抑制されたことから、Pea3 の発現は Fgf-Ras/ERK 経路を介して制御されていることが示唆された。

Pea3 が実際に峽部で活性化しているかどうかを調べるため、Pea3 の結合配列の下流に最小プロモーターと GFP を連結した Pea3 の活性化を示すレポーターを作成し、このレポーターを *in ovo* electroporation 法により中脳後脳領域に導入したところ、GFP の蛍光が後脳胞で観察された。さらに、このレポーターを Fgf8b と共導入したところ、中脳後脳領域で強い GFP の蛍光が観察された。これらの結果から、内在性の Pea3 は、後脳胞で Fgf8 シグナルによって強く活性化されていることが示唆された。

そこで、Pea3 を中脳胞に強制発現すると、中脳特異的に発現する Otx2 の発現は抑えられ、後脳特異的に発現する Gbx2 の発現が誘導される。しかし、構造的には中脳視蓋として分化した。ただ、外顆粒層と思われる層が出現したので、ERK の下流でいくつかの遺伝子が分担して小脳分化に働いている可能性があり、現在そのことを検証している。

(2) Ras-ERK 経路の制御と小脳分化

小脳の分化には強い Fgf8 シグナルにより Ras-ERK シグナル経路が活性化される必要があるが、この経路の活性化は ERK のリン酸化によって検出できる。正常発生過程では stage 9, 10 の頃に予定小脳領域である後脳胞で ERK がリン酸化されているが、stage 11 になると、後脳胞での ERK のリン酸化はみられなくなり、峽部から中脳胞にかけ、峽部を

中心に前後勾配を持つかたちで ERK のリン酸化がみられる。峡部領域では Ras-ERK 経路を負に制御するものとして Sprouty2, Sef, MKP3 等が Fgf8 と重複する形で発現している。そこで、小脳の分化にはいったん活性化した ERK が再び脱リン酸化される必要があるかを見るためにまず Fgf8b と DN-Sprouty2 を強制発現した。その結果、ERK の活性化は持続し、エレクトロポレーション 18 時間後でも ERK の強いリン酸化が見られた。結果的に中脳胞の発生運命は変わらず、視蓋として分化した (図 1)。

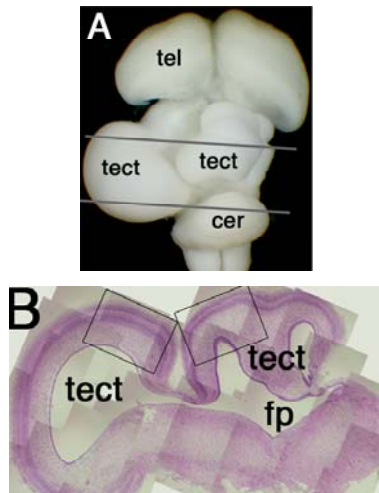


図 1 : Fgf8b と DN-Sprouty2 強制発現
A: E12 の脳の全体像、B: 中脳を通る切片
ERK の活性を持続させ続けると中脳胞の運命転換は起こらず、視蓋として分化する。
tel: 終脳, tect: 視蓋, cer: 小脳, fp: 底板

そこで、Fgf8 と DN-Sprouty2 の強制発現ベクターをエレクトロポレーションし、17 時間後、MEK の阻害剤 U0126 を染みこませたビーズをおいた。その結果、ERK の活性は押さえられ、中脳胞では Otx2 の発現が抑えられ、Gbx2 の発現が誘導され、後脳として分化するように見えるが、毒性が強く、小脳の形態が分化するには至らなかった。

今度は DN-Sprouty2 を TRE プロモーターで制御される BI-EGFP ベクター (Tetracyclin により off にする) に挿入し、6 時間後からテトラサイクリン (Doxycyclinn) を投与した。すると、中脳胞の遺伝子発現パターンは後脳胞パターンにかわり、孵卵 12.5 日に固定して調べると、小脳が分化していることが明らかになった (図 2)。この結果は作業仮説「小脳の分化には Fgf8 により Ras-ERK 経路が一旦活性化される必要があるが、その活性は抑制される必要がある」ということを見事に証明したものである。

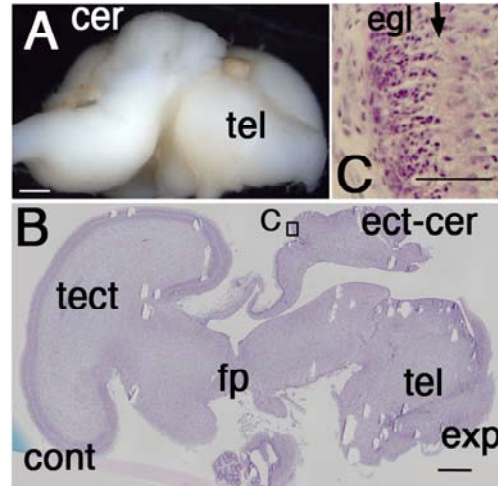


図 2 : Fgf8b と DN-Sprouty2 の強制発現, 6 時間後に DN-Sprouty2 の転写を Tet-off した結果
A: E12.5 の脳の側面、B: 中脳を通る切片、C: B で示された C の拡大図

Fgf8b で Ras-ERK 経路を活性化し、当初 DN-Sprouty2 により、Sprouty2 の働きを抑え、その後 DN-Sprouty2 の転写をテトラサイクリンで Off にし、ERK の活性を抑えると、中脳胞の発生運命が変わり、小脳として分化した (ect-cer)。外顆粒層 (B: egl) も分化している。cont: 対照側, exp: 実験側,

Ras-ERK 経路の負の調節因子の役割を見るために、Fgf8b と DN-MKP3 を共発現させたところ、ERK の活性化は持続された。ただし、Fgf8b と DN-Sprouty2 の共発現の時ほど ERK のリン酸化は強くなかった。中脳に滑車神経様の構造が分化したことから、結果的に峡部に分化したと考えられる。

以上の結果から、Fgf8 のシグナルにより Ras-ERK 経路が活性化されるが、Sprouty2, Sef, MKP3 等の負の制御因子によりその活性は急速に押さえられる。ERK の活性化レベルと、負の制御の程度によって、小脳、峡などの領域が形成されると思われる。

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 8 件)

- ① Aoki M, Kiyonari H, Nakamura H, Okamoto H (2008) R-spondin2 expression in the apical ectodermal ridge is essential for outgrowth and patterning in mouse limb development. *Development Growth & Differentiation* 50:85-95. (査読有)
- ② Funahashi J, Nakamura H (2008) Electroporation in avian embryos.

- Methods Mol Biol 461:377-382. (査読有)
- ③ Harada H, Takahashi Y, Kawakami K, Ogura T, Nakamura H (2008) Tracing retinal fiber trajectory with a method of transposon-mediated genomic integration in chick embryo. Dev Growth Differ 50:697-702. (査読有)
- ④ Nakamura H, Sato T, Suzuki-Hirano A (2008) Isthmus organizer for mesencephalon and metencephalon. Dev Growth Differ 50 Suppl 1:S113-118. (査読有)
- ⑤ 仲村春和・杉山清佳・鈴木-平野明日香 (2008) 峡部オーガナイザーと小脳・視蓋形成 蛋白質 核酸 酵素 53, 373-378 (査読無)
- ⑥ Odani N, Pfaff SL, Nakamura H, Funahashi J. (2007) Cloning and developmental expression of a chick G-protein-coupled receptor SCGPR1. Gene Exp Pattern, 7, 375-380. (査読有)
- ⑦ 仲村春和 (2007) 細胞間相互作用を担うシグナル系 化学 62, 23-27 (査読無)

[学会発表] (計 31 件)

- ① Harada, H., Sato, T., Nakamura, H. : Pea3/Ets transcription factors for cerebellar differentiation. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 28-30 May (2008) Tokushima, Japan
- ② Harada, H., Tanaka, J., Matsuda, Y., Suzuki-Hirano, A., Nakamura, H. : Fgf signaling in tectal polarity formation, Gordon Research Conference 2008 Fibroblast Growth Factors in Development & Disease, 2-7 March (2008), Il Ciocco, Italy
- ③ Suzuki-Hirano, A., Sato, T., Nakamura, H. : Regulation of ERK phosphorylation for the MHB formation and cerebellar development. , Gordon Research Conference 2008 Fibroblast Growth Factors in Development & Disease, 2-7 March (2008), Il Ciocco, Italy
- ④ Nakamura, H. : Regulation of the Fgf8-Ras-ERK signaling pathway for cerebellar development. GCOE International Zao Conference, 23-24 Jan. (2008) Miyagi, Japan
- ⑤ Suzuki-Hirano, A., Sato, T. and Nakamura, H. : Sequential Regulations of ERK signaling activity and cerebellar development. International chick meeting. 11-14 April (2007) Barcelona
- ⑥ Hou, X, Katahira, T, Kimura, J,

- Nakamura, H. : Analysis of coactosin, an actin binding protein, in neural crest cell migration., International chick meeting. 11-14 April (2007) Barcelona
- ⑦ Harada, H., Matsuda, Y, Tanaka, J, Suzuki-Hirano, A., Nakamura, H. : Establishment of anteroposterior axis of the chick optic tectum by Fgf-Ras/ERK signaling. , International chick meeting. 11-14 April (2007) Barcelona

[図書] (計 2 件)

Nakamura, H. (Editor) (2008) Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology, Springer Japan, Tokyo, Total page number : 331

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲村 春和 (NAKAMURA HARUKAZU)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号 : 90079690

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

鈴木-平野 明日香 (SUZUKI-HIRANO ASUKA)
東北大学・大学院生命科学研究科・PD
研究者番号 : なし
原田 英斉 (HARADA HIDEKIYO)
東北大学・大学院生命科学研究科・博士課程後期学生
研究者番号 : なし