

東京大学大学院理学系研究科・助教授

平 良 眞 規

「脳の初期発生制御遺伝子群の体系的収集と機能解析」

研究期間：平成10年12月1日～平成 15 年11月30日

1. 研究実施の概要

高次機能を司る脊椎動物の脳の仕組みを明らかにすることは、自然科学の大きな課題であり、また人類の福祉と繁栄に貢献するものである。本プロジェクトでは、脳の仕組みを発生分子メカニズムの観点から明らかにすることを目指した。それにより脊椎動物の脳が、無脊椎動物と比較して、いかに進化を遂げて複雑化し、最終的に知能を獲得するまでに至ったのかを理解することが可能となる。さらに将来的には、脳がさらに進化し高度化するか否かを予測することも可能となるかもしれない。

脊椎動物の脳の発生過程は大きく2つに分けることができる。第1の過程は原腸胚オーガナイザーによる外胚葉からの神経組織の誘導と初期パターン形成である。誘導された神経組織は神経板を経て神経管を形成し、後に中枢神経系を形成する。神経管の前方は3つの脳胞に分かれ前脳、中脳、後脳となり、後方は脊髄を形成する。第2の過程は脳内に形成されるオーガナイジング・センター（あるいはパターンニング・センター）によるパターン形成である。脳のオーガナイジング・センターとしては中脳後脳境界 (MHB, midbrain hindbrain boundary) 領域が良く知られており、MHBは中脳に対しては視蓋を誘導し、後脳に対しては小脳を誘導する。しかしMHBがどの時期から形成され始め、どのように機能し始めるのかの詳細は明らかではない。また、この2つの過程は後期原腸胚から神経胚期の間で徐々に切り替えられるのではないかと予想されるが、その詳細も不明である。

一般に初期胚組織の誘導能や反応能（コンピテンス）を形態的に判別することは困難であるが、それらの組織に特異的に発現する遺伝子を同定することで解析が可能となる。また組織や器官形成の場合も、それぞれに特異的に発現する遺伝子を同定することで形態形成の初期過程を解析することが可能となる。このように胚発生において領域特異的に発現する遺伝子を同定し、その発現パターンを解析することは発生過程を知る上で非常に重要である。そしてそれら未分化状態の組織で領域特異的に発現する遺伝子の多くは機能的には発生を司る遺伝子、いわゆる発生制御遺伝子であることが多くの例で示されている。一方、細胞内シグナル伝達系の因子などで明確な領域特

異的発現を示さない発生制御遺伝子も知られている。それらを同定するためには、生物活性を指標とした発現スクリーニングが必要である。また他の生物で同定された発生制御遺伝子のオーソログをクローニングして初期発生における役割を検討することも有効な方法である。

これら種々の方法で同定された遺伝子の役割を個々に明らかにすることで、発生制御遺伝子に基づく発生の分子メカニズムを明らかにすることが可能となる。アフリカツメガエルは、脊椎動物であるが体外で発生するため初期胚の観察や胚操作が容易であり、また発現パターン・スクリーニングと機能スクリーニングと共に遺伝子の機能解析にも適したモデル生物であることより、脳の初期発生過程の解析に有用なモデル生物といえる。

以上を背景に、本プロジェクトでは、アフリカツメガエルのオーガナイザーと予定脳領域に発現する遺伝子を体系的に収集し、それらの胚発生における発現パターンを解析し、発現クローニング法で機能に基づく遺伝子スクリーニングを行い、そこで見出された発生制御遺伝子候補について詳細な機能解析を行った。また、各クローン遺伝子の部分配列 (ESTs, expressed sequence tags) と発現パターンを連結させたデータベースを構築し、ゲノムプロジェクトに対応する基礎データとした。これらの解析を通して、脊椎動物初期発生におけるオーガナイザー機能の分子基盤の解明、ならびに脳の誘導とパターン形成の分子メカニズムの解明を目指した。

本プロジェクトで得られた成果は以下の通りである。

1) 脳の初期発生に関わる制御遺伝子のスクリーニング

頭部オーガナイザー領域および予定脳領域に発現する遺伝子を同定するため、前方神経外胚葉領域 (ANE, anterior neuroectoderm) と前方内中胚葉領域 (AEM, anterior endomesoderm) を単離しcDNAライブラリーを作成した。尾芽胚胴部より抽出した全RNAから作成したcDNAプローブを用いてプラークハイブリダイゼーションを行い、陽性クローンは胴部に高発現しているクローンとして除き、陰性クローンから無作為に数千のクローンを単離した。次いで各クローンの5'側からのESTsを決定し、クラス

タリングと公共データベースに対するBlast検索を行った。その結果、ANE cDNAライブラリーからは1,819個のESTsを得、新規遺伝子候補806個の発現パターンを明らかにした。その内の約70個は主としてANE領域に発現する遺伝子であり、さらにその内の一つはMHBに特異的に発現する新規遺伝子でありXHR1と命名した。

AEM cDNAライブラリーからは、1,039個のESTsを得、新規遺伝子候補198個の発現パターンを明らかにした。その内の9遺伝子は主としてAEM領域に発現しており、その一つはニワトリ遺伝子crescentのオーソログであった。これらのESTsと発現パターンは、本プロジェクトで構築したデータベース (XEXTDB) にまとめ、検索可能とし、AEMのデータベースに関してはWeb上で公開している。以上のように、脳の誘導とパターン形成に関わると予想される多数の遺伝子を得た。

次に、発現クローニング法で機能に基づく遺伝子検索を行った。ANEの発現cDNAライブラリーを作成し、200クローンのプールごとにmRNAを合成し、アニマルキャップ（外胚葉外植体）に発現させて神経化活性の有無を検討した。次いで神経化活性を持つプールからシブ・セレクションにより活性を持つ単一のクローンを同定した結果、幾つかの新規遺伝子を見出した。その中の一つは機能未知のヒト核内膜蛋白質MAN1遺伝子のオーソログであった。

オーガナイザー特異的転写因子Xlim-1はオーガナイザーの脳誘導活性に関わることが示唆されていることより、その標的遺伝子を検索することでオーガナイザー因子の同定と脳誘導に至る遺伝子カスケードを明らかにできると考えられる。そこで予定外胚葉に活性型Xlim-1を発現させて発現誘導される遺伝子をサブトラクションライブラリーを作成してスクリーニングした。その結果、Xlim-1により発現上昇することが既に表示されていたホメオドメイン蛋白質Goosecoid、Xotx2と分泌性因子Chordinに加え、新たにオーガナイザー特異的分泌性因子Cerberus、レセプターチロシンキナーゼXror2、核蛋白質XPA26、メタロプロテアーゼADAMTS1、ホメオドメイン蛋白質Xotx5、ジンクフィンガー転写因子Zic3などの遺伝子が同定された。これらはいずれもオーガナイザー領域に発現していることからXlim-1の標的遺伝子候補である。

2) 脳の初期発生に関わる制御遺伝子の機能解析

これまで解析してきたXlim-1の活性制御機構と機能解析に加えて、本プロジェクトで得られた新規発生制御遺伝子候補から、遺伝子構造、発現パターン、生物活性に注目して選別した遺伝子に関して解析し、以下の結果を得た。

- 1) Xlim-1はオーガナイザー特異的転写抑制因子*goosecoid*の遺伝子プロモーターを直接活性化することを見出した。このことは、Xlim-1はオーガナイザーにおける転写制御ネットワークに関わることを示唆する。
- 2) 頭部オーガナイザーに発現する脳誘導因子*cerberus*の遺伝子プロモーターはオーガナイザー特異的ホメオドメイン蛋白質Xlim-1、Siamoisと内中胚葉転写因子Mix.1の三者複合体により活性化されることを見出した。これによりオーガナイザー形成から脳誘導に至る遺伝子カスケードの一端が示された。
- 3) Xlim-1の正の制御因子Ldb1と結合するRINGフィンガー蛋白質Rnf12/RLIMのアフリカツメガエル・オーソログXRnf12を単離し、オーガナイザーにおける役割を検討した。その結果、XRnf12は遊離のLdb1をユビキチン化し分解することで、Xlim-1とLdb1の適切な量比の維持に関わることを示唆された。
- 4) 頭部オーガナイザーに発現する分泌性因子Crescentは細胞平面極性に関わるXwnt11と複合体を形成し、神経外胚葉においてはXwnt11の活性を阻害して収斂伸長運動を阻害するのに対し、中胚葉においてはXwnt11と同様にWntのCdc42経路を活性化することを見出した。Crescentは頭部における細胞の収斂伸長運動を制御することで頭部形成に関わることを示唆された。
- 5) 発現クローニングによる神経化因子の検索で、核内膜蛋白質XMAN1に強い神経化活性を見出した。XMAN1はC末側領域がBMPシグナル伝達因子Xsmad1と結合することより、BMPシグナル伝達の新たな制御因子と考えられる。アンチセンス・モルフォリーノ・オリゴによる機能阻害実験の結果、XMAN1は前方神経板の形成に必要な因子であることが示され、XMAN1がBMPシグナルを負に制御する因子であることが支持された。核内膜蛋白質がシグナル伝達に関わることを示唆した最初

の例である。

- 6) bHLH型転写抑制因子XHR1は原腸胚初期で予定MHB領域に発現を開始し、この発現開始時期はこれまで報告されているどのMHB遺伝子よりも早期であることを見出した。ドミナント・ネガティブ・コンストラクトを用いた機能解析によりXHR1はMHB形成に関与することが示唆された。次いでXHR1の標的遺伝子を検索したところ、Notchの標的遺伝子であるbHLH型転写抑制因子ESR1、ならびにNeurogenin-related 1、delta等を見出した。

以上、オーガナイザーに発現する遺伝子、および予定脳領域に発現する遺伝子の発現調節機構と機能の一端が明らかとなった。今後はこれらの遺伝子間の相互作用、未解析の遺伝子の機能解析を行うことで、オーガナイザーによる脳の誘導とパターン形成、および脳内のオーガナイジング・センターによるパターン形成の分子メカニズムがさらに明らかになると期待される。

2. 研究構想

1) 序論

<脊椎動物の脳の特徴>

高等脊椎動物の哺乳類と下等脊椎動物の魚類・両生類とで脳の形態を比較すると、その複雑さには大きな違いがある。しかし初期発生過程における前脳、中脳、後脳という脳胞の基本的形態は同じである。さらに前脳からは眼胞が左右に膨出し残りが間脳となり、前脳の前端両側から一対の端脳が膨出し、また中脳の背側両側から一対の視蓋が膨出する。後脳は7から8つの菱脳分節構造をとり第1菱脳分節の背側両側から一対の小脳が膨出する。これらの脳の形態も脊椎動物に共通したものである。最近の分子マーカーを用いた解析によりその類似性は更に裏付けられている。

それに対し無脊椎動物と脊椎動物の脳を比較するとそこには歴然とした違いがある。前者は神経芽細胞の分裂によって形成される細胞の集合体としての固形脳であるのに

対し、後者は脳室をもつ脳、すなわち中腔脳である。中腔脳は背側中胚葉により外胚葉から誘導された神経板に由来し、神経板の両脇が融合して生じたものである。このように中腔脳という基本形態がヒトを頂点とする高次の脳を発達させ得たといえ、ヒトの脳を理解するためには脊椎動物をモデル生物として中腔脳の発生機構を解析する必要がある。

＜脳の初期発生におけるオーガナイザーの役割＞

両生類は脊椎動物初期発生の解析において古くより中心的役割を担ってきた。原口背唇部の神経誘導作用による外胚葉からの中枢神経系の形成機構は、イモリ胚を用いたSpemannとMangoldの実験により示されたものである（1924年）。その結果「オーガナイザー」と「胚誘導」という発生学の基本的概念が生まれた。オーガナイザーとは機能的概念であるが、その本体は背側中胚葉と前部内胚葉と考えられている。オーガナイザー（原腸胚オーガナイザーともいう）はさらに予定前脳・中脳領域である前部神経板を誘導する頭部オーガナイザー（脊索前板と前部内胚葉に相当）と、予定後脳・脊髄領域である後部神経板を誘導する胴部オーガナイザー（脊索に相当）とに分けられる。このようにオーガナイザーは単に組織分化を誘導するのみではなくそのパターン形成も行う点が重要であり、オーガナイザーの形成とその誘導作用による神経板形成とそのパターン形成が中腔脳の基本的形成過程であり、脳形成の最初の段階である。原腸胚後期から神経胚初期において、神経板の前後軸（anteroposterior axis）に関するパターン形成は胴部オーガナイザーからの後方化因子により行われ、神経板の中側軸（mediolateral axis）に沿ったパターン形成は恐らく中軸中胚葉と沿軸中胚葉からの誘導により行われると考えられている。両生類のモデル生物としては現在ではアフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）が主として用いられ、それにより分子レベル・遺伝子レベルでのオーガナイザーと神経誘導に関する解析が進展した。なお鳥類や哺乳類では結節（node）が原腸胚オーガナイザーに相当する。

< 脳のパターンニング・センターの役割 >

神経胚後期以降の脳の発生機構に関しては主としてニワトリやマウスを用いた解析からの知見がある。この時期の前後軸に関するパターン形成としては、中脳後脳境界 (MHB, midbrain-hindbrain boundary ; 菱脳峡、isthmus) 領域が「オーガナイジング・センター」あるいは「パターンニング・センター」として働き、中脳に視蓋を、後脳に小脳を誘導することが知られている。一方、神経板の中軸組織である底板 (floor plate) は神経管の腹側のパターンニング・センターとして働き、神経板の側方組織の神経稜は蓋板 (roof plate) となり背側のパターンニング・センターとして働く。それにより背腹軸に沿ってパターン形成が行われ、脊髄では運動・介在・感覚ニューロンが分化する。後脳に関しては前後軸に沿って生じる菱脳分節 (rhombomere) の形成機構について良く解析されている。間脳と端脳の前後軸に沿ったパターン形成としては、遺伝子の発現パターンに基づいた「分節単位」としてプロソメア (prosomeres) 構造が提唱されている。眼胞は前脳から形成されるが、網膜細胞層の形成機構など良く解析されている。

このように神経組織のパターン形成と領域化は、原腸胚オーガナイザーによる外部からの神経組織の初期パターン形成に始まり、神経組織内のパターンニング・センターによるパターン形成へと移行することで進行すると考えられる。神経組織内のパターンニング・センターとしては上記以外には前部神経稜 (anterior neural ridge, ANR) や zona limitans intrathalamica などが提唱されている。

2) 脳の初期発生機構における研究課題

脳の初期発生過程の概略は明らかになりつつあるが、それに関わる発生制御遺伝子の全体像、それらの遺伝子の個々の役割、遺伝子間の相互作用や遺伝子カスケードなどの分子機構に関しては不明な点が数多く残されている。

< オーガナイザーに関する課題 >

脊椎動物の初期発生における原腸胚オーガナイザーの形成とその役割に関する分子

生物学的解析は、アフリカツメガエルを用いて1990年初頭に始まり、オーガナイザー特異的転写因子や分泌性因子等の種々の発生制御遺伝子の発見により急速に進展した。アフリカツメガエルで初めて同定された重要なオーガナイザー遺伝子としては、転写因子をコードするホメオボックス遺伝子Xlim-1, goosecoidなどがあり、分泌性因子コードする遺伝子にはnoggin, chordin, cerberusなどがある。アフリカツメガエルを用いた機能解析により、Xlim-1はオーガナイザーの神経誘導活性に関与していること、Noggin, Chordin, CerberusはBMP阻害因子として神経誘導に関与していることが示唆されている。

マウスのオーガナイザーの解析は遺伝子ノックアウト法により行われ、Lim1とOtx2が頭部形成に必須の遺伝子であることが示され、頭部オーガナイザーでの機能が示唆されている。しかし頭部オーガナイザーと胴部オーガナイザーがどのように決定されるか、即ちそれらを規定する転写因子に関しては未だ充分には明らかにされていない。一般に転写因子の役割を明らかにするには、その標的遺伝子の同定は不可欠である。またオーガナイザーから分泌される誘導因子に関してはその遺伝子の発現制御を行う転写因子を同定する必要がある。このように「オーガナイザー形成」から「神経誘導とパターン形成」に至る遺伝子カスケードを明らかにするためには、オーガナイザーにおける遺伝子の発現制御機構、転写調節ネットワーク、遺伝子間の相互作用などを詳細に解析することが重要である。

<神経化機構とパターン形成に関する課題>

神経誘導機構に関しては、アフリカツメガエルを用いた解析により、BMPシグナルの阻害による神経化機構が提唱されたが、他にも分泌性因子FGF（線維芽細胞増殖因子）やWntのシグナルの関与も示唆されており、また外胚葉の内因性神経化因子に関しては未だ明らかにされていない。胴部オーガナイザーから分泌される後方化因子としてはFGF, Wnt, レチノイン酸 (RA) が提唱されている。逆に頭部オーガナイザーからはWntの阻害因子が分泌され、胴部オーガナイザーによる後方化作用を阻害していると考えられている。またRA分解酵素Cyp26は胚の前方と後方領域に発現してい

ることより胴中央部でのパターン形成にRAが関与することが示唆されている。しかしFGFとWntは相互に関わっており、またそれらとRAとの関係も含めて未だ統一的理解までには至っていない。

一方、脳のオーガナイジング・センターであるMHBの機能と形成機構に関しては良く研究されており、MHBの維持にはOtx2とGbx2が必要であること、およびMHBからの誘導因子としてはFGF8が働いていることが示唆されている。しかしMHB形成過程の最も初期の段階に関しては、それが原腸胚オーガナイザーからの誘導によるものか否かも含めて不明である。

< 5年間の研究計画・進め方の概要 >

以上を背景とし、本プロジェクトでは脳の初期発生、中でも未だ十分に解明されていないオーガナイザーによる神経組織の誘導とパターン形成の分子機構、ならびに未だ解析が充分に行われていない初期神経胚期における脳のパターンニング・センターの形成機構とそれによる初期パターン形成機構に注目して解析することとした。まず前半の2年間を目処にアフリカツメガエルを用いて脳の初期発生に関わる遺伝子の体系的スクリーニングを行い、後半の3年間で各遺伝子の機能解析を行うことで脳の発生過程における役割を検討することとした。また領域特異的に発現する遺伝子のプロモーター解析を行い、その遺伝子にどのようなシグナルが入力しているかを検討することでパターン形成機構を探る。

1) 頭部オーガナイザー領域と予定脳領域に発現する遺伝子の体系的スクリーニング (平良グループ、木村グループ)

アフリカツメガエルの頭部オーガナイザー領域（前部内中胚葉；AEM, anterior endomesoderm）と予定脳領域（前部神経板；ANE, anterior neuroectoderm）の領域特異的cDNAライブラリーを作成し、発現パターン・スクリーニングによる体系的遺伝子スクリーニングを行う。すなわち、cDNAライブラリーよりランダムに選んだクローンについて、全胚in situハイブリダイゼーションを用いて領域特異的に発

現するクローンを検索する。得られたクローンに関しては塩基配列を決定し、分類する。その中から新規発生制御遺伝子として機能解析するものを選択する。スクリーニングの効率を上げるための方策として、発現パターン・スクリーニングを行う前に、胚全体に不偏的に高発現するクローンをプラーク ハイブリダイゼーションにより検出して除くこと、さらに部分塩基配列を決定し、ハウス・キーピング遺伝子等の既知の遺伝子を除くことを行う（平良グループ）。

この体系的遺伝子スクリーニングにより、脳の初期発生過程に特異的に発現する遺伝子群の塩基配列および発現パターンのカタログ化が行われ、発生学ならびに脳研究を支える重要な基礎データの1つとなるものと考えられる。さらにヒトをはじめとする種々の生物の全ゲノム塩基配列およびESTsと対応させることで、それらに対し生物学的意味付けを与えるものと期待される。

アフリカツメガエルで見出された新規遺伝子のうち脳の初期発生に関わるものが予想される遺伝子に関しては、マウス・オーソログの単離を行い、マウス胚での発現パターンの解析を全胚in situハイブリダイゼーションにより行う（木村グループ）。

2) 新規遺伝子の機能解析

2-1) アフリカツメガエル胚への合成mRNAの微量注入実験（平良グループ）

2細胞から64細胞期胚の特定の割球に合成mRNAを微量注入し、目的の遺伝子の過剰発現あるいは異所発現による脳形成への影響を調べることで機能の推定を行う。遺伝子の構造によっては、ドミナント・ネガティブ型コンストラクトを作成し、その変異型蛋白質を発現させることで内在性蛋白質の阻害実験を行う。

2-2) 遺伝子ノックアウト・マウスを用いた解析（相沢グループ）

脳の形態形成の初期から発現する遺伝子Otx2, Otx1, Emx1, Emx2に関してそれぞれノックアウト・マウス作成し解析してきたが、それらの遺伝子はいれ子状に発現するため機能重複の存在が考えられた。そこで二重変異マウスを作成し脳発生における役割をさらに検討する。それと並行して平良グループによるアフリカツメガエル胚での解析、木村グループによるマウス胚での発現パターンの結果を基に、脳

の発生制御遺伝子と目されるものを選択してノックアウト・マウスを作成する。変異マウスの脳の形態変化に注目し、また種々の分子マーカーの発現変化を検討することで機能解析を行う。

2-3) トランスジェニック・マウスを用いた解析（木村グループ）

脳の領域特異的に発現する遺伝子のプロモーターをlacZレポーター遺伝子につなぎ、そのレポーターDNAコンストラクトを前核へ微量注入し、プロモーター・アッセイを行う。注入したDNAが核DNAに組み込まれた胚を予め選別するため、緑色蛍光蛋白質 (GFP) 発現ベクターとの共注入を試みる。また染色体の組込み部位による影響を除くためインシュレーター配列をレポーターDNAの両脇に組み込みその効果を検討する。プロモーター解析により領域特異的発現をもたらすプロモーター上のエレメントを同定し、さらにそれを基にその上流に存在するシグナル伝達の解析を行う。

<各グループの役割分担>

本プロジェクトは3グループにより構成される。アフリカツメガエルを用いた解析は平良グループが、マウスで遺伝子ノックアウト法での解析を相沢グループが、マウス胚でのオーソログの単離と遺伝子発現調節機構の解析を木村グループが担当した。

<その後の新展開から生まれた目標等>

- 1) 発現パターン・スクリーニングの過程の初期の段階で興味深い発現パターンを示すクローンを数多く見出したが、全長cDNAを単離して解析した結果、既知の遺伝子であると判明したものが少なからずあった。そこでmRNA注入による生物活性に基づく機能スクリーニング法も試みることにした。
- 2) アフリカツメガエルの実験系において、信頼性のある機能阻害実験法が確立していなかった。例えばアンチセンスRNAやリボザイムを用いる方法はあまり有効な手段となっていない。我々はRNAi法を試みたがXlim-1には効果的であったが、XHR1には効果が得られなかった。その後、毒性が少なく安定性が高いアンチセン

ス・モルフォリーノ・オリゴ (MO) が翻訳阻害に有効であることが示された。そこでMOによる機能阻害実験を行うこととした。

- 3) 機能解析した遺伝子の中で、Xror2とCrescentは後方神経組織と後方背側中胚葉の収縮伸張運動におけるWntの平面細胞極性経路の修飾因子として機能することが示された。収縮伸張運動の調節により前方神経組織と後方神経組織を物理的に分断させることで、間接的にパターン形成に関わることが予想された。そこで、本プロジェクト開始当初は神経組織のパターン形成機構に直接関わる遺伝子の解析を念頭に置いていたが、Wntの平面細胞極性経路に関する解析にも力点を置くこととした。
- 4) パターン形成に関わる遺伝子として脳のオーガナイジング・センターであるMHB領域に特異的に発現するXHR1遺伝子を見出したことで、その遺伝子の機能解析と発現制御機構の解析に力を注ぐこととした。一方、前脳中脳領域に発現する遺伝子でパターン形成に関わることが予想される遺伝子が予想外に少なかったため、本格的な機能解析まで至らなかった。
- 5) アフリカツメガエルにおけるプロモーター解析は、注入したレポーターDNAコンストラクトがゲノムに組み込まれないため、正確な発現解析は不向きであるとされていた。しかし導入するcerberusレポーター・コンストラクトの量を調整した結果は胚の内在性cerberus遺伝子の発現と類似の応答が見られたことより、解析可能と考えエレメントの同定を行うこととした。一方、XHR1遺伝子のレポーター解析ではDNA注入法では内在性遺伝子と同じ発現は得られなかったため、Amayaらが開発した核移植法によるトランスジェニック法を用いることとした。
- 6) アフリカツメガエルで見出された遺伝子XHR1とcrescentのマウス・オーソログが同定されなかったこと、およびアフリカツメガエルでプロモーター解析を行ったcerberus遺伝子レポーターコンストラクトがマウス胚で発現しなかったこと、などでマウスを用いる解析に大幅な遅れを生じた。そこで遺伝子検索の過程で見出されたARL6がマウス胚のオーガナイザー領域である結節で発現していたことより、この遺伝子の発現と機能解析を行うこととした。
- 7) プラナリアの脳形成に関わる遺伝子としてnou-darake (ndk) が同定され、そのコー

ドする蛋白質の構造からマウスとヒトで同定されていたFGFレセプター様蛋白質FGFRL1のホモログであることが神戸理研・阿形清和博士ら示され、共同研究としてアフリカツメガエルを用いてndkの機能解析を行った。その結果、NdkはFGFシグナルに対して阻害活性を持つことが判明した。FGFは後方化因子として働くことより、FGFRL1が脳形成に関わる可能性が考えられアフリカツメガエルのFGFRL1オーソログの解析を開始した。

3. 研究成果

3.1 アフリカツメガエルにおける発生制御遺伝子群の体系的収集と機能解析

(平良グループ)

(1) 研究内容及び成果

(A) 脳を誘導するオーガナイザーの分子基盤と (B) 神経板の初期パターン形成の分子メカニズムを明らかにするため、新規遺伝子の同定、オーガナイザーと初期神経板に発現する遺伝子の機能解析を行い、以下の研究成果を上げた。

A) 脳を誘導するオーガナイザーの分子基盤

1) オーガナイザーに発現する新規遺伝子の同定と発現パターンの解析

i) オーガナイザー特異的LIMホメオドメイン蛋白質Xlim-1の標的遺伝子の同定（日笠）

オーガナイザーで重要な役割を担っているLIMホメオボックス遺伝子*Xlim-1*の標的遺伝子を解析することは、オーガナイザーの形成と神経誘導とパターン形成における遺伝子カスケードを明らかにする上で重要である。そこでアニマルキャップ（予定外胚葉外植体）で活性化型*Xlim-1* (*Xlim-1/3m*) により発現が上昇し、かつオーガナイザー領域特異的に発現している遺伝子の検索を行った。まず*Xlim-1/3m*を発現させたアニマルキャップと発現させないコントロールのアニマルキャップを約500個用意し、それらからRNAを抽出し、poly(A)⁺RNAを調整し、cDNAを合成した。

得られたcDNAは制限酵素で断片化し、両端にアダプターをライゲーションした後、suppression PCRの手法を用いてXlim-1/3mを発現させたアニマルキャップで発現が上昇した遺伝子を選択的に増幅させた。このPCR産物をTAクローニングベクターに組み込みコロニーハイブリダイゼーションにより、Xlim-1/3mを発現させたアニマルキャップ由来cDNAプローブでハイブリダイズし、コントロールアニマルキャップ由来cDNAプローブでハイブリダイズしないクローンを選別した。

その結果、多数の陽性クローンを得たが、陽性クローンには、Xlim-1/3mで発現上昇することが既に示されている*gooseoid*, *Xotx2*, *chordin*が含まれていることが予想されたため、それらのプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行ったところ約半数は陰性であった。そこでこれら陰性のクローンをプローブとして、オーガナイザー領域とそれ以外の領域からそれぞれ抽出したRNAを用いてノーザンハイブリダイゼーションを行い、オーガナイザー領域特異的に発現するクローンを得た。またそれらのクローン間の異同をサザンハイブリダイゼーションで検討し、重複しないクローンに関して全長cDNAを、原腸胚cDNAライブラリー (Blumberg博士より供与) よりプラークハイブリダイゼーション法で単離し、構造解析を行った。その結果、オーガナイザー特異的分泌性因子*Cerberus*, レセプターチロシンキナーゼ*Xror2*, 核蛋白質*XPA26*, メタロプロテアーゼ*XADAMTS1*, ホメオドメイン蛋白質*Xotx5*, ジンクフィンガー転写因子*Zic3*が同定された。*cerberus*, *Xotx5*, *Zic3*以外はアフリカツメガエルの新規遺伝子で、本研究によって初めてオーガナイザーに発現していることが明らかとなった遺伝子である。これらはいずれもXlim-1の標的遺伝子候補と考えられる。

標的遺伝子候補の中から、*gooseoid*と*cerberus*に関してはXlim-1による発現調節機構を調べるためレポーターアッセイによるプロモーター解析を行った(後述)。Gooseoidは抑制性の転写因子で腹側化因子の発現を抑えることが知られていることより、Xlim-1の直接の標的遺伝子であることを示すことは、オーガナイザーにおける転写制御ネットワークの構築に必要である。*Cerberus*はBMP, Nodal, Wnt8に結合する分泌性の阻害因子で、腹側帯域に発現させると頭部構造を誘導することより

頭部誘導因子として知られている。しがたって、*cerberus*がXlim-1の直接の標的遺伝子であることを示すことはオーガナイザー特異的転写因子と分泌成因子との直接のつながりを示すことで意義深い。今回オーガナイザーに発現していることが新たに見出されたレセプターチロシンキナーゼXror2, 核蛋白質XPA26, メタロプロテアーゼXADAMTS1に関しては詳細な発現パターン解析と機能解析を行った（後述）。

ii) 頭部オーガナイザー領域に発現する遺伝子の体系的検索（柴田、伊藤、大森、信賀）

後期原腸胚の頭部オーガナイザーに特異的に発現する遺伝子の体系的検索を行うため、ESTsの作成と発現パターンの解析を行った。まず頭部オーガナイザー領域に相当する前部内中胚葉 (*anterior endomesoderm*, AEM) を後期原腸胚より切り出し、cDNAライブラリーを作成した。このcDNAライブラリーからハウスキーピング遺伝子のクローンを除くため、尾芽胚胴部より抽出した全RNAを鋳型としてcDNAプローブを作成し、プラークハイブリダイゼーションを行った。陽性クローンはハウスキーピング遺伝子あるいは胴部に高発現しているクローンであると考えられるので、陰性クローンから無作為にクローンを単離した。この中にオーガナイザー特異的遺伝子が含まれることが期待された。

単離した陰性クローンの5'側からの塩基配列 (ESTs) をデータベース化し、かつそれらのクラスタリングとBlast検索を半自動的にを行い、また発現パターンの画像データとリンクした関連データベースを構築するため、国立遺伝学研究所の小原雄治博士が作成した線虫用のESTsと発現パターンのデータベースNEXTDBを基に、カエル版に改良したデータベースXEXTDBを受託により作成した。

単離したAEMライブラリーの陰性クローンの中から5'側からの配列情報が得られた1,039クローンに関してESTsとしてXEXTDBに登録し、クラスタリングとBlastホモロジー検索を行った。その結果、1,039クローンは756個の独立クラスターに分けられ、その中の151クラスターは既知のアフリカツメガエル遺伝子であり (151/756=20%), そこには*chordin*, *noggin*, *folliculin*のオーガナイザー特異的遺伝子が8個

(8/151=5.3%) 含まれていた。また756個の独立クラスターのうち既知のカエル発生制御遺伝子が36クラスター、発生制御遺伝子と予想されるものは48クラスター (48/756=12%), 未知の遺伝子と予想されるものは315クラスター (315/756=42%) であった。

そこで発生制御遺伝子と予想されるものと未知の遺伝子と予想されるもの計363クラスターを選別し、そのうち現在まで198クローンに関して発現パターンを全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション法で解析した。その結果、オーガナイザー領域に発現していることが判明したクローンに関しては、cDNA全長の構造解析と新たに単離したcDNAの構造解析を行った。この段階でアフリカツメガエルの既知の遺伝子と新たに判明したクローンには *noggin*, *XHex* などがあった。最終的にオーガナイザー領域に発現するカエル新規遺伝子としては9個見出された。その中で特に頭部オーガナイザー領域に発現する4遺伝子、P4F1, P7E4, P8F7, P17F11, については発現パターンをさらに詳細に解析した。なおP4F1はニワトリ *crescent* のアフリカツメガエル・オーソログであり、N7E4はヒトESTクローン KIAA0952 と相同性があった。P8F7はどの遺伝子とも相同性はなく、P17F11は植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis*) の未知の遺伝子と相同性があった。

これらP4F1, P7E4, P8F7, P17F11は初期原腸胚のオーガナイザー領域に特異的発現し、後期原腸胚期と初期神経胚期には頭部オーガナイザー領域に発現していた。そこで既知のオーガナイザー遺伝子 *chordin* と *XHex* の発現パターンと比較検討した。胚を中軸に沿って2分割して片半球を *chordin* あるいは *XHex* で、他の半球を検討すべき遺伝子で全胚 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、オーガナイザー領域の中において *crescent*, P7E4, P8F7, P17F11 はそれぞれ異なる領域で発現していることが判明した。

このように我々が試みた体系的検索はオーガナイザー特異的遺伝子を単離する有効な手段であること、および頭部オーガナイザー領域が種々の遺伝子の発現によりさらに幾つかの領域に分けられることが示された。(Shibata et al., 2000)

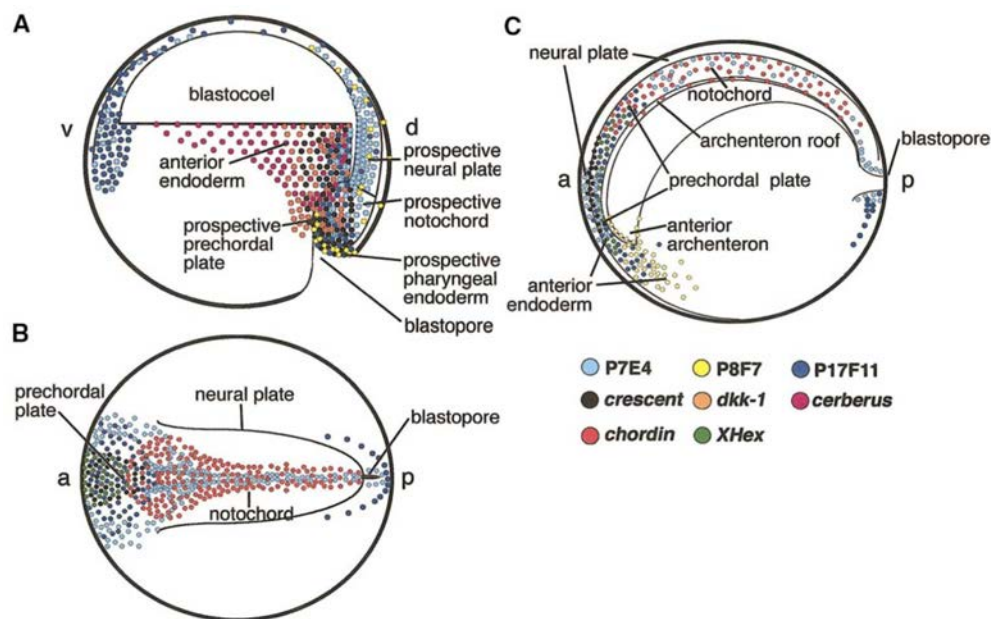


図 オーガナイザー領域に発現する新規遺伝子P7E4, P8F7, P17F11, の発現領域の模式図。*crescent*, *dkk-1*, *cerberus*, *chordin*, *XHex*, との比較。(A) 原腸胚期の矢状面。(B) 神経胚の背面図。(C) 神経胚期の矢状面。a, 前方；d, 背側；p, 後方；v, 腹側。(Shibata et al., 2001)

iii) 脊索特異的遺伝子XPA26の発現パターンの解析（日笠）

ヒトの培養細胞でp53により発現誘導される遺伝子の一つである核蛋白質PA26のオーソログ遺伝子 (XPA26と命名) がXlim-1/3mによるアニマルキャップにおいて発現誘導されることを見出した（前述）。そこでXPA26の発生過程での発現変化をノーザンハイブリダイゼーションと全胚in situハイブリダイゼーションにより検討した。XPA26は母性因子として発現していたが、初期原腸胚のオーガナイザーでの特異的な発現は認められなかった。しかし前期神経胚期からは形成しつつある脊索の前方部での発現が認められ出し、それ以降は脊索に非常に特異的に発現することが明らかとなった。したがってXPA26は脊索の分子マーカーとして非常に有用であることがわかり、また機能的には脊索の分化との関連が注目される。(Hikasa et al., 2001)。

iv) *crescent*の発現パターンと発現調節機構の解析（柴田）

AEMライブラリーの体系的検索で見出された*crescent*について全胚in situハイブ

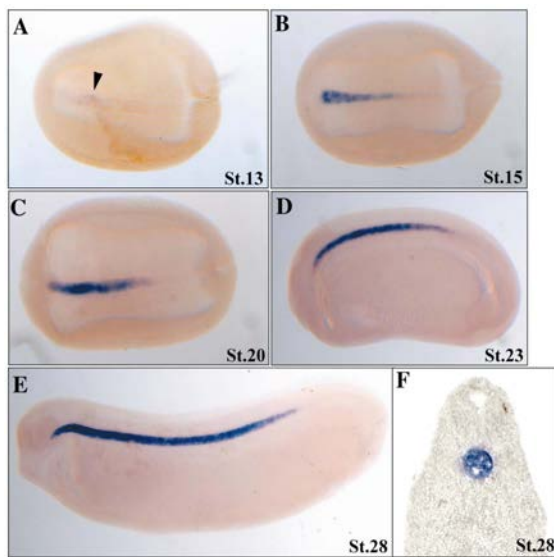


図 XPA26の脊索特異的発現パターン。(A) 初期神経胚。矢尻、形成過程の脊索前方での発現。(B) 中期神経胚。(C) 後期神経胚。背面視、左が前方 (A-C)。(D) 神経管胚期。(E) 尾芽胚期。側面視、左が前方 (D,E)。(F) Eの横断切片。全胚in situハイブリダイゼーション法により発現を検出した。(Hikasa et al., 2001)

リダイゼーションで種々の発生段階での発現パターンを検討した結果、*crescent*は初期原腸胚のオーガナイザー領域に特異的に発現しており、発生が進行するにしたがい次第に頭部オーガナイザーに局限することが判明した。次いで*crescent*の発現調節に関してアニマルキャップを用いて検討したところ、転写因子Siamois, Xlim-1, Ldb1により協調的に発現が活性化されることを見出した。しかし中胚葉化因子アクチビンで処理したアニマルキャップでは発現上昇は認められなかった。Siamoisは背側化因子Wntの下流遺伝子、Xlim-1はアクチビン/Nodalの下流遺伝子であることより、*crescent*遺伝子はWntとアクチビン/Nodalの両方のシグナルによって活性化されることが示唆された (Shibata et al., 2000)。

v) 密着結合分子Claudinの発現パターン解析：（藤田^ま、伊藤、平良^す）

頭部オーガナイザーcDNAライブラリーのEST解析（前述）よりマウスの密着結合分子Claudinと相同性を有するクローンが見出された。上皮組織の密着結合分子の発生過程における発現様式に関してこれまでほとんど報告がないことより、胚葉の上皮組織の発生過程を解析する上で有用な遺伝子となることが期待された。そこでまず得られたcDNAクローンの構造解析を行った。当初はClaudinと類似のクラスターは4個であったがその後のcDNA全長配列の解析により3クラスターであるこ

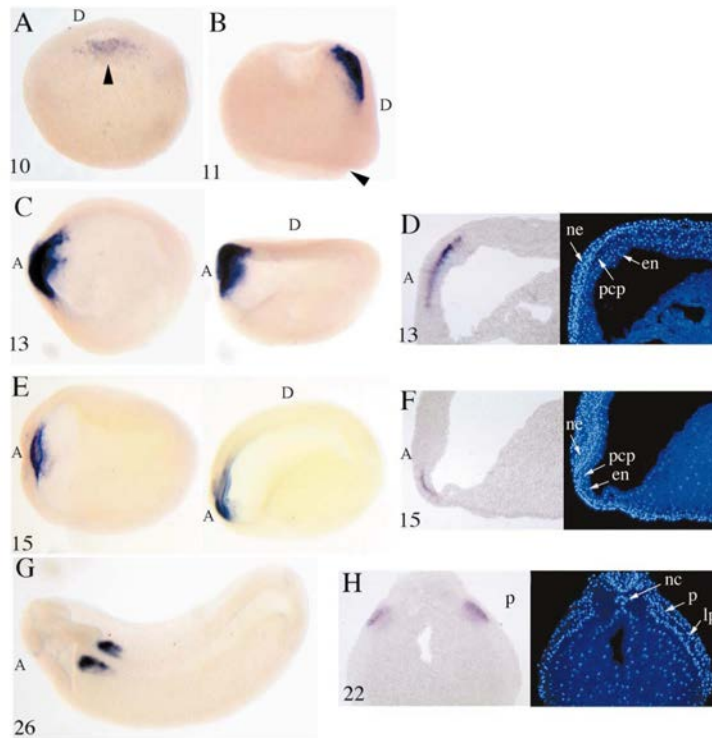


図 頭部オーガナイザーでのcrescentの発現。(A) 原腸胚。植物極視。(B) 中期原腸胚。側面視。矢尻、原口。(C) 初期神経胚。背面視(左パネル)。側面視(右パネル)(D) 初期神経胚(C)の矢状断切片。DAPI核染色(右パネル)。(E) 中期神経胚。背面視(左パネル)。側面視(右パネル)。(F) 初期神経胚(E)の矢状断切片。DAPI核染色(右パネル)。(G) 尾芽胚。前腎にシグナルが見られる。(H) 尾芽胚(G)の矢状断切片。DAPI核染色(右パネル)。A,前方；D,背側；P,後方；V,腹側；en,内胚葉；lp,側板；ne,神経外胚葉；pcp,脊索前板。数字はNieuwkoop/Fabarによる発生段階。(Shibata et al., 2000)

とがわかった。それらはマウスのClaudinファミリー (Claudin 1-18) との比較によりClaudin 4に類似の2遺伝子をClaudin 4L1とClaudin 4L2と命名し、Claudin 7に類似の遺伝子をClaudin 7L1と命名した。

全胚in situハイブリダイゼーション法を用いて各遺伝子の発現パターンを比較検討した。その結果、初期原腸胚期では3遺伝子共に外胚葉と中胚葉に発現するが、原腸陥入が進行すると共に外胚葉の上皮層と内胚葉の原腸蓋に発現が収束した。神経胚期では、*claudin 4L1*, *claudin 4L2*は神経溝に、*claudin 7L1*は表皮に発現し、尾芽胚期ではいずれも腮弓、耳胞、表皮感覚層に発現するが*claudin 4L1*, *claudin 4L2*は前腎に、*claudin 7L1*は表皮上皮層に発現する。このように、これらの遺伝子は細胞運動を伴う組織に主として発現していることが示された (Fujita et al., 2002)。

vi) XFGFRL1のクローニングと発現解析 (林、伊藤；神戸理研の阿形博士との共同研究)

プラナリアの頭部に発現する遺伝子Ndkは胴部での脳の形成を押さえる役割があ

ることが示された（理研、阿形グループの結果）。Ndkは哺乳動物のFGFレセプター様蛋白質 (FGFR-like protein 1, FGFR1) のオーソログであるが、FGFR1の機能に関しては報告されていなかった。そこでNdkをアフリカツメガエル胚に発現させ機能解析を行ったところ、中胚葉遺伝子Xbraの発現を阻害すること、またアニマルキャップでFGF2によるXbraの発現誘導を阻害することを見出した。これらの結果はNdk/FGFR1はFGFシグナルを修飾することでプラナリアの脳形成を頭部に限局させていると考えられる (Cebria et al., 2002)。

そこで脊椎動物の発生におけるFGFR1の役割を検討するために、またプラナリアと同様な頭部形成期機構が進化的に保存されているか否かを検討するために、アフリカツメガエルのFGFR1オーソログ (XFGFR1/Xndk) を単離した。XFGFR1/Xndkはヒトの遺伝子とはアミノ酸配列レベルで66%が一致しており、プラナリアとは17%が一致していた。RT-PCRと全胚in situハイブリダイゼーションによりXFGFR1/Xndkの詳細な発現パターンの解析を行った。非常に興味深いことにXFGFR1/Xndkは初期神経胚の頭部の内中胚葉領域に局在した発現パターンを示し、プラナリアのNdkの発現と進化的に保存されていることが示唆された (Hayashi et al., 印刷中)。

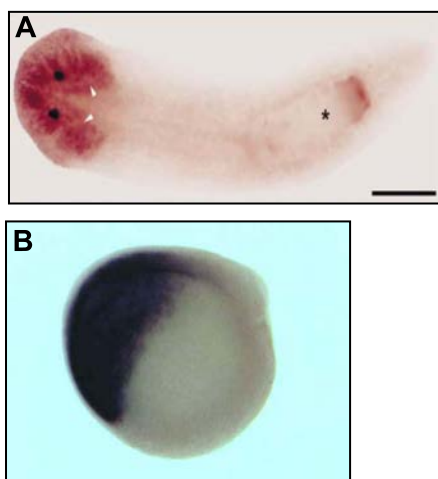


図 プラナリアとアフリカツメガエルにおけるFGFR/Ndk発現の類似性。(A) プラナリアの頭部での発現（白の矢尻）。後方の染色は非特異的なもの。背面視、左が前方。(B)アフリカツメガエル初期神経胚期での前方内中胚葉での発現。左が前方、上が背側。胚はbenzyl-benzoate/benzyl-alcoholで透明化している。(Cebria et al., 2002; Hayashi et al., 2004)

2) オーガナイザーに発現する遺伝子の機能解析

オーガナイザーで重要な役割を担っているLIMホメオボックス遺伝子Xlim-1の標的遺伝子候補のうち、これまでオーガナイザーでの役割に関して検討されていないレセ

プターチロシンキナーゼXror2, メタロプロテアーゼADAMTS1について発現パターン解析と機能解析を行った。また頭部オーガナイザーの体系的スクリーニングで見出されたCrescentの機能解析、Xlim-1の機能ドメインの解析、Xlim-1の制御因子としてXRnf12の機能解析を行った。それら結果は以下の通りである。

i) 後方中軸中胚葉と神経外胚葉の収斂伸長細胞運動におけるレセプターチロシンキナーゼXror2の役割（日笠）

Ror遺伝子ファミリー (Ror1, Ror2) は細胞外ドメインとして免疫グロブリン様ドメイン、frizzled様ドメイン、kringleドメインをもち、細胞内ドメインとしてはチロシンキナーゼドメインをもつ。Rorファミリーの機能としてはこれまでに線虫における遺伝的解析においてror遺伝子がニューロンの細胞移動に関連していること、マウスのRor2遺伝子の破壊により四肢の発生に異常が生じること等が報告されている。しかしRor2を介するシグナル伝達系は不明であり、またRor2の機能ドメインの解析は充分には行われていない。またWntとの結合が予想されるfrizzled様ドメインが存在するが実際にWntとの結合やWntとの機能的関連を示唆する実験的証拠は報告されていない。

そこでオーガナイザーでのXror2の役割を明らかにするため、mRNA顕微注入法を用いて検討し、以下の結果を得た。野生型Xror2および細胞内ドメイン欠失変異体Xror2-TMをアフリカツメガエル胚の腹側あるいは背側の中胚葉領域に過剰発現させ発生過程に対する影響を調べたところ、原腸陥入が著しく阻害されること、また予想外にも野生型および細胞内ドメイン欠失変異体Xror2共に類似の活性を持つことが見出された。Xror2の過剰発現細胞の挙動と細胞分化に関して検討するため、細胞系譜マーカーとして β -ガラクトシダーゼと共発現させて調べたところ、Xror2とXror2-TMは共に細胞の分化形質を変化させないが、原腸陥入を引き起こす細胞運動の1つである収斂伸長運動を阻害することが明らかとなった。

次に野生型Xror2と細胞内ドメイン欠失変異体Xror2-TMとが類似の表現型を示したことより、果たして両者が同じ生物活性を持っているか否かを検討した。そこで

両者を単独あるいは共発現させて表現型を観察したところ、Xror2とXror2-TMの作用は拮抗的ではなく相加的に収斂伸長運動を阻害することが示された。したがって少なくともXror2の収斂伸長運動阻害活性はキナーゼ活性に非依存的と考えられる。この予想外の結論は、しかし線虫のニューロンの細胞移動におけるRorの役割がキナーゼ活性に非依存的であることと良く対応している。

収斂伸長運動とは中軸中胚葉と予定後脳脊髄領域の細胞が中軸に向かって収斂し、それに伴い前後軸に沿って組織全体が伸長する細胞運動であり、その結果予定前脳・中脳領域と予定後脳脊髄領域とが分離されることになる。これまで収斂伸長運動にはWnt4, Wnt5a, Wnt11によるWntの平面細胞極性 (planar cell polarity; PCP) 経路が関わっていること、WntのPCP経路の阻害あるいは過度の活性化により収斂伸長運動が阻害されること、およびWntのPCP経路の因子の1つとしてRhoファミリーGTP結合蛋白質Cdc42が関与していることが報告されている。そこで野生型Xror2とドミナント・ネガティブ型Cdc42を共発現させ、Xror2とWnt経路との関連について検討した。その結果、XRor2による収斂伸長運動の阻害がドミナント・ネガティブ型Cdc42の共発現により回復した。またXror2をXwnt11あるいはWntレセプターXfz7と共発現させると相乗的に作用して収斂伸長運動を阻害し、三者を共発現させるとさらに阻害作用が強まった。これらの結果は、Xror2はWntのPCP経路を活性

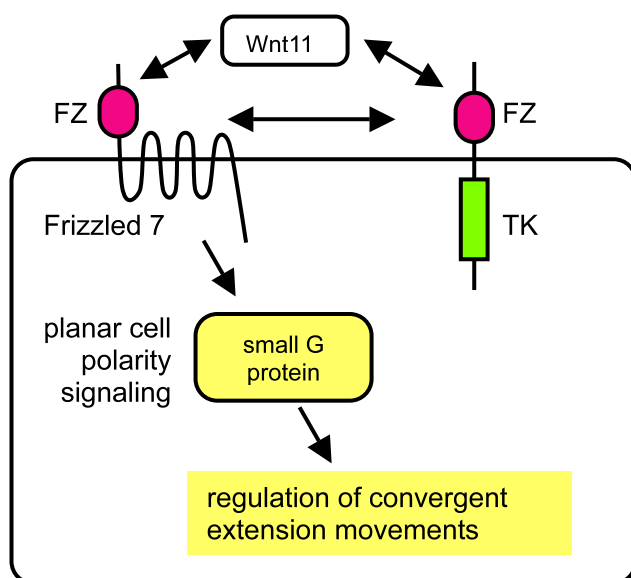


図 Wntの平面細胞極性 (PCP) 経路におけるXror2の役割のモデル図。Xror2はWnt11、Frizzled 7と協調的に作用しアフリカツメガエル胚の収斂伸長運動を阻害することより、三者の機能的関連性が示唆される。またXror2はWnt11と複合体を形成する。Wnt11/Frizzled 7のPCP経路は小型Gタンパク質を介して細胞極性を制御することで収斂伸長運動を調整すると考えられている。FZ、Frizzledドメイン；TK、チロシンキナーゼドメイン。

化していることを示唆する。さらにXror2からFrizzled様ドメインを欠失させたコンストラクトは収斂伸張阻害活性を消失し、また共免疫沈澱法でFLAGタグ付Xror2の細胞外ドメインとMycタグ付Xwnt11が複合体を形成することが示された。この結果はXror2の未知のリガンドはWntであることを示唆している。以上より、収斂伸長運動を行う後方の体軸中胚葉と外胚葉に発現するXror2は、WntのPCP経路を調節することで収斂伸張運動に関わっていることが考えられる (Hikasa et al., 2002)。

ii) 分泌型プロテアーゼXADAMTS1の機能解析 (須賀、日笠)

ADAMTSは線虫からヒトまで存在する遺伝子ファミリーである。ADAMTS1～20はいずれもN末側にメタロプロテアーゼドメインとディスインテグリンドメイン、C末側にトロンボスポンジンモチーフとシステインに富む領域をもつマルチドメイン蛋白質である。アフリカツメガエル・オーソログXADAMTS1はアニマルキャップにおいて活性型Xlim-1により発現が誘導され、またオーガナイザーに発現していることより (前述)、オーガナイザーにおけるXADAMTS1の役割を検討した。

ノーザンハイブリダイゼーションによる解析では、XADAMTS1は母性mRNAとして検出されず、初期原腸胚期から発現が認められた。全胚in situハイブリダイゼーションによる解析では、XADAMTS1は胴部オーガナイザーである背側後方中胚葉に主として発現し、それと隣接する外胚葉にも若干発現していた。

mRNA注入実験による機能解析の結果、背側帯域に過剰発現させると原腸陥入が阻害されること、前方外胚葉に発現させると、胚の最も前方に形成されるセメント腺が拡大することを見出した。背側帯域でのXADAMTS1の過剰発現では、中胚葉転写因子Xbraの発現が阻害されたことより、原腸陥入の阻害は中胚葉形成の阻害によると考えられる。XADAMTS1がXbraの発現を阻害することより、Xbraの発現を誘導するアクチビンとFGFのどちらの経路を阻害しているかをアニマルキャップアッセイにより検討した。その結果、XADAMTS1はFGF2によるXbraの発現誘導を阻害したが、アクチビンによる誘導は阻害しなかった。FGFシグナル伝達経路の阻害位置を検討するため、FGF2あるいは活性化型H-RasによるMAPキナーゼERKの

リン酸化に対するXADAMTS1の阻害効果を検討した。その結果、XADAMTS1はFGF2によるERKのリン酸化を阻害したが、活性化型H-Rasによるリン酸化は阻害しなかった。XADAMTS1は細胞外に分泌されることより、この結果はXADAMTS1が細胞外でFGF経路を阻害する予想と一致する。

XADAMTS1はマルチドメイン蛋白質であることより、このFGFシグナル阻害活性にXADAMTS1のどのドメインが必要かを種々の欠失コンストラクトを作成し検討した。その結果、シグナルペプチドとC末側のシステインに富む領域が必要十分でありメタロプロテアーゼ領域は必要ないことが明かとなった。タグ付きXADAMTS1を用いて細胞局在を検討したところ、予想通り細胞膜に沿って存在することを確認した。これらの結果は、XADAMTS1が細胞外においてFGFシグナルを負に制御する活性をもつことを示している。XADAMTS1がFGFシグナル伝達を阻害することは新しい知見であり、また機能未知であったC末領域にその活性があることは非常に興味深い。

XADAMTS1はマウスADAMTS1とC末側領域がアミノ酸レベルで76%一致していることより、XADAMTS1でみられたFGFシグナル阻害活性は進化的に保存されていることが考えられる。また発生後期の各器官でのXADAMTS1の発現もマウスの場合と良く対応している。FGFは中胚葉誘導、前後軸のパターン形成および各器官の発生に重要なシグナルであることより、ADAMTS1はFGFシグナルを抑制的に制御することでこれらの発生過程に関わっていると考えられる (Suga et al., 投稿準備中)。

iii) frizzledドメインをもつ分泌性因子Crescentの機能解析 (柴田)

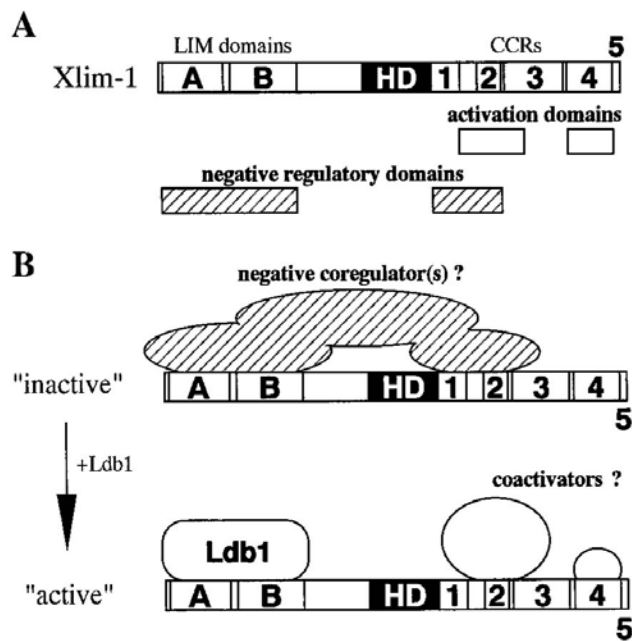
crescentは初期原腸胚のオーガナイザー領域に特異的に発現しており、発生が進行するにしたがい次第に頭部オーガナイザーに局限する (前述)。頭部オーガナイザーには種々の分泌性因子が発現し脳の誘導と形態形成に関与すると考えられているが、これらの中でCrescentの役割は未だ明らかでない。CrescentはFrizzled様ドメインをもつことよりWntとの相互作用が示唆されたため、Wntの作用である後方化

作用と平面細胞極性 (PCP) との関連を検討した。まずタグ付蛋白質をアフリカツメガエル胚に共発現させ共免疫沈降法で物理的相互作用を検討した。その結果、CrescentはPCP経路を活性化するXwnt11, Xwnt5a, Wnt4と強く複合体を形成し、また β -catenin経路を活性化するXwnt8とも複合体を形成することが示された。胚発生に対するCrescentの影響を調べるため背側外胚葉領域に異所発現させたところ、高濃度ではセメント腺を拡大と体軸の短縮が認められたが、低濃度では体軸の短縮のみが認められた。一方、Crescentを背側中胚葉領域に発現させたときは原腸陥入の阻害が認められた。分化マーカーを用いた検討により、原腸陥入の阻害は細胞分化の阻害によるものではなく、細胞の収斂伸張運動の阻害であることが示唆された。

興味深いことにこの収斂伸張運動の阻害作用は外胚葉領域に発現したとき、あるいはアニマルキャップにXBF2を発現させて伸張させたときはXwnt11と拮抗するが、中胚葉領域あるいはアクチビン処理により中胚葉化させたアニマルキャップの伸張運動に対してはWnt11の作用を阻害せず、伸張阻害をさらに増強することが示された。これらの結果よりCrescentは頭部オーガナイザー領域と隣接する中胚葉あるいは神経板の収斂伸張運動に対して異なる制御を行っていることが示唆された (Shibata et al., 投稿中)。

iv) LIMホメオドメイン蛋白質Xlim-1の機能ドメインの解析と相互作用因子の解析 (平谷、望月、栃本)

Xlim-1のホメオドメインの下流領域 (239個のアミノ酸残基) を進化的に保存されている5つの領域 (CCR1-CCR5, conserved C-terminal regions 1-5) に分け、それらの役割について2次軸形成能と異種DNA結合ドメインとの融合によるレポーターアッセイにより検討した。その結果、CCR1とCCR2は負の制御ドメインとして、またCCR2とCCR4が転写活性化ドメインとして機能することを明らかにした。さらにCCR2の進化的に保存されている5つのチロシン残基がこの転写活性化機能に必須であることを見出した。CCR2とCCR4が転写活性化補助因子と結合することが予想されたので、既知の代表的転写活性化補助因子CBP, SRC-1, TIF2について検



- 図 Xlim-1の活性制御機構のモデル。
- (A) 機能ドメイン。LIMドメイン、CCR1, CCR2は負の制御ドメインとして、CCR2とCCR4は転写活性化ドメインとして機能する。
- (B) 負の制御ドメインに負の制御因子が結合していると不活性化型であるが、LIMドメインにLdb1が結合すると、負の制御ドメインが外れ、転写活性化共役因子がCCR1とCCR2に結合し、標的遺伝子を活性化する。

討したところ、何れとも結合は認められなかった。したがって他の既知あるいは新規の転写活性化補助因子がXlim-1と相互作用していることが考えられる。(Hiratani et al., 2000)。

v) Xlim-1とLdb1の相互作用における核蛋白質XRnf12の役割（平谷、山本、望月、大森）

LIMホメオドメイン蛋白質 (LIM-HD) の補助因子LIMドメイン結合蛋白質Ldb1はN末側でホモ2量体となりC末側でLIM-HDのLIMドメインと結合するため、Xlim-1とLdb1はエンハンサーに4量体として結合して標的遺伝子の転写活性化を行うと考えられている（下図参照）。しかし複合体形成においてXlim-1とLdb1の蛋白質レベルの量比をどのように制御するのか、あるいはLdb1以外の蛋白質によるXlim-1の活性制御機構としてはどのようなものが存在するか等は未だ十分に解析されていない。そこでLhx3のLIMドメインおよびLdb1と結合することが報告されたRnf12/RLIM (Nat. Genet. 22:394-399) に注目し、アフリカツメガエル・オーソログXRnf12を単離してXlim-1に対する機能解析を行った。その結果、(1) XRnf12はLdb1特異的にユビキチン・リガーゼ活性をもちLdb1のプロテアソーム依存の分解を引き起こ

す、(2) XRnf12が引き起こすLdb1の分解はXlim-1の共存下で阻害される、(3) この阻害にはXlim-1のLIMドメイン領域と、Ldb1のLIMドメイン結合領域が必要である、(4) Ldb1あるいはXRnf12をオーガナイザーで過剰発現させるとオーガナイザー活性を低下させるが、両者を共発現させると相殺されることを見出した。

さらに (4) における作用の特異性を検討するため、原腸胚期においてXlim-1が関与するとされるオーガナイザー遺伝子の発現に対する過剰なLdb1の効果を検討した。その結果、Xlim-1の標的遺伝子と考えられている*goosecoid*, *Xotx2*, *chordin*, *para-axial cadherin*, *cerberus*の発現はLdb1の過剰発現により阻害され、XRnf12との共発現により回復することが示された。なおその他のオーガナイザーに発現する遺伝子では、Ldb1の過剰発現で影響を受けるものと受けないもの、XRnf12との共発現により回復するものとししないものがあった。Ldb1はLIMホメオドメイン蛋白質以外にも種々の転写因子と相互作用することが知られていることより、多くのオーガナイザー遺伝子に様々な影響を与えたものと考えられる。

以上の結果は、Ldb1の過不足がXlim-1のオーガナイザー活性の低下をもたらすこと、およびXlim-1と結合していない過剰のLdb1をXRnf12はユビキチン化して分解させることでXlim-1とLdb1の量比を正常に調節する働きがあることを示唆して

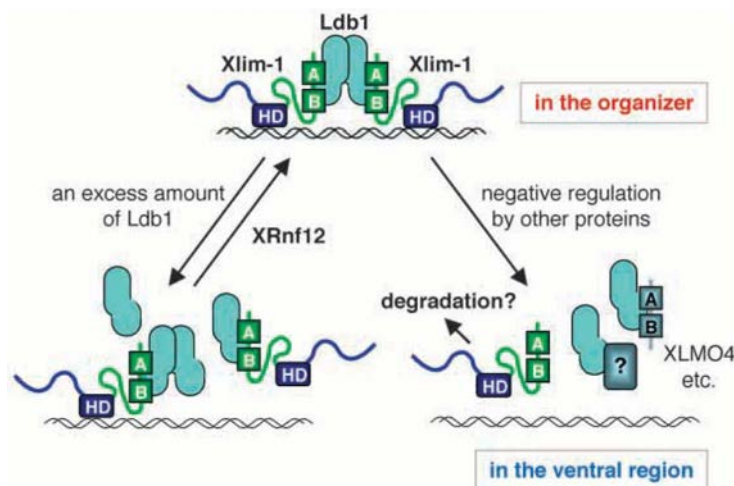


図 RING蛋白質XRnf12の作用機構のモデル。LIMホメオドメイン蛋白質はLdb1と複合体を形成しオーガナイザーにおいて標的遺伝子を活性化する（上図）。XRnf12は遊離のLdb1をユビキチン化し分解を引き起こすが、Xlim-1と結合したLdb1はユビキチン化から免れる（下左図）。これによりXRnf12はXlim-1とLdb1との量比を適切に保つのに役立つ。腹側ではLdb1に結合する他の因子（LMO4など）に

いる。このようなXRnf12の役割は転写因子複合体の構成要素の量比を適切に保つための一般的制御機構の1つであることを予想させる (Hiratani et al., 2003)。

3) オーガナイザー特異的転写因子Xlim-1の標的遺伝子の発現調節機構

i) オーガナイザー特異的ホメオボックス遺伝子goosecoid遺伝子のプロモーター解析とXlim-1とOtx2との相互作用 (望月)

Xlim-1, Ldb1, Otx2は協調的にgoosecoidプロモーターレポーター遺伝子および内在性のgoosecoid遺伝子を活性化する (Dev. Biol. 224, 470-485, 2000)。そこでそれらのタンパク間での相互作用をGSTプルダウンアッセイで検討した。その結果Ldb1はXlim-1のLIMドメインへの結合に加えてホメオドメインとその下流の27個のアミノ酸配列を含む領域 (Xlim1-HD27) にも結合することが示された。Xlim-1とOtx2ではXlim1-HD27領域とOtx2のホメオドメインとその下流の33個のアミノ酸配列 (Otx2-HD33) を含む領域が結合すること、またLdb1とOtx2-HD33が結合することが示された。DNA上での複合体形成を調べるためgoosecoidプロモーターのXlim-1とOtx2の結合領域を含むオリゴDNAをプローブとしてゲルシフトアッセイを行った。その結果、Xlim-1とLdb1のDNA上の複合体形成が認められたが、Xlim-1とOtx2あるいはXlim-1, Ldb1, Otx2の3者を共発現させても明確な複合体形成は認められなかった。しかしXlim-1, Ldb1, Otx2を共発現させた胚抽出物にはOtx2と相互作用する未同定因子の存在が示唆された。この未同定の因子はXlim-1とLdb1との共発現により出現することより、第1の可能性としてGoosecoidであることを予想している。

ii) 頭部誘導因子cerberus遺伝子のプロモーター解析 (山元)

Xlim-1標的遺伝子候補の一つとしてcerberusが見出された (前述)。Cerberusは、形態形成に関わるリガンドのWnt, BMP4, Nodalに結合する分泌性阻害因子であり、アフリカツメガエル胚の腹側に異所発現すると頭部を誘導することが知られている。したがってこの遺伝子がXlim-1の直接の標的遺伝子であることを明らかにすることは頭部オーガナイザーにおける遺伝子カスケードを明らかにする上で重要である。

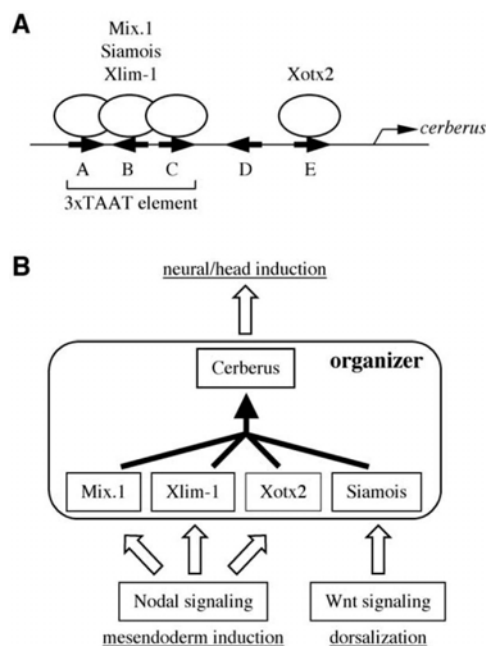
そこで*cerberus*ゲノム遺伝子の1928 bpの転写プロモーター領域にルシフェラーゼをつないだレポーター遺伝子 (-1938*cer*/Luc) を作成しその欠失変異体と点変異体コンストラクトを用いて、Xlim-1に対する反応性および他の転写因子との協調性、中胚葉誘導因子Nodalの反応領域に関して検討した。その結果、(1) 415 bpのプロモーター領域 (-415*cer*/Luc) はXlim-1/3mによる活性化、および胚の背側での特異的発現に十分な領域であること、(2) -219/-116領域の欠失、および-141/-118に存在する3つのTAATエレメント (*TAATGGATTCAATTATGTTAATTT*; 3 TAATエレメントと命名) の点変異により、Xlim-1/3mおよび胚の背側での発現が消失すること、(3) Xlim-1/3mの*in vitro*転写翻訳産物とTAAT部位A, B, Cを含むオリゴDNAとのゲルシフトアッセイによりXlim-1/3mは主として部位A, Bに結合すること、が明らかとなった。これらの結果は*cerberus*遺伝子がXlim-1の直接の標的遺伝子であることを強く支持している。

しかし野生型Xlim-1の活性化補助因子として見出されたLIMドメイン結合蛋白質Ldb1は*goosecoid*レポーター遺伝子を活性化するが (Mochizuki et al., 2000)、予想外にもXlim-1とLdb1とは*cerberus*レポーター遺伝子を協調的に活性化しなかった。それに対し、オーガナイザー特異的ホメオドメイン蛋白質Otx2とSiamoisがXlim-1と協調的に作用してレポーター遺伝子を活性化し、中胚葉全域に発現するホメオドメイン蛋白質Mix.1がSiamoisとXlim-1の協調性をさらに増強することを見出した。このような協調的活性化はアニマルキャップの内在性*cerberus*遺伝子の発現に対しても認められた。さらにXlim-1, Siamois, Mix.1は複合体を形成し3×TAATエレメントに結合することがゲルシフトアッセイにより示された。また興味深いことに、これら三者の協調的作用と複合体形成はXlim-1のLIMドメインに点変異を導入すると消失した。従ってこれらの転写因子はLIMドメインを介した協調的相互作用により*cerberus*の発現を調節していることが示唆された。

以上の結果は、オーガナイザー特異的転写因子Xlim-1, Otx2, Siamoisが汎中胚葉転写因子Mix.1と共に*cerberus*遺伝子の背側内中胚葉での発現を制御し、頭部形成に関わっていることを示唆している。Xlim-1, Otx2, Mix.1は中胚葉誘導因子Nodalによ

り、またSiamoisは背側化因子Wntにより発現誘導を受ける転写因子であることより、オーガナイザー形成に必要とされる両シグナルがこれらの転写因子の発現を介して *cerberus* 遺伝子の発現を引き起こすというオーガナイザーにおける遺伝子カスケードが示された。(Yamamoto et al., 2003)。

図 オーガナイザーにおける誘導連鎖のモデル。



(A) 頭部誘導因子*cerberus*遺伝子のプロモーターへの転写因子の結合の予想図。*cerberus*遺伝子プロモーター上にホメオドメイン結合配列(TAATNN)の部位A-Eが存在する。部位A-C(3×TAATエレメント)にはXlim-1, Siamois, Mix.1が複合体を形成し結合する。部位EにはXotx2が結合する。

(B) 背側中胚葉誘導と神経誘導の連鎖。オーガナイザー(背側中胚葉)はNodalとWntシグナルの協調作用により誘導される。オーガナイザーに発現する転写因子のうちXlim-1, Mix.1, Xotx2はNodalシグナルにより直接誘導され、SiamoisはWntシグナルにより直接誘導される。これらの転写因子は*cerberus*遺伝子プロモーター領域に結合し活性化することで頭部誘導因子の発現を引き起こす。このことより背側中胚葉誘導と頭部誘導を直接つなぐ「遺伝子カスケード」が示唆された。

B) 神経板の初期パターン形成の分子メカニズム

1) 予定脳領域に発現する新規遺伝子の体系的検索

i) ESTsと発現パターンによる検索(高橋、大森、栃本、稲森、高橋^a、伊藤、信賀、長田)

後期原腸胚から初期神経胚の前部神経外胚葉領域(anterior neuroectoderm, ANE)に特異的に発現する遺伝子の体系的検索をESTsの作成と発現パターンの解析により行った。まず後期原腸胚のANEを切り出し、ANE cDNAライブラリーを作成した。AEM cDNAライブラリーの場合と同様に(前述; A-1-ii)、このcDNAライブラリーからハウスキーピング遺伝子のクローンを除くため、尾芽胚胴部より抽出した全RNAを鋳型としてcDNAプローブを作成し、ブランクハイブリダイゼーションを

行った。陽性クローンはハウスキーピング遺伝子あるいは胴部に高発現しているクローンであると考えられるので、陰性クローンから無作為にクローンを単離した。この中に予定脳領域に特異的な遺伝子が含まれることが期待された。

陰性クローンの5'側からの部分塩基配列を決定し、合計1,820クローンの5' ESTsをデータベースXEXTDBに登録した。ESTsのクラスタリングとBLAST検索を行い、全ESTsについて既知遺伝子との配列類似性を基に注釈付け（アノテーション）と機能分類を行った。その結果、制御遺伝子は17%、構造遺伝子（細胞を構成する酵素・細胞骨格などの蛋白質をコードするもの）は38%、その他は25%、未同定は20%であった。

今回検索に用いたライブラリーについて、前部神経板で発現している総遺伝子数に対しての網羅率を概算するために、既知のANE領域発現遺伝子の出現頻度を検討した。その結果、既知の遺伝子67個中38個（57%）が今回の検索結果に含まれていた。遺伝子総数を仮に4万個と仮定し、またANE cDNAライブラリーは全胚ライブラリーに比べANE特異的遺伝子は20倍に濃縮していることを考えると、わずか1,820個のESTs（全胚ライブラリーの約36,000個に相当）を調べることで高率に領域特異的な遺伝子が得られたと考えられる。

発現解析は新規遺伝子候補を含む806クローン（806クラスターに対応）について全胚in situハイブリダイゼーションによる発現パターンの解析を行った。その結果、主として神経組織に発現するクラスターは多数見出され、中でも興味深い領域特異的発現が見られたものは26個（3.2%）であった。しかし、これらの発現パターンで神経板の詳細な運命予定地図に対応するようなものはほとんど見出されなかった。それに対し、脳のパターンニング・センターである中脳後脳境界 (midbrain-hindbrain boundary, MHB) 領域に発現する新規遺伝子としてXHR1が見出された（後述）。また前部神経稜、背腹軸に沿ったパターン形成のシグナリング・センターとなる底板と側方の神経稜（後の蓋板と神経冠）、そして予定網膜領域に発現する遺伝子が多数得られた。これらの結果は、初期神経胚期では未だ詳細な脳の領域化は行われておらず、この時期はオーガナイザーからの誘導により神経外胚葉にこれらのパター

ニング・センターが形成される時期であることを予想させる。

得られたクローンの中から、N3A9 (Scribble-related protein 1, SCR1；神経板に発現)、N3B10 (ヒトp54nrbのオーソログ；神経組織全体に発現)、N30H6 (ヒトSemaphorin 6D isoform 4のオーソログ；オーガナイザーと前方神経板に発現) については全長配列を決定した。その他N33D9 (前部神経板)、N20H12 (ANFと予定神経堤と神経板後方)、N23B9 (ANFと予定神経堤)、N27D4 (前部神経板と原口周辺部)、N31E4 (前部神経板と正中を除く原口周辺部、N23D7 (脊索) などは調べた限りにおいて新規遺伝子である。(Takahashi et al., 投稿準備中)。

ii) 機能に基づく新規遺伝子の検索 (長田、大森、稲森)

神経組織の神経化がどのような内在性因子によって進行するのかは未だ充分には解析されていない。また神経組織が外胚葉に働きかけて神経組織を誘導するhomeogenic inductionは古くより知られている現象であるがその実体は未だ明らかになっていない。したがってこれらのメカニズムを調べることは、神経組織の形成とパターン形成に関する理解を深めるものと期待される。そこで前部神経外胚葉cDNAを用いた発現クローニングを試みた。

プラスミド発現ベクターpCS105に、新たに作成したANEのcDNAを挿入し発現ライブラリーを作成した。このライブラリーをもとに200クローンからなるプールを200組 (A001-A200) 作成した。それらから順次プラスミドを調整し、mRNAを合成した。このmRNAプールを2細胞期の動物極側に微量注入し、胞胚期にアニマルキャップを切り出し、初期尾芽胚期に回収して神経組織の形成の有無を判定した。プールA001-A100に関しては神経組織の形成の有無を汎神経組織マーカーである*nrp1*の発現をRT-PCR法により検討した結果、11プールが陽性を示した。次のA101-A200のプールに関しては全胚in situハイブリダイゼーションによる*nrp1*の検出を試みた。その結果、18プールが*nrp1*陽性となり、そのうち9プールにセメント腺の形成が認められた。*nrp1*の発現パターンには散在型と局在型の2種類があり、異なる機構、例えばcell autonomousかnon-cell autonomousかなどにより*nrp1*の発現誘導がもたら

されていることが考えられた。

次に各陽性プールについてシブセレクション法により、活性を示す単一クローンを同定した。単一クローンで強い神経化作用を示したクローンについて塩基配列を決定した。これらの中には神経化作用をもつことが報告されていた既知の遺伝子XPitx2cなども含まれていたが、これまで神経化活性が示されていないもの、またアフリカツメガエルで未だクローニングされていないものが多数見出された。その中からMAN1のオーソログXMAN1の機能解析を行った（後述 B-2-iii）。

2) 予定脳領域に発現する新規遺伝子の機能解析

i) bHLH-WRPW型転写抑制因子XHR1の中脳後脳境界形成における役割（信賀、伊藤）

XHR1は中脳後脳境界 (MHB) 領域に発現するHES (Hairy/E (spl) ホモログ) 型転写抑制因子をコードする遺伝子である（図参照）。XHR1の発現は初期原腸胚期（ステージ10.5）に汎神経組織マーカー*Sox2*の発現領域の中央付近に認められた。そこで発現領域の位置をさらに検討するため、後方中胚葉（胴部オーガナイザーに相当）のマーカーである*Xbra*, および前脳中脳のマーカーである*Xotx2*との発現領域の比較を行った。その結果、*XHR1*発現領域と*Xbra*の発現領域との間には前後軸に沿って間隙があること、また*XHR1*の発現領域はその前方部のみが*Xotx2*の発現領域と重なっていることが明かとなった。このように原腸胚期の*XHR1*の発現領域は予定中脳後脳領域にほぼ一致しており、すでに原腸胚初期においてMHBの領域化が開始していることが示唆された。さらに*XHR1*の発現開始時期は他のMHBに発現す

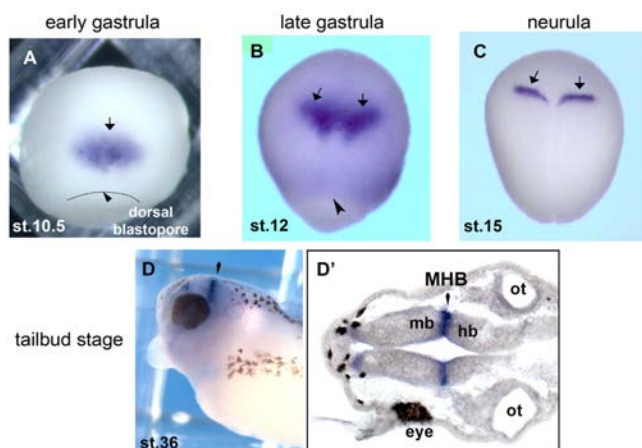


図 全胚in situハイブリダイゼーションによるXHR1の発現パターンの解析。XHR1は予定MHB領域とMHB領域に特異的に発現する。(A)初期原腸胚。(B)後期原腸胚。(C)中期神経胚。(D)尾芽胚。(D')(D)の水平切片。st.と数字、発生段階；矢印、予定MHB領域；矢尻、原口(A,B)またはMHB (D,D')。eye,眼；hb,後脳；mb,中脳；MHB,後脳中脳境界；ot,耳胞。

る遺伝子Pax2, En2の発現開始時期（ステージ13-14）より早期であることより、XHR1はこれらの遺伝子の上流に位置すると予想された。

そこで、XHR1の機能を明らかにする目的で2細胞期動物極側への野生型あるいはドミナント・ネガティブ型XHR1のmRNA顕微注入実験を行った。ドミナント・ネガティブ型としては、転写抑制ドメインを転写活性化ドメインと置き換えたもの (XHR1-VP16), 転写抑制ドメインを欠失させたもの (XHR1- δ WRPW), DNA結合ドメインに変異を入れたもの (mb-XHR1) を作成した。XHR1- δ WRPWとmb-XHR1は内在性XHR1と2量体を形成することで機能を阻害し、本来XHR1により抑制されている遺伝子の抑制を解除することが期待される。それに対し、XHR1-VP16は他の2つのコンストラクトとは異なりXHR1により抑制されている遺伝子を直接活性化させるので、より強い阻害効果が期待される。実験結果は、何れのドミナント・ネガティブ型XHR1も予定MHB領域に発現させるとPax2とEn2の発現が阻害されることが判明した。また期待通りXHR1-VP16が最も強い阻害効果を示し、それに対しXHR1- δ WRPWとmb-XHR1の阻害効果は弱く後のステージではPax2とEn2の発現の回復が認められた。

XHR1-VP16の阻害作用の特異性を調べるため野生型XHR1との共発現実験を行い、XHR1-VP16の作用が野生型XHR1により部分的ではあるがレスキューされることを確認した。逆に野生型XHR1を単独でMHB領域に発現させると頻度は低いがEn2の発現領域が拡大した。しかしMHB領域以外の異所的なEn2の発現は認められなかった。このことはMHBの形成にはXHR1の発現だけでは充分ではないことを示唆しており、XHR1が転写抑制因子であることを考え合わせるとMHBの形成に必要な転写活性化因子の存在を予想させる。なおMHB領域に野生型XHR1を高発現させると予想に反し高頻度でEn2の発現阻害も認められた。しかしXHR1の高発現により汎神経組織マーカーnrp1の発現も阻害されていたことより、XHR1の副作用として神経化阻害作用があること、およびその二次的効果でEn2の発現が阻害されたものと考えられる (Shinga et al., 2001)。

- ii) 予定中脳後脳境界 (MHB) 形成におけるXHR1の標的遺伝子の同定 (服部、高田[○]；基生研上野博士との共同研究)

XHR1がMHB形成に必要であることが示唆されたので (Shinga et al., 2001), MHB形成の遺伝子カスケードを明らかにするためXHR1の標的遺伝子の同定を行った。その目的のためホルモン誘導型の活性化型のドミナント・ネガティブコンストラクト (XHR1-VP16-GR) を作成した。XHR1-VP16-GRはデキサメサゾン (Dex) 添加で核に移行し標的遺伝子を活性化することが期待される。そこでXHR1-VP16-GRをトレーサーのGFPと共に予定MHB領域に発現させ、原腸胚期にDex添加、非添加群をつくり、蛍光実体顕微鏡下で初期神経胚期の予定MHB領域を切除し回収した。両群からRNAを調整しそのcDNAをプローブとして、マクロアレイ化したフィルターに対してディファレンシャル・ハイブリダイゼーションを行った。Dex添加群で発現上昇する遺伝子の中から特に顕著に変化したクローンを10個選別した。それらのクローンが実際にXHR1あるいはXHR1-VP16で発現が変化することを確認した。

標的遺伝子候補の中からbHLH型転写抑制因子ESR1と機能未知のXLCL2 (*Xenopus laevis* cleavage 2) についてさらに検討した。モルフォリーノオリゴによるXHR1のノックダウンを行ったところ、予定MHB領域におけるESR1の異所的な発現が見られ、野生型XHR1の共注入によりその発現が抑制された。一方、XHR1の異所的発現はESR1の正常発現を抑制したことより、XHR1がESR1の発現抑制に必要十分であることが示された。またESR1, XLCL2を過剰発現させるとMHBマーカーであるPax2の発現が抑制されたことからXHR1によるESR1とXLCL2の抑制がMHB形成に必要であると考えられる。また、MHBがニューロン非存在領域であることより、ニューロン分化に関わる*Xngnr1*と*Delta*に対するXHR1-VP16-GRの作用を検討した。その結果、翻訳の阻害剤シクロヘキシミド存在下でDexを作用させると、XHR1-VP16-GRは非常に強く*Xngnr1*と*Delta*を発現誘導することを見出した。以上の結果は、XHR1は*ESR1*, *XLCL2*, *Xngnr1*, *Delta*等を直接抑制することで予定MHBの領域化に関わることを示唆する (Hattori et al., 投稿準備中)。

iii) 核内膜蛋白質XMAN1の神経組織の形成における役割

外胚葉細胞が神経化する機構についてはBMPシグナルの阻害による機構が考えられているが、不明な点も数多く残されている。そこでアフリカツメガエルの発現クローニング法を用いて、ANE cDNAライブラリーから、予定外胚葉組織（アニマル・キャップ）を神経化する因子を探索した（B-1-ii参照）。その結果、XMAN1を同定し、全長cDNAを単離した。XMAN1は膠原病患者の抗核膜抗体により認識される核膜蛋白MAN1遺伝子のオーソログである。ヒトMAN1は核内膜蛋白質であることが報告されているが、その機能および発生過程における役割に関してはほとんど解析されていない。

XMAN1の発生過程での発現パターンをRT-PCRと全胚in situハイブリダイゼーションにより検討した。XMAN1のmRNAは母性mRNAとして存在し、原腸胚初期には外胚葉領域全体に発現しているが、神経胚期には前方神経領域に、尾芽胚期には中枢神経系に局在して発現した。免疫染色の結果、報告されているヒトMAN1と同様にMycタグ標識のXMAN1の核膜への局在が確認された。mRNA顕微注入法による機能解析で、XMAN1はアニマル・キャップにおいて、中胚葉の誘導なしに前方神経マーカーを誘導し、また腹側中胚葉を背側化して二次軸を形成した。XMAN1とBMP経路の関連を検討した結果、XMAN1はアニマル・キャップにおいてBMPの標的遺伝子*Xhox*, *Xmsx-1*, *Xvent1*の発現を抑制し、更にBMP依存的な*Xvent2*レポーターの活性化を抑制した。XMAN1の機能ドメインを調べるため、欠失コンストラクトを用いて検討したところ、2回膜貫通ドメインのC末領域が神経化活性に必要十分であった。またC末領域にはRRM (RNA recognition motif) が存在することを見出し、その領域を欠失させたところ神経化活性が消失した。

以上の結果からXMAN1によるアニマルキャップの神経化機構としてBMPシグナルの阻害が考えられたので、BMPシグナル伝達因子とXMAN1の結合をGSTプルダウンアッセイと共免疫沈降により検討した。その結果、XMAN1のC末領域でBMPシグナル伝達因子のSmad1, 5, 8と結合すること、またSmad1のMH2ドメインがXMAN1と結合することを見出した。一方、アクチビン伝達因子のSmad2, 3と共通

伝達因子Smad4とは強い結合は認められなかった。これらの結果は、XMAN1がBMP応答性Smadと特異的に結合し阻害することで外胚葉を神経化することを示している。

次に発生過程におけるXMAN1の役割を検討するため、アンチセンス・モルフォリーノによる内在性XMAN1の機能の低下実験を行った。その結果、眼を含む前方の神経組織の形成が阻害され、前方神経マーカーの発現領域の縮小が見られた。この表現型はXMAN1 mRNAの共注入により回復した。以上の結果より、核膜蛋白質XMAN1がBMP応答性Smadと結合することによりBMP経路を阻害し、神経化に関与することが明らかとなった。これは、これまで「シグナル伝達の制御」という観点から研究されることがなかった核膜蛋白質にその関わりを示した最初の例である (Osada et al., 2003)。

3) 予定脳領域に発現する遺伝子の発現調節機構：XHR1の予定MHB領域での発現解析とプロモーター解析（伊藤、高橋^あ）

脳の初期パターン形成はオーガナイザーからの作用によって行われると考えられるが、個々の遺伝子に関してどのような情報がプロモーターに集約されることで領域特異的な発現がもたらされるかについての検討はほとんど為されていない。そこで初期原腸胚期に予定MHB領域で発現を開始するXHR1の発現調節機構を解析することでこの問題にアプローチした。まず、神経外胚葉の領域化には後方化因子の関与が考えられることより、FGF, Wnt, レチノイン酸のシグナル伝達を変化させたときのXHR1の発現変化を検討した。その結果、Wntシグナルを活性化させるとXHR1の発現が減少し、逆に阻害すると発現が拡大した。FGFシグナルを阻害する薬剤SU5402や、レチノイン酸合成酵素Raldh2, 分解酵素Cyp26の過剰発現ではXHR1の発現は影響されなかった。またアニマルキャップ・アッセイで、BMP阻害因子nogginで誘導されたXHR1の発現はWnt8により低下した。これらのことから、少なくともWntシグナルがXHR1の発現領域の決定に関与することが示唆された。

次に、XHR1ゲノム遺伝子上で予定MHB領域に特異的な初期エンハンサーならびに

MHB領域に特異的な後期エンハンサーを同定するためプロモーター解析を行った。*XHR1*のゲノム遺伝子のクローニングは、偽4倍体の*X. laevis*ではなく近縁種の*X. tropicalis*を用いた。*tropicalis*は将来的に遺伝学的解析が可能となることが期待されているものである。*tropicalis*のHR1遺伝子(XtHR1)を約26kb長のゲノム断片として単離し、構造を決定した。その結果、XtHR1は3つのエクソンからなり、単離した領域は転写開始点より上流の約12kbとエクソン3の下流約11kbを含んでいた。発現制御領域の同定のため、エクソン3にin-frameでGFPあるいはルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター・コンストラクトを作製した。そのレポーターDNAを*X. laevis*胚に顕微注入したところ、予定MHB領域での限局した発現は認められず、広範囲の発現が認められた。DNA注入では通常染色体に組み込まれないとされており、それが原因で発現抑制がかからない発現となったと考えられた。そこで*X. laevis*の核移植によるトランスジェニック法で検討した。その結果、全長を含むコンストラクトで内在性の*XHR1*の発現パターンをほぼ忠実に再現できることが判明した。このことは初期と後期のエンハンサーが共に約26kbの領域内に存在することを示唆している。

(2) 研究成果の今後期待される効果

発現パターンによる遺伝子検索はNierhsらにより初めてアフリカツメガエル神経胚期cDNAライブラリーを用いて行われ (Gawantka et al., 1998)、その後ゼブラフィッシュでは初期体節形成期のcDNAライブラリーを用いて行われた (Kudoh et al., 2001)。本研究では頭部オーガナイザーによる脳の誘導と脳のパターン形成に焦点を絞り、それらの領域を単離して作成した領域化cDNAライブラリーを用いたのが特徴で、全胚cDNAライブラリーに比べ効率良く目的の遺伝子が単離可能となった。またESTsによる一次スクリーニングを取り入れた点、ファージクローンからのインサートの単離をPCRで行い、一度に多数のサンプルから全胚in situハイブリダイゼーション用のプローブの作成を可能にし、効率化を図った (Shibata et al., 2001)。機能に基づく発現スクリーニングでも同様に領域化ライブラリーを作成したことで、これまで単離されていない新規神経化因子の単離に成功した。

脊椎動物の初期発生で中心的役割を担うオーガナイザーには様々な発生制御因子が発現しており、その形成にはNodal/activinシグナル、FGFシグナル、Wntシグナルが関わり、BMPシグナルが抑制的に関わる。オーガナイザーには種々の特異的転写因子が発現しオーガナイザーの様々な機能を担っている。オーガナイザーの重要な機能の一つが神経誘導と神経組織のパターン形成であり、それに関わる因子としては、BMPシグナルの分泌性阻害因子、およびWntシグナル、FGFシグナル、RAシグナル、Hhシグナルがある。このように、発生の様々な現象に関わる重要なシグナル伝達系のほとんどが初期発生にも関わっており、それらの下流で働く転写因子もホメオドメイン蛋白質、Znフィンガー蛋白質、bHLH蛋白質などほぼ全てのクラスの転写因子が関わっている。このように、オーガナイザーと神経誘導とパターン形成は、発生、細胞分化、細胞運動などにおけるシグナル伝達および転写因子の役割およびこれらの相互作用の研究の重要なモデルとなってきた。このように、研究対象として重要な初期発生段階において、本研究では頭部オーガナイザーと脳の初期発生に焦点を絞り、それらの組織に発現する新規遺伝子の体系的検索と得られた遺伝子の機能解析を行うことで脳の初期発生の分子機構の解明を目指した。本研究の期間内において、機能解析を行った遺伝子は、XHR1, Xror2, Crescent, XMAN1, XADAMTS1, XRnf12, Xlim-1, などであり、また遺伝子カスケードと転写調節ネットワークの解析の一環としてのcerberusとXHR1遺伝子のプロモーター解析を行った。今後さらに得られた遺伝子の詳細な解析を進めることで、脳の初期発生の解明のみならず、後期の組織や器官の発生機構の解析のモデルとなり得る事が期待される。

3.2 胚発生制御遺伝子のマウスにおける機能解析（相沢グループ）

(1) 研究内容及び成果（平成9年12月から平成11年3月まで；2年4ヶ月）

Otx, Emxファミリーの遺伝子は、体幹部でのHox遺伝子群に類似して、前脳・中脳領域の形成に際し入れ子式の発現パターンを示し、その形態形成に深く関わっている可能性が想定される。そこで我々はOtx1, Otx2, Emx1, Emx2欠損マウスを作成し、脳の領域形成におけるその役割を解析してきたが、本プロジェクトでは、(1) Otx2と

Emx2の二重変異胚、および (2) Emx1とEmx2の二重変異胚について解析した。

1) Otx2とEmx2の二重遺伝子破壊による脳の発生異常の解析（相沢、須田）

Otx2/Emx2二重欠損マウスを作製し、終脳形成におけるOtx2遺伝子とEmx2遺伝子との協働機能の解析を試みた。発生後期の胚の組織学的検討より、終脳背側部および間脳領域の欠損が明らかとなり、両者が前脳の形成に協働していることが明らかとなった。そこで次に、発生初期（領域形成期）での分子マーカーを用いた解析を行った結果、9.5日胚を用いた解析では、Wnt1遺伝子発現領域の終脳背側部への拡大、Otx2遺伝子の終脳背側部での発現レベルの低下、En2, Pax5遺伝子の終脳領域における異所的発現の誘導が認められた。間脳マーカーPax6, Wnt7bの発現が欠損し、中脳とisthmusのマーカーFgf8, En2, Pax2, Wnt1の終脳における異所性の発現が顕著に認められた。これらの結果は組織学的所見を裏打ちするものである。さらに、8.5日胚（6体節期）を用いた解析から、Wnt1発現の減少、En2発現の増強が認められ、既にOtx2遺伝子発現のレベルの低下かつ領域の縮小が認められた。脳形態形成の異常はこれよりも早い時期に生じていることが示唆された。間脳領域形成、間脳お中脳の境界形成の分子機構に関しては殆ど知られていなかったが、Emx2とOtx2遺伝子が間脳領域形成のマスター遺伝子として働くことを明らかとした。

2) Emx1とEmx2の二重遺伝子破壊による脳の発生異常の解析（相沢、須田、篠崎）

大脳皮質は7層の層構造をとっているがこの形成機構は未だ充分には明らかにされていない。これまでの知見では、層構造の形成は脳室細胞層で分裂したニューロン前駆細胞が周辺域 (marginal zone；分子層) と下板 (subplate；神経板下) の間に移動することで形成され、その際新しく生まれたニューロン前駆細胞はより外層へと移動し行くことで内側の2番層から6番層へと順次層構造が形成される。このニューロン前駆細胞の移動には周辺域に存在するカハール・レチウス (Cajal-Retzius) 細胞から分泌される細胞外基質蛋白質Reelinが重要な役割を担っている。Emx1とEmx2は大脳皮質に発現するホメオボックス遺伝子であることより、この遺伝子に注目し遺伝子ノックアウト法により大脳皮質の層構造形成機構を解析した。Emx2のノッ

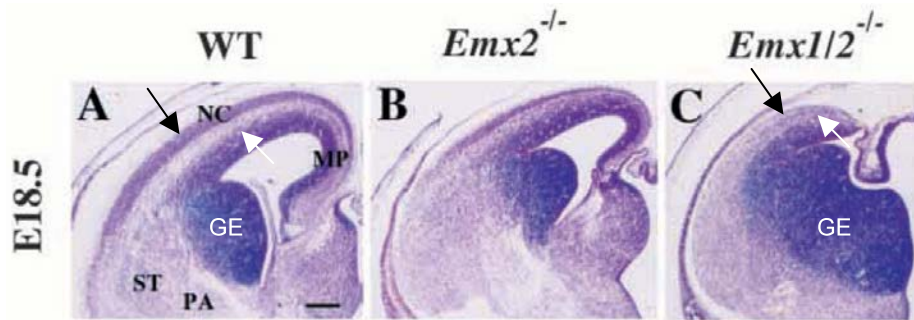


図1 *Emx1*と*Emx2*の二重変異による大脳皮質の異常。野生型（WT）に比べ二重変異体（*Emx1/2*^{-/-}）では大脳皮質（NC）の減少と神経節隆起（GE）の肥大が認められる。

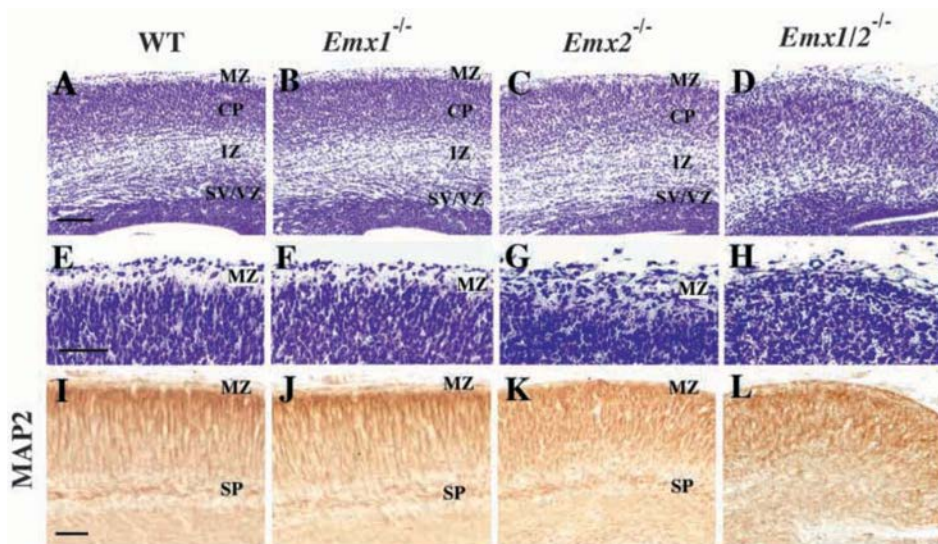


図2 *Emx1*と*Emx2*の二重変異による大脳皮質層構造の異常。野生型（WT）で認められる帯域（MZ, marginal zone）と下板（SP, subplate）が二重変異体（*Emx1/2*^{-/-}）では消失している。（I-L）汎ニューロン・マーカーMAP2の抗体染色。CP, cortical plate ; IZ, intermediate zone ; SV/VZ, subventricular zone/ventricular zone。

クアウト・マウスは皮質の層構造形成に軽度の異常が認められた。カハール・レチウス細胞は胚発生後期で消失しており、より後期に形成されたニューロンによる層形成が異常となっていた。*Emx1*のノックアウトでは軽微の異常しか認められなかった。そこで*Emx1*と*Emx2*の機能的重複が予想されたので、両遺伝子の二重変異体を作成したところ、より重度の異常が認められ、大脳皮質層の厚さが顕著に減少した。しかし細胞分裂の減少や細胞死の増大は認められなかったことより、それらが原因

とは考えにくい。それに対し、神経節隆起 (ganglionic eminence；大脳基底核原基) からの細胞移動に障害が認められた。この原因は、移植実験の結果、ニューロン側ではなく大脳皮質側の異常によるものであった。そして二重変異体の最も顕著な特徴としては、カハール・レチウス細胞と下板ニューロンが消失していることである。これらの結果は、大脳皮質の層構築に従来重要とされていたカハール・レチウス細胞、下板ニューロンの形成ならびに神経節隆起からのニューロンの移動に、Emx1とEmx2遺伝子の特異的相互作用が働いていることを示している。

(2) 研究成果の今後期待される効果

神経管が形成された後、前脳と中脳はプロソメア単位で発生が進行すると考えられている。その過程で発現する遺伝子は種々単離されているが、それらの役割は未だ充分には解析されておらず、その分子メカニズムは充分には明らかになっていない。従って、前脳と中脳領域に非常に早期から発現を開始するOtx1と2、Emx1と2に関して遺伝子ノックアウト法で解析することは非常に重要である。特にこれらの遺伝子は機能的に重複しており、二重や多重変異による解析が必要である。これらの解析を通じて脊椎動物の脳の発生の特徴がさらに明らかにされることが期待される。

3.3 マウスにおけるオーガナイザーと脳に発現する遺伝子の検索と領域特異的遺伝子の発現様式の解析 (木村グループ)

(1) 研究内容及び成果

脳の初期発生過程を解明するため、マウスを用いて予定脳領域およびオーガナイザーに領域特異的に発現する遺伝子の同定と発現様式の解析を行った。

1) アフリカツメガエルで見出された新規遺伝子のマウス・オーソログの単離

平良グループがアフリカツメガエルから単離した脳の領域特異的に発現する遺伝子のマウス・オーソログの単離を試みた。

i) XHR1のマウス・オーソログの単離の試み

XHR1と他種生物における類似遺伝子（ゼブラフィッシュのher5等）の間での相同性を調べて、種間で保存されている可能性が高いアミノ酸配列を基に数種の縮重プライマー (degenerate primers) を作成した。次いで10.5-11.5dpcのマウス胚の頭部からmRNAを調製し、そのcDNAを調整した。それと購入したヒト胎児脳cDNAライブラリーを鋳型として縮重プライマーを用いてPCRを行い、増幅された数種のバンドをクローニングし塩基配列を決定した。その結果、マウスcDNAからは既知の遺伝子でXHR1と同じbHLH-WRPWファミリーに属するHES3とStra13が得られたが、それよりXHR1に近縁の遺伝子は見出されなかった。またヒト胎児脳cDNAライブラリーからはやはりbHLH-WRPWのHRT3を得たのみであった。またヒトの全ゲノムのドラフト配列およびESTsに対してXHR1の配列でBlast検索を行ったが、オーソログの存在は見出されなかった。以上の結果より、XHR1のオーソログが哺乳類に存在しないことが示唆される。

MHB領域は一次ニューロン（神経板に発生するニューロン）を後脳と中脳とに分かつニューロン非存在の境界領域となっていることが示唆されている。Gelingら (Development 130, 1591-1604, 2003) の報告により、ゼブラフィッシュのher5 (XHR1のホモログ) はMHBでのニューロン形成に対して阻害的に働くこと、また平良グループによる結果（上記3.1(1)B-2-ii参照）ではXHR1がやはりニューロン関連遺伝子の発現を抑えることが示されている。しかし哺乳類発生過程では一次ニューロンは分化せず、全てのニューロンは脳室細胞層 (ventricular zone; ependymal layer) の神経幹細胞から分化するとされている。従って哺乳類では神経胚早期でのMHB形成でニューロン非存在領域の形成が必要ないことより、進化の過程でXHR1に相当する遺伝子の機能変化あるいは喪失が生じたことが考えられる。この予想はXHR1のオーソログが哺乳類に存在しないことを支持している。

ii) Crescentのマウス・オーソログの単離の試み

sFRPファミリー (secreted Frizzled-related protein family) に属するCrescentはニワ

トリの発生初期の胚盤葉前端の半月領域に発現している遺伝子として単離され、我々は発現パターン・スクリーニングでそのアフリカツメガエル・オーソログを単離した（上記、3.1(1)A-1-iv参照）。そこで両遺伝子の保存されているアミノ酸配列を基に縮重プライマーを作成し、マウス初期胚cDNAを鋳型としてPCRを行ったが、既知のsFRPしか単離できなかった。最近、sFRP5が頭部オーガナイザー領域に発現していること、sFRPファミリーの他のメンバーと異なりCrescentと同様にNetrin様ドメインを持たないことが報告された (Finley et al., Gene Expr. Patterns 3, 681-684, 2003)。sFRP5はアミノ酸配列ではCrescentとそれほど近縁ではないが、発現領域が似ていること、Netrin様ドメインを持たないことより、機能的にcrescentに対応する遺伝子と考えられる。

以上のように、アフリカツメガエルで見出された遺伝子*XHR1*と*crescent*には明確なマウス・オーソログが無いことが強く示唆された。これらの遺伝子はそれぞれbHLH-WRPWファミリーとsFRPファミリーに属するが、これらのファミリーは、例えばホメオドメイン蛋白質や多くの細胞内シグナル伝達因子などに比べ種間での変化が大きいことが知られている。このことは発生様式の違いに起因する遺伝子の必要性の有無が考えられる。例えば、(1) 短期間に発生を進行させ比較的初期に孵化して即座に行動する両生類や魚類では一次ニューロンは必要であるが、哺乳類のように発生初期の段階で行動する必要のない生物では一次ニューロンの形成は必要ないこと、(2) 原腸陥入様式は魚類、両生類、鳥類、哺乳類でそれぞれ大きく異なること、(3) 魚類、両生類、鳥類は卵黄を多量にもつが哺乳類はもたないこと、など基本的体制は同じであるが系統間には大きな違いが少なからず存在する。したがって系統間で変化が大きい遺伝子ファミリーかこれらの発生様式の違いをもたらしていることが想像される。

なお、*XHR1*と*crescent*のオーソログのスクリーニングの過程で低分子G蛋白質ARL6遺伝子の断片が単離された。それについては以下 (4) で述べる。

2) インシュレーターを用いた遺伝子導入方法の開発

領域特異的な遺伝子の発現制御機構の解析には、通常プロモーター領域をレポーター遺伝子に繋いだコンストラクトを胚に導入して解析する方法がとられている。しかし導入したレポーター・コンストラクトが挿入されたゲノム領域により影響を受ける場合があり、それをポジションエフェクトという。このポジションエフェクトを排除できれば発現制御に関わるシスエレメントの同定が容易になることが期待される。そこでインシュレーター（隣接する遺伝子間のエンハンサーとサイレンサーの相互作用を解消するDNA配列）をレポーター・コンストラクトの両端に挿入しその効果を検討した。不偏的 (ubiquitous) プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子をレポーターにウニのゲノム中に見出されたインシュレーターを両端に付けたコンストラクトを作成した。このコンストラクトをマウス胚にDNA注入しマウスの胚盤胞における発現を検討した結果、インシュレーターを持たないコンストラクトに比べ効率良くルシフェラーゼの発現が観察された。この結果は、インシュレーターによりポジションエフェクトが解消したことを示唆した。次いで胎仔期におけるインシュレーターの効果を検討した。その結果、胎仔期においては導入遺伝子の発現に関して、インシュレーターの効果のみられた個体も存在したが、胚盤胞期において観察されたような顕著な効果は認められなかった。この結果はウニ由来のインシュレーターは胚盤胞期と胎仔期においてはその効果が異なることが予想され、インシュレーターの利用にはさらに検討が必要である。

3) アフリカツメガエル遺伝子*cerberus*プロモーターのマウス胚での解析

脳の初期発生の分子メカニズムをアフリカツメガエルとマウスで解析するためには、その進化的保存性を検討する必要がある。平良グループによりアフリカツメガエルで解析された*cerberus*遺伝子のマウス・オーソログ*cerberus-like (cer-L)* は頭部オーガナイザーの前方内蔵内胚葉 (anterior visceral endoderm, AVE) に発現している。そこで頭部オーガナイザーでの発現調節機構の進化的保存性を明らかにするため、アフリカツメガエル胚を用いて同定された*cerberus*遺伝子の頭部オーガナイザー領域特異的発現

に必要なシスエレメントがマウス胚でも機能するか否かを検討した。*cerberus*遺伝子の転写調節領域（転写開始点を含む5'上流1938 bp）の下流にeGFPを繋いだ-1938cer/eGFPを作成した。このコンストラクトをマウス1細胞期受精卵の前核にいんじゅくしょん注入後、仮親マウスの卵管に移植し、6.5, 7.5, 8.5 dpcにおいて子宮から胚を回収して、トランスジェニック胚におけるeGFPの発現様式を調べたが、発現は検出できなかった。-1938cer/eGFPはイントロンを持たないことより、イントロンを持ち β -ガラクトシダーゼ (β -gal) をレポーターとするベクターに入れ換えた-1938cer/galを作成し、同様な実験を行ったがやはり発現は認められなかった。-1938cer/eGFPをゼブラフィッシュ胚に注入した場合は頭部オーガナイザー領域での発現が認められたことより（現、国立遺伝研、川上浩一博士との共同研究）、哺乳類は両生類と魚類での*cerberus*の発現制御機構と異なっていることが示唆された。

4) マウスのノードに発現する低分子G蛋白質ARL6遺伝子の発現解析（高田達、高田桂、木村、大森；神戸理研の佐々木博士との共同研究）

発生初期 (E10.5) の頭部で、蛋白質の膜輸送に関係すると考えられる低分子G蛋白質ARL6遺伝子が発現していることを見出した。そこで発生に伴う発現変化を解析したところ、E6.5では発現が認められなかったが、興味深いことにE7.5でノードおよびその周囲に局在した発現が認められた。E8.5では、主に神経管で発現していた。ノードでの発現をFoxA2 (HNF3 β) との比較、およびARL6の染色胚の切片による観察により、ARL6はノードから陥入する細胞で発現しており、陥入後に発現が減少することが明かとなった (Takada et al., 投稿準備中)。

この遺伝子の構造と発現パターンの進化的保存性を調べるため、ARL6のアミノ酸配列を用いてアフリカツメガエルのESTデータベースを検索した結果、アミノ酸配列でマウスと89%の一致率のクローンを見出した。そこでPCRでアフリカツメガエルのオーソログXARL6を単離し、発現解析と機能解析を行った。しかし、全胚in situハイブリダイゼーションでは特異的なシグナルは得られず、またXARL6 mRNAを顕微注入した胚では特異的な表現型は得られなかった。発現が得られなかったことに関して

は、プローブとして領域の塩基配列の特性の問題の検討、他のARL6のオーソログの存在の可能性、などの検討が必要である。過剰発現で表現型が得られなかったことは内在性蛋白質が既に過剰量存在していることが考えられるので、ドミナント・ネガティブ型コンストラクト (T31N, GDP結合型) を用いた機能阻害実験を行う必要がある。

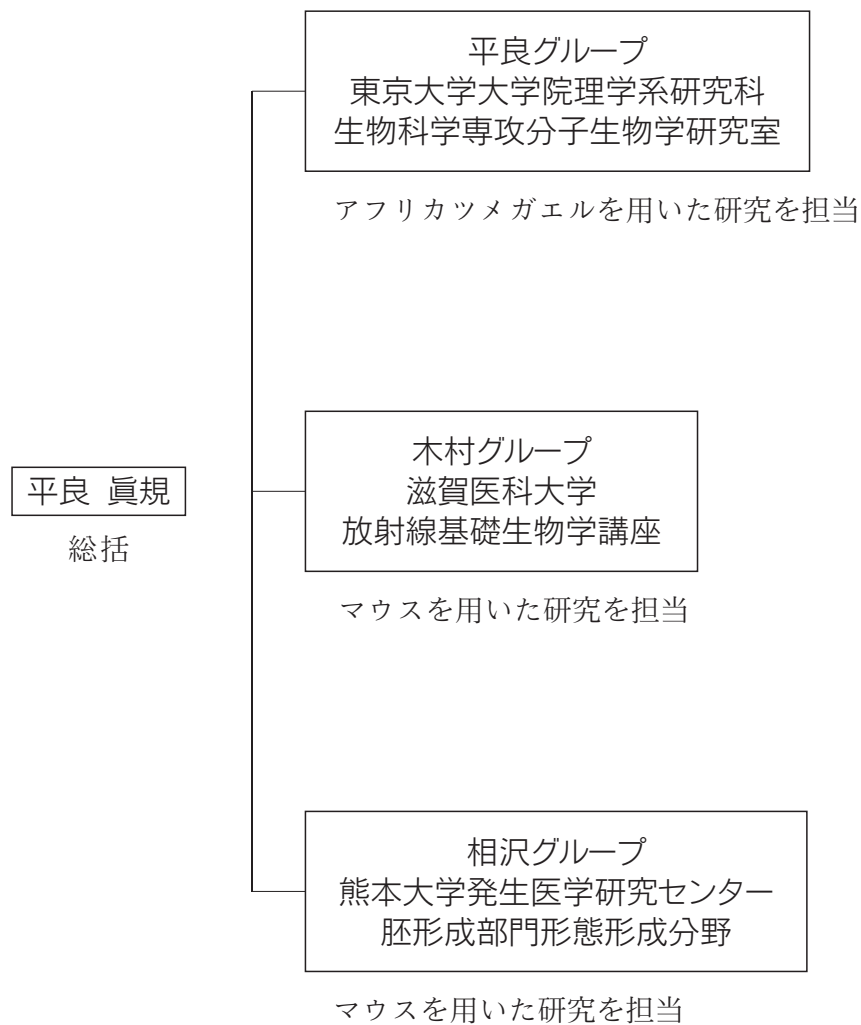
(2) 研究成果の今後期待される効果

アフリカツメガエルで新規遺伝子を同定し、そのマウス・オーソログを単離して解析するという当初の目標は、予想外にも*XHR1*と*crescent*にとっては適用できないことが判明した。本プロジェクトを開始した当時と比較し現在は様々な生物でのESTsが充実してきており、全ゲノム配列が明らかになった生物も数多く存在する。従ってオーソログの単離はまずはESTsとゲノム配列に対してBlast検索を行いことで遺伝子の存在の有無を検討する必要がある。ARL6はそのような方法でマウスとアフリカツメガエルで単離することができた例となった。

プロモーター解析におけるインシュレーターの利用は部分的には効果があったことより、インシュレーターの種類を検討するなどで改良すれば実用的なものになることが期待される。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

① 研究グループ名：平良グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
平良 眞規	東京大学	助教授	全体の総括	平成10.12～平成15.11
長田 真一	科学技術振興事業団	CREST研究員	脳特異的遺伝子の機能解析	平成11. 9～平成15. 6
柴田 幹士	科学技術振興事業団	大学院生 CREST研究員	頭部オーガナイザー 特異的遺伝子の解析	平成10.12～平成13.3 平成13.4～平成15.11
伊藤 万里	科学技術振興事業団	CREST 技術員	脳特異的遺伝子の 発現制御機構の解析	平成11. 4～平成15.11
大森 慎也	科学技術振興事業団	研究補助員	脳特異的遺伝子の 機能解析	平成11. 4～平成15.11
稲森 雅子	科学技術振興事業団	研究補助員	脳特異的遺伝子の 検索	平成12. 5～平成14. 3
高橋 飛鳥	科学技術振興事業団	研究補助員	脳特異的遺伝子の 発現解析	平成14. 5～平成15.11
藤田 三恵	科学技術振興事業団	チーム事務員	会計事務	平成11. 1～平成12. 3
菊地 薫	科学技術振興事業団	チーム事務員	会計事務	平成12. 5～平成15.11
信賀 順	科学技術振興事業団 東京大学	研究補助員 大学院生	脳特異的遺伝子の 検索と機能解析	平成10.12～平成13. 3
日笠 弘基	科学技術振興事業団 東京大学	研究補助員 大学院生	Xlim-1の新規標的 遺伝子の機能解析	平成10.12～平成13. 6
望月 俊昭	科学技術振興事業団 東京大学	研究補助員 大学院生	新規遺伝子の機能解 析とプロモータ解析	平成10.12～平成13. 3
平谷伊智朗	科学技術振興事業団 東京大学	研究補助員 大学院生 学振研究員	Xlim-1の活性制御 機構の解析	平成12.4～平成14.3 平成14.3～平成15.6

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
山元 進司	科学技術振興事業団 東京大学	研究補助員 大学院生	新規遺伝子の機能解析とプロモータ解析	平成12. 4～ 平成15. 3
高橋 範行	科学技術振興事業団 東京大学	研究補助員 大学院生	脳特異的遺伝子の 検索と機能解析	平成13. 4～ 平成15.11
須賀 晶子	東京大学	大学院生	オーガナイザー遺伝子の機能解析	平成13. 4～ 平成15.11
今中 康介	東京大学	大学院生	頭部オーガナイザー 遺伝子の解析	平成15. 4～ 平成15.11
呉屋 夕季	東京大学	大学院生	頭部形成関連遺伝子の 解析	平成15. 4～ 平成15.11
高田 仁実	東京大学	大学院生	脳の領域化機構の 解析	平成15. 4～ 平成15.11
儘田 博志	科学技術振興事業団 東京大学	研究補助員 研究生	脳特異的遺伝子の 機能解析	平成15. 4～ 平成15.11
平良珠美子	東京大学	教務補佐員	新規遺伝子の発現と 機能解析	平成10.12～ 平成15.11

② 研究グループ名：木村グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
木村 博	滋賀医科大学	教授	脳の領域特異的遺伝子の発現様式の解析	平成10.12～ 平成15.11
高田 達之	滋賀医科大学	助教授	同上	平成10.12～ 平成15. 3
高田 桂子	科学技術振興事業団	研究補助員	同上	平成10.12～ 平成15. 3
竹本 忠司	滋賀医科大学	助手	同上	平成15. 4～ 平成15.11

③ 研究グループ名：相沢グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
相沢 慎一	熊本大学	教授	変異マウスの作成	平成10.12～ 平成12. 3
須田 容子	科学技術振興 事業団	CREST研究員	変異マウスの発生学的解析	平成11. 1～ 平成12. 3
黒田 和子	熊本大学	研究補助員	マウス胚の顕微操作 と変異マウスの飼育	平成10.12～ 平成12. 3
古島 謙亮	熊本大学	博士課程2年	変異マウスの作成と 遺伝学的解析	平成10.12～ 平成12. 3
篠崎 恒二	熊本大学	博士課程2年	同上	平成10.12～ 平成12. 3

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成11年 3月	平良、相沢、木村グループ合同会議	東京大学	20名	グループ間の情報交換
平成13年 11月13～1日	平良、木村グループ合同会議	東京大学	15名	グループ間の情報交換
平成15年 3月10～11日	平良、木村グループ合同会議	東京大学	15名	グループ間の情報交換

(2) 招聘した研究者等

氏名（所属・役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Christopher Wright (Department of Cell Biology, Vanderbilt University Medical School; Professor of Cell Biology; バンダービルト大学、教授)	講演および研究打ち合わせ	東京都文京区	2000.8.30-31
Xi He (Division of neuroscience, Children's Hospital, Harvard Medical School, Associate Professor; ハーバード大学、準教授)	講演および研究打ち合わせ	東京都文京区	2001.6.26-27

6. 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表 19件（国内0件、海外19件）

1. Mochizuki, T., Karavanov, A. A., Curtiss, P. E., Ault, K. T., Sugimoto, N., Watabe, T., Shiokawa, K., Jamrich, M., Cho, K. W. Y., Dawid, I. B. and Taira, M. (2000). Xlim-1 and LIM domain binding protein 1 cooperate with various transcription factors in the regulation of the *goosecoid* promoter. **Dev. Biol.** **224**, 470-485.
2. Nakano, H., Amemiya, S., Shiokawa, K. and Taira, M. (2000). RNA interference (RNAi) for the organizer-specific gene *Xlim-1* in *Xenopus* embryos. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **274**, 434-439.
3. Shibata, M., Ono, H., Hikasa, H., Shinga, J. and Taira, M. (2000). *Xenopus crescent* encoding a Frizzled-like domain is expressed in the Spemann organizer and pronephros. **Mech. Dev.** **96**, 243-246.
4. Takada, T., Iida, K., Akasaka, K., Yasue, H., Torii, R., Tsujimoto, G., Taira, M. and Kimura, H. (2000). Evaluation of heterologous insulator function with regard to chromosomal position effect in the mouse blastocyst and fetus. **Mol. Reprod. Dev.** **57**, 232-237.
5. Tsuji, T., Sato, A., Hiratani, I., Taira, M., Saigo, K. and Kojima, T. (2000). Requirements of *Lim1*, a *Drosophila* LIM-homeobox gene, for normal leg and antennal development. **Development** **127**, 4315-4323.
6. Hikasa, H. and Taira, M. (2001). A *Xenopus* homolog of a human *p53*-activated gene, *PA26*, is specifically expressed in the notochord. **Mech. Dev.** **100**, 309-312.
7. Hiratani, I., Mochizuki, T., Tochimoto, N. and Taira, M. (2001). Functional domains of the LIM homeodomain protein Xlim-1 involved in negative regulation, transactivation, and axis formation in *Xenopus* embryos. **Dev. Biol.** **229**, 456-467.
8. Shinga, J., Itoh, M., Shiokawa, K., Taira, S. and Taira, M. (2001). Early patterning of the

- prospective midbrain-hindbrain boundary by the HES-related gene XHR1 in *Xenopus* embryos. *Mech. Dev.* **109**, 225-239.
9. Shibata, M., Itoh, M., Ohmori, S.-y., Shinga, J. and Taira, M. (2001). Systematic screening and expression analysis of the head organizer genes in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* **239**, 241-256.
 10. Kodjabachian, L., Karavanov, A. A., Hikasa, H., Hukriede, N. A., Aoki, T., Taira, M. and Dawid, I. B. (2001). A study of Xlim1 function in the Spemann-Mangold organizer. *Int J Dev Biol* **45**, 209-18.
 11. Suda, Y., Hossain, Z. M., Kobayashi, C., Hatano, O., Yoshida, M., Matsuo, I. and Aizawa, S. (2001). Emx2 directs the development of diencephalon in cooperation with Otx2. *Development* **128**, 2433-50.
 12. Hikasa, H., Shibata, M., Hiratani, I. and Taira, M. (2002). The *Xenopus* receptor tyrosine kinase Xror2 modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development* **129**, 5227-5239.
 13. Fujita, M., Itoh, M., Shibata, M., Taira, S. and Taira, M. (2002). Gene expression pattern analysis of the tight junction protein, Claudin, in the early morphogenesis of *Xenopus* embryos. *Mech. Dev.* **119S**, S27-S30.
 14. Shinozaki, K., Miyagi, T., Yoshida, M., Miyata, T., Ogawa, M., Aizawa, S. and Suda, Y. (2002). Absence of Cajal-Retzius cells and subplate neurons associated with defects of tangential cell migration from ganglionic eminence in Emx1/2 double mutant cerebral cortex. *Development* **129**, 3479-92.
 15. Cebria, F., Kobayashi, C., Umesono, Y., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Itoh, M., Taira, M., Alvarado, A. S. and Agata, K. (2002). FGFR-related gene nou-darake restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature* **419**, 620-4.
 16. Yamamoto, S., Hikasa, H., Ono, H. and Taira, M. (2003). Molecular link in the

- sequential induction of the Spemann organizer: direct activation of the cerberus gene by Xlim-1, Xotx2, Mix.1, and Siamois, immediately downstream from Nodal and Wnt signaling. *Dev. Biol.* **257**, 190-204.
17. Osada, S.-I., Ohmori, S.-y. and Taira, M. (2003). XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in *Xenopus* embryos. *Development* **130**, 1783-1794.
 18. Hiratani, I., Yamamoto, N., Mochizuki, T., Ohmori, S. and Taira, M. (2003). Selective degradation of excess Ldb1 by Rnf12/RLIM confers proper Ldb1 expression levels and Xlim-1/Ldb1 stoichiometry in *Xenopus* organizer functions. *Development* **130**, 4161-4175.
 19. Hayashi, S., Itoh, M., Taira, S., Agata, K. and Taira, M. (2004). Expression patterns of *Xenopus* FGF receptor-like 1/nou-darake in early *Xenopus* development resemble those of planarian nou-darake and *Xenopus* FGF8. *Dev. Dyn.*, in press.

(2) 口頭発表

① 招待、口頭講演10（国内7件、海外3件）

1. Taira, M (University of Tokyo; CREST,JST) "Possible target genes for the LIM homeodomain protein Xlim-1 in the Spemann organizer", Workshop on Molecular Nature of the Gastrula Organizing Center ; 75 years after Spemann and Mangold、(Madrid), 1999. 5. 24
2. 平良眞規^{1,2}、上野直人³、高橋淑子³、(1,東大・院理・生物科学、2,科技団・CREST ; 3,基生研)「発生生物学とゲノムサイエンスとのつきあい方（ワークショップ）」、第32回日本発生生物学会、(神戸)、1999.5.28-30
3. 平良眞規（東大・院理・生物科学、科技団・CREST）「アフリカツメガエルcDNAプロジェクトと発生学（国際動向も含めて）」、第22回日本分子生物学会、(福岡)、1999.12.7-10

4. Taira M. (University of Tokyo; CREST, JST): "Regulation of cerberus and gsc gene expression by organizer-specific homeodomain proteins", 8th International Xenopus Conference, (Colorado, U.S.A.), 2000. 8. 16-20 招待
5. Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST): "Comprehensive screening and expression analysis of genes which are involved in induction and patterning of the brain in Xenopus embryos", International Symposium entitled "New Horizons of Developmental Biology", (Okazaki), 2001 3 23-24 招待
6. 平谷伊智朗、山元直子、大森慎也、平良眞規（東大・院理・生物科学、科技団・CREST）：「RING フィンガー蛋白質XRnf12はLIMホメオドメイン蛋白質制御因子Ldb1のプロテアソーム依存性蛋白質分解を引き起こす」第24回日本分子生物学会（横浜）2001.12.12
7. Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST): "Systematic gene screening for analysis of head induction using Xenopus embryos" Genome-wide approaches for developmental biology, (Okazaki), 2002.2.23 招待
8. Taira M., Hiratani, I., Yamamoto, N., Mochizuki, T., Ohmori, S.-y. (University of Tokyo; CREST, JST): "Functional interactions between Xlim-1, Ldb1, and XRnf12: A possible role for XRnf12 in spatial restriction of the Xlim-1/Ldb1 activity to the Spemann organizer in Xenopus" 9th international Xenopus Conference (Cambridge, United Kingdom) 2002.8.23 招待
9. 長田真一、大森慎也、平良眞規（東大・院理・生物科学、科技団・CREST）：「核膜蛋白質XMAN1によるBMP経路の阻害と神経化」第36回日本発生生物学会（札幌）2003.6.13
10. 平良眞規（東大・院理・生物科学、科技団・CREST）「アフリカツメガエルのゲノムプロジェクトの現状」第74回日本動物学会, サテライトシンポジウム(函館) 2003.9.17 招待講演

②ポスター発表37件（国内34件、海外 3 件）

1. 小野裕史、日笠弘基、平良眞規、(東大・院理・生物科学、科技団・CREST)「オーガナイザー特異的ホメオボックス遺伝子Xlim-1によるCerberusの発現誘導と頭部形成」、第32回日本発生生物学会、(神戸)、1999.5.28-30
2. 高田達之^{1,2}、飯田桂子^{1,2}、赤坂甲治³、安江博⁴、鳥居隆三⁵、平良眞規^{2,6}、辻本豪三⁷、木村博^{1,2}、(1,滋賀医大・放射線基礎；2,科技団・CREST；3,広島大・理・遺伝子；4,畜産試験場；5,滋賀医大・動物実験施設；6,東大・院理・生物科学、7,国立小児医療研究センター・薬理)「マウス受精卵におけるウニ由来インシュレーターの機能」、第32回日本発生生物学会、(神戸)、1999.5.28-30
3. 平谷伊智朗、平良眞規 (東大・院理・生物科学、科技団・CREST)「アフリカツメガエルにおけるオーガナイザー特異的ホメオドメイン蛋白質Xlim-1の機能ドメインの解析」、第22回日本分子生物学会年会、福岡、1999.12.7-10
4. 高田達之^{1,7}、飯田桂子^{1,7}、赤坂甲治²、安江博³、鳥居隆三⁴、辻本豪三⁵、平良眞規^{6,7}、木村博^{1,7}、(1,滋賀医大・放射線基礎；2,広島大・理・遺伝子；3,畜産試験場；4,滋賀医大・動物実験施設；5,国立小児医療研究センター・薬理；6,東大・院理・生物科学、7,科技団・CREST)「マウス胚におけるウニ由来インシュレーターの機能」、第22回日本分子生物学会、(福岡)、1999.12.7-10
5. 須田容子^{1,2}、勝本恵一²、吉田道生²、松尾勲²、相沢慎一^{1,2} (1,CREST, JST;2, 熊本大・医・形態発生)「マウス前脳形態形成におけるOtx, Emx遺伝子の機能」第22回日本分子生物学会 (福岡) 1999.12.9-10
6. 信賀順、平良眞規 (東大・院理・生物科学、科技団・CREST)：「中脳・後脳境界に発現するHES関連蛋白質XHR1の同定と機能解析」第33回日本発生生物学会 (高知) 2000.5.25-27
7. 柴田幹士、平良眞規 (東大・院理・生物科学、科技団・CREST)：「アフリカツメガエル胚における頭部オーガナイザー特異的遺伝子の網羅的検索」第33回日本発生生物学会 (高知) 2000.5.25-27

8. 日笠弘基、平良眞規（東大・院理・生物科学、科技団・CREST）：「シュペーマン・オーガナイザー特異的LIMホメオドメイン蛋白質Xlim-1の標的遺伝子候補ror2の機能解析」第33回日本発生生物学会（高知）2000.5.25-27
9. 須田容子^{1,2}、小林千余子²、松尾勲²、相沢慎一^{1,2}（¹、熊本大・医・形態発生、²、科技団・CREST）：「マウス前脳形態形成におけるOtx, Emx遺伝子の機能」第33回日本発生生物学会（高知）2000.5.25-27
10. 平谷伊智朗、山本直子、大森慎也、平良眞規（東大・院理・生物科学、科技団・CREST）：「アフリカツメガエル初期胚における抑制性LIMドメイン結合蛋白質XRLIM1の単離と機能解析」第23回日本分子生物学会年会（神戸）2000.12.13-16
11. 山元進司、小野裕史、日笠弘基、平良眞規（東大・院理・生物科学、科技団・CREST）：「オーガナイザー特異的ホメオドメイン・タンパク質Xlim-1, Otx2, Siamoisによる頭部誘導因子Cerberusの遺伝子発現制御」第23回日本分子生物学会年会（神戸）2000.12.13-16
12. 望月俊昭、平谷伊智朗、日笠弘基、平良眞規（東大・院理・生物科学、科技団・CREST）：「ホメオドメイン（HD）蛋白質Xlim-1、Otx2と補助因子Ldb1によるオーガナイザー特異的goosecoid遺伝子の発現制御機構の解析」第23回日本分子生物学会年会（神戸）2000.12.13-16
13. Osada, S.-I, Ohmori, S.-y., Inamori, M., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST): Expression cloning of neuralizing factors derived from the anterior neuroectoderm of *Xenopus laevis*. 14th International Congress of Developmental Biology (Kyoto) 2001.7.8-12
14. Hiratani, I., Mochizuki, T., Tochimoto, N., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST): Functional domains of the LIM homeodomain protein Xlim-1 involved in negative regulation, transactivation, and axis formation in *Xenopus* embryos. 14th International Congress of Developmental Biology (Kyoto) 2001.7.8-12
15. Yamamoto, S., Ono, H., Hikasa, H., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST):

- Regulation of the head-inducing factor Cerberus gene by organizer-specific homeodomain proteins. 14th International Congress of Developmental Biology (Kyoto) 2001.7.8-12
16. Suga, A., Hikasa, H., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST): Cloning and functional analysis of Xenopus ADAMTS-1 expressed in the Spemann organizer. 14th International Congress of Developmental Biology (Kyoto) 2001.7.8-12
 17. Shibata, M., Itoh, M., Ohmori, S.-y., Shinga, J., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST) : 「Expression and functional analyses of head organizer genes isolated by a comprehensive screen in Xenopus embryos」 14th International Congress of Developmental Biology (Kyoto) 2001.7.8-12
 18. Takahashi, N., Tochimoto, N., Ohmori, S.-y., Itoh, M., Inamori, M., Shinga, J., Osada, S.-I., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST): Comprehensive screening for genes specifically expressed in Xenopus anterior neuroectoderm. 14th International Congress of Developmental Biology (Kyoto) 2001.7.8-12
 19. Shinga, J., Ito, M., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST) : 「Early patterning of the prospective midbrain-hindbrain boundary by the HES-related gene XHR1 in Xenopus embryos」 14th International Congress of Developmental Biology (Kyoto) 2001.7.8-12
 20. 山元進司、平良眞規（東大・院理・生物科学、科技団・CREST）：「シュペーマンオーガナイザーにおけるホメオドメインタンパク質Xlim-1, Otx2, Mix.1, Siamoisによるcerberus遺伝子の発現制御」第24回日本分子生物学会（横浜）2001.12.11
 21. Suga, A., Hikasa, H., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST): "The role of Xenopus ADAMTS-1, a secreted type of the ADAM family, in the Spemann organizer" Genome-wide approaches for developmental biology, Okazaki, 2002.2.23
 22. Yamamoto, S., Ono, H., Hikasa, H., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST): "Direct regulation of the cerberus gene by homeodomain proteins, Xlim-1, Xotx2, Mix.1

- and Siamois in the organizer" Genome-wide approaches for developmental biology, (Okazaki), 2002.2.23
23. Osada, S.-I., Ohmori, S.-y., Inamori, M., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST): "Expression cloning of neuralizing factor derived from the anterior neuroectoderm of *Xenopus laevis*" Genome-wide approaches for developmental biology, (Okazaki), 2002.2.23
 24. Shibata, M., Itoh, M., Ohmori, S.-y., Shinga, J., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST): "Expression and functional analyses of head organizer genes isolated by a comprehensive screen in *Xenopus* embryos" Genome-wide approaches for developmental biology, (Okazaki), 2002.2.23
 25. Takahashi, N., Tochimoto, N., Ohmori, S., Itoh, M., Inamori, M., Shinga, J., Osada, S.-I., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST): "Systematic screening for genes specifically expressed in *Xenopus* anterior neuroectoderm" Genome-wide approaches for developmental biology, (Okazaki), 2002.2.23
 26. Hiratani, I., Yamamoto, N., Ohmori, S., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST): "XRnf12/RLIM regulates the activity of LIM homeodomain protein Xlim-1 through proteasome-dependent degradation of Ldb1 and suppresses head formation in *Xenopus* embryos" Genome-wide approaches for developmental biology, (Okazaki), 2002.2.23
 27. 高田達之^{1,3}、飯田桂子^{1,3}、大森慎也^{2,3}、平良眞規^{2,3}、木村博^{1,3}（¹,滋賀医大・放射線基礎；²,東大・院理・生物科学、³,科技団・JST）：「マウス胚における低分子G蛋白質ARL遺伝子の発現」第35回日本発生生物学会（横浜）2002.5.21
 28. 長田真一、大森慎也、稲森雅子、平良眞規（東大・院理・生物科学、科技団・CREST）：「核膜蛋白をコードする新規因子は、BMPシグナルに拮抗することにより神経発生を制御する」第35回日本発生生物学会（横浜）2002. 5. 23
 29. 山元進司、平良眞規（東大・院理・生物科学、科技団・CREST）：「シュペーマン

オーガナイザーにおけるホメオドメインタンパク質Xlim-1, Xotx2, Mix.1, Siamois
によるcerberus遺伝子の発現制御」第35回日本発生生物学会 (横浜) 2002. 5. 23

30. 高橋範行、栃本直子、大森慎也、伊藤万里、稲森雅子、信賀順、長田真一、平良眞規 (東大・院理・生物科学、科技団・CREST)：「アフリカツメガエル前方神経外胚葉特異的遺伝子の体系的検索と発現解析」第35回日本発生生物学会 (横浜) 2002. 5. 23
31. Osada, S.-I., Ohmori, S.-y., and Taira M. (University of Tokyo; CREST, JST)："A novel Smad-interacting protein localized to the nuclear envelope regulates neural development by antagonizing BMP signaling" 9th international Xenopus Conference (Cambridge, United Kingdom) 2002.8.23
32. Shibata, M., Hikasa, H., Taira M. (University of Tokyo; CREST, JST)："Xenopus Crescent regulates convergent extension movements by antagonizing Wnt-11 activity in the head organizer region" 9th international Xenopus Conference (Cambridge, United Kingdom) 2002.8.23
33. 須賀晶子、日笠弘基、平良眞規 (東大・院理・生物科学、科技団・CREST)：「シュペーマン・オーガナイザーのFGFシグナル伝達におけるADAMTS1の役割」第25回日本分子生物学会 (横浜) 2002.12.13
34. 平谷伊智朗、山本直子、大森慎也、平良眞規 (東大・院理・生物科学、科技団・CREST)：「アフリカツメガエル胚オーガナイザーにおけるXlim-1, Ldb1, およびRINGフィンガー蛋白質XRnf12の機能的相互作用：XRnf12によるXlim-1/Ldb1の量比の制御の可能性」第25回日本分子生物学会 (横浜) 2002.12.14
35. 高橋範行、栃本直子、大森慎也、伊藤万里、稲森-色摩雅子、信賀順、小野裕史、長田真一、平良眞規 (東大・院理・生物科学、科技団・CREST)：「アフリカツメガエル前部神経外胚葉特異的に発現する遺伝子の体系的検索」第36回日本発生生物学会 (札幌) 2003.6.11
36. 林周一¹、伊藤万里^{1,2}、阿形清和³、平良眞規^{1,2} (1,東大・院理・生物科学、2,科

技団・CREST、3,神戸理研)「FGFreceptor-like1/nou-darakeのアフリカツメガエル
オーソログのクローニングと機能解析」第36会日本発生生物学会(札幌)
2003.6.11

37. Osada, S.-I., Ohmori, S.-y., and Taira, M. (University of Tokyo; CREST, JST) "XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in *Xenopus* embryos." Society for Developmental Biology 62 Annual Meeting (Boston) 2003.8.1-2

③ プレス発表

(3)特許出願(国内1件、海外0件)

①国内

発明者：平良眞規、長田真一

発明の名称：神経化誘導に関与する新規遺伝子、およびそのタンパク質、並び
にその利用方法

出願番号：特願2002-116378 特開2003-304881

出願年月日：平成14年4月18日

出願人：科学技術振興事業団(事業団整理番号 A141P08)

②海外

(4)新聞報道等

①新聞報道

科学新聞1999年(平成11年)12月3日掲載 第22回日本分子生物学会での発表「ア
フリカツメガエルcDNAプロジェクトと発生学(国際動向も含めて)」の紹介

②受賞

なし

③その他

なし

(5)その他特記事項

なし

7. 結び

アフリカツメガエルを用いて脳の初期発生に関わる遺伝子の体系的スクリーニング、発現スクリーニング、サブトラクション・スクリーニングを行い、多数の新規遺伝子を同定した。また得られた遺伝子の発現解析、機能解析、プロモーター解析などに関しては、プロジェクトの前半では立ち上がりに幾分遅れが生じたが、後半は概ね予定通り進めることができた。これらに関しては総じて目標の八割方は達成したと考えている。しかし、アフリカツメガエルの結果を踏まえて、マウスのオーソログを単離し、遺伝子ノックアウトで解析、あるいは発現解析を行う予定であったが、狙ったオーソログが偶々マウスに存在しないなど、予定通りに行かなかったこともあり、マウスグループにおいて狙いがあまり達成できなかったことが残念であった。しかし現在アフリカツメガエルで機能解析した遺伝子のノックアウトによる解析を相沢グループと進めており、CREST期間内には達成できなかったが、研究としては進展させることはできており、この点は本プロジェクトの成果の一つと考えている。

本プロジェクトで採用した研究員、技術員、研究補佐員、また大学院生として参加した人たちに対しては、このプロジェクトにおいて研究を行うことで、実験技量、科学的知識、科学的思考方法をかなりの程度向上させることができたのではないかと考えている。今後他の研究室に移ったとしても、間違いなくそれぞれの場で活躍できるものと考えており、また期待してやまない。

最後に、このプロジェクトに参加し、すばらしい発見を目指して価値あるデータを出すことに昼夜を問わず弛まぬ努力をしていただいた多くの方々に研究代表者として深く感謝致します。またこれらの研究を支えてくださった統括の久野先生ならびに京都事務所の方々に深く感謝いたします。



2003年6月の平良グループ。定例の研究室セミナーを終えた後の集合写真。