

## ナメクジウオ・マウス間の Hox 遺伝子発現制御の比較による神経冠進化に関する研究

Comparative study of the Hox transcriptional regulatory mechanisms between amphioxus and mouse, and implication to the evolution of the neural crest.

研究代表者 京都大学大学院理学研究科附属瀬戸臨海実験所 助手  
和田 洋

Assistant Prof., Seto Marine Biological Laboratory, Kyoto University  
Hiroshi Wada

To investigate how Hox genes acquire new expressions in the neural crest and neurogenic placode, I tested the cis-regulatory activity of genomic fragments from the amphioxus Hox cluster in transgenic mouse and chick embryos. Amphioxus Hox regulatory elements were identified which drive spatially localised expression in vertebrate neural crest and in neurogenic placodes. One element which is responsible for the preoral pit expression of *AmphiHox2* was also found in transgenic analysis on ascidians. However, this enhancer is different from those drive expressions in the vertebrate neural crest or placodes. Details of the expression pattern of the amphioxus Hox genes were also studied.

### 1. 研究目的

脊椎動物のボディプランの特徴の一つに複雑にパターン化された頭部・顔面があげられる。この頭部・顔面の形成は、脊椎動物で新奇に獲得されたと考えられる神経冠が重要な役割を果たしており、独自の Hox コードをもつ神経冠細胞が位置情報を持って移動してくる過程がパターン形成の鍵となっている。一方で、脊椎動物と最も近縁な無脊椎動物であるナメクジウオでは Hox 遺伝子の前後軸に沿った発現、即ち Hox コードは神経管にの

み見られる。したがって、脊椎動物の Hox 遺伝子が神経冠で新たな発現を獲得したことが、脊椎動物の複雑な頭部・顔面の進化に結びついたと考えられる。本研究の目的は、ナメクジウオと脊椎動物の間で Hox 遺伝子の発現制御機構を比較することによって、脊椎動物の神経冠で Hox 遺伝子が新たな発現を獲得したという現象の分子生物学的な背景を明らかにすることにある。そのような研究を通して、脊椎動物で神経冠という新しい組織がどのようにして進化してきたかについても考察し、さらには、遺伝子が新しい発現

パターンを獲得するという一般的かつ進化的に重要な現象についても理解していこうとするものである。

ここでは、ナメクジウオ胚やホヤ胚でのトランスジェニック動物の作製の試みを通じたナメクジウオ Hox 遺伝子エンハンサーのマッピング（特にマウスの神経冠での発現を活性化すると考えられたものについて）、ナメクジウオ Hox 遺伝子についての詳細な時空間的な発現の解析などを行った。

## 2. 研究経過

### 2.1 ナメクジウオ Hox 遺伝子エンハンサーの脊椎動物での活性

これまでにナメクジウオ Hox 遺伝子のパラログスグループ 1 - 3 (AmphiHox1-3) の周辺のゲノム DNA 約 30kb にわたる領域を 7つの断片に分けて、lac-Z レポーター遺伝子につないだプラスミドを複製し、それらをマウス受精卵に導入したトランスジェニックマウスの解析を行ってきた。そのうち、AmphiHox1 の 3'側約 2.9kb の領域 1A には、トランスジェニックマウスの後部神経管での発現を活性化することがこれまでの研究で明らかになっていた。その後、イギリスの Holland ラボと Krumlauf ラボとの共同研究で、この 1A エレメントが活性化する発現を詳細に調べていく中で、後脳に由来する神経冠でも発現を活性化する能力があること、後部神経管での発現はレチノイン酸に応答することが明らかになってきた。さらに 1A の塩基配列の中にレチノイン酸レセプター応答エレメント (RARE) のコンセンサス配列を認めることができた。脊椎動物のパラログスグループ 1 の Hox 遺伝子も 3'側に存在する

RARE により発現が制御されていることから、パラログスグループ 1 の 3'側の RARE による発現制御機構が脊椎動物とナメクジウオで進化的に保存されていることが示唆された。

脊椎動物の RARE が神経冠の発現を活性化することはこれまでのところ報告されていないので、1A には RARE とは別に神経冠での発現を活性化するエレメントも含まれていると考えられる。現在、ニワトリのエレクトロポレーション法の系を用いて、複数見られるコンセンサス配列の中から実際に活性を持っている RARE を特定することと、神経冠での発現を担っている領域を特定する作業を進めている。

AmphiHox2 と 3 の間に位置する 2つの DNA 領域 2A (約 5kb) と 2B (約 1.5kb) はそれぞれ、[三叉神経節+顔面神経節] と [第 1、第 2 鰓弓] での発現を活性化することがこれまでに明らかになっており、これらの発現が神経冠由来のものかどうかをニワトリの系を用いて調べた。その結果、領域 2A による発現はニワトリの神経管に対してエレクトロポレーションにより DNA を導入した際には発現は見られなかったが、表皮に対して導入した際には神経節での発現が見られた。したがって、2A による発現の活性化は神経冠ではなく、プラコード由来の細胞で見られたことが明らかになった。

### 2.2 ナメクジウオ Hox 遺伝子エンハンサーのナメクジウオ、ホヤでの活性

上記の 1A 及び 2A について、脊椎動物の神経冠での発現を活性化するエレメントを含む可能性が高いと判断されたため、ナメクジウオでの活性を調べてみた。こ

れまでに、ナメクジウオ受精卵に外来遺伝子を導入したという報告はないため、顕微注入法とエレクトロポレーション法で試みた。卵膜が非常に弱いこと、ナメクジウオの産卵期間が短いことなどから、顕微注入法で DNA を導入し、エンハンサー活性を調べることは困難であると判断された。一方、エレクトロポレーション法でも、様々な条件を試み、半数以上の卵が崩壊し、残りの半数が生き残って発生していくような条件でも外来遺伝子が導入されないことから、この方法でもナメクジウオ受精卵への外来 DNA の導入は困難であると考えざるを得なかった。精子へのエレクトロポレーション法での導入トリボソームを用いた方法を現在検討している。

そこで、次善の策として、ナメクジウオと同様明確な神経冠を持たないホヤへの導入で、ナメクジウオでのエンハンサー活性を推測することを試みた。1A に関しては、これまでのところホヤでの活性は認められていない。1A のエンハンサーはホヤのトランスの因子とは進化のノイズのため相互作用できないのかもしれない。

2A をホヤ卵に導入したところ、神経管の先端の脳下腺と呼ばれる領域で発現が活性化された。ここは脊椎動物の下垂体、ナメクジウオの preoral pit と相同と考えられており、後述のようにナメクジウオの preoral pit で AmphiHox2 が発現していることと合わせて、2A にはナメクジウオの preoral pit での発現を制御するエレメントが含まれていると考えられる。

この 2A をさらにいくつかの細かい断片に分けて、ホヤに導入して活性を見たところ、AmphiHox2 のコーディング領域とその 3' 側約 1.5kb を含む領域に脳下腺での発現を活性化するエンハンサーが存在していることがわかった。この領域を

含む DNA エlement をマウスに導入した際には神経節での発現は活性化されなかったことから、ホヤの脳下腺での発現を活性化するエンハンサーと脊椎動物の神経節での発現を活性化するエンハンサーは別のものである可能性が高いことがわかった。

以上の結果から、ナメクジウオ Hox 遺伝子のエンハンサーで脊椎動物の神経冠やプラコードでの発現を活性化させるものが存在することは確認された。しかし、それがナメクジウオでどのような活性を持つかは、ナメクジウオに対する外来遺伝子の導入が困難であったこと、ホヤに導入した際にはそのエンハンサーの活性が検出できなかったことから、これまでのところ明らかにできていない。

### 2.3 ナメクジウオ Hox 遺伝子の時空間的な発現の詳細な解析

脊椎動物とナメクジウオの間で Hox 遺伝子の発現制御機構を比較するに際して、ナメクジウオの Hox 遺伝子の発現を正確に理解しておくことが必須のことであると考え、AmphiHox1-4 について、時空間的な発現を詳細に解析した。その結果、AmphiHox1, 3, 4 は、1 から 4 の順に、神経管において 2 体節分ずつ後方にシフトした前方境界を持つ発現をすること、また発現の開始時期も少しずつ遅れることを明らかにすることができ、Hox 遺伝子発現の時間的、空間的なコリニアリティーがナメクジウオでも確認された。

また、AmphiHox1 は表皮でも明確な前後の境界を持った発現をしていることも明らかにすることができた。上記の 1A が神経冠の発現を活性化することとの関連も興味深い。

AmphiHox2は典型的なHox遺伝子様の神経管での発現はせず、発生後期に preoral pit での発現が見られた。このようなHoxクラスターの中に位置しながら、二次的にHox遺伝子としての機能が失われたように見られる例はショウジョウバエのzenなどでも見られる。

### 3. 研究成果

ナメクジウオのHox遺伝子のエンハンサーに脊椎動物のプラコード由来の神経節、神経冠など脊椎動物で新たに獲得されたと考えられる細胞群での発現を活性化するのが確認された。これらのナメクジウオでの活性は調べることができなかったが、新たにホヤの脳下腺で発現を活性化するのが見つかった。このエンハンサーはナメクジウオHox2のpreoral pitでの発現を活性化していると考えられる。さらに、ナメクジウオHox遺伝子の発現パターンについて時空間的に詳細に調べた。

### 4. 今後の課題と発展

本研究で最も明らかにしたいと考えていた、脊椎動物の神経冠やプラコードといった脊椎動物で新たに獲得されたと考えられる細胞での発現を活性化するエンハンサーのナメクジウオ自身での活性が残念ながら明らかにできていない。ナメクジウオに対する外来遺伝子の導入をリポフェクションなど別の方法で試みる必要がある。あるいはニワトリのエレクトロポレーションの系を用いて、エンハンサーを短く特定していき、トランスの因子を同定し、そのナメクジウオ相同遺伝子の発現を調べるという方法からも推定することができる。このいずれかの方法で、ナメクジウオでの活性を調べ

ていき、Hox遺伝子がどのようにして神経冠などでの新たな発現を獲得したか、さらには神経冠という組織がどのように進化してきたかを明らかにしていきたい。

### 発表論文リスト

- (1) Colinear and segmental expression of amphioxus Hox genes. Wada, H., Garcia-Fernandez, J. and Holland, P. W. H. *Dev. Biol.*, **1999**, *213*, 131-141.
- (2) The origin of the neural crest. Holland, P.W.H., Wada, H., Manzanares, M., Krumlauf, R. and Shimeld, S.M. In: Major events in vertebrate evolution (ed. P.E. Ahlberg). 2000, in press.
- (3) Amphioxus Hox genes have craniofacial patterning potential. Manzanares, M., Wada, H., Itasaki, N., (equal authorships) Trainor, P. A. Krumlauf, R., Holland, P. W. H. 投稿中
- (4) Origin of our head and face. Wada, H. Proceedings of the first international symposium on the biology of ascidians (ed. H. Sawada) 投稿準備中
- (5) Enhancer for the pre-oral pit expression of AmphiHox2 is detected in transgenic ascidians. Wada, H. 投稿準備中
- (6) Evolution of the neural crest. Wada, H. *Dev. Growth Diff.* 投稿準備中