

ゼブラフィッシュ胚を用いた脊椎動物中枢神経系の発生機構の解明 Regional Specificatoin of Developing Vertebrate Central Nervous System: Analyses Using Zebrafish Embryos

武田洋幸, 東京大学大学院理学系研究科

Hiroyuki Takeda, Graduate School of Science, University of Tokyo

FGF signaling has been implicated in neural induction and neural patterning in vertebrate neural tissues. However, the precise role of FGF signaling is still unclear, due to overlapping functions of FGF family genes. By use of zebrafish genetic and embryological analyses, we demonstrated that FGF signaling is involved in the formation of the posterior neural region, counteracting the BMP signaling pathway within the target cells. We then examined the role of FGF signaling in induction and patterning of zebrafish telencephalon, by use of anti-sense oligonucleotide. The results revealed that Fgf signaling, activated by FGF3 and FGF8, is required for the regionalisation within the telencephalon, especially in dorsoventral patterning of the telencephalon. The results obtained in the present study shed light on multiple actions of the FGF signal on neural development.

1. 研究目的

脊椎動物の中枢神経系は前脳、中脳、後脳、脊髄などの明瞭な前後軸および腹側運動神経領域、背側交連神経領域などの背腹軸に沿った明瞭な領域特異性が存在し、それぞれが独自の構造と機能を持ち、全体として高度な高次機構を営んでいる。従って、脳の高次機能を理解するためには、領域特異性の獲得機構を理解することが不可欠である。本研究の目的は中枢神経系の発生の初期に起こる体軸に沿った領域特異性の確立に焦点を当て(図1)、その機構を実験発生学・遺伝学に適した材料であるゼブラフィッシュ初期胚を使って明らかにすることにある。

我々は、オーガナイザー活性を持つ様々な組織をゼブラフィッシュ初期胚に移植する実験な

どで、神経系の初期の前後軸形成は、オーガナイザーを含めた中軸中胚葉から分泌される一般的な神経誘導因子 (Chordin など) と、胚盤周縁の中胚葉 (non-axial mesoderm) からの後方化因子の組み合わせで起こっていることを示してきた (Koshida et al., 1998)。このモデルは、スーパーマン以来半世紀以上にわたり支持されてきた中軸中胚葉を中心とした神経誘導モデルに大幅な修正を迫るものである。しかし、我々が提案した神経誘導モデルにおいて、後方化因子の実体はまだ不明である。本研究では、まずこの後方化因子の候補として注目されている FGF シグナルの後方神経誘導における役割を解析した。また、これらの後方神経の誘導機構を遺伝子レベルで明らかにするために、後方神経

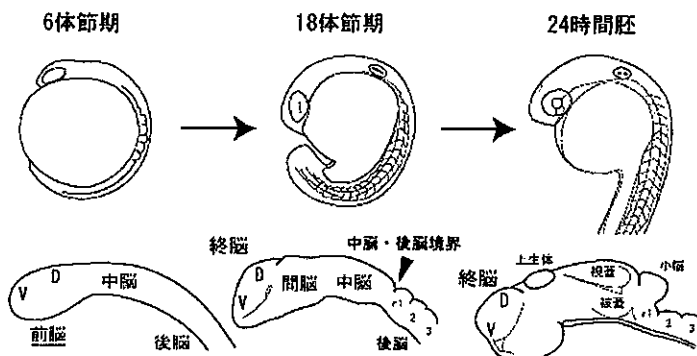


図1. ゼブラフィッシュ初期胚における神経発生の概要

の形成初期で活性化される *hoxa-1* の転写制御領域を絞り込んだ。次に FGF シグナルが前方の神経のパターン形成にどのような役割を担っているのかをアンチセンス技術を駆使して明らかにした。最後に、神経組織の領域特異性の獲得に異常を示す変異体 *chameleon* (*con*) の原因遺伝子の単離と新たな変異体のスクリーニングを試みた。

2. 研究経過 (方法)

2.1 RNA 微量注入と細胞移植による Fgf シグナルの神経誘導における役割の解析

後方化因子の候補として注目される FGF シグナルと神経誘導阻害因子の BMP シグナルとの関係を調べるために、dominant 型 BMP 受容体や dominant negative 型 FGF 受容体を胚内で共発現させた。

2.2 化学的阻害剤やアンチセンス法による頭部形成における Fgf シグナルの解析

後方神経の形成で重要な働きをしている Fgf3 や Fgf8 は、体節期初期には中脳・後脳境界と終脳の前端で強く発現する。それらの役割を FGF 受容体の kinase 活性を特異的に阻害する化学薬剤 SU5402, アンチセンス DNA (Morpholino oligonucleotides) の初期胚への注入により調べた。

2.3 *zhoxa-1* の転写制御領域の解析

zhoxa-1 遺伝子の 5', イントロン, 3' 領域の制限酵素地図を作製し、推定のプロモーター領域を含む DNA 断片と *lacZ* リポーター遺伝子をつないだコンストラクトを作製してゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションした。

2.4 突然変異体を用いた解析

神経管の腹側領域が欠損する変異体の *chameleon* の連鎖地図へマッピングと近傍マーカーの検出を交配パネルと radiation hybrid パネルを用いて行った。また、gene redundancy などの理由でゼブラフィッシュでは得られていない変異体の単離を目指して、メダカを用いて突然変異体のスクリーニングを行った。

3. 研究成果

(1) Fgf シグナルの神経誘導における役割—BMP と FGF の拮抗関係

我々はゼブラフィッシュ腹側化胚において後方神経マーカー *hoxa-1* が発現していることを実験の過程で見出した。この胚は organizer を欠き、神経誘導因子 *chordin* の発現もみられない。この結果は organizer やそこから分泌される因子に依存しない後方神経誘導機構が存在することを示唆している。さらに我々は、constitutive active 型 BMP 受容体の過剰発現で、in vivo においても後方神経誘導が阻害されないこと、constitutive active 型 BMP 受容体と dominant negative 型 FGF 受容体を共発現させた場合に後方神経の発生が阻害されることを観察した。これらの結果は、後方神経領域では FGF シグナルが細胞内で BMP シグナルを阻害していることを示している。以上の結果はゼブラフィッシュ神経誘導 (BMP シグナルの阻害) には 2 つの経路が存在するを示している (Koshida et al, 2002)。一つは、オーガナイザー因子で細胞外で BMP と結合する。もう一つは、後方神経誘導に参与する胚盤周縁からの Fgf で、標的細胞内で BMP シグナルと拮抗する (図 2)

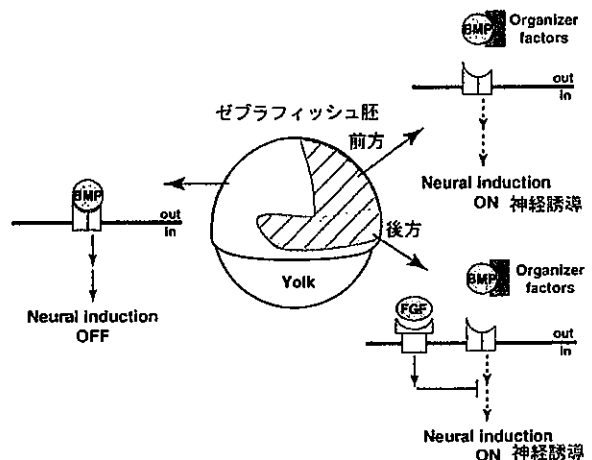


図 2 FGF は BMP シグナルを抑えることにより後方神経を誘導する

(2) Fgf シグナルの頭部パターン形成における役割 今回我々は、終脳前端領域で zebrafish *fgf3* と *fgf8* が共に発現し、この領

域でRas/MAPKカスケードが活性化されていること見いだした。Ras/MAPKカスケードが抑制されると、終脳の腹側領域の発生だけが特異的に抑制され、この領域の発生はFGFシグナルに依存していることが判明した。つまり、終脳領域で発現する *fgf* は終脳領域内の背腹軸の形成に（特に腹側の運命の誘導）必須な因子であるといえる（図3）。さらに、今回のアンチセンス技術を用いた実験により、終脳では、複数の *Fgf* が協調的に機能している事が判明した。従って、ゼブラフィッシュ *ace* 変異体（*FGF8* の変異体）で終脳形成の異常がほとんど観察されなかったことは、他の *Fgf* がその機能を代償していたと考えられた（Shinya et al, 2001）。

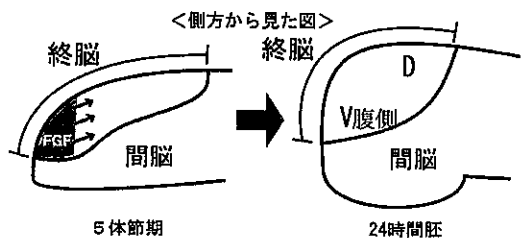


図3 FGFシグナルは終脳の前端で発現し、前脳の腹側領域を誘導する

(3) *zhoxa-1* の転写制御領域

今回の研究において、*zhoxa-1* 遺伝子のプロモーター領域を含むと思われる5'、上流403bpと他の領域の遺伝子断片をインジェクションすることにより、原腸形成期における *zhoxa-1* 遺伝子の発現の頭部側境界形成および背側に限局した発現にはイントロン領域が必要であることが示唆された。また同様に体節期においては *zhoxa-1* 遺伝子5'、上流8kb以内に腹側および頭部側の異所的な発現を抑制する領域が存在することが示された。さらに、イントロン領域は体節期で *zhoxa-1* 遺伝子が背側の神経組織に特異的に発現する機構に関与していることが予想された。また、3'領域は発現を増強する活性が認められ、その配列の中にはretinoic acid反応配列(RARE)が存在していた。以上のように、*zhoxa-1* は非常に複雑な制御を受けていることが徐々に明らかになってきた(図4)。現在、FGFの反応する領域を特定することを目指して、さらに詳細な解析を行っている。

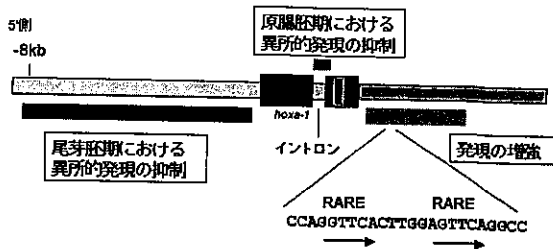


図4ゼブラフィッシュ *hoxa-1* の複雑な発現制御制御

(4) 突然変異体の解析

chameleon (con) のポジショナルクローニングは、0.3 cM (200kb) まで近づいた。しかし、マップされた領域がBACライブラリーにまったく存在せず近傍のゲノム情報が得られない状況に陥った。現在、別のBACライブラリーを試している。

一方、新たな突然変異体を単離を目指して、メダカ突然変異体の3世代スクリーニングを実施した。これまでに、神経系に異常のある興味深い変異体を複数系統単離することに成功した(図5)。

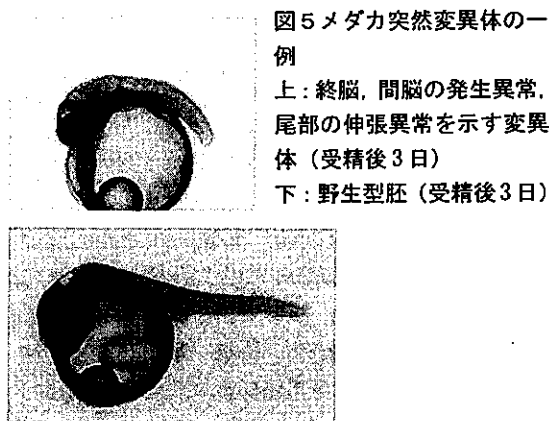


図5メダカ突然変異体の一例
上：終脳、間脳の発生異常、尾部の伸張異常を示す変異体（受精後3日）
下：野生型胚（受精後3日）

4. 今後の課題と発展

本研究により、神経発生におけるFGFシグナルの役割が明確になり、神経組織の領域特異性の獲得への理解がさらに深まった。本研究は、FGFを誘導する因子、FGFにより誘導される

因子の研究へ発展している。一方、本研究の期間中にメダカ（ゼブラフィッシュより変異体単離が容易なために系を変更した）の神経異常の変異体が複数系統単離されており、これらの表現型の詳しい解析と原因遺伝子の同定を通して、研究をさらに発展させていきたい。

今後は突然変異体の原因遺伝子の単離が重要な課題となる。

5. 発表論文リスト

(神経発生関連で本研究課題と特に関係が深いものだけを掲載した)

Sakaguchi, T., Kuroiwa, A. and Takeda, H. (2001). Expression of zebrafish *btg-b*, an anti-proliferative cofactor, during early embryogenesis. *Mechanisms of Devevelopment* 104: 113-115.

Shinya, M., Koshida, S., Sawada, A., Kuroiwa, A. and Takeda, H. (2001). Fgf signalling through MAPK cascade is required for development of the subpallial telencephalon in zebrafish embryos. *Development* 128: 4153-4164.

Koshida, S., Shinya, M., Nikaido, M. Ueno, N., Shulte-Merker, S., Kuroiwa, A. and Takeda, H. (2002). Inhibition of BMP activity by the FGF signal promotes posterior neural development in zebrafish. *Developmental Biology* 244: 9-20..

新屋みのり、武田洋幸、弥益 恭 (2000) 神経誘導と神経組織の体軸に沿ったパターンニング 蛋白質核酸酵素 45(17), 2738-2744.

単行本

武田洋幸 著 動物のからだづくり ー形態発生の分子メカニズムー シリーズ応用動物科学・バイオサイエンス2 朝倉書店 (2001)