

脳の発生メカニズムを ゼブラフィッシュで探る

脳科学総合研究センター
発生・分化研究グループ 発生遺伝子制御研究チーム
チームリーダー 岡本 仁

ヒトの脳は、千数百億ともいわれる神経細胞が精緻に結び付き巨大なネットワークを作ること、認知や運動、学習・記憶、感情など、さまざまな機能を発揮する。「脳は、ゲノムに書き込まれた一定の法則によって作られているはず。私たちの究極の目標は、ゲノムから読み取られた脳を作るプログラムがどのように発現して脳・神経系の各領域ができ、神経回路網が作られ、それがどのように機能に結び付くかを知ることです」と岡本仁チームリーダーは語る。これまで発生生物学では、ショウジョウバエや線虫による研究が先行してきた。発生遺伝子制御研究チームでは、ゼブラフィッシュを使って、脊椎動物の脳の発生にかかわるあらゆる遺伝子群を突き止めようとしている。その成果は再生医療にも不可欠な知識となる。

発生の基本原理は種を越えて共通

ショウジョウバエの突然変異の研究により、ホメオボックス遺伝子群が1980年代に見えられた。ホメオボックス遺伝子群は、体の前後軸や背腹軸などを決め、体の各領域の形態を特徴づける。例えばホメオボックス遺伝子に変異があると、頭部に脚が生えたり、羽のないハエになる。

その後、さまざまな動植物の遺伝子を調べて比較してみると、驚くべきことに、あらゆる多細胞生物に同じようなホメオボックス遺伝子群があることが分かった。ヒトを含む脊椎動物の体や脳の発生の過程でも、ショウジョウバエで使われている分子や基本原理が働いている。

「種を越えたさまざまな生物の発生を制御しているホメオボックス遺伝子群の発見

は、1980～90年代における発生生物学の最大のヒットです。しかし、それではなぜ私たちはヒトで、ハエではないのかという疑問が出てきます」。体づくりの根本的な指示を出す“司令官”の遺伝子群は基本的に共通でも、ヒトとハエでは、その下の“現場”で働く遺伝子群に違いがあるはずだ。

ショウジョウバエの研究では、何十万もの突然変異胚が生み出され、発生にかかわる遺伝子が数多く突き止められてきた。

「脊椎動物でもショウジョウバエと同じ規模の突然変異の研究を行う必要があります。そこから発見される未知なる遺伝子を調べて、なぜ脊椎動物になったのかという疑問に私たちは答えを出したいのです」

ゼブラフィッシュで脊椎動物の神経発生を探る

岡本チームリーダーらは、ゼブラフィッシュ(図①)をモデル実験動物として使い、脊椎動物の神経発生で働く遺伝子を探っている。「ヒトの遺伝子のうち約40%がショウジョウバエと、おそらく95%以上がゼブラフィッシュなどの魚類と共通性があると考えられます」

ゼブラフィッシュは、飼育が最も簡単な熱帯魚の一種である。2～3カ月で世代が入れ替わり、成魚の雌は数日ごとに50～200個の卵を産むので、遺伝学的な実験に適している。また、卵が大きいので、ある遺伝子を付け加えたり、発現を抑えるなどの遺伝子操作がしやすい。胚は極めて早く成長し、28.5℃の水温では受精後2日半で発生を完了する。胚は比較的少数の細胞からできていて、受精からかなりの期間透明なので、1個1個の細胞を観察することができる(図②)。



岡本チームリーダー

60万個の卵から神経系の突然変異を探る

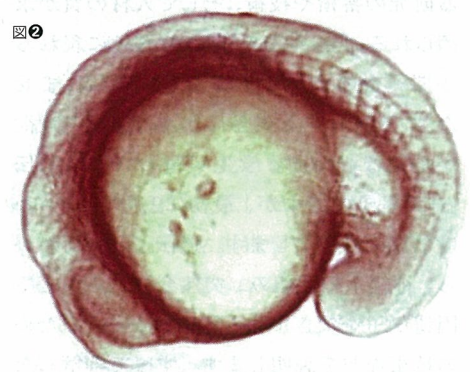
神経発生にかかわる遺伝子を探す方法の1つは、さまざまな突然変異胚を数多く生み出すことで、すべての遺伝子に変異を起こし、その中から神経系に異常がある個体を見つけることである。そして、その神経系の異常を生み出している原因遺伝子を突き止めるのだ。

ある薬剤をゼブラフィッシュの雄に作用させると、精子にランダムに突然変異を起こすことができる。その雄と正常な雌の交配から生まれた子供たち(F₁)には、それぞれ20～30個の遺伝子に突然変異が起きる。さらにF₁の異なる系統の雄と雌の交配から生まれた子供たち(F₂)には、平均50個の

図①



図②



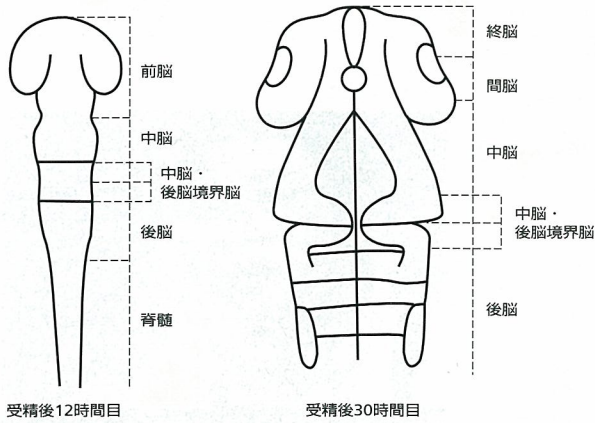


図1:ゼブラフィッシュの成魚
 図2:ゼブラフィッシュ胚(受精後20時間目)
 図3:ゼブラフィッシュ胚の脳の模式図
 図4:後脳と特定の神経細胞が光るゼブラフィッシュ(受精後72時間目)
 図5:ゼブラフィッシュ胚の顔面神経の形成(受精後48時間目)

突然変異が起きる。F₂の同じファミリー(兄弟姉妹)内で交配させると、一部の子どもは、両親から同じ突然変異を受け継ぐ。このようにしてファミリーごとに異なる突然変異が形質として現れる。

ゼブラフィッシュの遺伝子が例えば4万個あり、F₂が1ファミリーにつき50個の突然変異を持っていたとすると、800ファミリーくらい、突然変異の重複などを考えると1500ファミリーくらいのF₂を生み出せば、すべての遺伝子に突然変異を起こすことができるはずである。1ファミリーにつき8ペアを交配させて、それぞれ約50個の卵が産まれると、1500ファミリーでは60万個の卵が産まれる。「この60万個の卵の発生を1個ずつ見て、神経系の異常を調べるのです」

ある観点から異常があるかないか“ふるいにかける”ことを「スクリーニング」という。脊椎動物を使った、すべての遺伝子を対象とするような規模の突然変異のスクリーニングは、現在のところゼブラフィッシュとメダカでしか行われていない。ゼブラフィッシュは、日本では岡本チームリーダーを中心にグループのみ、海外ではアメリカとドイツで行われている。メダカは日本とドイツで進められている。

大規模スクリーニングには、それを支える研究の蓄積や技術、そして人材の質が求められる。「60万個のうち1個だけに現れる一期一会の突然変異もあるかもしれません。スクリーニングを行う人の資質と意欲が重要なのです。学生実習の人にも手伝ってもらおうのですが、最初に2週間くらいかけて集中講義をします。遺伝子とは何かから、神経系の仕組み、突然変異からなぜ原因遺伝子を突き止められるのか、そのための技術などを説明します。すべて理解した

上でスクリーニングを行ってもらいます。意欲をできるだけ高く持ってもらい、神経発生に重要な意味を持つ突然変異を見つけてもらうことが大切です」

神経細胞が光るゼブラフィッシュで突然変異を見つけだす

岡本チームリーダーは、科学技術振興事業団さがけ研究員の東島真一博士(現・ニューヨーク州立大学)との約5年間に及ぶ共同研究で、遺伝子操作により蛍光物質を導入して特定の神経細胞だけが光るゼブラフィッシュを世界で初めて開発した。現在研究チームでは、科学技術振興事業団(戦略的基礎研究推進事業)との共同で、この技術を利用して後脳の運動神経細胞に現れる突然変異のスクリーニングを行っている。後脳は、ヒトでは延髄になる部分で、生命活動に必須の領域である(図3・図4)。

研究チームでは、すでにいくつかの突然変異を見つけている。図5は顔面神経の様子である。正常胚ではr4の節から生まれた顔面神経がr6まで伸びるのだが、突然変異胚ではr4にとどまっている。

「神経細胞は、生まれたところから機能する場所まで移動していかなければなりません。この突然変異は神経系ができるさまざまなステップのうち、移動するステップだけに異常があります」

研究チームではこれから約3年間で、神経発生において重要な意味を持つ突然変異を200~300個見つけだすことができると予想している。2002年秋には、イギリスのサンガー・センターにより、ゼブラフィッシュの全ゲノム配列の概略が明らかにされる予定である。研究チームでは、このデータも利用して、発見した突然変異の原因遺伝

子を突き止めようとしている。

特定の遺伝子に着目して下流の遺伝子群を探す

ある神経細胞は、特定の感覚器や筋肉の細胞などに結び付いて、初めて機能を発揮する。脳・神経系の精緻な配線がどのよ

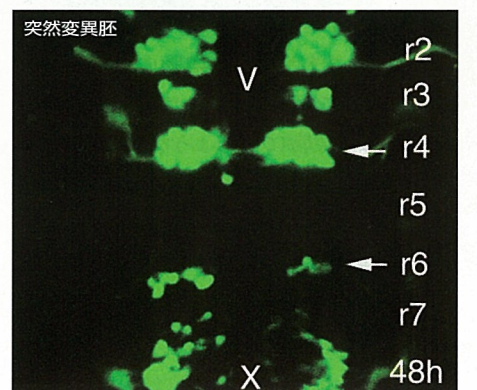
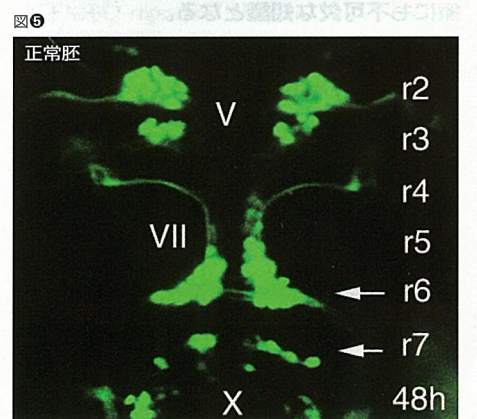
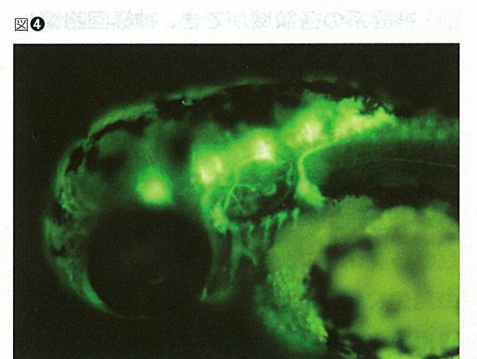
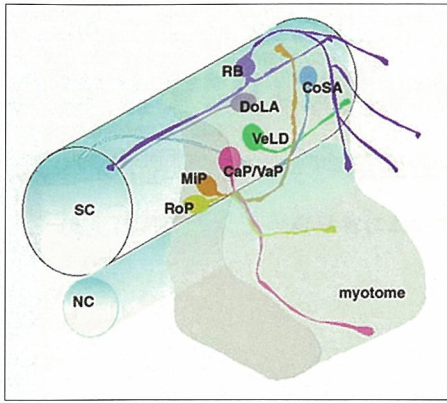


図6



うなメカニズムで可能となるのかは、いまだ大きな謎である。脊椎の神経系が交差する領域などで、神経細胞を引き寄せるネトリンなどの誘引性物質や、遠ざける反発性物質が見つかった。しかし、それだけでは配線のメカニズムを説明できない。「例えば実験で運動神経細胞の並び方を逆にしても、ある運動神経細胞は、必ず決まった筋肉に結び付きます。どの筋肉にどの運動神経細胞が結び付くかは、運動神経細胞がおのおの特徴を持った時点で運命が決められるのです」

図6はゼブラフィッシュの脊髄神経細胞の模式図である。受精後24時間目ごろにはRoP、MiP、CaPと呼ばれる一次運動神経細胞が、すでにそれぞれ違う場所に伸びている。岡本チームリーダーらは、運動神経細胞ごとの特徴が決まる受精後16時間より前に、RoPのみにIslet-1、CaPのみにIslet-2と呼ばれる分子が働いていることを発見した(図7)。例えばCaPのIslet-2の機能を抑えると、本来とは違う後ろ向きに神経細胞が伸びるようになる。

Islet-1やIslet-2は、LIMホメオドメイン型の転写因子である。転写因子とは、遺伝子のスイッチとなる分子だ。ホメオボックス遺伝子群がある領域全体で働くのに対し、LIMホメオドメイン型転写因子は特定の細胞でだけ働く。

「LIMホメオドメイン型の転写因子は、異なる種類のものが結び付いてペアを作ります。さまざまな組み合わせのペアができるので、細胞ごとの特徴を決定する転写因子として向いています」

Isletによって、神経細胞ごとの特徴の形成に必要な分子を作る遺伝子にスイッチが入ると考えられる。ただし何の遺伝子のスイッチなのかは分かっていない。

図7

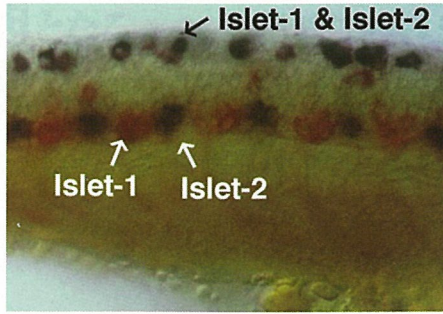


図6:ゼブラフィッシュ胚の脊髄神経細胞の模式図(受精後24時間目ごろ)

図7:受精後16時間以前のゼブラフィッシュ胚の脊髄神経細胞で発現するIslet-1とIslet-2

●
監修:脳科学総合研究センター
発生・分化研究グループ
発生遺伝子制御研究チーム
チームリーダー 岡本 仁

そこで研究チームでは、Isletを働かなくした場合にだけ発現しなくなる遺伝子を調べている。現在は中脳と中脳・後脳境界脳で働くIslet-3に関連するものを探している。中脳は視覚をつかさどる視蓋になり、中脳・後脳境界脳は運動をつかさどる小脳になる。

「視蓋と小脳は独立して分化するわけではなく、小脳と視蓋になる領域が相互に分子を出して作用し合いながら分化することが、ニワトリの実験で確認されています。これを誘導的相互作用と呼びます。例えばニワトリの小脳を、実験で脳の前の領域に移植すると、周りが視蓋になります。Islet-3は、誘導的相互作用のレベルを調節する分子の1つだと考えられます。中脳のIslet-3の機能を抑えると中脳自身は視蓋になりますが、小脳はできません」

研究チームではIslet-3の機能を抑えたときにだけ働かなくなる遺伝子をすでに30個ほど見つけた。その中にはまだ機能が分からない未知の遺伝子や、ショウジョウバエの誘導的相互作用で知られているFGF8やWnt1などの遺伝子がある。FGF8やWnt1は細胞の分化や成長を促す分子を作る。

「面白いことに、脳だけではなく手や足も誘導的相互作用によって作られ、FGF8やWnt1など脳と同じ分子が働いていることが知られています。脳や手足は、進化の過程で劇的に変化してきた器官です」

誘導的相互作用は、進化の多様性のなぞを解く重要な鍵の1つなのかもしれない。

「例えば、ほ乳類の系統になると終脳が大きくなり、大脳皮質が発達してきたわけです。大脳皮質の形成においても、脳の最先端部と外側の部分との誘導的相互作用が働くことが分かってきました。最近、アメリカの科学雑誌『Science』(2002年7月19日号)でWnt1に関連して働くβカテニンとい

う物質を脳の中で活性化させると、マウスの大脳皮質が巨大化し、頭蓋骨に収まりきれずにシワができたという実験が発表されました」

ヒトの大脳皮質にはシワがあるが、正常なマウスにはない。ヒトの脳への進化にも誘導的相互作用に関係する分子が重要な役割を果たしているのだろうか。

「突然変異から原因遺伝子を探したり、Isletのような遺伝子の下流で働く遺伝子群を探して、ゼブラフィッシュの神経分化の“現場”で働いているあらゆる分子を調べることが、当面の大目標です。そしてその働きをヒトやマウスなどほかの動物と比較することにより、種の多様性や脳の進化のなぞにも迫ることができると期待しています」

再生医療の不可欠な知識となる

発生メカニズムの解明は、機能を失った臓器を患者自身の細胞などを培養して再生する「再生医療」にも不可欠な知識となる。

「例えば運動神経細胞の分化のメカニズムが分かれば、運動神経細胞の培養に役立ちます。運動神経細胞が培養できたとしても、正しい標的の筋肉に結び付かないと、指が逆に動いたりしてしまいます。正しく結び付けるためには、その仕組みも知らなければならぬのです」

「私たちは、これまで大変苦勞していた遺伝子の塩基配列の決定などから解放されて、発生にかかわる遺伝子の機能を調べるという発生生物学の最も面白いテーマに集中できるようになりました。それを医療に役立てるなど、発生生物学もやっとな人類に貢献できる時代になったのです」

ゼブラフィッシュの研究により、発生生物学は新たな発展段階を迎えようとしている。