

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号： 82611

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2009~2011

課題番号： 21500333

研究課題名（和文） マウス前脳コンパートメント形成に関わる分子機序の解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular machinery for mouse forebrain compartmentalization

研究代表者

井上 高良 (INOUE TAKAYOSHI)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所・疾病研究第六部 室長

研究者番号： 20370984

研究成果の概要（和文）：本研究では細菌人工染色体を解析単位とした独自かつ効率的な遺伝子発現制御領域特定法の適用により、マウス前脳コンパートメント形成に関わる分子機序を明白にすることをめざした。その結果、まず細胞接着分子 *Cdh6* のマウス前脳コンパートメントに対応した発現様式に転写開始点上流およそ 40-kb に位置する 110-bp の断片が必要なことがわかった。また、この 110-bp 断片と前脳特異的なマスターコントロール遺伝子 *Pax6* の結合モチーフを含まないゲノム領域が協同的に働くことが前脳コンパートメントに対応した *Cdh6* 発現様式に十分であることが示された。本成果は複雑な細胞構築と機能をもつ前脳発達基盤を規定する遺伝的調節カスケードの組み合わせを初めて明らかにしたため意義深い。

研究成果の概要（英文）：In the present research project, an original and efficient bacterial artificial chromosome-based enhancer bashing methodology was applied to clarify the detailed molecular machinery for mouse forebrain compartmentalization. As the results, a 110-bp fragment located approximately 40-kb upstream of the cell adhesion molecule *Cdh6* gene transcription start site was confirmed to be necessary yet insufficient for the forebrain compartment specific expression. Importantly, together with the 110-bp fragment, an evolutionary conserved region that does not contain any forebrain specific master control gene *Pax6* binding motifs was found to be synergistically sufficient for the *Cdh6* expression, highlighting the value of combinatorial regulatory cascades in specifying the forebrain compartment as patterning basis for the elaborated cellular structure and function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経実験形態学

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物胚の神経板前脳部 **prosencephalic neural plate** は、終脳、間脳（視床や視床下部）、そして神経性網膜を産み出す中枢神経系の原基である。とりわけヒトを含む哺乳類において、終脳部は大脳皮質や基底核、海馬など脳高次機能の中核を担う領域形成の基盤となっているため、前脳の発生機序を明らかにすることは、領域特異的な機能細胞群の誘導、再生、ひいてはヒトの『こころ』の成り立ちとその異常の理解につながる重要な課題といえる。近年、多くの転写因子群の発現様式が前脳特定領域の形成や維持に関わることが示唆されている一方、それら下流でどのような遺伝子群が複雑精緻な脳組織構築様式を支えているのか、殆ど未知なのが現状であった。

これまでに研究代表者は、哺乳類胚の特殊培養・操作技術をもとに、マウス初期胚前脳部が5体節期以降、隣接する中脳部とは、互いに細胞が混和しないことで定義される発生基本単位「コンパートメント：compartment」として存在することを明らかにした (Inoue T et al., 2000: *Dev Biol*)。さらに前脳コンパートメントが形成される時期（マウス5体節期）に符合して、前脳区画全体に転写因子 **Pax6** や細胞接着分子カドヘリン6 (**Cdh6**) の発現が誘導されることを見出した (Inoue T et al., 2000: *Dev Biol*)。カドヘリンは細胞に選択的な接着活性を賦与するため、前脳区画特異的な **Cdh6** 発現が前脳部の細胞に中脳部とは異なる接着性を与え、前脳/中脳境界で細胞の混和を制限する可能性が考えられる (Inoue T et al., 2000: *Dev Biol*)。また発現様式と時期を考慮にいと、**Pax6** が前脳部における **Cdh6** 発現様式を直接制御する可能性もある (Inoue T et al., 2000: *Dev Biol*)。研究代表者は、従来法では遺伝子構造の巨大、複雑さ故に全く解析が進んでいなかったマウス **Cdh6** 遺伝子発現調節機序を、細菌人工染色体 (BAC) を解析単位とした固有の新規解析パラダイムを用いて体系的に解き明かし、前脳部特異的な **Cdh6** 発現様式を制御するのに必要十分なゲノム領域内に、幾つかの **Pax6** 結合モチーフが存在することを報告している (図1; Inoue T et al., 2008: *Dev Biol*)。以上から細胞、分子レベルでの解析が独自に進んでいるマウス初期胚前脳部は、これまで詳細が不明であった脳内コンパートメント形成原理に迫る新規モデルとなることが期待された。

2. 研究の目的

本研究はマウス発生初期胚の前脳コンパートメント形成過程に対応して発現する転写

因子 **Pax6** 等が、**Cdh6** 遺伝子発現を直接的に制御し、中脳部との細胞混和を制限することで脳領域性の形成や維持に関わるのかどうか、研究代表者固有の解析技術を効率よく組み合わせることを目的とした。具体的には、まず **Cdh6** が前脳部に発現するのに必要十分な調節領域を~数百 bp に絞り込み、そのコア部分に **Pax6** 等の転写因子が直接結合して **Cdh6** の発現が誘導されているのかどうか等を確認することをめざした。

3. 研究の方法

研究代表者による先行研究によって転写開始点上流およそ 40kb~76kb に位置する 36kb のゲノム領域が **Cdh6** のマウス前脳コンパートメントに対応した発現制御に必要なことがわかっていた (図1中の橙色の Segment II; Inoue T et al., 2008: *Dev Biol*)。

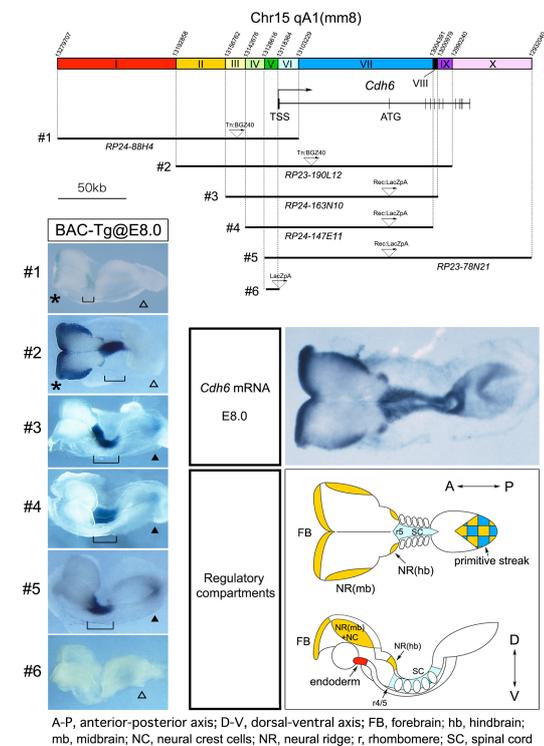


図1: **Cdh6** のマウス前脳コンパートメント特異的な発現を制御するゲノム領域の特定 (Inoue T et al., 2008: *Dev Biol*)

マウス第15番染色体(Chr15) qA1に位置する **Cdh6** 遺伝子座を異なる様式でカバーする BAC クローン群 #1~#5 へ相同組換え (Rec) やトランスポゾン転位 (Tn) を用いてレポーター遺伝子発現カセット (BGZ40, LacZ-pA) を挿入した。それらレポーター修飾済み BAC からトランスジェニックマウス系統を作出したところ、#1と#2のみが前脳コンパートメントでの **Cdh6** mRNA 発現を再現することがわかった (図、星印)。よって前脳部の発現を制御するゲノム領域はセグメントIIであることが予測された。同様に原条(発現あり△; 発現なし▲)や脊髄/後脳(鍵括弧)、内胚葉等に特異的な発現様式がそれぞれ異なるセグメントで制御されることがわかった (右下図では発現制御するゲノム領域の色で胚組織を塗り分けてある。**Cdh6** mRNA 発現部が異なるゲノム領域・モジュールによって制御される点に注目)。

本研究においては、この 36kb のゲノム領域の中から脊椎動物種間で保存されている領域 (Evolutionary Conserved Region: ECR/www.dcode.org) に着目し、*Pax6* など前脳部で発現している転写因子の結合が予測される ECR を選出した。それら ECR を図 1 に示す LacZ→*Cdh6*-BAC クローン #1 から相同組換えの原理を用いて欠失させた後、順次マウス受精卵前核に注入し、得られた BAC-トランスジェニックマウス系統前脳部で LacZ レポーター発現が維持されるのかどうかを判別した。これによって、実際どの ECR が前脳コンパートメントに対応した *Cdh6* 遺伝子発現に必要なのかを絞り込んだ。絞り込まれた ECR 領域は、LacZ レポーターカセットをもつプラスミドベクターに導入し、それ単独で前脳部での発現誘導活性を与えるのに十分なのか、トランスジェニックマウス作出技術を用いて確認した。

4. 研究成果

上述 36kb のゲノム領域を ECR の存在パターンから体系的に分割し、これらそれぞれを欠く種々の LacZ→*Cdh6*-BAC クローン #1 (図 1) からトランスジェニックマウスを作成する検定を経て、最終的に *Cdh6* 遺伝子転写開始点上流 40kb 付近に位置する 706-bp の ECR (mm8; Chr15:13156911-13157616 ; 図 2 右側の星印) 内部にある 110bp のゲノム領域が *Cdh6* の前脳コンパートメント特異的な発現に必要なことが見出された。

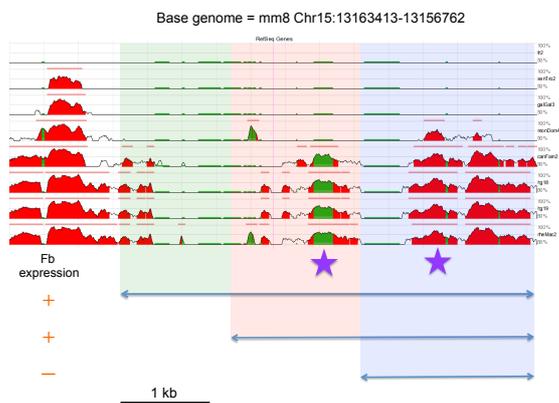


図2: *Cdh6* のマウス前脳コンパートメント特異的な発現に必要な十分なゲノム領域の特定
Cdh6 遺伝子転写開始点上流 40kb 付近に位置する ECR のうち星印をつけた 2 つの組み合わせがマウス前脳コンパートメント (Fb) 特異的な発現に必要な十分であることが確認された。図上部では、マウス *Cdh6* 遺伝子領域 (mm8 Chr15:13163413-13156762) を上から順にフグ、カエル、ニワトリ、フクロネズミ、イヌ、ヒト (2006 年ドラフト/2009 年ドラフト)、マカクザルの相同ゲノム領域とそれぞれ比較した際の類似度が 50% を超える部分についてのみ山型でプロットされている。図下部には実験に用いたゲノム領域とその前脳部における発現誘導活性の有無が +/- で示してある。詳細は本文参照。

これと同時に 36kb のゲノム領域に存在する脊椎動物種間で非常に保存率が高い *Pax6* 結合モチーフを含む二つの ECR は、予想に反してどちらも前脳コンパートメント特異的な発現には不必要であることがわかった。この 110bp 断片が前脳コンパートメント特異的な発現に十分かどうかについて、それだけでは発現活性をもたない β グロビン遺伝子最小プロモーターもしくはそれだけでは前脳特異的な発現を示さない *Cdh6* 遺伝子自身の最小プロモーター存在下でこの断片をレポーター遺伝子に直接連結したコンストラクトを準備し、トランスジェニックマウス系統を作成する方法によって検証したところ、110bp 断片単独では前脳特異的な発現を再現できない一方で、隣接する ECR 領域 (図 2 左側の星印) を含めると前脳コンパートメントできわめて安定な転写活性が検出されることが判明した。以上の解析によって図 2 に星印で示した双方のゲノム領域に含まれる *Pax6* とは異なる転写因子 (*Sox10* 等) が結合するシス調節領域の協同作用が *Cdh6* の前脳コンパートメント特異的な発現に重要であることが示された。本研究成果は、精緻な神経系の領域性獲得初期過程における細胞・分子機序を理解するのに際し、当初の予想とは異なる分子カスケードの存在を明示するためきわめて意義深く、今後の新たな研究展開が期待される。

なお本研究成果の基盤となった BAC を解析単位とする遺伝子発現制御領域特定法とその応用に関しては既に学会や国際専門誌上に公表済みである (下記業績欄参照) とともに、本報告書に纏めた論文未発表データについても論文投稿へ向けた最終準備段階にある。さらにマウス発生初期前脳部の発現制御に関わるのと全く同じゲノム領域がマウス発生中期神経堤細胞由来のシュワン細胞特異的な *Cdh6* 遺伝子転写調節にも関わることが見出されており、ゲノム発現制御カセットが時空間を超えてどこまで共通でどこまで異なるのかを分離する詳細解析も進行中である (下記業績欄参照)。

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 3 件)

- ① Asami J, Inoue YU, Terakawa YW, Egusa SF, Inoue T. Bacterial artificial chromosome as analytical basis for gene transcriptional machineries. *Transgenic Res.* 20, 913-924, 2011
DOI: 10.1007/s11248-010-9469-3

【査読有】

- ② Osterhout JA, Josten N, Yamada J, Pan F, Wu SW, Nguyen PL, Panagiotakos G, Inoue YU, Egusa SF, Volgyi B, Inoue T, Bloomfield SA, Barres BA, Berson DM, Feldheim DA, Huberman AD. Cadherin-6 mediates axon-target matching in a non-image-forming visual circuit. *Neuron* 71, 632-639, 2011.
DOI: [10.1016/j.neuron.2011.07.006](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.006)

【査読有】

- ③ Shibata S, Yasuda A, Renault-Mihara F, Suyama S, Katoh H, Inoue T, Inoue YU, Nagoshi N, Sato M, Nakamura M, Akazawa C, Okano H. *Sox10-Venus* mice: a new tool for real-time labeling of neural crest lineage cells and oligodendrocytes. *Mol Brain* 3, 31, 2010.
DOI: [10.1186/1756-6606-3-31](https://doi.org/10.1186/1756-6606-3-31)

【査読有】

[学会発表] (計 2 件)

- ① Inoue T, Asami J, Egusa SF, Inoue YU. Gene regulatory patterns for *Cdh6* expression identify divisible genetic compartments in the postnatal mouse cerebral cortex. 日本神経科学学会 2011年9月16日 パシフィコ横浜
- ② Inoue T. Genetic labeling of mouse rhombomeres by Cadherin-6::EGFP-BAC transgenesis highlights the role of cadherins in hindbrain compartmentalization. 日本分子生物学会 2009年12月11日 パシフィコ横浜

[図書] (計 1 件)

- ① Terakawa YW, Inoue YU, Asami J, Inoue T. Bacterial artificial chromosome-based experimental strategies in the field of developmental neuroscience. *InTech Bacterial Artificial Chromosomes (Chapter 7)*; pp103-118, 2011.
DOI: [10.5772/32881](https://doi.org/10.5772/32881)

【査読有】

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

[その他] ホームページ等

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 高良 (INOUE TAKAYOSHI)

独立行政法人

国立精神・神経医療研究センター

神経研究所・疾病研究第六部 室長

研究者番号：20370984

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

井上 由紀子 (INOUE YUKIKO)

独立行政法人

国立精神・神経医療研究センター

神経研究所・疾病研究第六部 流動研究員

研究者番号：30611777