

神経分化の際に前後軸情報と背腹軸情報はいかにして統合されるのか？

～Phox2b エンハンサーをモデルに用いた分子遺伝学的研究～

How are AP axis and DV axis information integrated in motor neuron specification?

-Molecular genetic study using *Phox2b* enhancer as a model system-

フリードリッヒ ミーシャー研究所 成田 裕一

Friedrich Miescher Institute Yuichi NARITA

派遣期間 2007年4月4日～2008年3月31日

April 4, 2007 - March 31, 2008

研究機関 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

1 rue Laurent Fries, BP 10142 67404 Illkirch CEDEX, France

研究指導者 Dr. Filippo Rijli

英文サマリー

It has been reported that the position of neural progenitor cells in neural tube is important to determine their neural identity. However, there is almost no report about the mechanism to integrate the positional information of anterior-posterior (AP) and dorso-ventral (DV) axis. I used *Phox2b* gene enhancer as a model system and analyzed how AP and DV axis information is integrated during the facial nerve (VII) development.

Firstly, I identified Hox, Pbx and Prep binding sites in the *Phox2b* enhancer. I found that all of the sites are essential for *Phox2b* enhancer activity through binding with Hoxb1/Pbx1/Prep1 heterotrimer complex, which is a mediator of AP axis information. Next, I found that existence of Nkx2.2, which is a mediator of DV axis information, is important for the activity of *Phox2b* enhancer. Furthermore, I clarified that the Nkx2.2 mediated activation *Phox2b* enhancer is accounted for by its repressor function. These observations take an important step to understand how positional information along the AP and DV axes are integrated to regulate specific target gene expression, leading to neuronal fate specification at the appropriate location.

神経のアイデンティティ決定には、神経前駆細胞が神経管内のどの位置に存在するのが重要であると考えられています。つまり、神経前駆細胞は受け取った前後軸および背腹軸情報に応じて、その形態や性質が決定されるのです。まず、神経管の前後軸に沿った位置情報は、*Hox* 遺伝子群とそのコファクターの入れ子式の発現パターンによって割り与えられます。一方、背腹軸に沿っての位置情報は、*Shh* の濃度勾配に応答して *Pax6*、*Nkx2.2*、*Nkx6.1* などが、領域特異的に発現することにより獲得されます。しかし、神経の発生過程において、これら2つの軸に関する位置情報がどのように統合されるのかについてはほとんど理解されていませんでした。

Phox2b は顔面神経(VII)のアイデンティティ決定に重要な役割を担っています。この遺伝子は顔面神経(VII)が発生するロンボメア4の腹側で特に強く発現することが知られており、この発現を制御するエンハンサーも同定されています。そして、このエンハンサー内には前後軸情報をもたらす*Hox*の結合可能サイトが存在していることが確認されていました。さらに、このエンハンサーが正常に機能するためには、背腹軸情報をもたらす *Nkx2.2* も必須であることが示唆されていました。そこで本研究では、*Hox* や *Nkx2.2* などのホメオボックス転写因子、および *Pbx* や *Prep* などの *Hox* コファクターが、*Phox2b* のエンハンサーを介してどのように発現制御に関係しているのかを解析することにより、前後軸、背腹軸の位置情報が統合されるメカニズムを探ることを目的としました。

1) 前後軸の位置情報をもたらす*Hox*の重要性

*Phox2b*エンハンサー376bp中には*Hox*タンパクが結合可能なサイトが存在しており、*in vitro*の系では*Hoxb1*がこのサイトに結合できることが明らかになっていました。そこで本研究では*in vivo*の系を用いて、この*Hox*結合サイトを介して実際に*Phox2b*エンハンサーが前後軸情報を獲得しているのかどうかを解析しました。

*Phox2b*エンハンサー内の*Hox*結合サイトの配列を改変したレポーターコンストラクトを構築し、ニワトリ菱脳へエレクトロポレーションにより遺伝子導入することによりエンハンサー活性を解析しました。その結果、*Hox*結合サイトの配列変化により、*Phox2b*エンハンサーの活性が著しく低下することが明らかになりました。さらに前後軸情報依存的に*Phox2b*エンハンサーが機能していることを確認する目的で、*Phox2b*エンハンサーコンストラクトを*Hoxb1*の強制発現コンストラクトと同時に遺伝子導入しました。これにより、本来ロンボメア4でしか発現しない*Hoxb1*が菱脳全体で異所的に発現されることになり、あたかも菱脳全てがロンボメア4であるかのような環境を作ることができま

す。その結果、菱脳の全ての前後軸レベルにおいて*Phox2b*エンハンサーの活性が観察されました。これらの結果により、Hoxb1が*Phox2b*エンハンサー上の結合サイトに直接結合する事により前後軸情報をもたらし、*Phox2b*遺伝子の発現パターンを制御していることを明らかにすることができました。

また、この結果をマウスを用いた系で確認するために、*Phox2b*エンハンサーコンストラクトを導入したトランスジェニックマウスラインを作出中です。将来的には、このトランスジェニックマウスを既に確立されている*Hoxb1*ノックアウトマウスと交配することにより、Hoxによる前後軸情報が存在しない状態での*Phox2b*エンハンサーの活性を解析する予定です。

2) Hoxのコファクターの重要性

*Phox2b*エンハンサー配列のさらなる解析を行なったところ、PbxおよびPrepの結合可能サイトも発見することができました。PbxおよびPrepは、Hoxと複合体を形成することにより、HoxのDNAへの結合や標的遺伝子の発現調節に影響を与えるHoxコファクターと呼ばれる因子です。そこで、*Phox2b*エンハンサーの発現制御におけるHoxコファクターの役割について解析することにしました。まずPbxやPrepがこれらのサイトに実際に結合できるかを解析するために、*Phox2b*エンハンサー領域をプローブに用いてゲルシフトアッセイを行ないました。その結果、Pbx1およびPrep1単独では*Phox2b*エンハンサーには結合できず、Hoxb1、Pbx1、Prep1の全てが存在する状況においてのみ、*Phox2b*エンハンサー領域への結合が可能であることが明らかとなりました。また、同様の解析をPbxおよびPrepの結合可能サイトの配列を改変または削除して行なうと、Hoxb1、Pbx1、Prep1の*Phox2b*エンハンサーへの結合が検出できなくなりました。これらの結果により、*Phox2b*エンハンサー上のHox、PbxおよびPrep結合サイトを介して、Hoxb1/Pbx/Prepのヘテロトリマー構造が結合していることが明らかになりました。

次にHoxb1/Pbx/Prepのヘテロトリマーの結合が*Phox2b*エンハンサー活性の制御に重要であるかどうかを解析する目的で、これらの結合サイトを削除もしくは改変したレポーターコンストラクトを構築し、ニワトリ菱脳中でエンハンサー解析を行ないました。その結果、Pbx、Prepいずれの結合サイトを改変した場合にもロンボメア4領域でのレポーター遺伝子の発現が著しく低下することが分かりました。この結果から、HoxコファクターであるPbx1、Prep1もHoxb1とヘテロトリマーを形成することによって、*Phox2b*エンハンサーの制御に重要な役割を果たしていることが明らかになりました。今後は、同様のエンハンサー解析をトランスジェニックマウスの系を用いて行なうとともに、

Hoxb1、Pbx1、Prep1のミュータントマウスを様々な組み合わせで交配し、得られた複合ミュータントにおける*Phox2b*発現や鰓弓運動神経の形態を比較することにより、*Phox2b* 遺伝子制御におけるHoxコファクターの重要性をより詳細に解析していく計画をしています。

3) 背腹軸の位置情報をもたらす *Nkx2.2*、*Pax6* の重要性

先行研究により、背腹軸の位置情報をもたらす *Nkx2.2* が *Phox2b* エンハンサーの制御に必要であることが示唆されてきました。そこで、*Nkx2.2* の重要性をより詳細に解析するために、P19 細胞系を用いた定量的なエンハンサー解析を *Phox2b* エンハンサーに対して行ないました。その結果、*Nkx2.2* 発現コンストラクトを共導入することにより、1.6〜3.5 倍 *Phox2b* エンハンサー活性が増強されることが明らかになりました。

しかし、配列を解析する限り、*Phox2b* エンハンサーの配列中には *Nkx2.2* が直接結合できるサイトは存在しません。そこで、Hoxb1/Pbx1/Prep1 のヘテロトリマーを介して、*Nkx2.2* が *Phox2b* エンハンサーに作用する可能性について検討する目的で、ゲルシフトアッセイを行ないました。その結果、Hoxb1、Pbx1、Prep1 の全てが存在する条件下においても、*Nkx2.2* と *Phox2b* エンハンサーへの結合は観察されませんでした。

また、Englailed 抑制ドメインと *Nkx2.2* のキメラタンパクを使って *Phox2b* のエンハンサー活性を定量したところ、正常な *Nkx2.2* を用いた場合よりも強いエンハンサー活性が観察されました。逆に VP16 活性ドメインと *Nkx2.2* のキメラタンパク質を用いて同様の解析を行なった場合は、エンハンサー活性の増強は観察できなくなりました。このことから、*Phox2b* エンハンサーの制御には *Nkx2.2* の抑制因子としての機能が重要であることが明らかになりました。

これらの結果は、*Phox2b* の発現を抑制するような因子(X)が存在し、*Nkx2.2* はその抑制因子(X)の発現を阻害することにより、間接的に *Phox2b* の発現を誘導するのではないか、という私達の仮説をより強く支持するものです。いくつかの傍証からこの抑制因子(X)は *Pax6* なのではないかと考え、実験を計画していましたが、残念ながら本派遣期間中にそこまで研究を進めることができませんでした。今後への課題として、*Pax6* が実際に抑制因子(X)としての役割を果たしているのかどうかを解析するために、

(1) P19 細胞系およびゲルシフトアッセイを用いて、*Phox2b* エンハンサーのエンハンサー活性および、Hoxb1/Pbx1/Prep1 のヘテロトリマーとの結合を、*Pax6* の存在下と非存在下で比較する。(2) *Phox2b* エンハンサーコンストラクトを、*Nkx2.2* および *Pax6* 強制発現コンストラクトと同時にニワトリ菱脳へ遺伝子導入して、エンハンサー

活性を解析する。(3) *Pax6* および *Nkx2.2* のノックアウトマウスと *Phox2b* エンハンサーのトランスジェニックマウスを交配して得られた個体でのエンハンサー活性についての解析を行なうなどの実験を行なう必要があると考えられます。