

哺乳類神経発生におけるPax6下流遺伝子ネットワークの網羅的解析

●大隅典子 ◆高橋将文

東北大学大学院医学系研究科創生応用医学研究センター

＜研究の目的と進め方＞

脊椎動物の神経管はシグナルセンターから拡散されるFGF、Wnt、Shh、BMPなどの分泌因子の濃度勾配を最初の位置情報とし、これらの分泌因子が誘導または抑制する転写因子群の領域特異的な発現によりパターン化される。神経管のそれぞれの区画の神経前駆細胞から異なるサブタイプの神経細胞が分化し、細胞体の配置や軸索ガイダンスの位置情報を与えられることが高次脳機能構築の基盤となっている。Pax6はこの脊椎動物の初期脳のパターン化に必須な転写因子のうちでも最も注目されているものの一つで、前脳、菱脳、脊髄で領域特異的に発現する。Pax6は発生過程においてニューロンやグリアを生じる神経幹細胞として機能する神経上皮細胞で発現がみられ、大脳皮質層形成、神経管腹側神経細胞の特異化をはじめ、多岐に渡る神経系の発生事象に関わることから、Pax6を上流とするいくつかの遺伝子カスケードが複雑に絡み合いながら脳の分化を制御していると考えられる。Pax6は眼や脾臓の発生にも深く関わり、クリスタリン、ロドプシン、グルカゴン、ソマトスタチンなどがPax6により転写が制御される遺伝子として知られているが、神経系の発生においてはbHLH型転写因子をコードするNeurogenin2がPax6の直接の標的遺伝子として報告されている以外はほとんどわかっていないのが現状である。そこで本研究は、近年多用されるようになってきたマイクロアレイ法の中でも、ゲノム/cDNA情報を元に設計された市販の高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いたマウスおよびラットの遺伝子発現解析によりPax6の下流で働く遺伝子群を同定し、発生段階・領域による発現変動と生体内での発現パターンから因子間相互の関連を示し、マウスとラットにおける種間の比較からその保存性も検証して、神経発生におけるPax6下流の遺伝子ネットワークの全容を解明することを目的とする。

＜研究開始時の研究計画＞

野生型およびPax6ホモ接合変異胚の各発生段階の脳・神経管領域からPax6発現領域である終脳、間脳、菱脳、脊髄をそれぞれ切り出して得られたRNAもとにcDNAを調整し、これを鋳型として、断片化ピオチン標識cRNAを得る。ほぼ全ての遺伝子を網羅する約30,000の転写産物に対するプローブセットが載ったGeneChip Rat Expression Set 230 (Affymetrix)とハイブリダイズ後、蛍光シグナルをスキャンし、各プローブセットの検出シグナルをMicroarray Suiteで演算処理し遺伝子発現シグナル値を求める。得られた各チップ上の遺伝子発現シグナル値は解析ソフトウェアGeneSpring (Silicon Genetics)に取り込み、チップ毎にノーマライゼーションを行った後に、野生型とPax6変異胚での終脳、間脳、菱脳、脊髄の各領域の発生段階を追ったデータの比較検討を行い、遺伝子発現パターンの共通する遺伝子群を選び出す。遺伝子発現の増減のパターンから着目する遺伝子群については各種ウェブデータベース上の最新情報との照合を行い、アノテーション情報の得られないESTクローンに関

してはBLAST検索により他の生物種も含めた既知遺伝子との相同性をみる。また、マウスとラットの比較解析も行い、これらの遺伝子群の保存性を検討する。同時に、マイクロアレイ解析のターゲット調整に用いたのと同じ二本鎖cDNAを鋳型として、LightCycler (Roche)を用いて個々の遺伝子に対するリアルタイム定量PCRを行い、発現量の比を求め、マイクロアレイ解析での各遺伝子のシグナル値の比を検証する。再現性の得られた遺伝子に関してはin situハイブリダイゼーション法を行い、より詳細な発現様式を明らかにする。さらに、実際の生体内における各遺伝子の発現の局在を比較して遺伝子相互の関連を明らかにし、比較的近い種間での共通性を確かめることにより、神経系の発生に関わる遺伝子ネットワークを解明する。

＜研究期間の成果＞

最も顕著な発現変動を示した遺伝子として、脂肪酸結合タンパク質Fabp7を得た。Pax6ホモ接合変異胚菱脳においてFabp7は野生型の1/30以下にまで発現が減少していた。Unc5h1やCyp26b1遺伝子などでもPax6変異体での著しい発現減少を明らかにした。

Fabp7については、発現様式の確認、電気穿孔法と全胚培養系を組み合わせた野生型胚でのRNA干渉による機能欠失実験や過剰発現による機能獲得実験などの機能解析を行った。その結果、Fabp7遺伝子が転写因子Pax6の標的候補であり、神経新生において幹細胞の維持に重要な役割を担うことを明らかにした(成果3)。

また、胎齢11.5日の終脳領域についても同様に2回の実験を行い、遺伝子発現比較解析を行った。

＜国内外での成果の位置づけ＞

マイクロアレイを用いた転写因子の下流遺伝子の解析として、極めて信頼度の高い結果を得ることができ、国内外から高い評価を得た。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

マンパワーの問題から、期間内では興味深い遺伝子すべてについて、網羅的に解析することができなかった。

＜今後の課題＞

興味深いPax6下流遺伝子について、その機能解析を進めていきたい。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1. Nomura, T., and Osumi, N.: Misrouting of mitral cells in Pax6/Small eye rat telencephalon. Development 131, 787-796 (2004)
2. Takahashi, M., Osumi, N.: Identification of a novel type II classical cadherin: Rat cadherin19 is expressed in the cranial ganglia and Schwann cell precursors during development. Dev. Dyn. 232 (1), 200-208 (2005)
3. Arai, Y., Funatsu, N., Numayama-Tsuruta, K., Nomura, T., Nakamura, S., & Osumi, N.: The role of Fabp7, a

downstream gene of Pax6, in maintenance of neuroepithelial cells during early cortical development. J Neurosci 25 (42), 9752-9761 (2005)