

前脳最前部で発現するホメオボックス遺伝子の機能解析

Functional analysis of the homeobox gene that expresses at most anterior region of forebrain

研究代表者 筑波大学基礎医学系 講師 小林 麻己人
Lecturer, Inst. Basic Medical Sciences, Univ. Tsukuba
Makoto Kobayashi

The zebrafish *six3* genomic DNA was analyzed and the regions required for its specific expression were searched by GFP reporter assays using zebrafish embryos. The results suggest that the transcription regulatory elements for prospective forebrain-specific expression are located within about 1 kb upstream of the translational initiation site.

six3 proteins fused with En transcriptional repression domain (RD-*six3*) or VP16 activation domain (AD-*six3*) was overexpressed in zebrafish embryos in order to test its roles as a transcriptional factor. Overexpression of RD-*six3* induced an enlargement of the forebrain and eye being similar with the case for wild-type *six3*, while that of AD-*six3* caused severe reduction. These results indicate that *six3* functions as a transcriptional repressor during the eye and forebrain formation.

1. 研究目的

脊椎動物の前脳形成には、前脳オーガナイザーともいふべき誘導シグナルの存在が推測されているが、その分子実体はわかっていない。ホメオボックス型転写因子である*six3*は、多くの脊椎動物において、予定前脳領域に特異的に発現するため、前脳形成において重要な機能をもつことが予想されている。我々は、この*six3*に着目し、実験発生的手法と遺伝学的手法をともに適用できるゼブラフィッシュ胚を利用して、その機能解析を試みた結果、*six3*タンパク質が前脳最前部及び眼の形成を促進する活性をもつことを示した。

本研究は、*six3*を中心とした遺伝子カスケードに参画する分子群を同定することにより、脊椎動物前脳の初期形成過程における制御機構の分子基盤を明らかにすることを最終目的とする。そこで、*six3*の発現を促す因子の同定を目的に、*six3*ゲノムを単離し、その前脳・

眼原基特異的な発現に寄与する制御エレメントの同定を試みた。一方、転写因子としての*six3*の作用機序を明らかにするために、種々の変異型*six3*を作製し、その個体における機能解析を行った。

2. 研究経過

2.1. 方法

*six3*ゲノム遺伝子の単離

*six3*のcDNA全長をプローブに、ゼブラフィッシュゲノムDNAライブラリーをスクリーニングした。240万プラークから、約15 kbのクポジティブクローンを1種類得た。

レポーター解析用コンストラクトの構築

サブクローン化した*six3*ゲノムDNAから、翻訳開始点上流2 kbのDNA領域を切り出し、GFP遺伝子の5'上流に接続し、コンストラクト*six3g2k-GFP*を構築した。欠失変異コンスト

ラクトに関しては、エキソヌクレアーゼIIIを用いたデレション法により、作製した。

GFPレポーター遺伝子解析

上記のDNAコンストラクトを線状化したのち、1細胞期のゼブラフィッシュ胚にガラス針で約40 pg注入した。GFP発光の観察は実体蛍光顕微鏡を用いた。

RD-six3とAD-six3の作製

ショウジョウバエ*Engrailed*の転写抑制化ドメイン、または、ヘルペスウイルスVP-16の転写活性化ドメインを、*six3*のDNA結合部位と考えられるSixドメインとホメオドメインをコードするcDNA領域のN末端に融合させたDNAコンストラクトを、PCR法を用いて作製した。

変異型*six3*を用いた機能解析

上記コンストラクトを鋳型DNAとして、SP6 RNAポリメラーゼにより、胚注入用のmRNAを合成した。1-2細胞期のゼブラフィッシュ胚に、5 pgの合成RNAを注入し、その効果を実体顕微鏡を用いて観察した。

2.2. 結果と考察

前脳最前部及び眼原基における発現を規定する制御エレメント

*six3*の上流カスケード因子の探索を目的に、*six3*の前脳最前部及び眼原基における発現を規定する制御エレメントの同定を試みた。まず、ゼブラフィッシュゲノミックDNAのライブラリーから、*six3*遺伝子ゲノムをスクリーニングしたところ、翻訳開始点上流約2 kbを含むゲノムクローンを得た。翻訳開始点から上流約2 kbのDNA断片を、クラゲ発光タンパク質GFP遺伝子に接続したコンストラクトを作製し、ゼブラフィッシュ初期胚に導入してレポーター遺伝子解析を行ったところ、前脳

最前部及び眼原基においてGFPの発光が観察された (Figure 1)。この結果は、目的の制

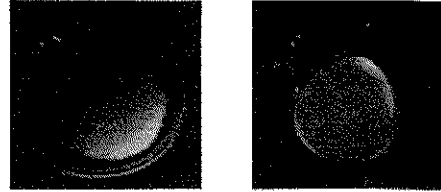


Figure 1. GFP expression in the *six3g2k*-GFP injected embryos at 4 somite stage (left) and 24 hour (right) embryos.

御エレメントが、この2 kbのゲノム領域に含まれることを示唆する。

そこで、制御エレメント同定を目的に、一連の欠失コンストラクトを作製し、ゼブラフィッシュ胚を用いたGFPレポーター遺伝子解析を行った。翻訳開始点上流-949 bpまであれば、2 kbと同様の転写活性を示したが、-882 bpまで削ると転写活性は著しく減少し、さらに-324 bpになるとGFPによる発光は全く観察されなくなった (Figure 2)。この結果は、

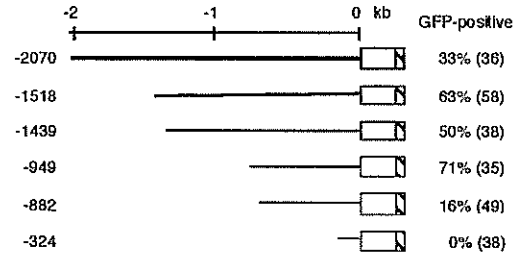


Figure 2. Localization of regulatory regions for forebrain/eye-specific expression in the *six3* gene. GFP-positive embryos at 24 hours after fertilization. Numbers of the tested embryos are shown in the parenthesis.

-882 bpから-324 bpの間の558 bpに時期・部位特異的な発現を規定するエレメントが、また、-949 bpから-882 bpの間の67 bpにこの発現を増強するエンハンサーが存在することを示している。後者の67 bpには、AP-1配列があり、前脳オーガナイザーからの誘導シグ

ナルには、PKCを介した経路などが関与する可能性が出てきた。

転写抑制化因子としてのsix3の機能

six3の下流カスケード遺伝子の探索を目的に、ドミナントネガティブ型six3の構築を試みた。Sixファミリータンパク質のひとつ、ヒトSix4が転写活性化因子であると推測されていたので、six3も同様に転写活性化因子であると予想し、この活性を抑えるべく、ショウジョウバエEngrailタンパク質 (En) の転写抑制化ドメイン (RD) とsix3の予想DNA結合部位を融合させたEn-six3を作製し、ゼブラフィッシュ初期胚で過剰発現させた。予想に反して、転写常時抑制化型six3は、野生型Six3を用いたときよりも強力に、眼や前脳の肥大を促した (Figure 3)。この結果は、six3がもとも



Figure 3. Effect of RD-six3 overexpression on the forebrain formation

と転写抑制化因子として機能していることを示唆した。そこで、逆に、ヘルペスウイルスVP16タンパク質の転写活性化ドメイン (AD) とsix3の予想DNA結合部位を融合させたAD-six3を作製し、これをゼブラフィッシュ胚で過剰発現させたところ、眼及び前脳の形

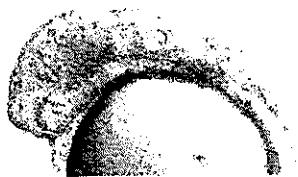


Figure 4. Effect of AD-six3 overexpression on the forebrain formation

成不全がおこった (Figure 4)。この表現型は、野生型Six3を発現させたときと正反対であることから、six3が転写抑制化因子であることを示唆するとともに、転写常時活性化型six3がドミナントネガティブ分子として機能することが推測された。最近、ヒトSIX遺伝子が単離され、これが前脳形成不全の奇形症である全前脳症2型の原因遺伝子であることが明らかとなった。AD-six3を用いた今回の解析結果は、上記遺伝病の表現型と類似しており、six3が脊椎動物前脳形成の鍵転写因子の一つであることが示された。

six3の機能発現に必須なシックスドメインのアミノ酸配列を検索したところ、転写抑制化因子であるEnやGscに共通して存在するGrouchoコリプレッサー結合モチーフに類似した配列を見いだした (Figure 5)。そこで、

| | |
|-----------|-------------|
| z six3 | LNFSAPQVAS |
| m Six3 | LNFSPEQVAS |
| c Six3 | LNFSPEQVAS |
| d Gsc | SLFTLDSILG |
| m Gsc | SMFSIDNLLA |
| d En | LAFSISNLLS |
| m En-1 | TNGFIEDNLLS |
| consensus | LNFSIDNLLS |
| | T EQVAA |

Figure 5. Alignment of the Gsc/En repression domain with various six3 proteins. z, zebrafish; m, mouse; c, chicken; ; d, *Drosophila*.

この配列に点変異 (F49E) を導入した変異型six3を作製し、ゼブラフィッシュ胚で発現させたところ、野生型に比べ、眼・前脳の肥大化能が著しく減少した。以上の結果は、six3が眼・前脳形成において、Grouchoを介した転写抑制化因子として機能ことを示唆する。興味深いことに、ゼブラフィッシュにおけるGrouchoホモログ遺伝子のひとつであるgroucho1は、six3と同時期に前脳最前部で発現しており、我々の解析結果を支持する。

一方、ショウジョウバエSix遺伝子の解析から、Six2・Six4・Six5は、予想コアクチベーターEyaタンパク質と相互作用し、標的遺伝子の転写活性化を促すことが予想されている。本解析により明らかとなったsix3のGrouchoコリプレッサー結合モチーフ類似配列は、Sixファミリータンパク質間でよく保存されていることから、他のSixタンパク質も、転写活性化因子としてだけでなく、転写抑制化因子として機能する局面がある可能性が浮かび上がった。

3. 研究成果

ゼブラフィッシュ胚を用いたGFPLレポーター遺伝子解析により、前脳最前部及び眼原基におけるsix3遺伝子の発現を規定する遺伝子領域が明らかとなり、前脳オーガナイザーの分子の実体を解く鍵を得た。一方、過剰発現解析により、前脳・眼形成期においては、six3が転写抑制化因子として働くことが示唆された。

4. 今後の課題と発展

six3の発現を制御する遺伝子領域がかなり絞られたので、今後はさらに細かい欠失変異や点変異を導入したコンストラクトを作製し、これらを用いたGFPレポーター遺伝子解析により制御エレメントを同定する。さらに、このエレメントに結合する転写因子の同定も目指す。現在、six3g2kGFPを導入したトランスジェニックゼブラフィッシュのライン化を進めており、既存の前脳形成変異フィッシュとの掛け合わせ実験も計画している。

一方、six3がgroucho依存型転写抑制化因子として機能している可能性がでてきたが、このことを証明するためには、ゼブラフィッシュgrouchoとsix3の相互作用を、タンパク質レベル、及び、個体内での機能発現解析により示す必要がある。また、En-six3がドミ

ナントネガティブ分子として機能すると推測されるので、これを利用した標的遺伝子の探索も行いたい。

5. 発表論文リスト

1. Overexpression of the forebrain-specific homeobox gene *six3* induces rostral forebrain enlargement in zebrafish. Kobayashi, M., Toyama, R., Takeda, H., Dawid, I.B., Kawakami, K. *Development*, 1998, 125, 2973-2982.
2. Functions of Six3 as a transcriptional repressor during the zebrafish eye and forebrain formation. Kobayashi, M., Yamamoto, M. (投稿準備中)