

研究課題別研究評価

1. 研究課題名:脊椎動物の新しい神経系形態形成遺伝子の同定

2. 研究者名:清木 誠

3. 研究のねらい

脊椎動物の脳(中枢神経系)は、前から後ろに向かって前脳、中脳、後脳、脊髄という一定の構造をとっており、前2者を前方神経系、後の2者を後方神経系と呼ぶ。後方神経系は前方神経系と同様に、将来、脊索となる中軸中胚葉が神経外胚葉に働きかけて形成されると長い間考えられてきた。最近、体幹の筋肉になる組織(非中軸中胚葉)が神経外胚葉に働きかけて後方神経系を形成することがわかり、ゼブラフィッシュを用いてその分子機構を探った。

4. 研究結果及び自己評価

発生初期に、背腹の区別のない胚にまず背側ができる。この背側組織の一部(中軸中胚葉)が、胚の残りの部分に働きかけ、前後、背腹方向に秩序ある体の形づくりをしていく。中軸中胚葉の前方は脊索前板、後方は脊索になり、それぞれ前方と後方の神経外胚葉に働きかけ、前方、後方神経系ができると考えられてきた。最初に、前方の中軸中胚葉である脊索前板に発現されている分泌因子 Dickkopf1(Dkk1)をクローニングした。脊索前板のみに Dkk1 を過剰発現させると、中脳が縮小し前脳が拡大したことから、前脳と中脳の比率を決定するという脊索前板の新しい機能を見出すことができた。

Wnt シグナル抑制因子である Dkk1 を、脊索前板だけでなく胚全体に過剰発現させると、将来後方神経系になる部分が前方神経系に分化転換し、前方神経系だけの胚になった。この胚で非中軸中胚葉が消失していることに着目し、非中軸中胚葉の形成および後方神経系形成への Wnt シグナルの関与を調べる目的で、非中軸中胚葉に発現される分泌因子 Wnt8 のレセプター frizzled8c と frizzled 9 をクローニングした。胚全体に Wnt8 を過剰発現させると前方神経系が後方神経系に分化転換することから、Wnt8 は後方神経系の形成分子の候補とされてきたが、その可能性を Wnt8 レセプター遺伝子を用いた解析により否定し、Wnt8 はむしろ非中軸中胚葉の形成と維持に関わっていることを明らかにした。さらに、非中軸中胚葉から分泌され神経外胚葉に働きかけて後方神経系を形成する新規分子を探索する目的で、非中軸中胚葉に特異的に発現されている 14 の新規遺伝子をクローニングした。このうち1つが TGFβ 遺伝子ファミリーに属する分泌因子であり、残りの 13 遺伝子は、非中軸中胚葉が神経外胚葉に働きかけた際に、神経外胚葉で活性化されることが判明した。これらの遺伝子がどのようにクロストークすることにより後方神経系を形成していくのかは、今後の重要な課題であると考えられる。

脊椎動物の中で、ゼブラフィッシュは、変異体を網羅的にスクリーニングし、原因遺伝子を突き止めるという順遺伝学的なアプローチをとることができる。しかし、本研究の最初の1年間の大規模な変異体のスクリーニングでは、神経系の前後軸形成に異常のある新規の変異体を得られなかったために、神経系の前後軸形成において、機能の重複した遺伝子が存在する可能性を想定した。本研究を開始した当時、日本ではゼブラフィッシュを用いて変異体の大規模スクリーニングを行える施設がなかったために、ドイツで本研究を行わせていただいた。1年余りで順遺伝学的なアプローチから、遺伝子をまず同定し機能を解析していく逆遺伝学的なアプローチに切り替えることができたのは、ドイツで既存の施設と技術を用いて、最初から変異体のスクリーニングを行えたからである。

以上の逆遺伝学的な解析は、遺伝子探索とそれらの機能解析を別々に行わなくてはならず、本研究期間内

に機能解析を終えることができなかった。このような問題点を克服するために、より鋭敏な新規遺伝子探索とそれらの機能解析を平行して行える新技術の開発を平行して行った。生細胞で蛍光を発する GFP (Green fluorescent protein) をレポーター遺伝子に用い、これをゲノムにランダムに挿入した系統を効率よく作成する方法を樹立した。これにより、生きた胚で、レポーター遺伝子挿入先のゲノム遺伝子(トラップ遺伝子)の発現場所とタイミングを蛍光でリアルタイムに観察しスクリーニングすることが可能になった。興味ある発現パターンを示した系統では、レポーター遺伝子を指標として、トラップ遺伝子を迅速にクローニングでき、この系統を2世代交配することにより、トラップ遺伝子が働かない変異体の作成を可能とした。本研究の期間中に8系統のトラップ系統を確立し、この方法の有用性を示した。このエンハンサートラップ法は、脊椎動物ではマウスを中心に行われてきたが、ほ乳類では子宮内で発生が進行するため、発生過程でダイナミックな発現をする遺伝子の同定には適していない。当初、母胎外で発生が進行するため、発生過程の一部始終を観察できるゼブラフィッシュを用いてこの技術の開発を行ったがうまくいかず、代わりに日本で独自に開発されてきた実験系であるメダカを用いて、未知の遺伝子の発現パターンを生きた胚で観察分離する事を可能にした。

今後、日本国内でサポートを得て、是非とも本研究により樹立した技術を用いて、発生途上の生きた胚で発現パターンによる新規遺伝子のスクリーニングを大規模に行い、脳の形づくりに重要な役割を果たす遺伝子群を同定し、神経難病治療へ向けた脳組織の再生、移植などへの基礎研究としたい。

5. 領域総括の見解

小型魚類のゼブラフィッシュは胎外で発生が進行し、その様子を終始観察できる上に遺伝学的解析が可能なことから、脊椎動物の発生・分化過程の研究に好適な材料と考えられている。この特徴に注目して、神経系の前後軸形成機構の解明を当面の目標として、突然変異の大規模スクリーニングの可能なライプツィグ大学において実験を行い、幾らかの遺伝子 DNA クローンを得て、神経系形成に新たな知見を加えている。しかし、より効率良く突然変異体を分離することの必要性を痛感し、GFP 蛍光遺伝子をレポーターとしたエンハンサートラップ法を考案し、その有用性を確認している。最近はこの方法をメダカにも適用し、発生中の胚を観察しながら突然変異体を選択することを行っている。この新しいモデル生物の開発への努力は高く評価されるべきである。

6. 主な論文等

- Kondoh, H., Uchikawa, M., Yoda, H., Takeda, H., Furutani-Seiki, M., Karlstrom, R. O. (2000). Zebrafish mutations in Gli-mediated hedgehog signaling lead to lens transdifferentiation from the adenohipophysis anlage. *Mech Dev* 96, 165-174.
- Shinya, M., Eschbach, C., Clark, M., Lehrach, H. and Furutani-Seiki, M. (2000) Zebrafish Dkk-1, induced by the pre-MBT Wnt signaling, is secreted from the prechordal plate and patterns the anterior neural plate. *Mech Dev* 98, 3-17.
- Yoda, H., Eschbach, C., Steinbeisser, H. and Furutani-Seiki, M. Identification and Functional Analysis of Wnt8 Receptor in Zebrafish. in submission.

7. その他

招待講演 国内2件