

所属 (主指導教員)	分子発生生物学講座 (高橋淑子教授) 脳形成学講座 (相澤慎一教授)		
氏名	櫻井 祐介	提出	平成 22 年 12 月 21 日
題目	エンハンサー解析による脳形成における <i>Otx2</i> 機能の解明		
<p>要旨</p> <p><i>Otx2</i> 遺伝子は吻側胚体外内胚葉及び吻側胚体中内胚葉により誘導された吻側神経外胚葉全体で発現するが、その発現は 90kb 5' 上流にある AN エンハンサーの他、未知の別のエンハンサーによって制御されていることが先行研究で明らかとなっていた。また、体節期になり <i>Otx1</i> 発現が起こると共に <i>Otx2</i> の発現は予定間脳、中脳域に限局し、その発現は 75kb 5' 上流にある FM1 エンハンサー、115kb 3' 下流にある FM2 エンハンサー の 2 つの異なるエンハンサーにより制御されていることも明らかとなっていた。</p> <p>本研究ではまず、<i>Otx1</i> と共に FM1, FM2 エンハンサーをともに欠損マウスするマウス胚を作製し、吻側脳が終脳、間脳、中脳、後脳に領域化する E8.5-E9.5 の時期 <i>Otx2</i> と <i>Otx1</i> が協働して間脳、中脳の後脳への後方化を抑制することを示した。また、この <i>Otx2</i> 発現は FM1, FM2 エンハンサーに加え更に未同定の FM3 エンハンサーによって制御されていることが明らかになった。新皮質、大脳核隆起と視床下部よりなる最吻側部脳はこの時期後方化シグナルへの感受性を失い、その発生に <i>Otx2</i>, <i>Otx1</i> を必要としなくなる。</p> <p>また、無体節期吻側神経外胚葉での <i>Otx2</i> 発現を制御するエンハンサーとしてあらたに AN2 エンハンサーを 5' 上流 87 Kb に同定し、AN, AN2 エンハンサーをともに欠損するマウス胚を作製した。同変異体は、E7.0-E8.5 吻側神経外胚葉全体の後方化抑制に <i>Otx2</i> が必要で、この時期の吻側神経外胚葉での <i>Otx2</i> 発現がある閾値以下になると全吻側神経外胚葉 (終脳、間脳、中脳) が後脳域へ後方化することを示した。また、この <i>Otx2</i> 発現も AN, AN2 エンハンサーの他に更に第 3 の AN3 エンハンサーによって制御されていることが示された。</p>			

エンハンサー解析による脳形成における
Otx2 機能の解明

桜井祐介

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子発生生物学講座（高橋淑子教授）

脳形成学講座（相澤慎一教授）

平成 22 年 12 月 21 日提出

目次

1. 序論	4
2. 結果	
2-1. <i>Otx2</i> FM1, FM2 エンハンサー欠損マウスの解析	
2-1-1. FM1, FM2 二重エンハンサー欠損マウス(DKO)の作製	10
2-1-2. DKO の表現形解析	10
2-1-3. <i>Otx1</i> ^{-/-} <i>Otx2</i> ^{FM1ΔFM2/ΔFM1ΔFM2} 三重変異体(TKO)の作製	12
2-1-4. TKO 変異体における間脳・中脳の後脳化	13
2-1-5. TKO の原皮質領域の形成異常	14
2-1-5. TKO における間脳・中脳の異常の開始時期	15
2-1-6. DKO 変異体マウスにおける間・中脳形態の回復機序	18
2-2. AN, AN2 エンハンサー欠損マウスの解析	
2-2-1. AN2 エンハンサー活性	20
2-2-2. AN2 欠損マウスの作製	21
2-2-3. AN, AN2 エンハンサー二重欠損マウスの作製	21
2-2-4. AN2 エンハンサー必須配列の同定	22
3. 考察	23
4. 材料と方法	
4-1. 変異体マウスの飼育管理	31
4-2. AN, FM1, FM2 エンハンサー変異体マウス	
4-3. <i>Otx2</i> FM FM 2 エンハンサー二重変異体マウスの作成	31

4-4. 二重変異体マウスの遺伝子型の決定	32
4-5. <i>Otx1</i> ^{-/-} <i>Otx2</i> ^{ΔFM1ΔFM2/ΔFM1ΔFM2} 三重変異体(Triple Knock Out)マウスの作製	33
4-6. <i>Otx2</i> AN2 変異体, AN AN 2 エンハンサー二重変異体マウスの作成	33
4-7. AN 変異体、ANAN2 変異体マウスの遺伝子型の決定	34
4-8. RNA in situ ハイブリダイゼーション	34
4-9. トランスジェニックマウスとβガラクトシターゼ染色	35
4-10. AN2 エンハンサー活性の必須配列の決定	36
4-11. 組織学的解析	37
4-12. 細胞増殖の検出 (BrdU 取り込みアッセイ)	37
4-13. 細胞死の検出 (TUNEL アッセイ)	38
4-14. 細胞増殖および細胞死の測定	39
4-15. 定量的 RT-PCR 法による遺伝子発現解析	39
5. 謝辞	41
6. 参考文献	42
7. 表	49
8. 図	51

1. 序論

すべての後生動物は頭から形成される。体幹部の形成は頭部形成に引き続き、そのパターン形成に主要な役割を果たす *HOM-C* 群遺伝子は (Ingham, 1988; McGinnis and Krumlauf, 1992)、頭部では発現しない。ショウジョウバエの脳は b1, b2, b3 と命名されている 3 つの領域からなるが、この領域では *otd*, *ems* とよばれるホメオボックス遺伝子が、体幹部での *Hox* 群遺伝子と同様に入れ子式に発現し、それぞれの欠損胚では各脳領域が失われ、これらの遺伝子は頭部ギャップ遺伝子として働くことが知られている。マウスでこれら頭部ギャップ遺伝子の相同遺伝子として *Otx2*, *Otx1*, *Emx2*, *Emx1* が同定されており、これらのマウス遺伝子も *Hox* 群遺伝子の発現しない頭部で特異的に発現する {参考図 1, (Kimura et al., 1997; Kurokawa et al., 2004a; Kurokawa et al., 2004b; Simeone et al., 1992a; Simeone et al., 1993; Simeone et al., 1992b)}。

着床前のマウス胚盤胞胚 (blastocyst) で、将来の胚体の全ての組織を生じる細胞は内部細胞塊 (Inner cell mass; ICM) として存在するが、*Otx2* の発現はこれらの細胞で起こる (Kimura et al., 2001; Kurokawa et al., 2004b)。ICM は着床前にエピブラストと原始内胚葉に分化するが、*Otx2* 発現はエピブラストに引き続く。原始内胚葉は胚体の形成にはあずからない胚体外の組織で、エピブラストを裏打ちする臓側内胚葉 (visceral endoderm, VE) と胚体外外胚葉トロフォエクトダームを裏打ちする体壁内胚葉 (parietal endoderm) を生じる。着床後エピブラスト、VE は卵筒状に伸展し、胎生 5.5 日目胚の最遠位部の VE (distal visceral endoderm : DVE) に *Otx2* の発現がおこる。同時に DVE には *Hex*, *Cer-1*, *dkk1*, *Lim1*, *Lefty1* などのいわゆる頭部オーガナイザー遺伝子の発現も起こり、これと対応して *Brachury*, *Wnt3*, *Fgf8* などのいわゆるトランクオーガナイザー遺伝子の発現が近位部エピブラストに局限、前後軸 (A-P 軸) が胚の遠近軸にそって形成される。その後 DVE 細胞は原条形成に先立つ胎生

6.0 日目迄に将来の吻側に移動し、トランクオーガナイザー遺伝子の発現が原条の形成される尾側エピブラストに移動することによって、最終的な A-P 軸が形成される。引き続き後方エピブラストでの原条形成後(胎生 6.5 日目)、*Otx2* はノードより生じる吻側内中胚葉 (anterior mesendoderm: AME) で発現し、また AVE, AME により誘導される吻側神経外胚葉で発現する。神経外胚葉での *Otx2* 発現も発生とともにダイナミックに変化する。前体節期は吻側神経外胚葉全体で発現するが、その後方境界は耳前溝の前で不明瞭である。その後初期体節期(胎生 8.5 日目)に、*Otx2* 発現は神経外胚葉の最吻側で失われ始め、その後方発現境界は次第に中脳・後脳境界 (midbrain-hindbrainboundary: MHB) に明瞭になる。この時期 *Otx1* が吻側神経外胚葉で *Otx2* 発現領域内に生じる。次いで *Emx2* が前脳後方領域で起こり、さらに遅れて胎生 9.5 日目で *Emx2* 発現がより限局した終脳で起こる (参考図 1)。この時期 *Otx2* 発現は視床下部及び終脳の大部分で失われ、原皮質と終脳最腹側部及び間脳・中脳で認められる。その後方境界は MHB と一致する。これに対し *Otx1* は終脳皮質で発現を続け、後に皮質第 5 層に限局する。*Otx2* はまた移動期の頭部神経堤細胞で発現する (Kimura et al., 1997; Matsuo et al., 1995)。これらの発現パターンの変化は、*Otx2*, *Otx1* が胚発生過程において、それぞれの時期、それぞれの部位で頭部形成に働くことを示唆する。実際マウス頭部形成における *Otx*, *Emx* 遺伝子の働きは一連の変異マウス作成により示された。

Otx2 ホモ欠損マウスは ICM, エピブラストの形成には異常を示さず、ICM, エピブラストでの *Otx2* の働きはなお不明である。しかし、DVE での *Otx2* 発現は AVE の形成と、引き続き頭部形成に必須である (Katahira et al., 2000; Kimura-Yoshida et al., 2007)。Visceral endoderm での発現は正常で、*Otx2* をエピブラスト由来の組織でのみ欠損する胚 (*Otx2* 欠損 ES 細胞を 4 倍体野生型宿主胚に導入して発生するキメラ胚) での解析結果は、*Otx2* は AME でも吻側神経外胚葉誘導に必須の役割を果たしていることを示唆した (Rhinn et al., 1998, 相澤等未発表); 4 倍体細胞は胚体外の組

織のみに寄与し、エピブラスト及びこれ由来の胚体組織の形成には参画しない。*Otx2* ヘテロ欠損胚はまた、*Otx2* が頭部神経堤細胞由来の組織（頭蓋、脳神経）の形成に必須であることを示した (Matsuo et al., 1995)。ヒト及びマウス *Otx1* cDNA を *Otx2* 遺伝子座にノックインしたマウス胚では (*Otx2^{mOtx1/mOtx1}*, *Otx2^{hOtx1/hOtx1}*) 吻側神経外胚葉は一旦誘導されるが胎生 9.0 日迄に失われる (Acampora et al., 1998; Suda et al., 1999)。これらの変異マウス胚は一次的には吻側神経外胚葉での *Otx2* 機能を反映すると考えられる。しかし、ノックイン *hOtx1* は吻側中内胚葉などのエピブラスト由来の組織では発現しないとされており、*Otx2^{hOtx1/hOtx1}* 胚での吻側神経外胚葉の異常は、吻側中内胚葉での *Otx2* 機能をも反映する可能性がある (Acampora et al., 1998)。*Otx2^{mOtx1/mOtx1}* 胚は吻側神経外胚葉の形成には AVE, AME の形成より *Otx2* の高発現を必要とすることを示したが、その吻側神経外胚葉の異常は、吻側神経外胚葉での *Otx* 発現の完全な喪失でなく減少により、吻側神経外胚葉での *Otx2* 機能を部分的にしか現していない可能性がある (Suda et al., 1999)。λ フェージ DNA 断片を *Otx2* 3'UTR に挿入した変異マウス胚 (*Otx2^λ*) (Boyl et al., 2001)、*frit-neo* DNA を *Otx2* イントロンに挿入した変異マウス胚 (*Otx2^{frit-neo}*) (Tian et al., 2002) はいずれも hypomorphic で、同様の状態を現していると想定される。これに対し、*Otx1^{+/-}Otx2^{+/-}*, *Otx1^{-/-}Otx2^{+/-}*, *Otx2^{λ/λ}* 変異マウス胚はいずれも、その後の前脳・中脳形成における *Otx1*, *Otx2* 機能を現していると想定される (Acampora et al., 1997; Boyl et al., 2001; Suda et al., 1997)。これらの変異マウスでは前視床及び終脳は形成されるが、*Otx2*, *Otx1* 発現は完全には失われておらず、前脳・中脳形成時、終脳、前視床の形成に *Otx2*, *Otx1* 機能を必要としないかどうか明らかでない。ゼブラフィッシュでは *Otx* は前視床形成には必要でないとされている (Scholpp et al., 2007)。加えてこれら変異マウス胚は、より早い吻側神経外胚葉形成時の *Otx* 機能の部分的欠損による異常をも現している可能性がある。*Otx1*, *Otx2* 発現を減少するこれら変異マウス胚の表現型の程度は極めて不均一である。また、*Otx2/Emx2* 2重変異マウス (*Otx2^{+/-}Emx2^{-/-}*) は間脳・終脳形成におけるこ

これら遺伝子の、*Emx1/Emx2* 2重変異マウス (*Emx1^{-/-}Emx2^{-/-}*) は終脳形成におけるこれら遺伝子の必須の役割を示した (Shinozaki et al., 2002; Shinozaki et al., 2004; Suda et al., 2001)。

頭部形成の各段階、各部位での *Otx2* 機能を明確にし、それぞれでの *Otx2* 発現を制御する上流因子を同定するため、相澤等は *Otx2* 発現を調整するエンハンサーの同定を 5'上流 170kb から 3'下流 120kb の 290kb 領域に渡って網羅的に解析した (Kimura et al., 1997; Kimura-Yoshida et al., 2007; Kurokawa et al., 2004a; Kurokawa et al., 2010; Kurokawa et al., 2006; Kurokawa et al., 2004b)。その結果 *Otx2* の臓側内胚葉、吻側中内胚葉、頭部神経堤細胞での発現を司るエンハンサーはプロモーター領域の近傍に存在し (VE, CM エンハンサー)(Kimura et al., 1997; Kimura-Yoshida et al., 2007; Kurokawa et al., 2010)、エピブラストでの発現を司るエンハンサー (EP) は 92kb 上流に、吻側神経外胚葉で発現するエンハンサーは 90kb 上流 (AN エンハンサー) と 87kb 上流 (AN2 エンハンサー) に存在することが明らかとなった (参考図 2)。AN エンハンサーはエピブラスト (EP) エンハンサーも構成し、単独ではエピブラストで活性をもたないが、AN 領域を欠損すると EP エンハンサーは活性をもたない。AN エンハンサーは誘導された吻側神経外胚葉全体で発現し、その発現の後方境界は耳前溝の前方で不明瞭である。その活性は終脳原皮質を除き胎生 9.0 日迄に失われる (Kurokawa et al., 2004b)。AN2 エンハンサーの吻側神経外胚葉での活性の詳細は不明であった。AN, AN2 エンハンサーの活性が失われた後の前脳・中脳域での *Otx2* 発現は 75kb 5'上流にある FM1 エンハンサーと、115kb 3'下流にある FM2 エンハンサーによる。FM1, FM2 エンハンサーは AN, AN2 エンハンサーが活性をもつ無体節期は活性をもたず胎生 8.5 日目以降に予定前脳・中脳域で活性をもつ。その活性の後方境界は MHB と一致し、吻側では原皮質を除く終脳及び視床下部では活性をもたない (参考図 2, Kurokawa et al., 2004a; Kurokawa et al., 2006)。

VE エンハンサーのコア配列は 51bp に限局され FOXA2 がその活性を制御するこ

とが明らかにされているが、その他の上流因子は明らかでない (Kimura-Yoshida et al., 2007)。CM エンハンサーはそのコア配列として CTAATTA, TAAATCTG が同定されているが、これに結合する上流因子は未同定である (Kimura et al., 1997)。AN エンハンサーのコア配列は 165bp に限局され、アセチル化 YY1 によって制御されるがその活性を制御する主要な因子は未同定である (Takasaki et al., 2007)。AN2 エンハンサーの詳細な解析はされていない。FM1 エンハンサーは TCF、OTX 自身、POU 転写因子、GBX2 により制御される (Kurokawa et al., 2006, Inoue et al., 未発表)。FM2 エンハンサーは TCF により制御される (Kurokawa et al., 2004a)。また、VE 及び CM エンハンサーは四足動物及び総鰭類に保存されているが、条鰭類、軟骨魚、無顎類には存在しない (Kurokawa et al., 2010)。FM2 エンハンサーはほ乳類でもげっ歯類に特異的で他の動物には存在しない。FM1 エンハンサーは全ての有顎脊椎動物に保存されている。AN、AN2 エンハンサーは四足動物、総鰭類、軟骨魚には保存されているが、ポリプテルスを含む条鰭類では失われ、条鰭類では FM1 エンハンサーが AN 活性 (無体節期の吻側神経外胚葉での活性) を合わせ持つ (Kurokawa et al., 2006)。

VE, CM エンハンサー欠損マウスでは吻側神経外胚葉が誘導されない (Acampora et al., 2009)。その詳細は解析中である。*Otx2* の一方のアリルが AN エンハンサーを欠損し、他方のアリルがヌルである *Otx2*^{ΔAN/ΔAN} 胚では、吻側神経外胚葉は一旦誘導されるが、維持出来ず後脳に後方化し、AN エンハンサーの下での *Otx2* 発現は誘導された吻側神経外胚葉の後方化を防ぐことに働いている (Kurokawa et al., 2004b)。しかし AN エンハンサーをホモに欠損する *Otx2*^{ΔAN/ΔAN} 胚では吻側神経外胚葉の異常は軽微である。同胚に残存する AN2 エンハンサーの下での *Otx2* 発現で吻側神経外胚葉の後方化は阻止されると想定される。他方 FM1, FM2 エンハンサーを *Otx1* とともにそれぞれ欠損する *Otx1*^{-/-}*Otx2*^{ΔFM1/ΔFM1} 胚、*Otx1*^{-/-}*Otx2*^{ΔFM2/ΔFM2} 胚では胎生 8.5 日で吻側神経外胚葉は形成されるが、その後中脳及び前視蓋、視床が後方化して失われ

る。しかし前視床及び終脳は形成される。前視床及び終脳の後方化が起こらないのは、それぞれの胚では FM2 エンハンサーあるいは FM1 エンハンサーの下での *Otx2* 発現が残っているためか、この時期 *Otx* はこれらの領域の形成には必要でないためか明らかでない。本研究ではこの点を明らかにするため、*Otx1* とともに *Otx2* FM1, FM2 エンハンサーをともに欠損する *Otx1*^{-/-}*Otx2*^{ΔFM1ΔFM2/ΔFM1ΔFM2} 胚を作製し、前脳・中脳形成の異常を解析した。あわせて AN2 エンハンサーの活性を確認し、これを欠損する *Otx2*^{ΔAN2/ΔAN2} 胚を作製して AN2 エンハンサーの機能を確認するとともに、AN, AN2 エンハンサーをともに欠損する *Otx2*^{ΔAN ΔAN2/ΔAN ΔAN2} 胚を作製して、AN, AN2 エンハンサーの下での *Otx2* 発現が吻側神経外胚葉の後方化抑制に働くことの確認を目指した。

2. 結果

2-1. *Otx2* FM1, FM エンハンサー欠損マウスの解析

2-1-1. FM1, FM2 二重エンハンサー欠損マウス(DKO)の作製

FM1、FM2 エンハンサー制御下における *Otx2* の機能を調べる為に両方のエンハンサー領域を欠失したマウスを作製した (図 1)。

黒川等が作製した *Otx2* FM1 エンハンサー領域をネオマイシン耐性遺伝子 (neo) カセットで置き換えたホモ変異体マウス *Otx2*^{ΔFM1/ΔFM1}; (Kurokawa et al., 2004a) の胎生 3.5 日目胚から ES 細胞を樹立した。この ES 細胞に FM2 エンハンサー領域をピューロマイシン耐性遺伝子 (puro) で置き換えたノックアウトベクターを導入し、相同組み替えにより FM2 エンハンサーが puro に置き換わった ES 細胞を選抜した (図 1)。この ES 細胞を野生型胎生 3.5 日目胚に導入後、仮親に戻してキメラマウスを作製した。3 系統の独立した ES 細胞株由来のキメラマウスでジャームライントランスミッションが確認された。これらの系統を正常マウスと交配することにより、ヘテロ接合体 (*Otx2*^{ΔFM1/ΔFM2}) を得、ヘテロ接合体同士の掛け合わせにより、FM1、FM2 エンハンサーの双方を欠損したホモ接合体 (*Otx2*^{ΔFM1ΔFM2/ΔFM1ΔFM2}) を得た (図 1, 2, 4-3 項参照)。以下、*Otx2*^{ΔFM1ΔFM2/ΔFM1ΔFM2} を DKO 変異体と呼ぶ。

2-1-2. DKO の表現形解析

FM1、FM2 エンハンサーの活性が開始する胎生 8.5 日目胚における DKO の表現型を調べたが、形態的な異常は認められず *Otx1* および *Gbx2* の発現パターンも野生型

と比較して変化が見られなかった (図 2a, d, k, n)。

DKO 胎生 9.5 日胚でマーカー遺伝子の発現を観察した所、峽より前方の中脳、間脳、および終脳で発現する *Otx1* は、DKO では発現の後方境界が前方に移動し、発現領域が狭くなっている様子が観察された (図 2b, e)。それに伴い、峽より後方の後脳に発現する *Gbx2* の発現は前方へ拡張していた (図 2l, o)。終脳は形態的に、ほぼ正常であり間脳後方から中脳全体にかけて発現する *Dmbx1* の発現領域が縮小している (図 2g, i) ことから、DKO 胎生 9.5 日目胚では間脳・中脳領域が縮小していると考えられた。しかし、これらの異常は DKO 胎生 10.5 日目胚においては形態的には大部分回復してしまった (図 2c, f)。マーカー遺伝子の発現を観察した所、この時期、野生型では *Otx1* の発現は、終脳全体、間脳および中脳の前方背側と側方に発現し、中脳背側後方での発現は弱い。DKO では野生型で発現している領域の他に背側後方でも強い発現が観察された (図 2c, f に*で示す)が、依然、峽付近の後方境界は野生型に比べて若干前方に移動しており (図 2c, f)、それに伴い *Gbx2* の発現の前方境界は、若干前方に拡張していた (図 2m, p)。また *Dmbx1* の発現領域は野生型とほぼ変わらない程度に回復していたが、発現シグナルは胎生 9.5 日目同様、弱いままだった(図 2h, j)。

DKO 胎生 12.5 日胚の組織切片を観察した所、終脳では異常は認められないが、峽の狭窄が浅く小脳原基が若干前方に移動している、中脳水道が低形成である等、間脳・中脳に異常が見られた(図 2q, t)が、DKO 胎生 15.5 日,18.5 日胚では、これらの異常は回復し、形態的にはほぼ正常であった (図 2r, s, u, v)。

以上のように *Otx2* FM1, FM2 エンハンサーを欠失した DKO 変異体では、胎生 9.5 日胚において間脳・中脳領域の低形成が認められたが、その異常は発生が進行すると共に回復し、正常に誕生・成長し、妊性も正常であった。2系統の ES 細胞由来の DKO を観察したが、同様の表現型を示した。

2-1-3. *Otx1*^{-/-}*Otx2*^{ΔFM1ΔFM2/ΔFM1ΔFM2} 三重変異体 (TKO) の作製

DKO 変異体は、FM1、FM2 エンハンサーが発現活性を持つ脳の領域を完全に欠失することは無かった。この現象に *Otx2* のパラログ遺伝子 *Otx1* の相補的な働きが関与していることが考えられる。そこで *Otx1*^{+/-} と DKO ヘテロ個体の交配から、*Otx1*^{-/-}*Otx2*^{ΔFM1ΔFM2/ΔFM1ΔFM2} 変異体マウスを作製し、その表現型を解析した(図3,以下、このマウスを TKO 変異体と呼ぶ。)。TKO 胎生 12.5 日胚では、DKO と異なり、間脳と中脳が完全に欠失しており (図 3a, k)、胎生 15.5 日、胎生 18.5 日胚においても回復する事は無かった (図 3b-e, h-j, l-o, r-t)。

終脳では、胎生 12.5、15.5 日胚を通じて、新皮質の形成および、脈絡叢 (choroid plexus) (図 3l, n)の形成はほぼ正常であるが、内側皮質の低形成が認められた (図 3a-d, k-n)。海馬、歯状回、海馬采の構造は認められず、後方より Pax6 陽性 (図 3g, q) でニッスル染色により濃染 (図 3i, s) される顆粒層を持った小脳と思われる構造が、本来の間脳、中脳が形成される場所を占拠して前方に伸び、脈絡叢を通して痕跡的な内側皮質とつながっていた (図 3b, h, l, r)。延髄以外の峽 (isthmus) と橋部 (pons) も同様に前方に伸展していた。第四脳室に面している峽の細胞は過増殖して、細胞塊が形成されていた (図 3p, 矢尻部)。前脳腹側では、視床下部はほぼ正常に形成されているが、大脳核隆起 (ganglionic eminence) は肥厚していた (図 3c, m)。TKO 胎生 18.5 日胚では、大脳皮質の層形成に異常が認められる (図 3h, j, r, t) が、大脳皮質の介在ニューロンの一部は、大脳核隆起から接線方向へ移動することにより形成されることが報告されており (Pleasure et al., 2000; Shinozaki et al., 2002)、TKO では大脳核隆起より大脳皮質への接線方向の移動が阻害された結果、大脳核隆起が肥厚し、大脳皮質の層構造の異常が生じる可能性が示唆された。現在、TKO 大脳核隆起の細胞移動の異常の解析を準備中である。

2-1-4. TKO 変異体における間脳・中脳の後脳化

TKO変異体の間脳と中脳の欠損を胎生12.5日胚における各種マーカーの発現を用いて解析した (図4)。

野生型において*Tcf4*は視蓋前域 (pretectum) と視床 (thalamus) で (図4Aa)、*Gbx2*は視床で (図4Ba)、*Dlx1*と*Pax6*は視蓋前域 (pretectum) で (図4Ca, Da)、*Lhx1*は視床内境界溝 (zona limitans intrathalamica: ZLI)、前視床 (prethalamus)、視蓋前域 (pretectum)、被蓋 (tegmentum)、峡 (isthmus)、橋 (pons)、延髄 (medulla)で強く発現している(図4Ea, Fujii et al., 1994)。TKOにおいては*Tcf4*、*Gbx2*、*Dlx1*および*Pax6*の発現が欠失しており、視蓋前域 (pretectum)、視床 (thalamus)、前視床 (prethalamus)が欠失している事が示された (図4Ac, Bc, Cc, Dc)。さらに、*Wnt8b*、*Emx2*、*Pax6*および*Lhx1*陽性の視床隆起 (Thalamic eminence; 図4Fa, Ga, Da, Eaの矢印部) もTKOでは欠失していた(図4Fc, Gc, Dc, Ec)。結果として、*Lhx1*陽性の視床内境界溝、前視床、前視蓋、被蓋も同じく欠失していると考えられ、*Lhx1*陽性の峡と橋は本来間脳と中脳がある場所に形成されていた (図4Ec)。野生型においては被蓋で発現している*Emx2* (図4Ga; 矢尻部) が、TKO変異体では認められず (図4Gc)、被蓋も欠失している事が示された。*Tcf4*は前視蓋と視床に加えて、視蓋の最前方でも発現しており、TKO変異体ではその領域も欠失していた (図4Aa, c)。*EphrinA2*陽性の中脳上丘 (superior colliculus)と*Dmbx1*陽性の中脳下丘 (inferior colliculus) もTKO変異体型では欠失していた (図4Ha, c, Ia, c)。野生型において小脳原基の前方で発現している*Gbx2*、*Lhx1*および*Dmbx1* (図4Ba, Ea, Ia; 矢尻部)は、TKOにおいては拡張した小脳原基 (Cerebellar primordium)の前方部に発現していた (図4Bc, Ec, Ic; 矢尻部)。野生型の腹側では、*Lhx1*が乳頭体 (mammillary region)で、*Dlx1*は後方の脚内核 (posterior entopeduncular area)領域と視床で、*Nkx2.1*は乳頭体と視床に発現している (図4Ca, Ea, Ja)。これらの遺伝子の発現はTKO変異体でも認められたが、発現領域は明瞭で無く、

腹側における発生異常の有無に関してはさらに詳細な解析が必要である (図4Cc, Ec, Jc)。DKOにおいてはこれらのマーカー遺伝子の発現は胎生12.5日胚ではほぼ正常な発現パターンを示した (図4Ab-Jb)。

2-1-5. TKO の原皮質領域の形成異常

TKO の原皮質領域における異常を解析する為に胎生 12.5 日目におけるマーカー遺伝子の発現パターンを解析した (図 4, 5)。

胎生 12.5 日胚の TKO 変異体の終脳では *Pax6* と *Emx2* 陽性の新皮質と *Gbx2*, *Dlx1*, *Nkx2.1* 陽性の脳核隆起 (GE ; 図 4Da, Ga, Ba, Ca) は正常に発生していた (図 4Dc, Gc, Bc, Cc, Jc) が、*Emx2* 陽性の内側皮質は縮小している (図 4Ga, c)。 *TTR* と *Msx1* 陽性の脈絡叢と *TTR* 陰性で *Msx1* 陽性の終脳天井板 (choroidal roof) も TKO 変異体では縮小している (図 5Aa, c Ba, c)。内側皮質では *Wnt3a*, *Wnt8b* 遺伝子が入れ子状に発現している。野生型では *Wnt3a* は脈絡叢に近接する皮質縁 (cortical hem) に発現しているが (図 5Ca; Yoshida et al., 2006)、TKO では *Wnt3a* 陽性の皮質縁は縮小していた (図 5Cc)。また、*Wnt8b* は、野生型の内側外套において *Wnt3a* よりも広い領域に発現がみられる (図 5Da, 図 4Fa) が、TKO では *Wnt8b* 陽性の領域が非常に小さくなっていった (図 5Dc, 図 4Fc)。さらに、将来の海馬領域に *Ephb1* が発現する (図 5Ea) が、TKO では、その発現領域も非常に縮小していた (図 5Ec)。これらの異常は DKO では軽微であった (図 5A-Eb)。

内側皮質は胎生 9.0 日胚以降の、神経管が閉塞する時期より終脳背側から生じる。内側外套の発生異常がいつから生じるか解析する為に、胎生 9.5 日~10.5 日胚の終脳背側におけるマーカー遺伝子の発現と、この領域における FM1、FM2 および AN エンハンサーの活性を検討した (図 6)。

胎生 9.5 日~10.5 日胚の終脳領域において、*Otx1* は脈絡叢と脈絡膜を除く終脳背

側 (dorsal telencephalon) で (図 6A)、*Otx2* は胎生 9.5 日胚では皮質領域にて広く発現が認められるが、発生が進行するにつれ、内側に局在化し、胎生 10.5 日胚では、最も内側の領域でのみ発現が見られるようになり、皮質縁や脈絡叢、脈絡膜で発現が維持される (図 6B)。*Otx2* の FM1、FM2、AN エンハンサーを *LacZ* 遺伝子に連結したレポーター遺伝子の発現 (Kurokawa et al., 2004a; Kurokawa et al., 2004b) は、この時期の *Otx2* の内側外套での発現と重なり (図 6C-E)、これらのエンハンサーが終脳背側において *Otx2* の発現を活性化すると考えられる。TKO では *Otx2* の内側皮質での発現が著しく減少しているが、わずかな発現が認められた (図 6F)。残存している内側外套の *Otx2* の発現は AN エンハンサーによるものと思われる (図 6Eb, 図 12 参照)。また TKO において FM1, FM2, AN エンハンサーが活性を持たない終脳腹側の領域で *Otx2* の発現は維持されており、この領域の発現を司る未同定のエンハンサーの存在が示唆された (図 6 B, F)。

胎生 9.5 日胚では *Wnt8b* 陽性の内側皮質が TKO 変異体においても正常に形成されていた (図 6G, H) が、胎生 10.5 日胚では終脳背側内側の陥入が貧弱で、*Wnt3a* 陽性の皮質縁と *Wnt8b* 陽性の内側皮質が縮小している (図 6I-L)。終脳天井板で細胞死が多く起こっていることは、以前より報告されている (Shinozaki et al., 2004)。これらの異常に細胞死や細胞増殖の減少が関与している可能性を検討するため、胎生 10.0 日胚において TUNEL 検定を行ったが、TKO の内側外套の細胞において細胞死の亢進は認められなかった (データ示さず)。また BrdU の取り込み実験も行ったが、野生型と TKO 変異型の内側外套の細胞増殖に違いは認められなかった (図 7)。内側外套における異常を DKO で解析したが、その形態、およびマーカー遺伝子の発現の異常は軽微であった (図 6F-Lb)。

2-1-5. TKO における間脳・中脳の異常の開始時期

TKO の間脳・中脳の異常がいつ開始するかを調べる為に、胎生 9.5 日、8.5 日、7.8 日胚を用いてマーカー遺伝子の発現を解析した (図 8, 9)。

野生型の胎生 9.5 日胚では、*Pax6* は終脳と間脳前方で発現 (図 8Ca, Kimura et al., 2005) し、*Emx2* と *Fez1* が終脳にのみ発現している (図 8Aa, Ba, Hirata et al., 2004; Kimura et al., 2005)。TKO 変異体では、*Pax6* の発現領域が小さくなっているのに対して、*Emx2* と *Fez1* の発現領域は野生型と変わらない事から、間脳領域が欠失している事が示された (図 8A-Cc)。前脳腹側で発現する *Shh* の発現は、TKO において視床内境界溝で欠失していた (図 8D 矢印, Shimamura et al., 1995) が、腹側前脳最前方の発現は正常だった (図 8D 矢尻, Echelard et al., 1993)。野生型胚において間脳後方と中脳全体において発現している *Dmbx1* (図 8Ea, Ohtoshi et al., 2002) 陽性の領域は、TKO 変異体では完全に欠失していた (図 8Ec)。間脳と中脳の背側中央部と、中脳・後脳境界の中脳側に発現する *Wnt1* (図 8Fa, Bally-Cuif et al., 1995; Rowitch and McMahon, 1995) 陽性領域も、TKO 変異体では欠失していた。野生型において、中脳・後脳境界の後脳側で発現する *Fgf8* (図 8Ga) と *Gbx2* (図 8Ha) は、TKO 変異体においてはそれらの発現領域が大きく前方側に伸長していた (図 8Gc, H)。しかし吻側神経菱 (ANR: anterior neural ridge) での *Fgf8* の発現は変化がなかった (図 8G 矢尻)。これらの結果から、TKO 変異体においては胎生 9.5 日目胚において、すでに間脳・中脳領域が欠失している事が示された。

後脳のどの領域が前方に拡張しているのかを調べる為に、後脳に分節的に発現するマーカー遺伝子の発現を調べた。*Vgll1* 陽性の第二菱脳節 (rhombomere2) と *Hoxb1* 陽性の第四菱脳節 (rhombomere4) の位置と大きさは TKO 変異体においても変化が無かった (図 8I, J)。また野生型後脳において *Pax6*、*Wnt1* および *Gbx2* の発現は第二菱脳より後方で発現する (図 8Ca, Fa, Ha, 矢印) が、TKO においても、これらの遺伝子の発現は第二菱脳に明瞭な前方境界が認められた (図 8Cc, Fc, Hc, 矢印)。これらの結果より、第二菱脳節より後方の領域は前方へは拡張していないと考えられる。

第一菱脳節 (rhombomere1) だけで発現する良いマーカー遺伝子は見つかっていないが、峡で発現する *Fgf8* と *Gbx2* が陰性の第一菱脳節 (図 8Ga, Ha 括弧部) の領域が TKO 変異体では拡張しており (図 8Gc, Hc 括弧部)、拡張した後脳領域は第一菱脳節由来であると考えられる。

胎生 9.5 日胚での DKO では *Otx1* 陽性の前脳・中脳と *Dmbx1* 陽性の前脳後方・中脳が縮小し (図 2e, i, 図 8Eb)、*Wnt1*、*Fgf8*、*Gbx2* 陽性の峡が前方に伸長している (図 8F-Hb 図 2Bo)。*Emx2* と *Fez1* 陽性の終脳、*Pax6* 陽性の前脳前方、*Vgll1* 陽性の第一菱脳節、*Hoxb1* 陽性の第四菱脳節は明らかに正常であった (図 8Ab-Cb, Ib, Jb)。

Otx1 の発現が始まる前の胎生 7.75 日胚では、*Otx2* の神経外胚葉での発現は、FM1, FM2 エンハンサーによる制御を受けておらず、AN エンハンサーにより制御されている (参考図 2, 図 12A, Kurokawa et al., 2004a; Kurokawa et al., 2004b)。この時期の TKO 変異体 *Otx2* 陽性の前方神経外胚葉は、野生型と同様に正常に発生している (図 9Aa, c)。その後 AN エンハンサーの活性が残っている胎生 8.5 日胚でマーカー解析を行うと、いくつかの遺伝子発現パターンの異常が既に生じていた。TKO 変異体では *Six3* 陽性の最も前端の前方神経外胚葉、*Pax6* 陽性の前脳、*Emx2* 陽性の後方前脳原基は、ほぼ正常に見えた (図 9B-Dc) が、中脳原基での *Wnt1* の発現が減少し (図 9E)、*Gbx2* 陽性の後脳前端が、その発現強度の減少を伴い前方に伸長していた (図 9F, 7G)。同様に *Fgf8* の発現も強度の減少を伴い前方に伸長していた (図 9H)。野生型胚において中脳原基と後脳前方で発現する *En1* も *Fgf8* や *Gbx2* と同様に、TKO 変異体においては、発現強度が減少し発現部位の前方への移動が認められた (図 9I)。TKO 変異体では *En1* 陽性の中脳原基が縮小し、同時に *En1* 陽性の後脳の前端が前方に伸長している可能性がある。

以上の結果から、TKO 変異体に見られる間脳および中脳領域の後方化は、FM1、FM2 エンハンサーが活性を持ち始め、AN エンハンサーの活性が失われつつある胎生 8.5 日胚に始まり、胎生 9.5 日胚で完了すると考えられる。

DKO 変異体については、胎生 8.5 日胚における上記のマーカー遺伝子の発現に異常は見られなかった (図 9A-Ib)。

TKO 変異体で観察された間脳・中脳領域の後方化が、間脳・中脳原基の細胞増殖率の減少や、後脳原基での細胞増殖の増加が原因である可能性を検討する為に、胎生 9.5 日胚で BrdU の取り込み実験を行ったが、野生型と TKO で細胞増殖率に違いは認められなかった (図 10)。また間脳・中脳における細胞死の増加、後脳前端での細胞死の減少により、後方化が生じる可能性を検討する為に、TUNEL 検定を行った (BrdU の取り込み、および TUNEL 検定は図 7J a-f, a'-f' で示す領域で行った) が、野生型胚では 182 ± 65 細胞中に 1 個の TUNEL 陽性細胞が、TKO 変異体では 150 ± 37 細胞中に 1 個の TUNEL 陽性細胞が認められ、頻度としては変化が無かった (データ示さず)。

2-1-6. DKO 変異体マウスにおける間・中脳形態の回復機序

DKO 変異体では胎生 9.5 日胚の中脳領域が後脳領域へと後方化していたが、胎生 10.5 日胚ではその形態異常は回復していた (2-1-2 項参照)。TKO において胎生 9.5 日、胎生 10.5 日胚において、BrdU 取り込み実験と TUNEL 検定を行ったが、細胞増殖や細胞死に変化は認められず (図 10 参照)、この発生異常の回復は、胎生 9.5 日までに前方に伸展してきた後脳領域が、胎生 9.5 日目以降、中脳へと転換した結果と考えられる。発生異常の回復に、胎生 9.5 日以降の *Otx1*、*Otx2* 遺伝子の発現量の上昇が関与している可能性を検討する為に、DKO 変異体の各胚発生ステージにおいて定量的 RT-PCR を行った。

胎生 8.0 日胚と 9.5 日胚での *Otx1* の発現量のレベルは、野生型と DKO 変異体で変化が無かったが (図 11Aa, b)、胎生 10.5 日胚での DKO 変異体の *Otx1* の発現は間脳・中脳で若干の増加がみられた (図 11Ac)。また Whole mount in situ hybridization

でも中脳の背側での *Otx1* の発現の増加が示唆された (図.11Bc,f の *で示す領域)。

AN エンハンサーが活性をもっており、FM1, FM2 エンハンサーがまだ活性をもっていない胎生 8.0 日胚では、*Otx2* の発現レベルは野生型と TKO で変化が無い (図 11Ad) が、胎生 9.5 日胚の *Otx2* の発現レベルは、野生型に比べて TKO では約 1/4 にまで減少し (図 11Ae)、in situ hybridization による観察でも胎生 9.5 日胚の間脳・中脳領域での *Otx2* の発現は明確ではない (図 11Ba-d)。この時期 AN エンハンサーは内側外套で活性を持つ (図 6E, 図 12 参照, Kurokawa et al., 2004b)。また *Otx2* は腹側終脳でも発現があるが (図 11Be, f)、この発現活性を制御しているエンハンサー領域は未同定である。さらに *Otx2* の内中胚葉領域での発現を調節するプロモーター領域の近傍に位置する VE, CM エンハンサーもこの時期に活性を持つ (Kimura et al., 1997; Kurokawa et al., 2010)。この時期、TKO で残存している *Otx2* の発現は、FM1, FM2 以外の、これらのエンハンサーによる転写が寄与しているものだと考えられる。胎生 10.5 日胚での間脳・中脳領域での *Otx2* の発現レベルは野生型の約 70%にまで回復しており (図 11Af)、in situ hybridization による観察でも、間脳・中脳領域での著しい発現の回復が認められた (図 11Be-j)。

以上の結果から、胎生 10.5 日目以降に見られる DKO 変異体の間脳・中脳領域の異常の回復は、*Otx1/2* 遺伝子の発現が胎生 10.5 日目以降に亢進することによる可能性が示唆された。

Otx2 遺伝子の 10.5 日目以降の発現亢進の原因として、胎生 9.0 日目以降は活性を失うはずの AN エンハンサーが、FM1, FM2 エンハンサーが無くなることにより、相補的に活性を持つようになる可能性を検討した。DKO 変異体と AN エンハンサーに *LacZ* レポーターを連結した遺伝子を持つトランスジェニックマウス (図 12 参照, Kurokawa et al., 2004b) を掛け合わせ、DKO において AN エンハンサー活性が、間脳・中脳領域で活性を示すか検討したが、胎生 10.5 日胚の β ガラクトシターゼの活性は野生型と変わらず、間脳・中脳では検出されなかった (データ示さず)。したが

って、DKOにおいて観察された胎生 10.5 日目以降の *Otx2* の発現の回復に關与する FM1, FM2 以外の第三の前脳・中脳エンハンサーが存在する可能性が示唆された。

2-2. AN, AN2 エンハンサー欠損マウスの解析

胎生 7.0 日-8.5 日目胚における吻側神経外胚葉での *Otx2* 発現を担うエンハンサーとして先に 5'上流 90kb に存在する AN エンハンサーを同定, その欠損マウス *Otx2*^{ΔAN/ΔAN} を作製したところ吻側神経外胚葉での *Otx2* 発現は減少しているものの残存し、吻側神経外胚葉の発生に異常が認められなかった (Kurokawa et al., 2004b)。これらの結果から吻側神経外胚葉での *Otx2* 発現には別のエンハンサーの存在することが想定された。黒川らによって行われた *Otx2* 上流 170kb から下流 120kb の領域についてのエンハンサー検索において、胎生 7.75 日胚において吻側神経外胚葉での活性が部分的で微弱なため無視した領域として 5'上流 89kb~87kb 付近に存在する SmaI 2.2kb 断片 (図 12,13A) があったので、この領域のエンハンサー活性を詳細に調べた (以下この領域にあるエンハンサーを AN2 エンハンサーと呼ぶ)。

2-2-1. AN2 エンハンサー活性

Otx2 翻訳開始点より上流 1.8kb 領域をプロモーターとして用い、SmaI 2.2kb 断片を *LacZ* 遺伝子と連結した DNA を受精卵前核に顕微注入しトランスジェニックマウスを作製し、AN2 エンハンサー活性を各ステージで β ガラクトシターゼ活性により検索した (図 12, 13A)。プロモーターとして用いた 1.8kb 断片には、吻側中内胚葉、頭部間充織での発現活性があり、これを発現の内部指標として用いた (図 12 矢印)。AN2 エンハンサーは吻側神経外胚葉で胎生 7.5 日目では殆ど活性を示さず、胎生 7.75 日目で弱い活性を生じ、胎生 8.0 日では吻側神経外胚葉全体で強い活性を

示し、その活性は胎生 8.5 日には減弱し、胎生 9.5 日では内側皮質に強い活性を示した。すなわちその活性は AN エンハンサーより遅れて立ち上がるが、他は AN エンハンサーと極めて類似した活性を示した (図 12g-p)。

2-2-2. AN2 欠損マウスの作製

SmaI 2.2kb 断片がトランスジェニックマウスでエンハンサー活性を示したので、この領域が実際に *Otx2* の吻側神経外胚葉での発現を担うかどうかを確認するため、SmaI 2.2kb 断片を欠損した (Δ AN2) マウスを作製した (図 13A, B, 4-6 項参照)。AN エンハンサー欠損 (Δ AN) マウス (*Otx2*^{AAV/AAV}) 同様、その胎生 9.5 日目ホモ変異胚 *Otx2*^{AAV2/AAV2} で吻側神経外胚葉は正常に発生し、ホモ欠損マウスは出生後、正常に成長し、妊性も正常であった (図 14 b, e, h, 表 2-1)。*Otx2*^{+/+}ヘテロ変異でも吻側神経外胚葉は正常に発生するが、*Otx2*^{AAV/}同様 *Otx2*^{AAV2/}胚では胎生 9.5 日目胚の吻側神経外胚葉が欠損していた (図 14 c, f, Kurokawa et al., 2004b)。すなわち、AN2 エンハンサーは吻側神経外胚葉での *Otx2* 発現を担っている。

2-2-3. AN, AN2 エンハンサー 2 重欠損マウスの作製

上記の結果は吻側神経外胚葉での *Otx2* 発現に、AN, AN2 エンハンサーがともに働くことを示唆しており、このことを確認するために両エンハンサーを含む SpeI-SmaI 間の 3.2kb 領域を欠損する (Δ AN Δ AN2) 変異マウスを作製した (図 15, 4-6 項参照)。ヘテロ欠損マウス間の交配でホモ変異胚(*Otx2*^{AAV Δ AN2/AAV Δ AN2})の発生を調べたところ、予想に反し胎生 9.5, 胎生 12.5, 胎生 18.5 日目でホモ変異胚はメンデル律に従って存在し、かつ生誕することが明らかとなった (表 2-2)。しかし AN 及び AN2 単独欠損 (*Otx2*^{AAV/AAV} あるいは *Otx2*^{AAV2/AAV2}) と異なり両エンハンサー欠損胚では、

胎生 12.5 日目において中脳・間脳の各領域境界が不明瞭であり (図 13Ch)、何らかの異常が生じている可能性がある。中脳形成と間脳形成の不全は組織学的に胎生 9.5 日でより顕著であった (図 16 Ae, f)。異常は胎生 8.5 日目より生じると想定され、現在マーカーを用いて解析中である。また、胎生 8.0 日の $Otx2^{AN/AN}$, $Otx2^{AN2/AN}$, $Otx2^{ANAN2/ANAN2}$ 胚での $Otx2$ 残存発現量についても RT-PCR で決定する準備を進めている。

いずれにしろ以上の結果は、胎生 7 日-8 日の吻側神経外胚葉での $Otx2$ 発現にも更に第 3 のエンハンサー (AN3) が存在することを強く示唆する。同時に、 $Otx1$ が吻側神経外胚葉でもその形成と維持に $Otx2$ と協働している可能性もある。そこでまず $Otx1$ の胎生 7.5 日-8.5 日における吻側神経外胚葉の発現を再検討した (図 16B)。Whole mount in situ hybridization によって $Otx1$ の発現は無体節期吻側神経外胚葉で認められないが、1 体節期よりその発現が生じ、 $Otx2$ が AN、AN2 エンハンサーによって活性化される時期に $Otx1$ も共発現している事が示された。現在 $Otx1^{-/-}$ $Otx2^{ANAN2/ANAN2}$ 変異胚の表現型の解析を準備中である。

2-2-4. AN2 エンハンサー必須配列の同定

AN2 エンハンサー必須配列を同定するため deletion 解析を行っている。まず $SmaI$ 2.2kb 断片を図 17A に示すように一部が重複するように、 $SmaI$ - $BalI$ 断片 1.2kb (A 断片)と、 $XbaI$ - $SmaI$ 断片 1.1kb (B 断片) の 2 つの断片に分け、それぞれのエンハンサー活性を 2-2-1 項に述べた方法で検定したところ、A 断片には活性は全く認められず (図 17Ba, a')、B 断片にのみ前方神経外胚葉におけ活性が認められた (図 17Bb, b')。そこで B 断片を更に C,D の 2 断片に分けたところ、両者で大きく減弱した活性が認められた (図 17Bc-d')。B 断片のゲノム配列を脊椎動物間で比較したところ、保存された配列 α , β が C, D 断片それぞれに認められた (図 18)。 α 配列の保存度

は *Xenopus*, エイで低く、 α , β 両配列ともゼブラフィッシュのみならずポリプテルス、すなわち条鰭類では保存されていなかった。AN エンハンサーの活性には YY1 の結合部位が必須であるが (Takasaki et al., 2007)、AN2 α 領域は YY1 結合配列を持つ (図 18)。AN と同様に AN2 も YY1 により調節を受けるか等、更に詳細な解析を継続中である。

3 考察

FM1, FM2 エンハンサー欠損マウスは吻側脳が終脳、間脳、中脳、後脳に領域化する胎生 8.5 日-9.5 日の時期 *Otx2* と *Otx1* が協働して間脳、中脳の後脳への後方化を抑制することを示した。また、この *Otx2* 発現は FM1, FM2 エンハンサーに加え更に未同定の FM3 エンハンサーによって制御されていることが明らかとなった。新皮質、大脳核隆起と視床下部よりなる最吻側部脳はこの時期後方化シグナルに不感性となり、その発生に *Otx2*, *Otx1* を必要としなくなる。他方 AN, AN2 エンハンサー欠損マウスは、吻側胚体外（臓側）内胚葉、吻側胚体内中胚葉により誘導される胎生 8.0 日-8.5 日の吻側神経外胚葉で、その全体の後方化抑制に *Otx2* が必要で、この時期の吻側神経外胚葉での *Otx2* がある閾値以下になると全吻側神経外胚葉（予定終脳、間脳、中脳領域）が後脳域へ後方化することを明らかとした。また、この *Otx2* 発現も AN, AN2 エンハンサーの他に更に第 3 の AN3 エンハンサーによって制御されていることが示唆された。

エンハンサーを解析する主な目的は、エンハンサーを欠損させてその時期・部位に特異的な遺伝子機能を明らかにすることとともに、エンハンサーに結合して発現を制御する上流因子を同定することである。このためには必須領域を限定する必要がある。私が対象とした AN2 エンハンサーについては必須領域を 1kb にまで限局することは出来たが、これを更に限局し得るか否かについては今後の解析による。

740bp C 断片と 480bp D 断片に分けたところ、両者に微弱な活性が残り、deletion 解析によっては必須配列をこれ以上限局することは困難である。AN、FM1、FM2 エンハンサーについても、培養細胞内とは異なり生体内では、エンハンサーの必須領域を数百 bp 以下に限局することは困難であった。またその配列内に既知の転写因子の結合配列が存在する場合を除いて、初期胚の一部域について未知上流因子を同定することは困難である。FM1 エンハンサーについては *Otx*, *Tcf* 結合サイトが、FM2 エンハンサーについては *Tcf* 結合サイトがあり、それぞれがそれぞれのエンハンサー活性に必須であることが明らかとなったが、AN、AN2 エンハンサーを含め配列から結合因子を類推出来ないものについては、YY1 (AN エンハンサー)(Takasaki et al., 2007)、POU 転写因子 (FM 1 エンハンサー; Inoue et al., 未発表) が明らかにされたのみである。加えて、*Otx2* の発現はそれぞれの時期、部位で異なるエンハンサーにより制御されているのみならず、同一時期、部位の発現も複数のエンハンサーにより制御されており、当初の期待であったエンハンサーから上流遺伝子カスケードを明らかにすることは極めて困難であると結論せざるを得ない。

マウスゲノムで FM1 エンハンサーは 75kb 5' 上流に、FM2 エンハンサーは 115kb 3' 下流に、AN エンハンサーは 90kb 5' 上流、AN2 エンハンサーは 87kb 5' 上流に存在する。また、FM1 エンハンサーは全ての脊椎動物に保存されているが、FM2 エンハンサーはげっ歯類に特有である。AN、AN2 エンハンサーはポリプテルスを含む条鰭類で特異的に失われている。FM 1、FM 2 エンハンサーの間にも、AN、AN2 エンハンサーの間にも共通する特有な保存配列は無い。マウスで *Otx2* 5' 上流 170kb から 3' 下流 120kb の 300kb を探索した結果では、AN/AN2 エンハンサーあるいは FM1/FM2 エンハンサー様活性を示す領域は他に見当たらなかった。エンハンサー配列は数 Mb 離れて存在することもある (Sagai et al., 2004)。従って第 3 の AN3、FM3 エンハンサーを実験的に同定することは事実上不可能といえる。

序論で述べたこれまでの様々な *Otx2* 変異体を用いる研究は、吻側神経外胚葉、吻

側脳の発生において、*Otx2* の頭部形成の様々な時期、部位における機能の部分的欠損の累積的効果をみたもので、その表現型は個々の胚によりばらつきが大きかった。時期、部域特異的 AN、AN2 エンハンサー欠損マウスでは吻側臓側内胚葉、吻側胚体内中胚葉での *Otx2* 発現は正常で、その表現型は均一であり、誘導された吻側神経外胚葉での *Otx2* 機能を選択的に明らかにしている。同様に FM1、FM2、*Otx1* 欠損マウスでは、吻側臓側内胚葉、吻側胚体内中胚葉、吻側神経外胚葉での *Otx2* 機能は正常で、その表現型は均一であり、脳の初期領域化の時期での *Otx2* 機能を選択的に明らかにしている。本研究は、これらの変異体で吻側神経外胚葉あるいは間脳・中脳はそれぞれ狭、第一菱脳節に後方化したのであり、欠損したのではないと考える。その根拠は 1) 両変異体で発生後期に小脳、峡、橋の拡大の認められること、2) 発生初期には *Fgf8*、*Gbx 2* 陽性領域と、両陰性第一菱脳節領域の拡大の認められること、3) 細胞死、細胞増殖に変化の認められなかったことによる。しかし、欠損ではなく後方転換によることを最終的に結論するには、細胞系譜解析により、最初誘導される吻側神経外胚葉細胞あるいは予定間脳・中脳細胞が、後脳細胞となっていることを確認する必要がある。

序論で述べたこれ迄の *Otx2*、*Otx1* 変異体を用いた解析では、初期脳領域化の時期に *Otx* 遺伝子が中脳、前視蓋 (pretectum)、視床 (thalamus/dorsal thalamus) の形成に必要であることは示していたが、前視床 (prethalamus/ventral thalamus)、視床隆起 (thalamic eminence) はいずれの変異体でも形成され、*Otx2*、*Otx1* 発現はあるもののこれらの領域形成に必要であるかは不明であった。ゼブラフィッシュでは視床内境界溝 (ZLI; zona limitans interthalamica) より吻側にある前視床の形成に *Otx* 遺伝子は働かないとの報告がある (Scholpp et al., 2007)。FM1、FM2 エンハンサー、*Otx1* を欠損させた TKO 変異マウス作成による本研究の結果は、初期脳領域化の時期に *Otx* 機能を必要とする領域は中脳と前視床、視床隆起を含む全間脳領域であることを明らかとした。これはこの時期の *Otx2* 発現域と一致している。TKO 変異体には

なお未同定の FM3 エンハンサーによるものと思われる *Otx2* 発現が残っているが、この発現だけでは前視床、視床隆起の後方化も維持出来ないと想定される。前視床 (prethalamus) は視床の腹側の構造 (ventral thalamus) と考えられてきたのと同じの見地から、視床下部は従来間脳の一部として理解されてきた。しかし本研究は、視床下部を前視床より吻側の終脳レベルの腹側構造とする見解と一致する (Puelles et al., 2003)。視床下部、乳頭体の一部で発現する *Lhx1*、*Dlx1*、*Nkx2.1* の発現の解析結果は、TKO 変異体で乳頭体も発生していることを示唆し、これは乳頭体も前視床より吻側の腹側構造であるとの見解を支持する。しかし、間脳、中脳の腹側の個々の領域に対する特異的マーカーは現在のところ存在せず、TKO 変異体での腹側構造の形成の詳細は今後の解析を必要とする。但し、TKO 表現型は前後軸に沿っての後方化であり、間脳、中脳の背側構造の腹側化は認められなかった。

本研究及び黒川等による各エンハンサー欠損マウスの解析結果は、頭部形成の各部位で必要とされる *Otx* 遺伝子の発現量は発生段階順に増加することを示している。吻側臓側内胚葉、胚体内中胚葉は最少量の *Otx2* で発生・機能し、その異常は *Otx2* のホモヌル変異のみによって生じる。吻側神経外胚葉の維持に必要な *Otx2* 発現量は AN、AN2 両エンハンサー下での発現量 (*Otx2*^{AN/-, Otx2AN2/-}) では足りず、*Otx2*^{ANAN2/ANAN2} で許容範囲一杯 (その *Otx2* 残存量は RT-PCR で予備的結果では野生型の約 1/5 量) と考えられ、頭部神経堤細胞の発生異常は野生型の半分の発現量でおこる (*Otx2*^{+/-}; Matsuo et al., 1995)。また、初期脳領域化の時期、後方部ほどより多くの *Otx* を必要とし、*Otx2*^{AFM1/AFM1}、*Otx2*^{AFM2/AFM2} 変異体では中脳後方部が軽微に失われ *Otx2*^{AFM1/AFM1} *Otx1*^{+/-} では中脳の大半が、*Otx2*^{AFM1/AFM1} *Otx1*^{-/-} では視床内境界溝 (ZLI; zona limitans interthalamica) より後方部が、*Otx2*^{AFM1AFM2/AFM1AFM2} *Otx1*^{-/-} では間脳・中脳の全てが失われる。頭部形成の各部位、段階での *Otx* 必要量がこのように異なることなどがどのような意義をもち、進化的に成立したかは興味ある謎である。

原皮質 (archipallium) の各構造 (海馬, 歯状回, 海馬采) を生み出す内側皮質 (medial

pallium) は、胎生 9.0 日目頃終脳部での神経管閉鎖後形成されるが、その領域は神経管閉鎖前に既に領域化されている可能性もある。すなわち、TKO 変異体での内側皮質領域の形成不全は、中脳・間脳の後方化と同一事象の一部とも考えられる。Puelles と Rubenstein によるプロソメリックモデルは当初、この領域をプロソメアー (p)3 前視床より更に吻側の p4 と考えた (Bulfone et al., 1993; Rubenstein et al., 1998)。この考えの下では初期脳領域化の時期、中脳と p1 (前視蓋), p2 (視床), p3 (前視床), p4 (原皮質) よりなる領域が *Otx* コードの下にあり、TKO 変異体ではこの領域全体が後脳に後方化したと考えることになる。しかし TKO 変異体では胎生 9.5 日胚の予定内側皮質全体をカバーする *Wnt8b* の発現は野生型と差が無かった。今後のより詳細な解析が必要であるが、本研究では、TKO 変異体での内側皮質の形成不全は、胎生 8 日-9 日での中脳・間脳後方化とは別の、胎生 9.5 日目以降の事象と想定する。胎生 9.5 日以降も *Otx1* は内側皮質を含む全皮質で発現しつづけ、*Otx2* は AN、AN2、FM1、FM2 全てのエンハンサーの下、内側皮質でのみ発現し、*Otx1*^{-/-}, *Otx2*^{ΔAN/ΔAN}, *Otx2*^{ΔAN2/ΔAN2}, *Otx2*^{ΔFM1/ΔFM1}, *Otx2*^{ΔFM2/ΔFM2}, *Otx2*^{ΔANΔAN2/ΔANΔAN2}, *Otx2*^{ΔFM1ΔFM2/ΔFM1ΔFM2}, *Otx2*^{ΔFM1ΔFM2/ΔFM1ΔFM2}*Otx1*^{-/-} の何れもが内側皮質の形成不全を示し、それぞれのエンハンサーの下での *Otx2* 発現が内側皮質形成に関与していると考えられる。終脳で何故内側皮質のみが胎生 9.5 日以降も *Otx* 発現を必要とするのか、またその発現が何故 4 つ以上のエンハンサーにより制御されることとなったのかは謎である。また、TKO 変異体で失われた内側皮質が他の構造に転換しているのか、形成不全化、一部の領域の欠損によるのか、換言すれば内側皮質の形成に *Otx* がどのように機能しているかも今後の課題である。

DKO 変異体では胎生 9.5 日目の予定間脳・中脳は大幅に縮小しているにも関わらず、胎生 10.5 日胚では形成不全は回復した。この過程で細胞増殖、細胞死の変化は認められず、一旦後脳化した間脳・中脳域が再度前方化したと想定される。すなわち、胎生 9.5 日-10.5 日において、この領域は間脳・中脳にも後脳にも未だ転換し得ると

想定される。DKO 変異体は胎生 12.5 日目でも中脳域の一部はなお欠損しているが胎生 15.5 日迄にこれらも回復する。同変異体で *Otx2* 発現量は胎生 9.5 日で 28%程度に減少したが、胎生 10.5 日目では 65%程度に回復していた。最初の後脳への後方化は FM1、FM2 エンハンサーの欠損によって *Otx2/Otx1* 発現がある閾値以下に低下したことによって生じ、その後第 3 の FM3 エンハンサーによる発現が遅れて起こり、間脳・中脳への再前方化が起こったと考えられる。しかし、この FM3 エンハンサーによる *Otx2* 発現上昇のみでは TKO 変異体の後方化は阻止出来ないと考えられる。

本研究は、TKO 変異体で間脳・中脳は峡と第一菱脳節よりなる後脳に後方化し、これに第二菱脳節以降の領域は含まれないことを示した。*Otx2^{AAV/}*変異体で吻側神経外胚葉が後方化するのも峡と第一菱脳節であり (Kurokawa et al., 2004b)、*Otx2^{+/-}Emx2^{+/-}*変異体では間脳が失われるが補償的に峡と第一菱脳節が増大する (Suda et al., 2001)。*Otx2^{+/-}*変異体では峡より吻側部が失われる (headless, Matsuo et al., 1995)のに対し、*Cripto* ホモヌル変異体では第二菱脳節より尾部が失われ (trunkless, Ding et al., 1998)、*Otx2/Cripto* 2 重ヌル変異体で発生するのは峡と第一菱脳節のみであった (Kimura et al., 2001)。*Otx* も *Hox* も発現しない峡と第一菱脳節は哺乳動物がダイプランの基本設計において特殊な位置を占めると想定する。

以上の本研究を含む *Otx* に関する研究と体幹部形成に関する *Hox* 群遺伝子に関する研究を総合し、私は、哺乳動物吻側脳形成の基本デザインを次のように想定する。すなわち、哺乳動物の前後軸に沿った体は、*Hox* 遺伝子がコードする第二菱脳節より尾部の体幹部、*Otx* がコードする中脳より前の吻側部と、*Otx* コード、*Hox* コードの何れの支配も受けない、両者の境界、デフォルト状態として峡、第一菱脳節がある。*Otx* 及び *Hox* コードの成立しない時形成される哺乳動物の体は峡、第一菱脳節のみである (Kimura et al., 2001)。原条およびその後の尾部からの後方化シグナルによりいわゆる *Hox* コードが成立し体幹部の各部位が形成されるのに対して、*Otx* はこのシグナルを抑制して吻側脳の成立に働く。峡、第一菱脳節には *Otx*, *Hox* の何

れも発現しない何らかのメカニズムがあり、*Otx* コードが失われたとき、本来吻側脳となる領域は体幹部化することなく峡、第一菱脳節（後脳）となる（囊胚形成時、胎生 6.5 日-7.0 日）。*Hox* コードが全て失われたとき体幹部はやはり峡、第一菱脳節（後脳）となると想定する (Minoux et al., 2009; Santagati and Rijli, 2003)。吻側臓側内胚葉、吻側胚体中内胚葉により誘導された吻側神経外胚葉全体で AN、AN2、AN3 エンハンサーの下 *Otx* は後方化シグナルを抑制して後方化（峡、第一菱脳節化）抑制に働き、その喪失は吻側神経外胚葉全体をデフォルト状態である峡、第一菱脳節とする (AN、AN2 エンハンサー変異体、胎生 7.0 日-8.5 日)。引き続き初期脳領域化の時期となると、将来終脳、視床下部となる最吻側域は後方化シグナルに不感性となり その後方化抑制に *Otx* を必要としなくなる (胎生 8.5 日以降)。しかし、予定間脳・中脳領域の発生にはなお FM1、FM2、FM3 エンハンサーの下で *Otx2* 及び *Otx1* による後方化シグナル抑制が必要でその喪失は、間脳・中脳の後脳化を生じる (*Otx1*、FM1、FM2 エンハンサーTKO 変異体)。

上記の仮説の検証には多くの実験が必要とされる。峡・第一菱脳節での *Otx*、*Hox* の強制過剰発現の効果は、この部位で特異的に発現する遺伝子が同定されていないこともあり未検討課題である。*Otx* の代わりに *Hox* を強制発現するノックイン変異体の作成、体幹部で *Otx2* を過剰発現する変異マウス胚の報告例もない。ニワトリ胚を用いて予定中脳領域に *Gbx2* を過剰発現させた例 (Katahira et al., 2000)等はあるが、峡・第一菱脳節の形成に関わる分子機構は全く未知である。吻側脳と後脳の境界形成には *Otx2* と *Gbx2* の相互抑制が主要な役割を担うとの報告があるが (Nakamura and Watanabe, 2005; Ye et al., 2001)、その相互作用の分子機構の詳細も明らかでない。予定終脳域が胎生 8.5 日前後どのようにして後方化シグナルに非感受性となるか、*Otx* を必要としなくなるかも明らかでない。また、*Otx2* と協働し吻側各部位の形成に働く因子についても、間脳形成に *Emx2*、*Pax6* の働くことが示されており (Kimura et al., 2005; Suda et al., 2001)、また、終脳、中脳部域の領域決定に協働する分子とし

て *Six3*, *En1*, *En2*, *Lhx1*, *Pax3*, *Pax5* などの候補はあるものの不明である (Heimbucher et al., 2007; Kobayashi et al., 2002; Lagutin et al., 2003; Matsunaga et al., 2001; Nakamura and Watanabe, 2005; Nakano et al., 2000; Puellas et al., 2006)。 *Hox* コードの下で体幹部の各部位を形成する下流分子機構が全く未知であるのと同様、 *Otx* の下流で後脳化抑制に働く分子についても、変異体を用いた SAGE 解析 (Zakin et al., 2000)、Microarray 解析 (Montalta-He et al., 2002)、あるいは抗 OTX 抗体を用いた Chromatin immunoprecipitation などによる試みがあるものの明確な成果は無い。吻側脳各部位の形成に至る分子機構の大半は依然として未知であるが、しかし、この課題は変わらぬ哺乳動物発生の基本命題の一つであり、本研究はその解明に向けての礎になると期待する。

4. 材料と方法

4-1. 変異体マウスの飼育管理

実験に使用したマウスは全て理化学研究所実験動物飼育ガイドラインに準拠し、飼育維持を行った。

4-2. AN, FM1, FM2 エンハンサー変異体マウス

Otx2 AN KO マウス、FM1 KO マウス、FM2 KO マウスは黒川等によって作製されたものを用いた (Kurokawa et al., 2004a; Kurokawa et al., 2004b)。

4-3. *Otx2* FM FM2 エンハンサー二重変異体 (DKO) マウスの作成

Otx2 遺伝子 FM1 変異体 (図 1B) ホモ接合体同士を交配し、胎生 3.5 日胚の胚盤胞内部細胞塊より八木等の方法 (Yagi et al., 1993) に従い ES 細胞を樹立した。この ES 細胞に対して、*Otx2* 遺伝子の下流約 115kb に位置する BsmI と BamHI 間に存在する FM2 エンハンサー (参考図 2, 図 1A) をピューロマイシン耐性遺伝子に置換えたノックアウトベクター (図 1C) を電気穿孔法により導入し、八木等の方法 (Yagi et al., 1990; Yagi et al., 1993) に従い、相同組み替え体を選抜した。選抜した ES 細胞よりゲノム DNA を抽出し、XbaI 消化した DNA と図 1C に示すプローブ (ProbeB) を用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、相同組み替えが正確に起こっている事を確認し (図 1Dc)、*Otx2* DKO 変異体 ES 細胞を三系統樹立した (#3, #5, #13)。これらを胎生 3.5 日の胚盤胞にインジェクションして、仮親の子宮内にもどしてキ

メラマウスを作製したところ、#3, #5 系統より得られたキメラマウスで ES 細胞のジャームライントランスミッションを確認した。これらの系統を正常マウス(CBA)と交配することにより、二重変異体ヘテロ接合体を得た。

4-4. 二重変異体マウスの遺伝子型の決定

突然変異体の遺伝子型の同定は PCR 法により行った。図 1B, C に示す位置にプライマー、

p1: 5'-GAGCATGCTGCATCTCTGAAATACAC-3',

p2: 5'-GAGTGGCTTCTGTCTTTCCATTCCAC-3',

p3: 5'-ATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTG-3',

p4: 5'-AAGACTCTGTCATTGGGTGTGTTGC-3',

p5: 5'-TTGTCAACCTCCTCTTTGAAGAGCC-3',

p6: 5'-ACCGAAAGGAGCGCACGACCCCATG-3'

(p1-p3; 図 1B, p4-p6; 図 1C)を設計した。キメラマウスと正常マウスの交配より得られた二週齢仔の尾より抽出した DNA を鋳型に、GoTaq (promega)を用いて PCR 反応後、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、遺伝子型を決定した。p1, p2, p3 を用いて PCR を行った場合、FM1 野生型では p1 と p2 プライマーにより 856bp、FM 1 変異型では p1 と p3 プライマーによって 660bp の増幅産物が確認される(図 1Db)。p4,p5,p6 を用いて PCR を行った場合、FM2 野生型では p4 と p5 プライマーによって 279bp、FM2 変異型では p4 と p6 プライマーによって 794bp の増幅産物が確認される (図 1Dd)。なお、以下の実験に用いた胚も必要に応じて卵黄膜等の胚体外組織より抽出した DNA を鋳型として、上述の方法で遺伝子型を決定した。

4-5. *Otx1*^{-/-}*Otx2*^{ΔFM1ΔFM2/ΔFM1ΔFM2} 三重変異体 (TKO) マウスの作製

Otx1 遺伝子変異体マウスは、須田らによって作製されたものを用いた(Suda et al., 1997)。 *Otx1* 遺伝子変異体マウスのヘテロ個体を、 *Otx2*^{ΔFM1ΔFM2/ΔFM1ΔFM2} 二重変異体マウスと自然交配させ、 *Otx1*^{+/-}*Otx2*^{+/ΔFM1ΔFM2} を得、それらを交配する事により *Otx1*^{-/-}*Otx2*^{ΔFM1ΔFM2/ΔFM1ΔFM2} 三重変異体マウスを得た。 *Otx 1* の遺伝子型の決定は須田らの方法(Suda et al., 1997)に従い PCR 法により行った。

4-6. *Otx2* AN2 変異体, AN AN 2 エンハンサー二重変異体マウスの作成

TT2 ES 細胞株 (Yagi et al., 1993) に対して、 *Otx2* 遺伝子上流約 89~87kb 付近に位置する AN2 エンハンサーを含む SmaI-SmaI 間 2.2kb (参考図 2, 図 13A, B)、もしくは AN, AN2 エンハンサー双方を含む上流約 90kb~87kb に位置する SpeI-SmaI 間 3.2kb (参考図 2, 図 15 A, B) を LoxP 配列で挟んだ neomycin 耐性遺伝子に置換えたノックアウトベクター (AN2 KO Vector; 図 13B, ANAN2 KO vector; 図 15B) をそれぞれ電気穿孔法により導入し、八木等の方法 (Yagi et al., 1990, 1993) に従い、相同組み替え体を選抜した。選抜した ES 細胞よりそれぞれゲノム DNA を抽出した。AN2 KO Vector を導入した ES 細胞に関しては BstXI で、ANAN2 KO Vector を導入した ES 細胞に関しては BstEII で消化したゲノム DNA と、それぞれ図 13Ba、図 15Ba に示すプローブ(Probe C)を用いてゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行い、相同組み替えが正確に起こっている事を確認した (図 12Cb, 図 13Bb)。AN2 変異体は 3 系統 (#34, #100, #184)、ANAN2 二重変異体は 5 系統 (#25, #65, #84, #130, #143) の相同組み替え体を得た。これらを胎生 3.5 日の胚盤胞にインジェクションして、仮親の子宮内にもどしてキメラマウスを作製したところ、AN2 変異体では 2 系統(#100, #184)、ANAN2 二重変異体では 3

系統 (#25, #65, #143) のキメラマウスで ES 細胞のジャームライントランスミッションを確認できた。これらの系統を正常マウス (CBA) と交配することによりヘテロ接合体を得、以後の解析に用いた。

4-7. AN2 変異体、ANAN2 変異体マウスの遺伝子型の決定

AN2, ANAN2 変異体の遺伝子型の決定は 4-2 項と同様に PCR 法によって行った。図 13Ba、図 15Ba に示す位置にプライマー (p7-p11) を設計した。各プライマーの配列を以下に示す。

p7: 5'- TCAGCTGAAAAGCTCACACCTACAGC -3',

p8: 5'- CAAAGTCACTGGCTAAAGCAACCAGG -3',

p9: 5'- ATCTCTTCACACTGGTTTCTGACTC -3',

p10: 5'-GGCCTACACCATTAATTGCCCCACGTCC-3',

p11: 5'- GTCACGTCCTGCACGACGCGAGCT -3',

p3 (4-4 項), p7, p8 を用いて PCR を行った場合、AN 野生型では p7 と p8 プライマーにより 205bp、AN2 変異型では p3 と p8 プライマーによって 522bp の増幅産物が確認される (図 13Bc)。p9, p10, p11 を用いて PCR を行った場合、ANAN2 野生型では p9 と p10 プライマーにより 583bp、ANAN2 変異型では p9 と p11 プライマーにより 410bp の増幅産物が確認される (図 15Bc)。なお、以下の実験に用いた胚も必要に応じて卵黄膜等の胚体外組織より抽出した DNA を鋳型として、上述の方法で遺伝子型を決定した。

4-8. RNA in situ ハイブリダイゼーション

Wilkinson らの方法 (Wilkinson and Nieto, 1993) に従い、ジゴキシゲニン (DIG) 標識したアンチセンス一本鎖 RNA をプローブに用いて In situ ハイブリダイゼーションを行った。

Whole-mount in situ ハイブリダイゼーション (WISH) に用いる胎生 7.5~胎生 9.5 日胚は、4%PFA で 4°Cにおいて約 14 時間固定した。固定後の胚は、PBST (PBS + 0.1% Tween20) で洗浄し、メタノール希釈系列で最終的に 100%メタノールに置換し -20°Cにて保存した。

Section in situ hybridization に用いる胎生 9.5~胎生 12.5 日胚は、上記のように 4%PFA で固定後、PBS にて洗浄し、エタノール希釈系列で 100%エタノールに置換した。次に安息香酸メチル、ベンゼンにて透徹し、60°Cのパラフィン (PARAPURAST PLUS, McCormick) に入れ、4 回交換の後に包埋し、ミクロトーム (HM355S, MICROM) を用いて 10 μ m の切片を作製した。切片は DEPC 処理した MilliQ 水を滴下したスライドグラスに乗せて、4 2°Cで伸展させた。

In situ ハイブリダイゼーションに用いた RNA probe は表 1 に示す。

4-9. トランスジェニックマウスと β ガラクトシターゼ染色

AN, FM, FM2 エンハンサーの活性により LacZ レポーター遺伝子を発現するトランスジェニックマウスは黒川等によって作成されたものを用いた (Kurokawa et al., 2004a; Kurokawa et al., 2004b)。 *Otx2* 遺伝子上流-92kb から-77kb に位置する XhoI 消化によって得られる 15kb の AN, AN2 エンハンサーを含む DNA 断片、上流-77kb から-68kb に位置する ClaI/XhoI 消化によって得られる 10kb の FM1 エンハンサーを含む DNA 断片、下流+106kb から+116kb に位置する MluI/NotI 消化によって得られる FM2 エンハンサーを含む DNA 断片を、それぞれ *Otx2* の翻訳開始点から 1.8kb よ

り成るプロモーターLacZ 遺伝子 (1.8k-LacZ ; Kimura et al., 1997) の上流に連結した DNA 構築を持つトランスジェニックマウス (Kurokawa et al., 2004a; Kurokawa et al., 2004b) と、正常マウス (ICR) を交配して得られた胎生 10.5、12.5 日胚を用いて、木村らの方法 (Kimura et al., 1997; Kimura et al., 2000) に従って β ガラクトシターゼ染色を行った。

4-10. AN2 エンハンサー活性の必須配列の決定

AN2 エンハンサー活性を持つ SmaI-SmaI 2.2kb を図 17A のように断片化した。C, D 領域を分割する適当な制限酵素サイトが無かったため図 17A の矢印で示すプライマー (AN2-F, AN2-R) を設計し、B 断片 (XbaI-SmaI 1077bp) を pBluescript II SK(+)の XbaI-SmaI 間にサブクローニングしたプラスミドを鋳型として、C 断片を M13Reverse プライマー (5'- GCGGATAACAATTCACAC-3') と AN2-R プライマー (5'- CAGGGAGTTGTTTTAAATCT-3') で、D 断片を M13Forward プライマー (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') と AN-F プライマー (5'-CCCTAAGGACAAGAGATGCC-3') で PCR 増幅した。得られた各断片を 1.8kb-LacZ の上流に連結してレポーター遺伝子を作成した。それぞれのレポーターを雌性前核にマイクロインジェクションした受精卵を仮親の子宮に戻した後、胎生 7.8 日目で解剖した。得られた胚体は 4-9 項の方法で β ガラクトシターゼ染色を行い、卵黄囊より抽出したゲノム DNA を鋳型として LacZ レポーター遺伝子の SV40polyA 領域を標的とする SV40F プライマー (5'-CCCTAAGGACAAGAGATGCC-3') と SV40R プライマー (5'- TCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCA-3') を用いて PCR を行って遺伝子の導入の有無を確認した。

AN2 相同領域のニワトリ (*Gallus gallus*)、ニシツメガエル (*Xenopus tropicalis*)、トラフグ (*Takifukgu rubripes*) ゲノム配列は UCSC Genome Browser

(<http://genome.ucsc.edu/index.html?org=Mouse&db=mm5&hgsid=35066732>) より得た。シーラカンス (*Latimeria menadoensis*)、ポリプテルス (*Polypterus senegalus*)、エイ (*Raja eglanteria*) のゲノム配列は黒川等によって決定されたそれぞれの *Otx2* 遺伝子座を含む BAC クローンの塩基配列より得た (Kurokawa et al., 2006, 未発表)。配列の相同性は mVISTA (Mayor et al., 2000)、ClustalW (Thompson et al., 1994) を、YY1 の結合配列は TFSEARCH (Heinemeyer et al., 1998) プログラムを用いて解析した。

4-11. 組織学的解析

胎生 12.5~18.5 日目で冷却した PBS 中で解剖を行い、胎生 12.5 日胚は頭部のみを切断し、胎生 15.5, 18.5 日胚は脳組織だけを取り出し、ブアン固定もしくはカルノア固定を 12 時間~48 時間行った。その後エタノール希釈系列で最終的に 100%エタノールに置換した。次に安息香酸メチル、ベンゼンにて透徹した。最後に 60°C のパラフィン (PARAPURAST PLUS, McCormick) に入れ、4 回の交換の後に包埋した。包埋後の試料よりマイクロトーム (HM355S MICROM international) を用いて 10 μ m の切片を作製し、42°C の伸展機上で伸展させ、プレパラート上に固定した。その後切片はパラフィンをキシレンで除去し、エタノール段階希釈系列で再水和し、マイヤー・ヘマトキシリン、エオシン染色もしくはクレシルバイオレットで染色した。次にエタノールの段階希釈系列、キシレンで脱水し、非水溶性封入剤 (マリノール, 武藤化学) にて封入し永久標本とした。作製した標本は、正立型顕微鏡 (DMR AZ, Leica) にて観察および画像の取得を行った。

4-12. 細胞増殖の検出 (BrdU 取り込みアッセイ)

交配後に臍栓を確認した胎生 9.5 日胚を妊娠した雌マウスに対して 50mg/kg 体重の BrdU を腹腔内投与し、30 分後に解剖した。得られた胚は 4-11 項の方法でパラフィン包埋し、8 μ m の切片を作製した。その後パラフィンをキシレンで除去し、エタノール段階希釈系列にて再水和した。次に 10mM クエン酸 (pH6.0) で処理し、室温にて 30 分静置した。次に MiliQ 水で洗浄し、0.3% H₂O₂ / メタノールで 30 分室温処理した。

BrdU を検出する為の 1 次抗体反応は、マウスのモノクローナル抗 BrdU 抗体 (BD Pharmingen) を 1000 倍希釈して用いた。ブロッキングおよび 2 次抗体反応は M.O.M kit (VECTOR) を用いて、キットの説明書に従って行った。

染色は NovaRED (VECTOR) を添付の説明書に従って行った。染色後 BrdU 陰性細胞を HEMATOXYLIN QS を用い 10~30 秒室温にて反応させ核染色した。その後流水にて発色、洗浄し、エタノール希釈系列とキシレンにて脱水し、非水溶性封入剤 (マリノール, 武藤化学) にて封入した。

4-13. 細胞死の検出 (TUNEL アッセイ)

胎生 9.5 日胚を 4-11 項の方法で切片にし、キシレンで脱パラフィンを行った後に再水和して PBS で洗浄した。次に試薬の細胞への浸透性を高める為に、0.5% Triton X-100 / PBS 中にて室温 10 分間静置した。次に内在性の HRP の活性を失活させるために、3% H₂O₂ / PBS にて室温 5 分間静置した。

TUNEL アッセイは ApopTag[®] Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (CHEMICON INTERNATIONAL) を用い、付属の説明書に従って行った。染色は DAB を用い、染色後は流水中で洗浄した後、TUNEL 陰性細胞を HEMATOXYLIN QS を用い 10~30 秒室温にて反応させ核染色した。その後流水にて発色、洗浄し、エタノール希釈系列とキシレンにて脱水し、非水溶性封入剤 (マリノール, 武藤化学) に

て封入した。

4-14. 細胞増殖および細胞死の測定

BrdU の取り込みおよび TUNEL アッセイを行い得られた標本は、正立型顕微鏡 (DMR AZ, Leica) を用いて観察し、画像を取得した。画像は Adobe Photoshop CS にて画像サイズを処理し、画像解析ソフト image J cell counter を用いて細胞数を測定した。

4-15. 定量的 RT-PCR 法による遺伝子発現解析

Otx2^{AFM1ΔFM2/ΔFM1ΔFM2} 二重変異体マウスを交配し、臍栓を確認した雌を胎生 8.5 日、9.5 日目で解剖し、胎生 8.5 日胚は頭部と体幹部に、胎生 9.5 日胚は終脳と間脳・中脳部分と体幹部に切り分け (図 2b, c, e, f 参照)、それぞれから RNeasy® Plus Micro (QIAGEN) を用いて、添付説明書に従って total RNA の抽出を行った。コントロールとして野生型 C57/BL6 から同様の作業で total RNA を抽出した。得られた RNA は変性ゲル電気泳動を行い、分解が無いことを確認した後、分光光度計 (NANO DROP 2000; Thermo Fisher Scientific) を用いて定量し、終濃度を 25ng/μl に合わせた。得られた total RNA 250ng を鋳型とし、OligodT プライマーにより SuperscriptIII (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、柴田等の方法 (Shibata et al., 2008) により定量的 RT-PCR を行った。定量的 RT-PCR 及びデータ解析には ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System を用いた。PCR に用いたプライマーはそれぞれの遺伝子の 3'UTR を含む最終エクソンに設計した。プライマー配列を以下に示す。

Otx2 forward: (5'-CAATGTCCCAGGCTCATTCA-3')

Otx2 reverse: (5'-TCAGTGCCAACTACCTGTTGGT-3')

Otx1 forward: (5'-GGAGACGGACTGCCTTACATC-3')

Otx1 reverse: (5'-TGCGGAGAGTACCTGTGTACC-3')

Tbp forward: (5'-GTGATGTGAAGTTCCCCATAAGG-3')

Tbp reverse: (5'-CTACTGAACTGCTGGTGGGTCA-3')。

謝辞

本研究は、理化学研究所 神戸発生・再生科学総合研究センター、ボディプラン研究グループで行いました。この様なすばらしい研究環境で研究を出来る機会を与えて下さった、相澤慎一教授に感謝いたします。相澤教授には指導教官として研究に関する事以外にも、色々と心配をかけました、最後まであきらめる事なく私を叱咤激励して下さい本当にありがとうございました。奈良先端科学技術大学院大学、分子発生生物学座の高橋淑子教授は、研究やそれ以外においても常にネガティブな思考に陥り落ち込む私を、ポジティブな方向へと導いて下さいました。本当に感謝しております。また博士論分の審査員をして下さいました、別所康全教授、中島欽一教授、石田靖雅准教授にお礼申し上げます。本研究の礎を築かれた黒川大輔博士、高崎延佳博士には、分子生物学的バックグラウンドの無い私に、実験手技や知識を丁寧に教えて頂きました。特に黒川大輔博士には、博士論文の作成にあたり年末年始を問わずアドバイスを頂きました。本当にありがとうございました。当研究室の柴田幹人博士、星野秀治博士には **QPCR** 実験について、田尾嘉誉博士には **BrdU** と **TUNEL** 実験についてお世話になりました。切片 **in situ** 実験や脳の解剖学的なアドバイスでは須田容子博士、吉田道生博士に大変お世話になりました。平野真理子博士には **RNA** プローブを提供して頂きました。画像解析や編集に関しては、竹内雅貴博士にいろいろとアドバイスを頂きました。エンハンサー解析に関しては、井上詞貴博士に相談に乗って頂きました。あらためてお礼申し上げます。ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスの作製では、変異マウス開発チームの清成寛博士、阿部高也さん、井上健一さんに協力をして頂きました。またマウスの世話や分与ではテクニカルスタッフの梶川絵里子さん、動物実験支援ユニットの皆様に大変お世話になりました。この場を借りてお礼申し上げます。研究以外の事務的な事全般では、秘書の佐井藤紗代さんに色々とお世話になりました。研究室のスタッフの方や理研神戸 **CDB** の友人達には日夜となくディスカッションにおつきあい頂いたり、アドバイスを頂いたりしました。皆様本当にありがとうございました。

参考文献

Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., Briata, P., Corte, G., and Simeone, A. (1998). Visceral endoderm-restricted translation of Otx1 mediates recovery of Otx2 requirements for specification of anterior neural plate and normal gastrulation. *Development* *125*, 5091-5104.

Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., and Simeone, A. (1997). Genetic control of brain morphogenesis through Otx gene dosage requirement. *Development* *124*, 3639-3650.

Acampora, D., Di Giovannantonio, L.G., Di Salvio, M., Mancuso, P., and Simeone, A. (2009). Selective inactivation of Otx2 mRNA isoforms reveals isoform-specific requirement for visceral endoderm anteriorization and head morphogenesis and highlights cell diversity in the visceral endoderm. *Mech Dev* *126*, 882-897.

Bally-Cuif, L., Cholley, B., and Wassef, M. (1995). Involvement of Wnt-1 in the formation of the mes/metencephalic boundary. *Mech Dev* *53*, 23-34.

Boyl, P.P., Signore, M., Acampora, D., Martinez-Barbera, J.P., Ilengo, C., Annino, A., Corte, G., and Simeone, A. (2001). Forebrain and midbrain development requires epiblast-restricted Otx2 translational control mediated by its 3' UTR. *Development* *128*, 2989-3000.

Bulfone, A., Puellas, L., Porteus, M.H., Frohman, M.A., Martin, G.R., and Rubenstein, J.L. (1993). Spatially restricted expression of Dlx-1, Dlx-2 (Tes-1), Gbx-2, and Wnt-3 in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *J Neurosci* *13*, 3155-3172.

Ding, J., Yang, L., Yan, Y.T., Chen, A., Desai, N., Wynshaw-Boris, A., and Shen, M.M. (1998). Cripto is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo. *Nature* *395*, 702-707.

Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* *75*, 1417-1430.

Fujii, T., Pichel, J.G., Taira, M., Toyama, R., Dawid, I.B., and Westphal, H. (1994). Expression patterns of the murine LIM class homeobox gene *lim1* in the developing brain and excretory system. *Dev Dyn* 199, 73-83.

Heimbucher, T., Murko, C., Bajoghli, B., Aghaallaei, N., Huber, A., Stebegg, R., Eberhard, D., Fink, M., Simeone, A., and Czerny, T. (2007). *Gbx2* and *Otx2* interact with the WD40 domain of Groucho/Tle corepressors. *Mol Cell Biol* 27, 340-351.

Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kel, A.E., Kel, O.V., Ignatieva, E.V., Ananko, E.A., Podkolodnaya, O.A., Kolpakov, F.A., *et al.* (1998). Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* 26, 362-367.

Hirata, T., Suda, Y., Nakao, K., Narimatsu, M., Hirano, T., and Hibi, M. (2004). Zinc finger gene *fez*-like functions in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons. *Dev Dyn* 230, 546-556.

Ingham, P.W. (1988). The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* 335, 25-34.

Katahira, T., Sato, T., Sugiyama, S., Okafuji, T., Araki, I., Funahashi, J., and Nakamura, H. (2000). Interaction between *Otx2* and *Gbx2* defines the organizing center for the optic tectum. *Mech Dev* 91, 43-52.

Kimura, C., Shen, M.M., Takeda, N., Aizawa, S., and Matsuo, I. (2001). Complementary functions of *Otx2* and *Cripto* in initial patterning of mouse epiblast. *Dev Biol* 235, 12-32.

Kimura, C., Takeda, N., Suzuki, M., Oshimura, M., Aizawa, S., and Matsuo, I. (1997). Cis-acting elements conserved between mouse and pufferfish *Otx2* genes govern the expression in mesencephalic neural crest cells. *Development* 124, 3929-3941.

Kimura, C., Yoshinaga, K., Tian, E., Suzuki, M., Aizawa, S., and Matsuo, I. (2000). Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals. *Dev Biol* 225, 304-321.

Kimura, J., Suda, Y., Kurokawa, D., Hossain, Z.M., Nakamura, M., Takahashi, M., Hara, A., and Aizawa, S. (2005). *Emx2* and *Pax6* function in cooperation with *Otx2* and *Otx1* to

develop caudal forebrain primordium that includes future archipallium. *J Neurosci* 25, 5097-5108.

Kimura-Yoshida, C., Tian, E., Nakano, H., Amazaki, S., Shimokawa, K., Rossant, J., Aizawa, S., and Matsuo, I. (2007). Crucial roles of *Foxa2* in mouse anterior-posterior axis polarization via regulation of anterior visceral endoderm-specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5919-5924.

Kobayashi, D., Kobayashi, M., Matsumoto, K., Ogura, T., Nakafuku, M., and Shimamura, K. (2002). Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. *Development* 129, 83-93.

Kurokawa, D., Kiyonari, H., Nakayama, R., Kimura-Yoshida, C., Matsuo, I., and Aizawa, S. (2004a). Regulation of *Otx2* expression and its functions in mouse forebrain and midbrain. *Development* 131, 3319-3331.

Kurokawa, D., Ohmura, T., Ogino, H., Takeuchi, M., Inoue, A., Inoue, F., Suda, Y., and Aizawa, S. (2010). Evolutionary origin of the *Otx2* enhancer for its expression in visceral endoderm. *Dev Biol* 342, 110-120.

Kurokawa, D., Sakurai, Y., Inoue, A., Nakayama, R., Takasaki, N., Suda, Y., Miyake, T., Amemiya, C.T., and Aizawa, S. (2006). Evolutionary constraint on *Otx2* neuroectoderm enhancers-deep conservation from skate to mouse and unique divergence in teleost. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19350-19355.

Kurokawa, D., Takasaki, N., Kiyonari, H., Nakayama, R., Kimura-Yoshida, C., Matsuo, I., and Aizawa, S. (2004b). Regulation of *Otx2* expression and its functions in mouse epiblast and anterior neuroectoderm. *Development* 131, 3307-3317.

Lagutin, O.V., Zhu, C.Q.C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puelles, L., Russell, H.R.C., McKinnon, P.J., Solnica-Krezel, L., and Oliver, G. (2003). *Six3* repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev* 17, 368-379.

Matsunaga, E., Araki, I., and Nakamura, H. (2001). Role of *Pax3/7* in the tectum regionalization. *Development* 128, 4069-4077.

Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N., and Aizawa, S. (1995). Mouse *Otx2*

functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev* 9, 2646-2658.

Mayor, C., Brudno, M., Schwartz, J.R., Poliakov, A., Rubin, E.M., Frazer, K.A., Pachter, L.S., and Dubchak, I. (2000). VISTA : visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length. *Bioinformatics* 16, 1046-1047.

McGinnis, W., and Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.

Minoux, M., Antonarakis, G.S., Kmita, M., Duboule, D., and Rijli, F.M. (2009). Rostral and caudal pharyngeal arches share a common neural crest ground pattern. *Development* 136, 637-645.

Montalta-He, H., Leemans, R., Loop, T., Strahm, M., Certa, U., Primig, M., Acampora, D., Simeone, A., and Reichert, H. (2002). Evolutionary conservation of otd/Otx2 transcription factor action: a genome-wide microarray analysis in *Drosophila*. *Genome Biol* 3, RESEARCH0015.

Nakamura, H., and Watanabe, Y. (2005). Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon. *Int J Dev Biol* 49, 231-235.

Nakano, T., Murata, T., Matsuo, I., and Aizawa, S. (2000). OTX2 directly interacts with LIM1 and HNF-3beta. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 64-70.

Ohtoshi, A., Nishijima, I., Justice, M.J., and Behringer, R.R. (2002). Dmbx1, a novel evolutionarily conserved paired-like homeobox gene expressed in the brain of mouse embryos. *Mech Dev* 110, 241-244.

Pleasure, S.J., Anderson, S., Hevner, R., Bagri, A., Marin, O., Lowenstein, D.H., and Rubenstein, J.L. (2000). Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron* 28, 727-740.

Puelles, E., Acampora, D., Gogoi, R., Tuorto, F., Papalia, A., Guillemot, F., Ang, S.L., and Simeone, A. (2006). Otx2 controls identity and fate of glutamatergic progenitors of the thalamus by repressing GABAergic differentiation. *J Neurosci* 26, 5955-5964.

Puelles, E., Acampora, D., Lacroix, E., Signore, M., Annino, A., Tuorto, F., Filosa, S., Corte, G., Wurst, W., Ang, S.L., *et al.* (2003). Otx dose-dependent integrated control of

antero-posterior and dorso-ventral patterning of midbrain. *Nat Neurosci* 6, 453-460.

Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R.R., Le Meur, M., and Ang, S.L. (1998). Sequential roles for *Otx2* in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development* 125, 845-856.

Rowitch, D.H., and McMahon, A.P. (1995). *Pax-2* expression in the murine neural plate precedes and encompasses the expression domains of *Wnt-1* and *En-1*. *Mech Dev* 52, 3-8.

Rubenstein, J.L., Shimamura, K., Martinez, S., and Puelles, L. (1998). Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu Rev Neurosci* 21, 445-477.

Sagai, T., Masuya, H., Tamura, M., Shimizu, K., Yada, Y., Wakana, S., Gondo, Y., Noda, T., and Shiroishi, T. (2004). Phylogenetic conservation of a limb-specific, cis-acting regulator of Sonic hedgehog (*Shh*). *Mamm Genome* 15, 23-34.

Santagati, F., and Rijli, F.M. (2003). Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nat Rev Neurosci* 4, 806-818.

Scholpp, S., Foucher, I., Staudt, N., Peukert, D., Lumsden, A., and Houart, C. (2007). *Otx11*, *Otx2* and *Irx1b* establish and position the ZLI in the diencephalon. *Development* 134, 3167-3176.

Shibata, M., Kurokawa, D., Nakao, H., Ohmura, T., and Aizawa, S. (2008). MicroRNA-9 modulates Cajal-Retzius cell differentiation by suppressing *Foxg1* expression in mouse medial pallium. *J Neurosci* 28, 10415-10421.

Shimamura, K., Hartigan, D.J., Martinez, S., Puelles, L., and Rubenstein, J.L. (1995). Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121, 3923-3933.

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, 3479-3492.

Shinozaki, K., Yoshida, M., Nakamura, M., Aizawa, S., and Suda, Y. (2004). *Emx1* and *Emx2* cooperate in initial phase of archipallium development. *Mech Dev* 121, 475-489.

Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., and Boncinelli, E. (1992a). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 358, 687-690.

Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M.R., Nigro, V., and Boncinelli, E. (1993). A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J* 12, 2735-2747.

Simeone, A., Gulisano, M., Acampora, D., Stornaiuolo, A., Rambaldi, M., and Boncinelli, E. (1992b). Two vertebrate homeobox genes related to the *Drosophila* empty spiracles gene are expressed in the embryonic cerebral cortex. *EMBO J* 11, 2541-2550.

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, 2433-2450.

Suda, Y., Matsuo, I., and Aizawa, S. (1997). Cooperation between *Otx1* and *Otx2* genes in developmental patterning of rostral brain. *Mech Dev* 69, 125-141.

Suda, Y., Nakabayashi, J., Matsuo, I., and Aizawa, S. (1999). Functional equivalency between *Otx2* and *Otx1* in development of the rostral head. *Development* 126, 743-757.

Svingen, T., Spiller, C.M., Kashimada, K., Harley, V.R., and Koopman, P. (2009). Identification of suitable normalizing genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in fetal mouse gonads. *Sex Dev* 3, 194-204.

Takasaki, N., Kurokawa, D., Nakayama, R., Nakayama, J., and Aizawa, S. (2007). Acetylated YY1 regulates *Otx2* expression in anterior neuroectoderm at two cis-sites 90 kb apart. *EMBO J* 26, 1649-1659.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994). Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

Tian, E., Kimura, C., Takeda, N., Aizawa, S., and Matsuo, I. (2002). *Otx2* is required to

respond to signals from anterior neural ridge for forebrain specification. *Dev Biol* 242, 204-223.

Wilkinson, D.G., and Nieto, M.A. (1993). Detection of Messenger-Rna by in-Situ Hybridization to Tissue-Sections and Whole Mounts. *Guide to Techniques in Mouse Development* 225, 361-373.

Yagi, T., Ikawa, Y., Yoshida, K., Shigetani, Y., Takeda, N., Mabuchi, I., Yamamoto, T., and Aizawa, S. (1990). Homologous recombination at c-fyn locus of mouse embryonic stem cells with use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9918-9922.

Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y., Nada, S., Yoshida, M., Tsukada, T., Saga, Y., Takeda, N., Ikawa, Y., and Aizawa, S. (1993). A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Anal Biochem* 214, 70-76.

Ye, W.L., Bouchard, M., Stone, D., Liu, X.D., Vella, F., Lee, J., Nakamura, H., Ang, S.L., Busslinger, M., and Rosenthal, A. (2001). Distinct regulators control the expression of the mid-hindbrain organizer signal FGF8. *Nat Neurosci* 4, 1175-1181.

Yoshida, M., Assimacopoulos, S., Jones, K.R., and Grove, E.A. (2006). Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order. *Development* 133, 537-545.

Zakin, L., Reversade, B., Virlon, B., Rusniok, C., Glaser, P., Elalouf, J.M., and Brulet, P. (2000). Gene expression profiles in normal and *Otx2*^{-/-} early gastrulating mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14388-14393.

遺伝子名	プロンプト長	プラスミドベクター	制限酵素サイト及びRNA polymeraseの種類	提供者	Reference
<i>Dlx1</i>	0.24kb	pBluescript II	BamHI / T7	Dr J.L. Rubenstein/University of California at San Francisco	Bulfone et al., 1993.
<i>Dmbx1</i>	1.6kb	pGEM-Teasy	Sall / T7	宮本敏伸博士/NIH(現 旭川医科大学)	Myamoto et al., 2002.
<i>Emx2</i>	0.3kb	pBluescript II	HindIII / T3	吉田道生博士/理研ODB	Yoshida et al., 1997.
<i>En1</i>	0.6kb	pBluescript II	HindIII / T7	嶋村健児博士/熊本大学	Davis and Joyner., 1988
<i>Epib1</i>	0.5kb	pT73D-Pacl	EcoRII / T3	IMAGE Clone ID: AA058194	Liehl et al., 2003
<i>EphraA2</i>	1.6kb	pBluescript	HindIII / T3	Dr J. Brodie / National Institute for Medical Research	Fenniken et al., 1996.
<i>Fez1</i>	0.7kb	pSP72	EcoRI / SP6	日比正彦博士/理研ODB(現 名古屋大学)	Hirata et al., 2004.
<i>Fgf8</i>	0.8kb	pBluescript II	SnaI / T7	Dr G. R. Martin/University of California at San Francisco	Crossley and Martin., 1995.
<i>Gbx2</i>	1.0kb	pBluescript	HindIII / T7	Dr M. A. Frohman / UNIV medical center stony brook	Bulfone et al., 1993.
<i>Hoxb1</i>	0.3kb	pBluescript	XbaI / T7	松尾勲博士/熊本大学(現 大阪府立母子保健総合医療センター研究所)	Kimura et al., 2001.
<i>Lhx1 (Lim1)</i>	2.5kb	pBluescript II	XhoI / T7	Dr B.L. Hogan/Duke University Medical Center	Fujii et al., 1994
<i>Msx1</i>	0.5kb	pBluescript II	EcoRI / T3	篠崎恒二博士 / 熊本大学	Hill et al., 1989.
<i>Nkx2.1</i>	1.4kb	pGEM3Z	EcoRI / SP6	Dr F. J. Gonzalez / National Institutes of Health	Kimura et al., 1996.
<i>Otx1</i>	0.7kb	pSP72	EcoRII / SP6	松尾勲博士/熊本大学(現 大阪府立母子保健総合医療センター研究所)	Suda et al., 1997.
<i>Otx2</i>	0.8kb	pSP72	BamHI / SP6	松尾勲博士/熊本大学(現 大阪府立母子保健総合医療センター研究所)	Matsuo et al., 1995.
<i>Pax6</i>	0.26kb	pBluescript	EcoRI / T3	Dr P. Gruss/ Max Plank Institute	Waltner and Gruss., 1991.
<i>Shh</i>	2.6kb	pBluescript II	EcoRI / T7	Dr A. McMahon / Harvard University	Echelard et al., 1993.
<i>Six3</i>	0.65kb	pBluescript II	XbaI / T7	Dr G. Oliver/St. Jude Children's Research Hospital	Oliver et al., 1995.
<i>Tcf4</i>	0.35kb	pBluescript	HindIII / T3	Dr M.Z. Hossain/ 熊本大学	Korinek, et al., 1998.
<i>TTR</i>	0.8kb	pBluescript II	PstI / T3	山村研一博士/熊本大学	Wakasugi et al., 1985.
<i>Vgll1</i>	1.5kb	pBluescript II	XhoI / T3	平野真理子博士/理研ODB	unpublished
<i>Wnt1</i>	0.45kb	pGem4	HindIII / SP6	Dr A. McMahon / Harvard University	McMahon and Bradley., 1990.
<i>Wnt3a</i>	0.75kb	pGem3zf	EcoRI / SP6	Dr R. Nusse / Stanford University School of Medicine	Roelink and Nusse., 1991.
<i>Wnt8b</i>	0.5kb	pCMV-SPORT2	Sall / T7	IMAGE Clone ID: AA170920	Lee et al., 2000.

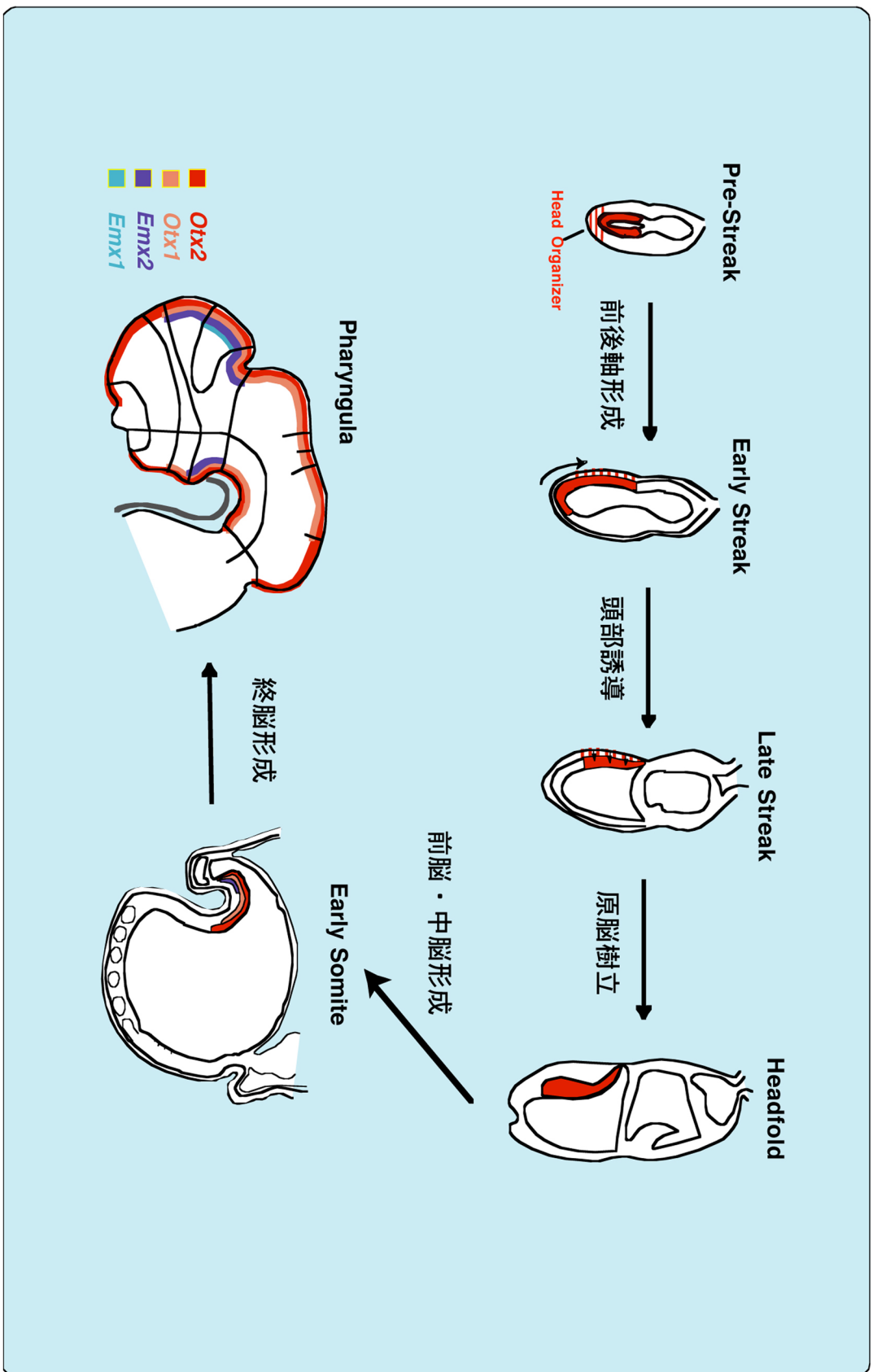
表1. in situ ハイブリダイゼーションに用いた遺伝子の一覧表

表 2-1. AN2 欠損マウスの胚及び出生仔の遺伝子型

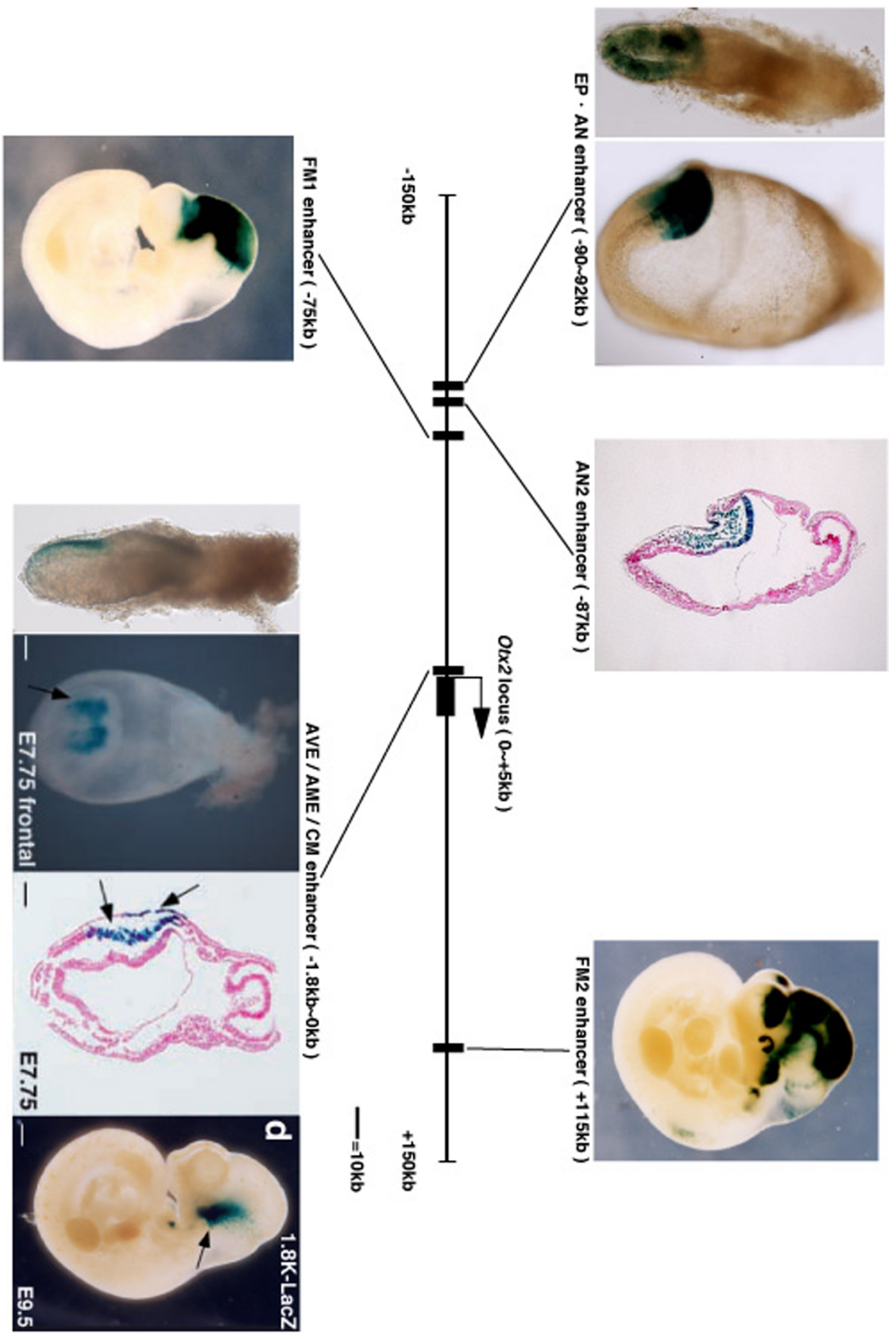
	-/-	+/-	+/+
胎生 8.5 日胚	18	42	10
胎生 9.5 日胚	14	35	19
胎生 12.5 日胚	9	31	8
胎生 15.5 日胚	3	9	5
離乳後マウス	15	30	19
合計	59 (22.1%)	147 (55.1%)	61 (22.8%)

表 2-2. ANAN2 二重欠損マウスの胚及び出生仔の遺伝子型

	-/-	+/-	+/+
胎生 8.5 日胚	4	7	1
胎生 9.5 日胚	3	4	2
胎生 12.5 日胚	2	6	3
胎生 18.5 日胚	1	2	2
離乳後マウス	1	3	2
合計	11 (25.6%)	22 (51.2%)	10 (23.3%)

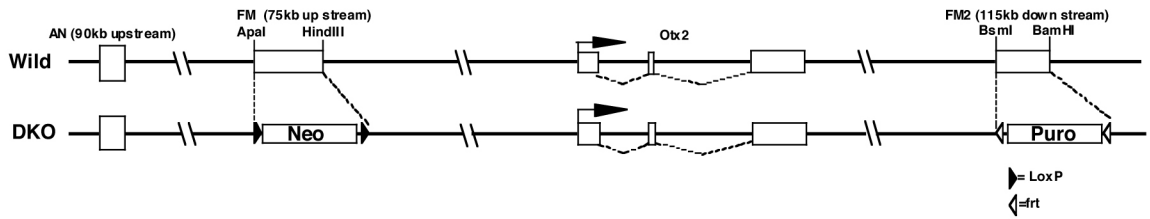


参考図 1 胎生5.5日目(Pre-streak stage)から胎生10.5日目(咽頭胚)までのマウス胚発生とOtx2(赤), Otx1(橙), Emx2(紫), Emx1(水色)の発現の略図。

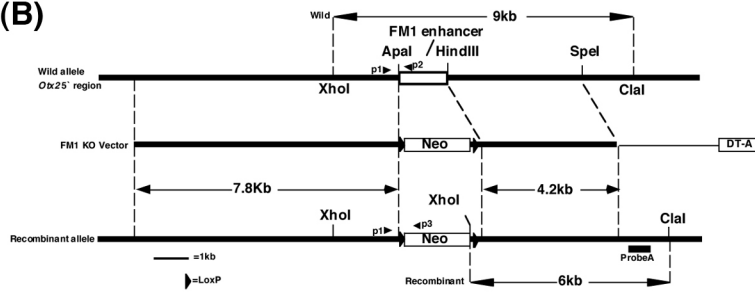


参考図2 マウス *Otx2* 遺伝子を活性化するエンハンサーのゲノム上の位置。矢印は *Otx2* 遺伝子の転写方向を示す。

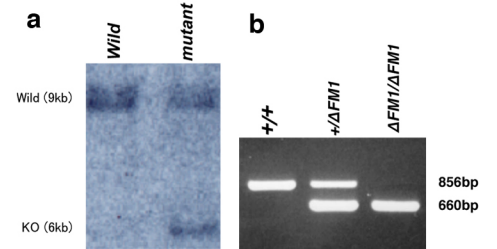
(A)



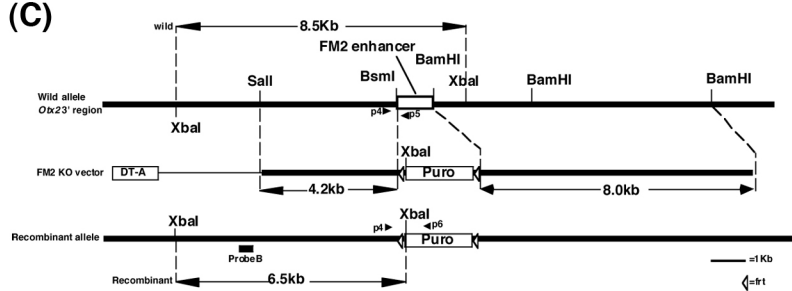
(B)



(D)



(C)



(c)

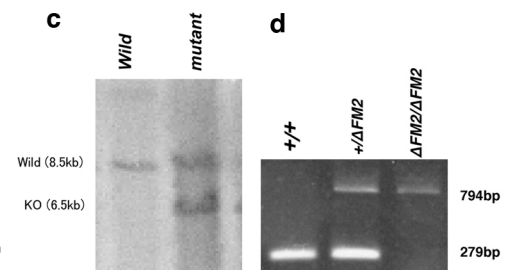


図1 DKO ($Otx2^{\Delta FM1 \Delta FM2 / \Delta FM1 \Delta FM2}$) 二重変異体マウスの作製

(A) *Otx2*遺伝子座近傍の野生型とDKO二重変異体の略図。

エンハンサー領域を□で、*Otx2*の転写領域を■で示す。▲はloxP配列、△はfrt配列とそれぞれの方向を示す。

(B) FM1エンハンサー領域の野生型、ノックアウトベクター、突然変異型の略図。Pgk1プロモーターに連結したネオマイシン耐性遺伝子とSV40polyAシグナル配列をloxP配列で挟んだDNA断片を、FM1エンハンサーを含むApal-HindIII間の1314bpと置換えた。

(C) FM2エンハンサー領域の野生型、ノックアウトベクター、突然変異型の略図。Pgk1プロモーターに連結したピュロマイシン耐性遺伝子とSV40polyAシグナル配列をfrt配列で挟んだDNA断片を、FM2エンハンサーを含むBsmI-BamHI間の995bpと置換えた。DT-AはMC1プロモーターに連結したジフテリア毒素A遺伝子のカセット (Yagi et al., 1990)太線はマウスのゲノム配列を、細線はノックアウトベクター由来の配列を示す。ProbeA, Bは相同組み替え体のゲノミックサザンハイブリダイゼーションに用いたプローブの位置 (Da, c; 4-3項参照)、p1-p6は遺伝子型の決定に用いたPCRプライマーの位置 (Db, d; 4-4項参照)を示す。

(D) DKO変異体の検出。(a, c) 4-3項の方法により、Probe A(a)、ProbeB(c)を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った一例を示す。*wild*は野生型、*mutant*は $Otx2^{\Delta FM1 \Delta FM2 / +}$ ES細胞より調製したゲノムDNAを用いた。(b, d) 4-4項の方法によりDKOヘテロ個体同士を掛け合わせた産児より得たゲノムDNAを用いたPCRの一例を示す。(b)FM1アレル。+/+は野生型、+ΔFM1はヘテロ個体、ΔFM1/ΔFM1はホモ個体。(d) FM2アレル。+/+は野生型、+ΔFM2はヘテロ個体、ΔFM2/ΔFM2はホモ個体。

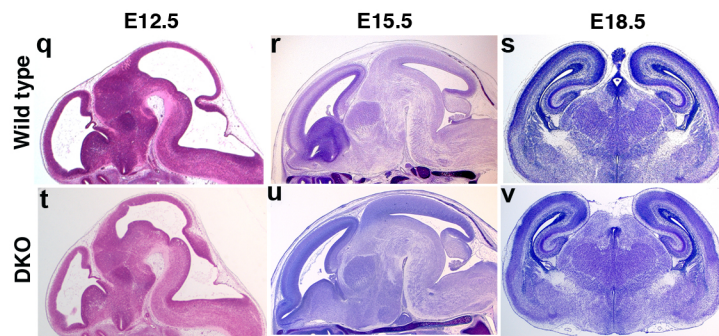
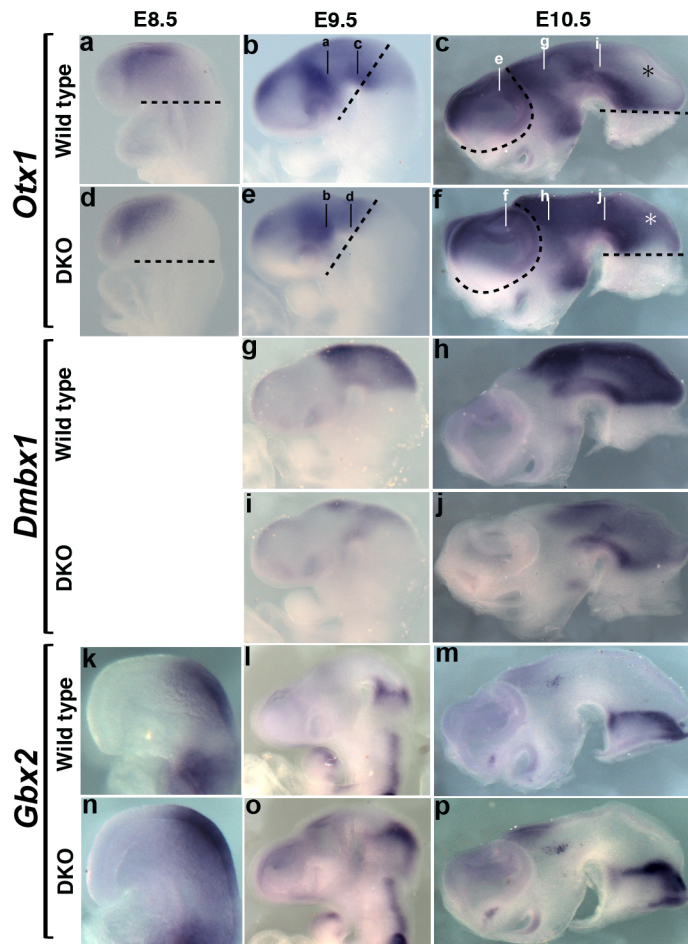


図2 DKO変異体の表現型とマーカー遺伝子の発現

それぞれ、胎生8.5日胚 (a, d, k, n)、胎生9.5日胚 (b, e, g, i, l, o)、胎生10.5日胚 (c, f, h, j, m, p)、胎生12.5日胚 (q, t)、胎生15.5日胚 (r, u)、胎生18.5日胚 (s, v) ; (a-c, g, h, k-m, q-s) は野生型、(d-f, i, j, n-p, t-v) は二重変異体。Otx1 (a-f)、Dmbx1 (g-j)、Gbx2 (k-p) の発現、ヘマトキシリン・エオシン (q, t) とクレシル・バイオレット (r, s, u, v) で染色した前脳と間脳レベルの矢状断切片 (q, r, t, u) と前頭断切片 (s, v) を示す。点線は図11a-fで示すRT-PCRを行った際の切断面、黒線は図11 g-pで示す前頭断切片in situ ハイブリダイゼーションの切断面を示す。(c, f) 中の*は、DKO変異体においてOtx1の発現が増強している中脳背側領域を示す。

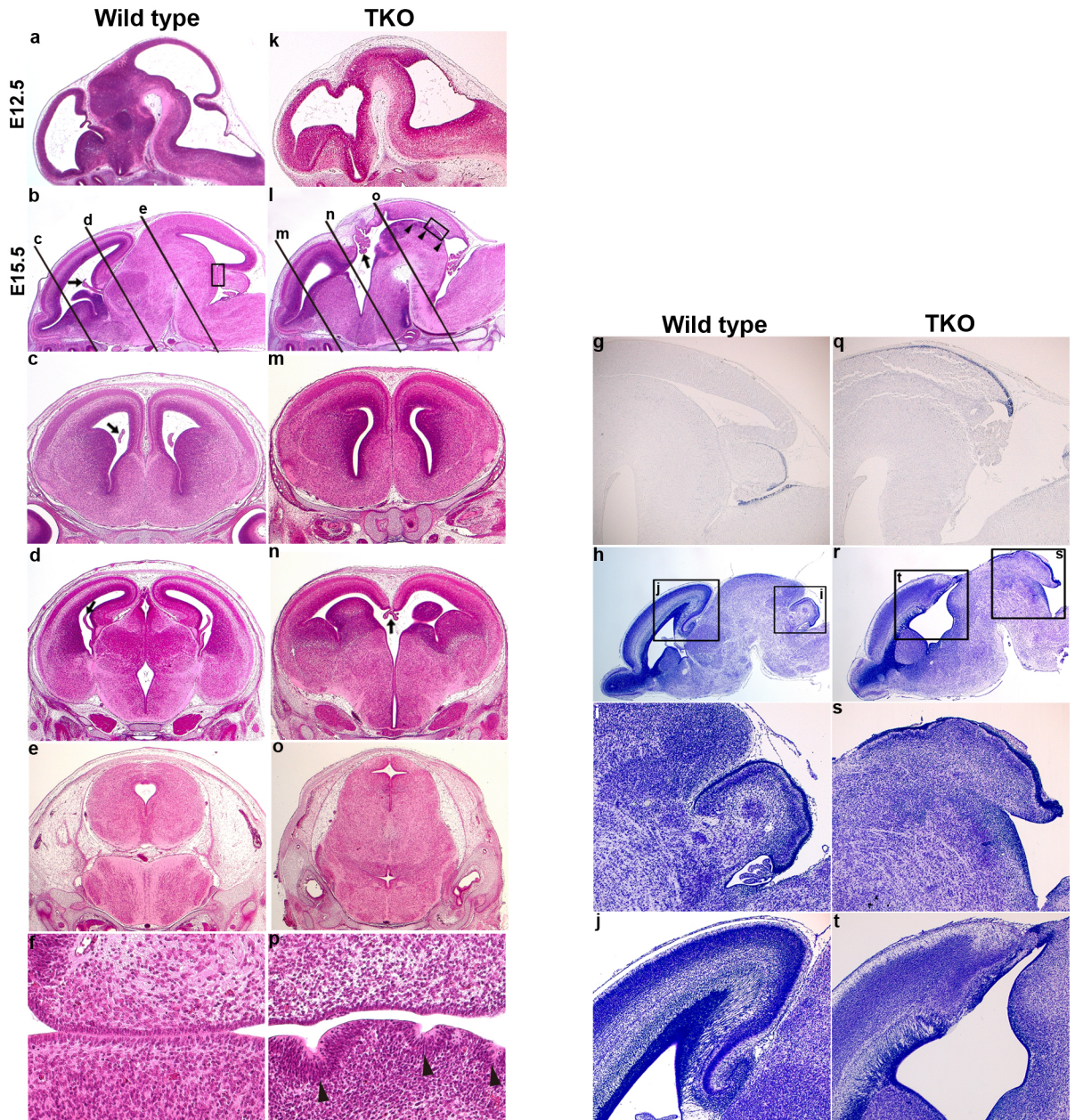


図3 TKO ($Otx1^{-/-}Otx2^{\Delta FM1\Delta FM2/\Delta FM1\Delta FM2}$) 変異体表現型の組織学的解析

(a-j)野生型、(k-t)TKO変異体。(a-f, k-p)ヘマトキシリン-エオシン染色。(h-j, r-t)クレシルバイオレット染色。
 (a, k)胎生12.5日、(b-g, l-q)胎生15.5日、(h-j, r-t)胎生18.5日胚。(a, b, f, k, l, p, g-j, q-t)矢状断切片(前方が前)。(f, p)はb, l中の□で囲まれた小脳/峡部の拡大図。(c-e, m-o)前頭断切片。切断面は(b, l)中に黒線で示す。(g, q)胎生15.5日胚の小脳の外顆粒層でのPax6の発現。(i, s) h, r内の□で囲んだ小脳/峡部領域を拡大図、クレシルバイオレットで濃染される外顆粒層を示す。(j, t) h, r内の□で囲んだ内側外套領域を示す。
 黒矢尻は、拡張した峡部においてヘマトキシリン-エオシンで濃染される細胞塊を示す(l, p)。黒矢印は脈絡叢を示す(b, l)。

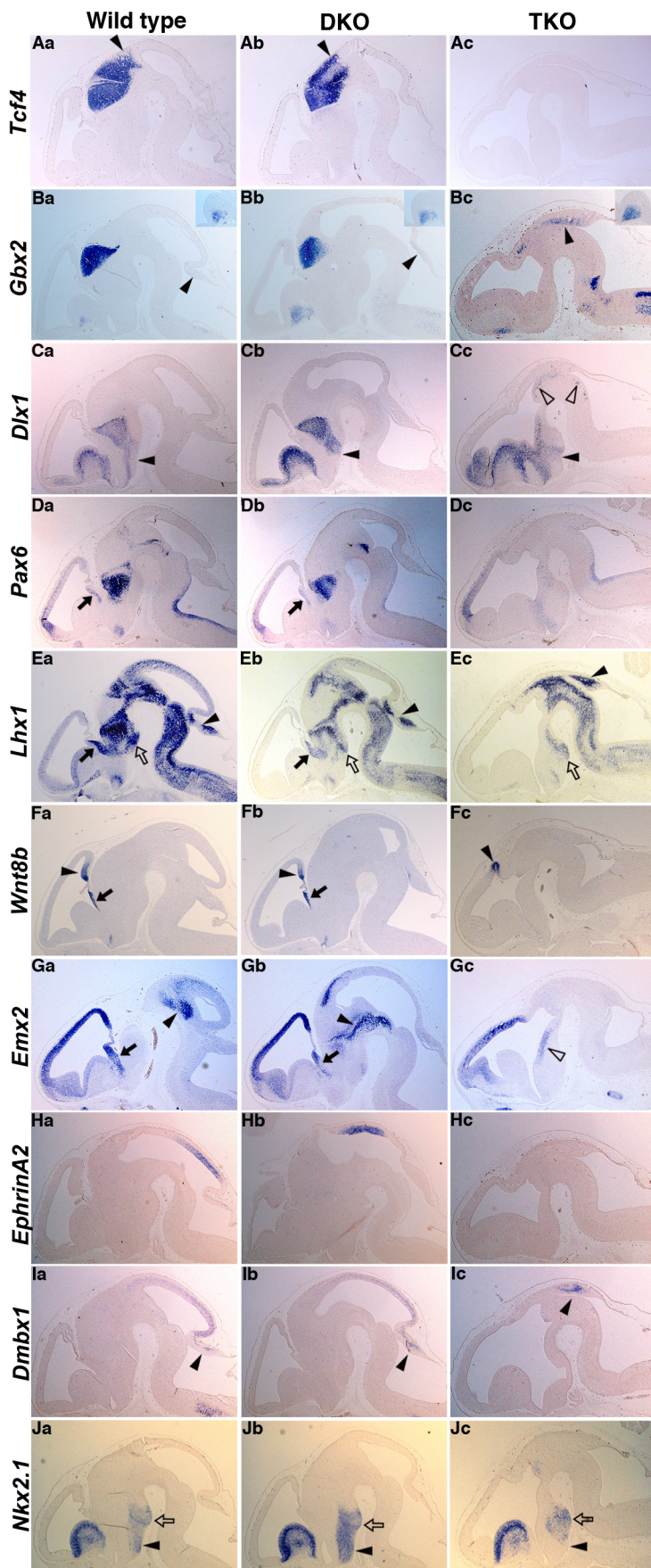


図4 胎生12.5日胚の間脳/中脳領域
欠損部分に対するマーカー解析の結果

(A) *Tcf4*, (B) *Gbx2*, (C) *Dlx1*, (D) *Pax6*,
(E) *Lhx1*, (F) *Wnt8b*, (G) *Emx2*, (H) *Ephrin A2*,
(I) *Dmbx1* (J) *Nkx2.1*. (a)は野生型、(b)はDKO
二重変異体、(c)はTKO三重変異体胚の矢状断切片
を示す。左が頭部前方。(B)中の挿入図は、
*Gbx2*の神経節隆起での発現を示す。(D, F)の
黒矢印は視床隆起での*Pax6*, *Lhx1*, *Wnt8b*遺伝子
の発現で、TKO三重変異体ではそれぞれの発現領
域が失われる。(Gc)の白矢尻で示される*Emx2*
遺伝子の発現は視床隆起での発現ではなく、どの
部位に由来する発現なのかは不明である。(Cc)
の白矢尻は、拡張した峡部での異所的な*Dlx1*
遺伝子の発現を示す。(A)の黒矢尻は視蓋の最も
前方での*Tcf4*遺伝子の発現を示し、(B, E, I)の
黒矢尻はそれぞれ小脳原基における*Gbx2*, *Lhx1*,
*Dmbx1*の発現を示す。(C, J)の黒矢尻はそれぞ
れ*Dlx1*, *Nkx2.1*遺伝子の視床下部での発現を示す。
(F)の黒矢尻は*Wnt8b*遺伝子の内側外套での発現を
示す。(G)の黒矢尻は*Emx2*遺伝子の被蓋での発現
を示す。(E, J)の白矢印は、乳頭体での*Lhx1*,
*Nkx2.1*遺伝子の発現をそれぞれ示す。

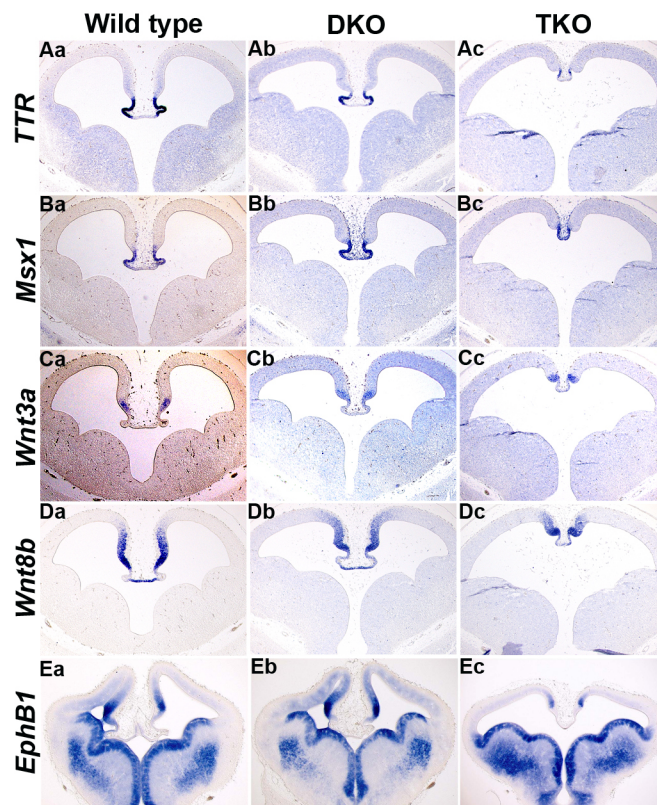


図5 胎生12.5日胚の内側皮質のマーカー解析

(A) *TTR*、(B) *Msx1*、(C) *Wnt3a*、(D) *Wnt8b*、(E) *Ephb1*の発現。
 (a)は野生型、(b)はDKO変異体、(c)はTKO変異体胚。全て胎生12.5日胚の終脳領域における前頭断切片。

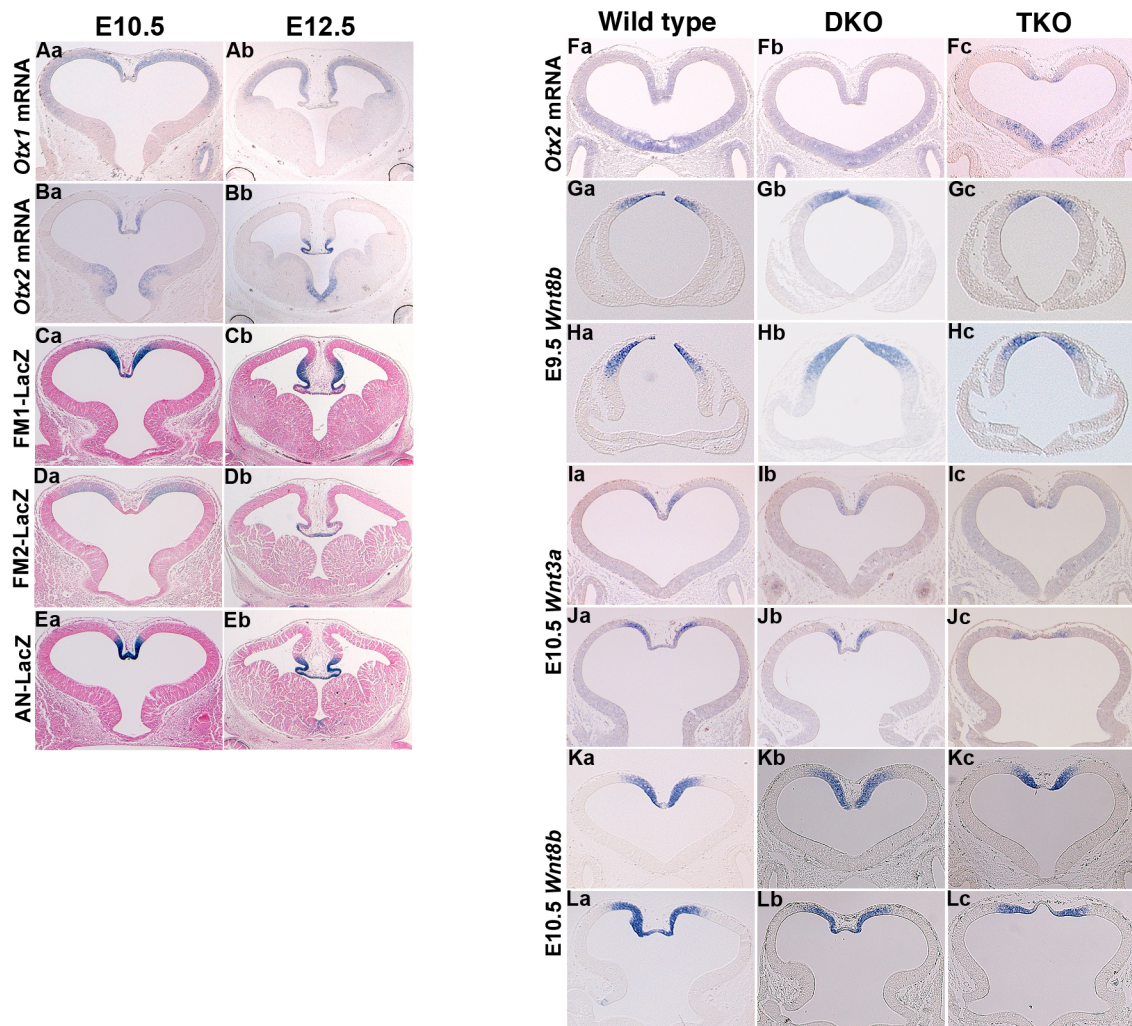


図6 内側皮質の形成異常が開始する時期

(A) *Otx1*、(B) *Otx2* mRNAの発現。(C-E) FM1(C)、FM2(D)、AN(E)エンハンサーをそれぞれ*Otx2*プロモーターと連結した β ガラクトシターゼレポーター遺伝子の発現。(a)は胎生10.5日、(b)は胎生12.5日胚の前頭断切片。(F) *Otx2*、(G, H, K, L) *Wnt8b*、(I, J) *Wnt3a* mRNAの発現。(G, H)は胎生9.5日、(F, I-L)は胎生10.5日。(a)野生型、(b)DKO変異体、(c)TKO変異体。全て終脳領域における前頭断切片；(G, I, K)は終脳前方部、(H, J, L)は終脳後方部の切片。

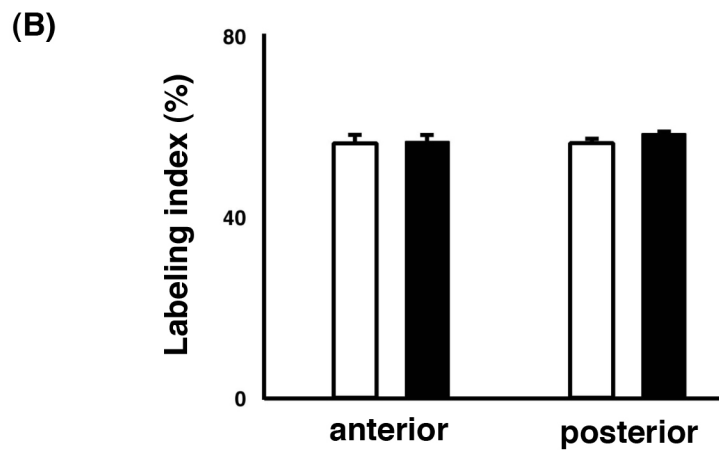
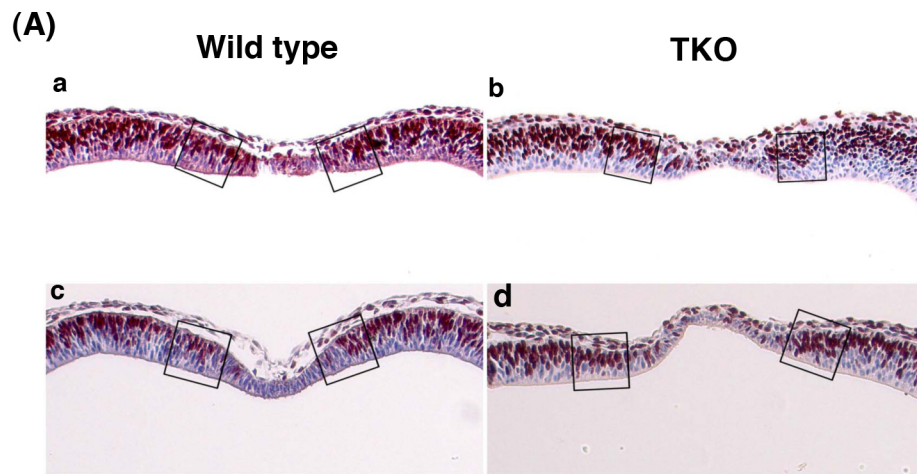


図7 TKO変異体の内側皮質における細胞増殖

(A) 4-12項の方法でBrdUを取り込ませた野生型(a, c)、TKO (b, d) 胎生10日胚の内側皮質前方側(a, b)、後方側(c, d)の前頭断切片の抗BrdU抗体染色像。

(B) Aで□で囲った領域(200 μ m X 200 μ m)のヘマトキシリン染色された全細胞(青)に対するBrdU陽性の細胞(茶色)の割合を縦軸に示す(%). □は野生型. ■はTKO.

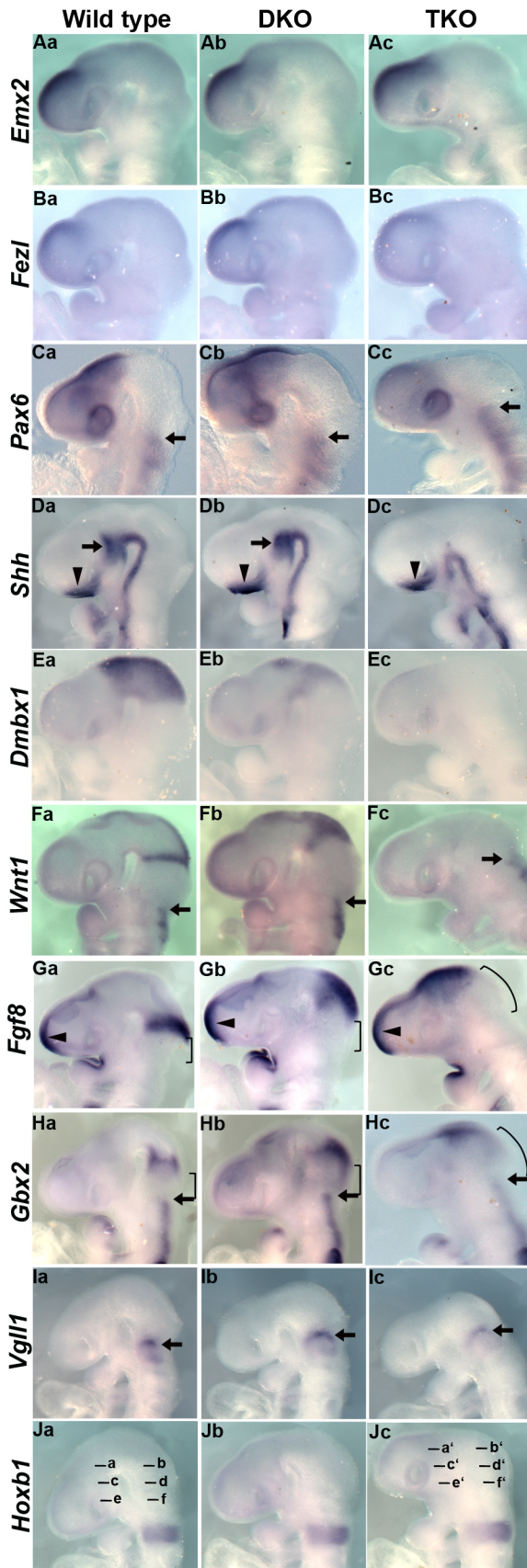


図8 胎生9.5日胚のマーカー解析

(A) *Emx2*, (B) *Fezl*, (C) *Pax6*, (D) *Shh*, (E) *Dmbx1*, (F) *Wnt1*, (G) *Fgf8*, (H) *Gbx2*, (I) *Vgll1*, (J) *Hoxb1*の発現。(a)野生型、(b) DKO二重変異体、(c) TKO三重変異体を示す。全て側面から撮影(前部は左)。(C、F、H、I)の黒矢印は菱脳第2節前端的それぞれの遺伝子発現の前方境界を示す。(D)の黒矢印は前脳腹側の最も吻側における*Shh*遺伝子の発現を、黒矢印は間脳腹側の視床内境界溝を生じる部位での*Shh*遺伝子の発現を示す。(G)の黒矢印は前方神経隆起での*Fgf8*遺伝子の発現を示す。(G、H)の括弧は菱脳第1節部分を示す。(Ja, c)のアルファベットをつけた黒線はBrdU取り込み実験(図10)とTUNEL分析(データ示さず)を行う際にサンプリングした部位を示す。

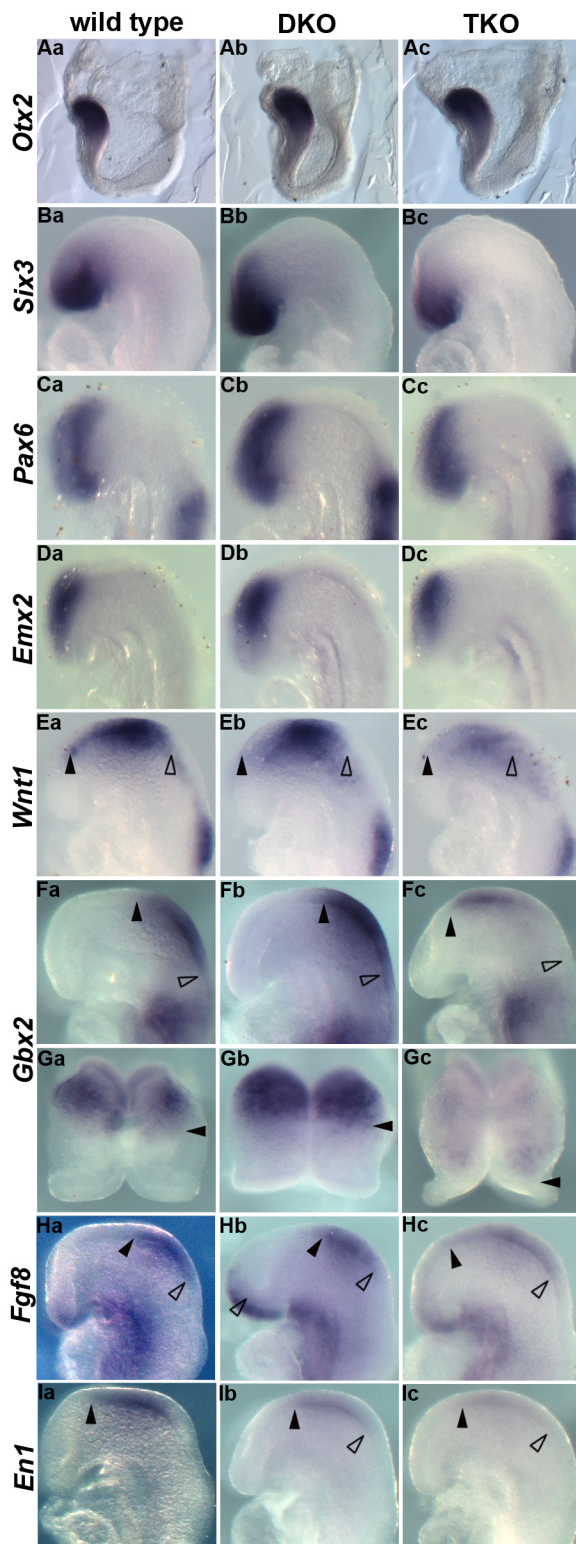


図9 間脳/中脳欠陥の開始時期

(A) 胎生7.75日胚の *Otx2* mRNAの発現。
 (B-I)胎生8.5日胚における *Six3*(B)、
Pax6(C)、*Emx2*(D)、*Wnt1*(E)、*Gbx2* (F, G) 、
Fgf8(H)、*En1*(I) mRNAの発現。(a)野生型、
 (b) DKO変異体、(c) TKO変異体。(A-F, H, I)
 は側面図(前方は左)、(G)は背側図(前方は下)。
 (E-I)の黒矢尻は発現の前方境界、白矢尻は後方境
 界を示す。

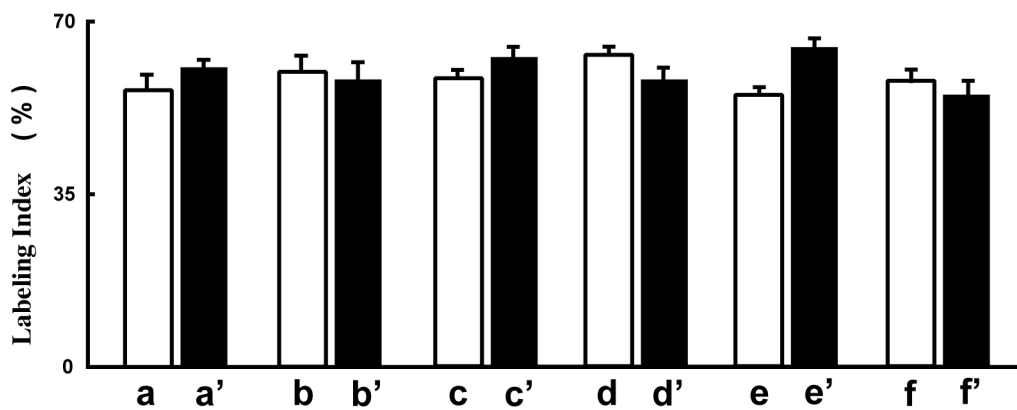


図10 胎生9.5日胚の間脳/中脳領域のBrdU取り込み実験

BrdUを取り込ませた胎生9.5日野生型胚、TKO胚より、図8Ja, cに黒線で示した水平断面で切片を作製し、間脳(a, c, e ; 野生型, a', c', e' ; TKO)、中脳(b, d, f ; 野生型, b', d', f' ; TKO)の各領域の神経上皮内における全細胞数に対するBrdU陽性の細胞 (4-12項参照)の割合(%)を縦軸に示す。

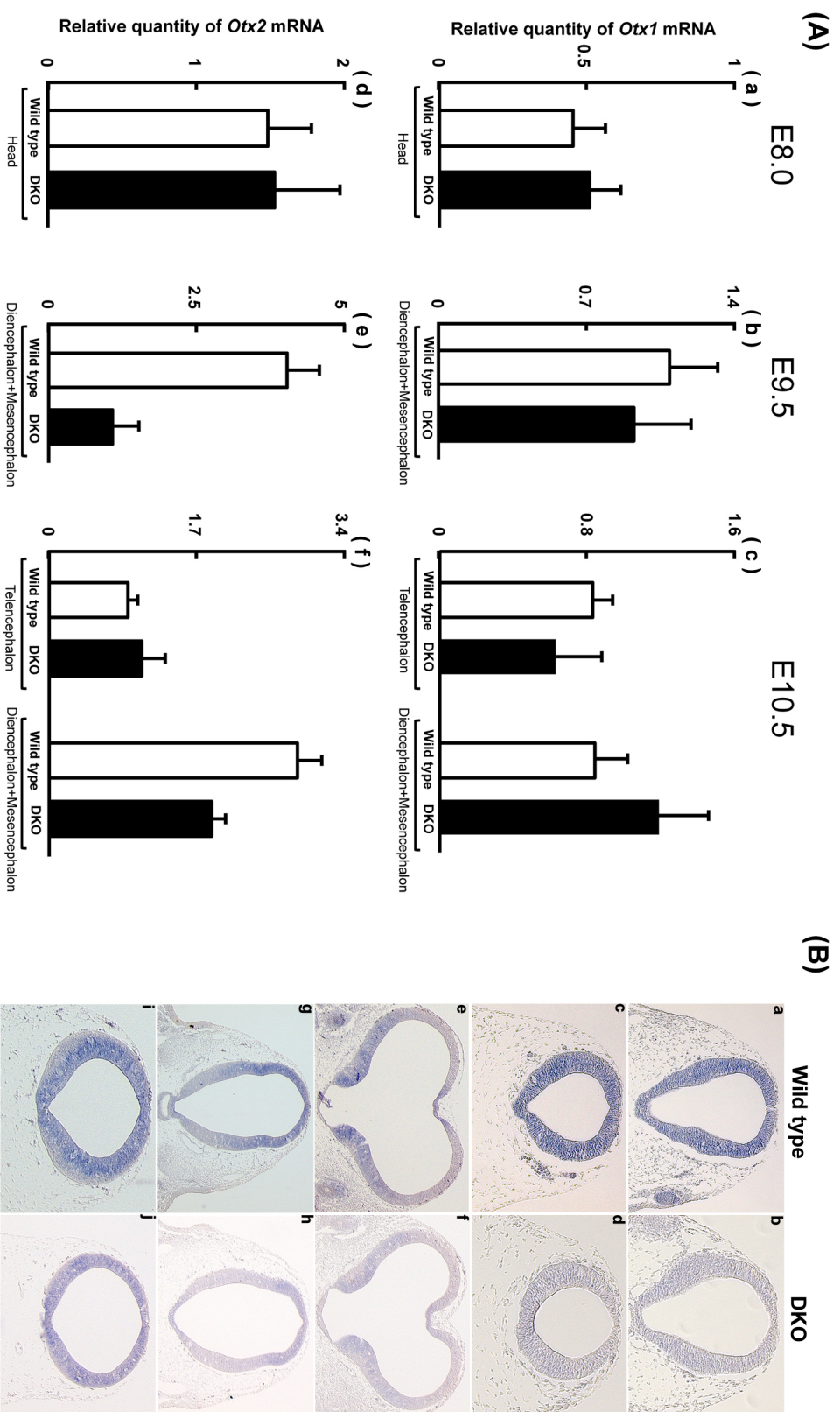


図1 1 DKO二重変異体の *Otx1* と *Otx2* 遺伝子の発現

(A) *Otx1*、*Otx2* 遺伝子発現の定量的RT-PCR。図2a-fに点線で示した各領域における、*Otx1* (a-c)、*Otx2* (d-f)の胎生8.0日 (a, d)、胎生9.5日 (b, e)、胎生10.5日 (c, f)の発現量を示す。*Tbp1* 遺伝子 (Svingen et al., 2009) の発現量を内部標準とし、それに対する *Otx1*、*Otx2* 遺伝子の相対的発現量を測定した。

(B) 胎生9.5日胚 (a-d)、10.5日胚 (e-j) における、図2c, f内に (a-j) で示した領域での *Otx2* 遺伝子の発現。(a, c, e, g, i) 野生型、(b, d, f, h, j) DKO 変異体。

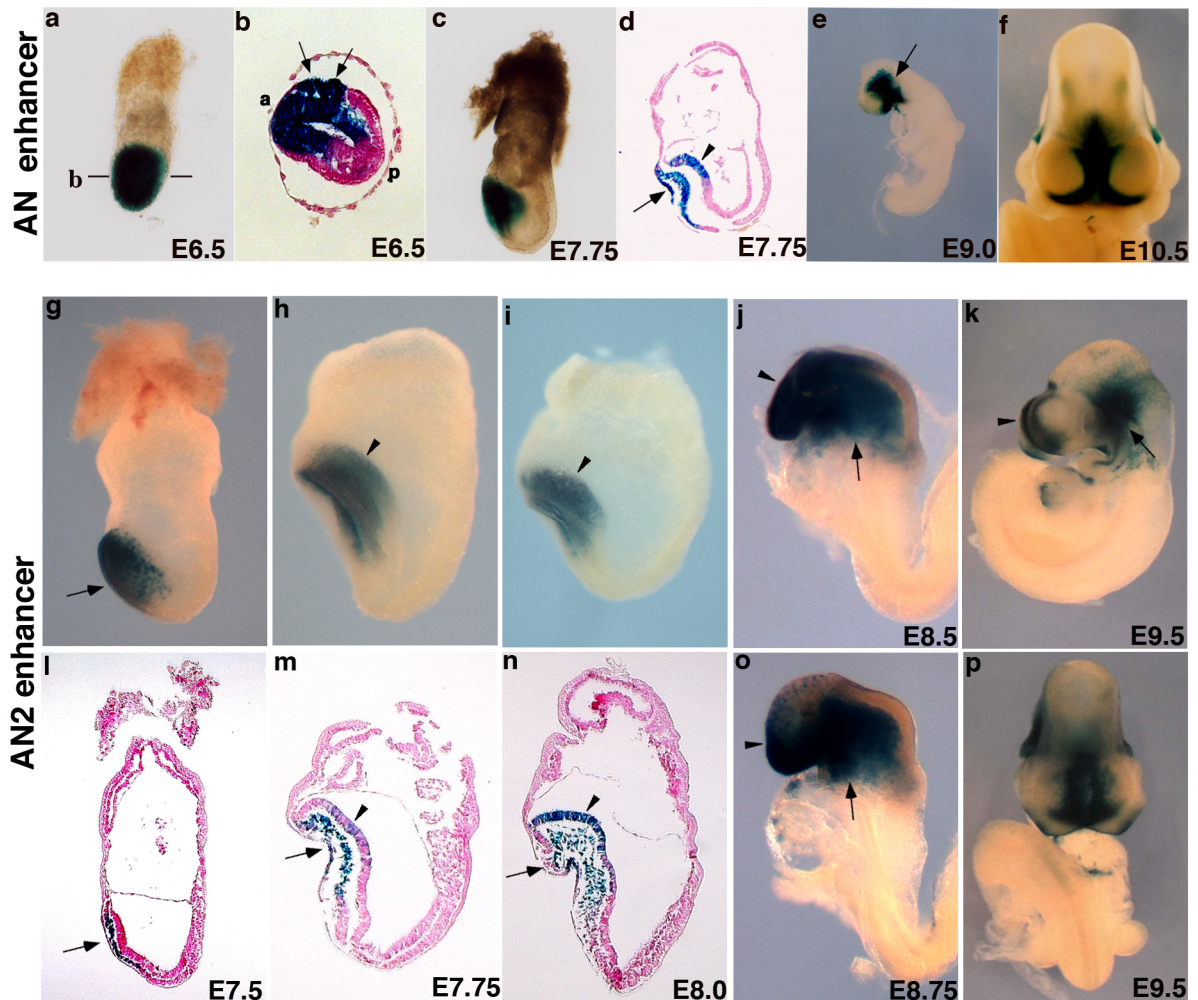
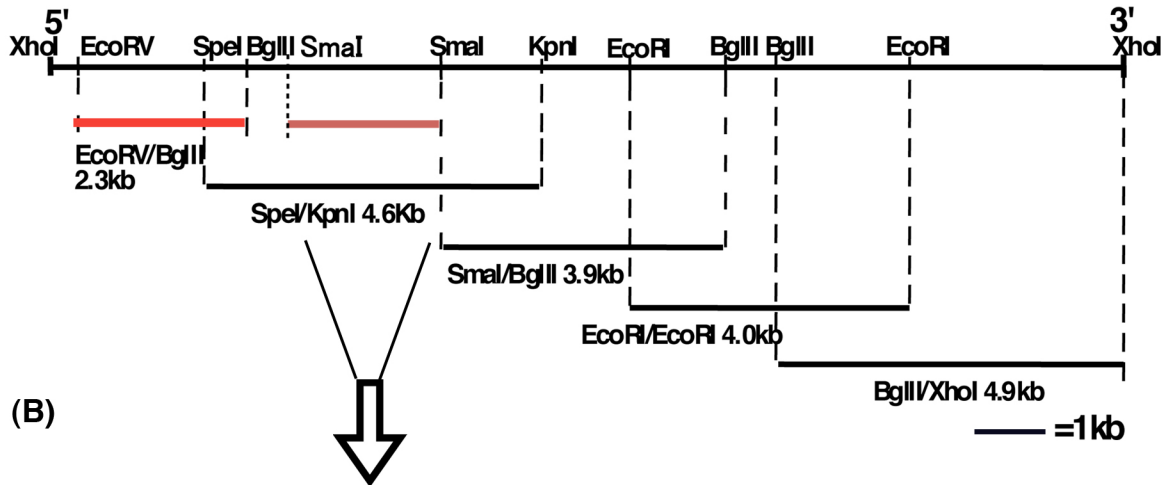


図12 AN2エンハンサーの活性

(a-f) ANエンハンサーの活性。(a, b)胎生6.5日、(c, d)胎生7.75日、(e)胎生9.0日、(f)胎生10.5日 (Kurokawa et al., 2004b, より改変)。(g-p) AN2エンハンサーの活性。(g, l)胎生7.5日、(h, m)胎生7.75日、(i, n)胎生8.0日、(j)胎生8.5日、(o)8.5日、(k, p)9.5日。(a, c, e, g-k, o)側面図(前方は左)、(f, p)前方図。(b) aの黒線で示す位置での横断切片 (aは前方、pは後方を示す)。(d, l-n) 矢状断切片。矢印はプロモーターに用いた1.8kb-LacZ (4-10項参照)に含まれるVE, CMエンハンサーによるAVE, AME, CMにおける発現、矢尻はAN2エンハンサーによる神経外胚葉での発現を示す。

(A)



(B)

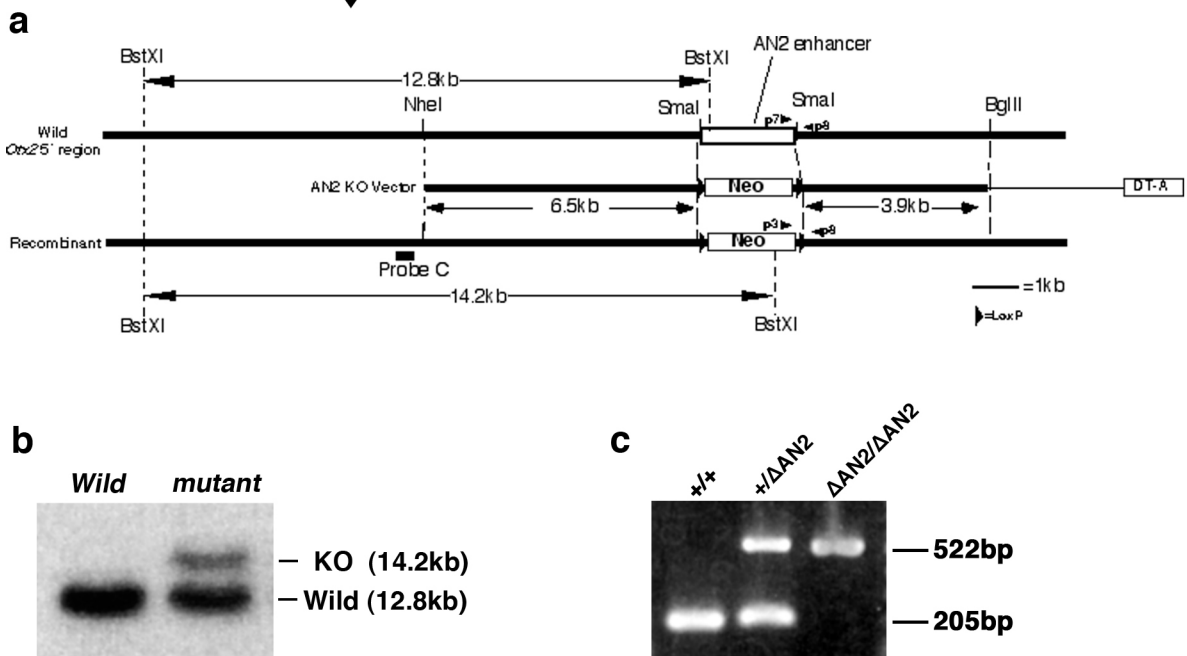


図13 AN2エンハンサーノックアウトマウスの作製

(A) マウス *Otx2* 遺伝子座のAN2エンハンサー近傍の制限酵素地図。EP, ANエンハンサーを含む EcoRV-BglII間2.3kbとAN2エンハンサーを含むSmaI-SmaI間2.2kbを赤で示す。

(B) (a) AN2エンハンサー領域の野生型、ノックアウトベクター、突然変異型の略図(4-6項参照)。略号等は図1に準ずる。(b) 4-6項の方法でサザンハイブリダイゼーションを行った一例を示す。 *wild* は野生型、 *mutant* は *Otx2*^{+/ΔAN2} (c) 4-7項の方法で、AN2欠失変異体ヘテロ個体同士を掛け合わせた産児より得たゲノムDNAを鋳型にp3, p7, p8プライマー(a; 矢尻)を用いたPCRの一例。 +/+は野生型、 +/ΔAN2はヘテロ個体、 ΔAN2/ΔAN2はホモ個体。

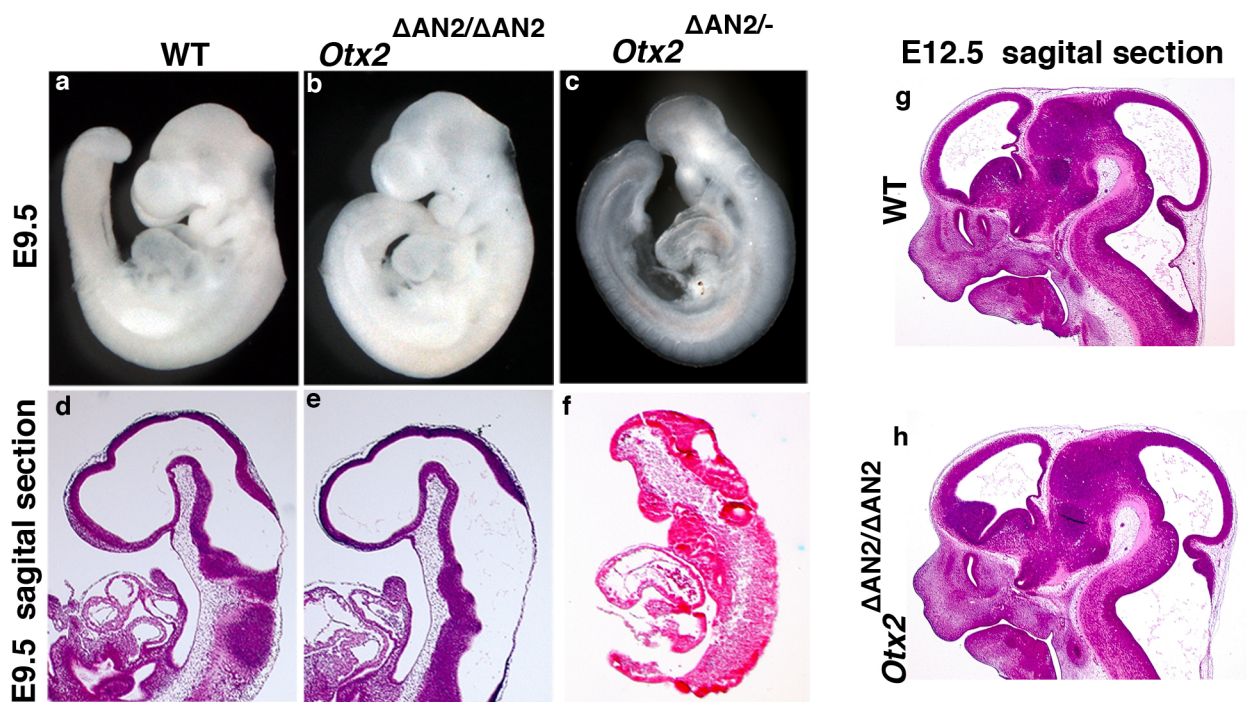
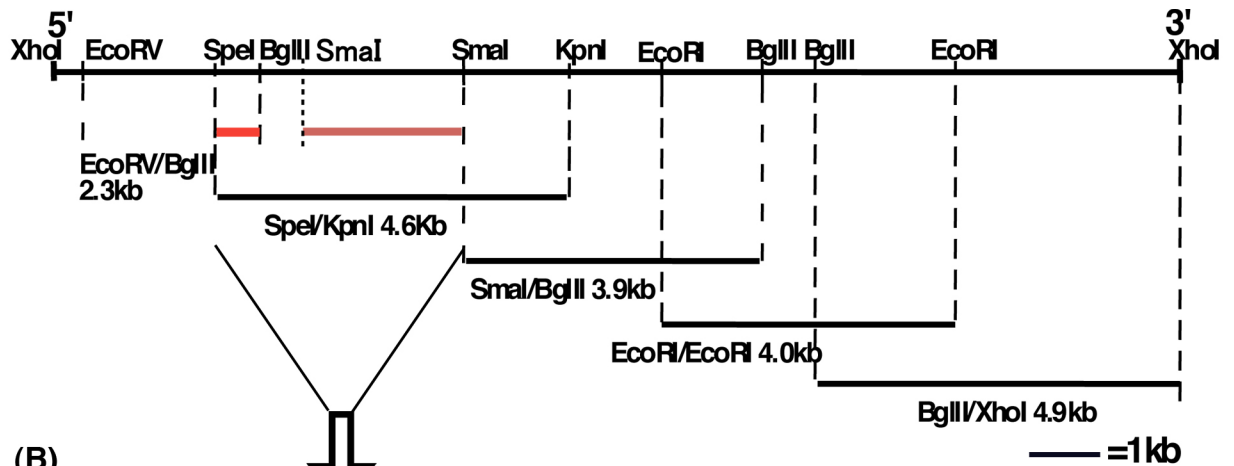


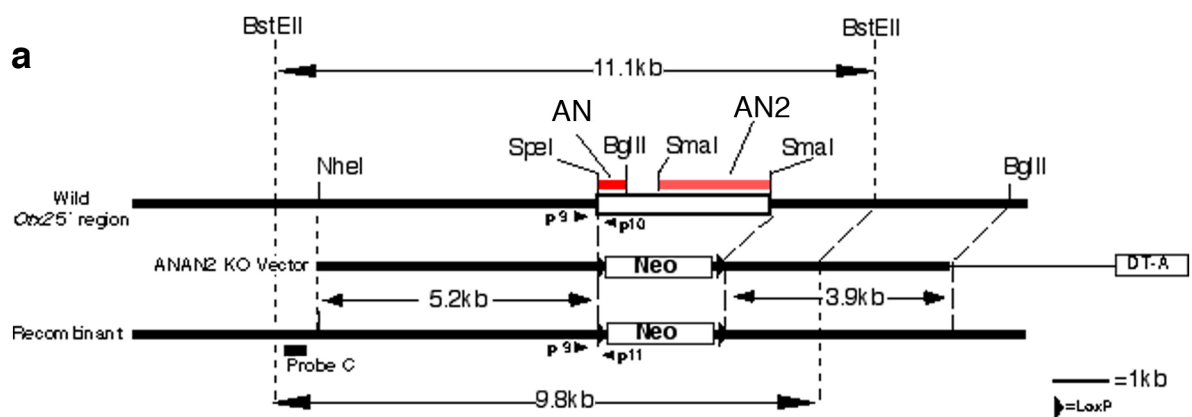
図14 AN2欠失変異体の表現型

(a-f) 胎生9.5日胚、(g, h)胎生12.5日胚; (a, d, g) 野生型、(b, e, h) $Otx2^{\Delta AN2/\Delta AN2}$ 。(c, f) $Otx2^{\Delta AN2/-}$ 。
(a-c)は側面図(前方は左)。(d-h)はヘマトキシリン-エオシン染色した矢状断切片。

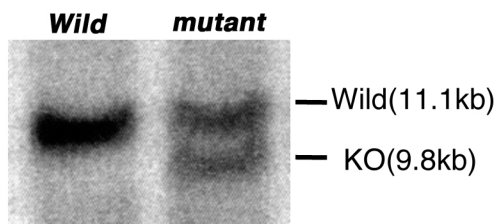
(A)



(B)



b



c

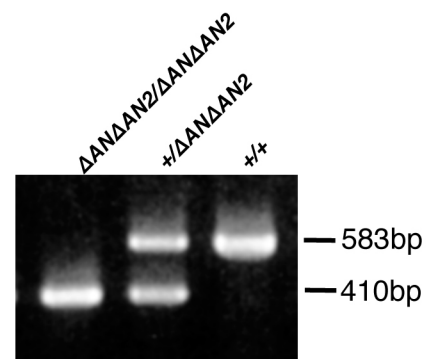


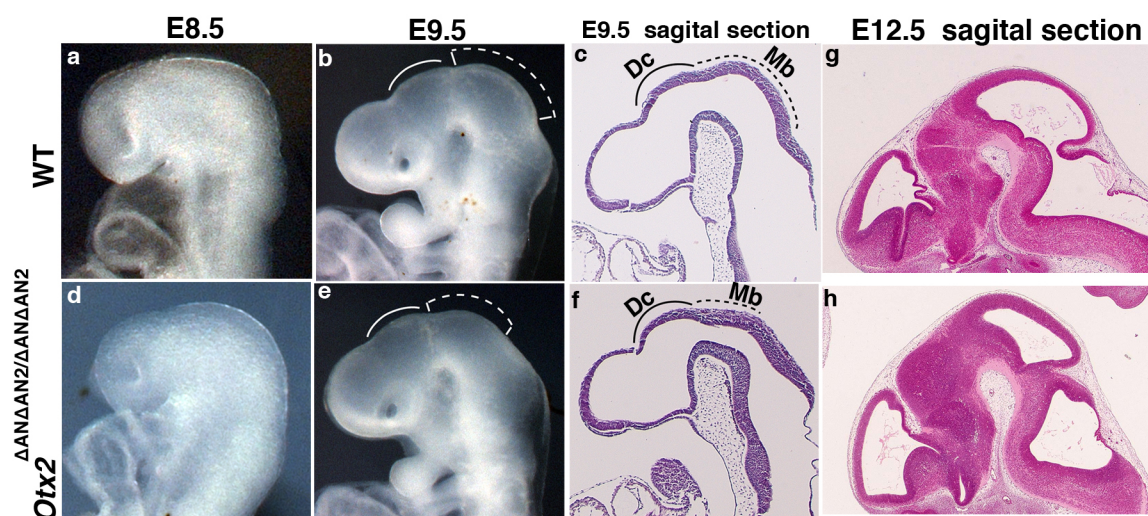
図15 ANAN2エンハンサー欠失変異体の作製

(A) マウス *Otx2* 遺伝子座のAN、AN2エンハンサー近傍の制限酵素地図。ANエンハンサーを含むSpeI-BglII間0.5kbとAN2エンハンサーを含むSmaI-SmaI間2.2kbを赤で示す。

(B) (a) ANAN2エンハンサー領域の野生型、ノックアウトベクター、突然変異型の略図(4-6項参照)。

略号等は図1に準ずる。(b) 4-6項の方法でサザンハイブリダイゼーションを行った一例を示す。*wild*は野生型、*mutant*は*Otx2* $+/\Delta AN\Delta AN2$ 。(c) 4-7項の方法で、ANAN2変異体のヘテロ個体同士を掛け合わせた産児より得たゲノムDNAを鋳型にp9, p10, p11プライマー(a; 矢尻)を用いたPCRの一例。 $+/+$ は野生型、 $+/\Delta AN\Delta AN2$ はヘテロ個体、 $\Delta AN\Delta AN2/\Delta AN\Delta AN2$ はホモ個体。

(A)



(B)

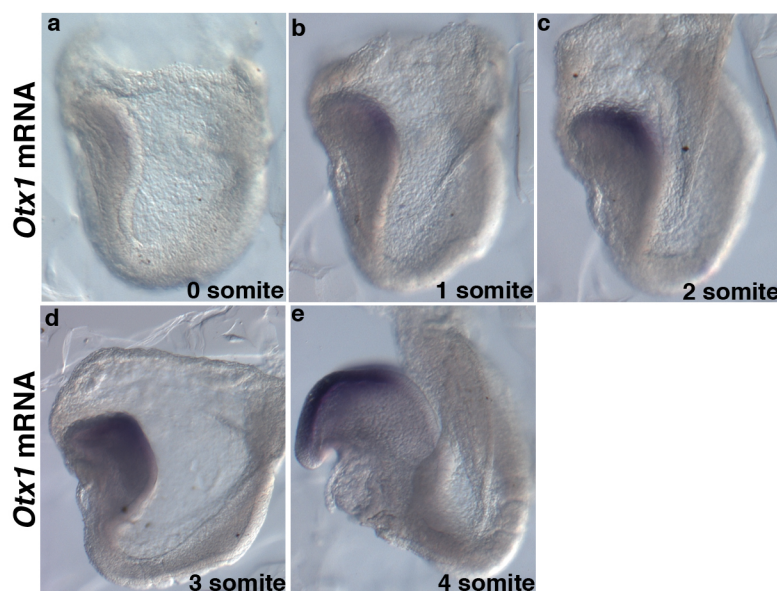


図16 ANAN2エンハンサー欠失変異体の表現型

(A) (a, d) 胎生8.5日、(b, c, e, f)胎生9.5日、(g, h)胎生12.5日; (a-c, g) は野生型、(d-f, h) は $Otx2^{\Delta AN\Delta AN2/\Delta AN\Delta AN2}$ 。(a, b, d, e)は側面図(前方は左)。(c, f-h)はヘマトキシリン-エオシン染色した矢状断切片。実線(Dc)は間脳領域、点線(Mb)は中脳領域を示す。

(B) 野生型マウスの無体節期(a), 1体節期(b), 2体節期(c), 3体節期(d), 4体節期(e)における $Otx1$ mRNAの発現。

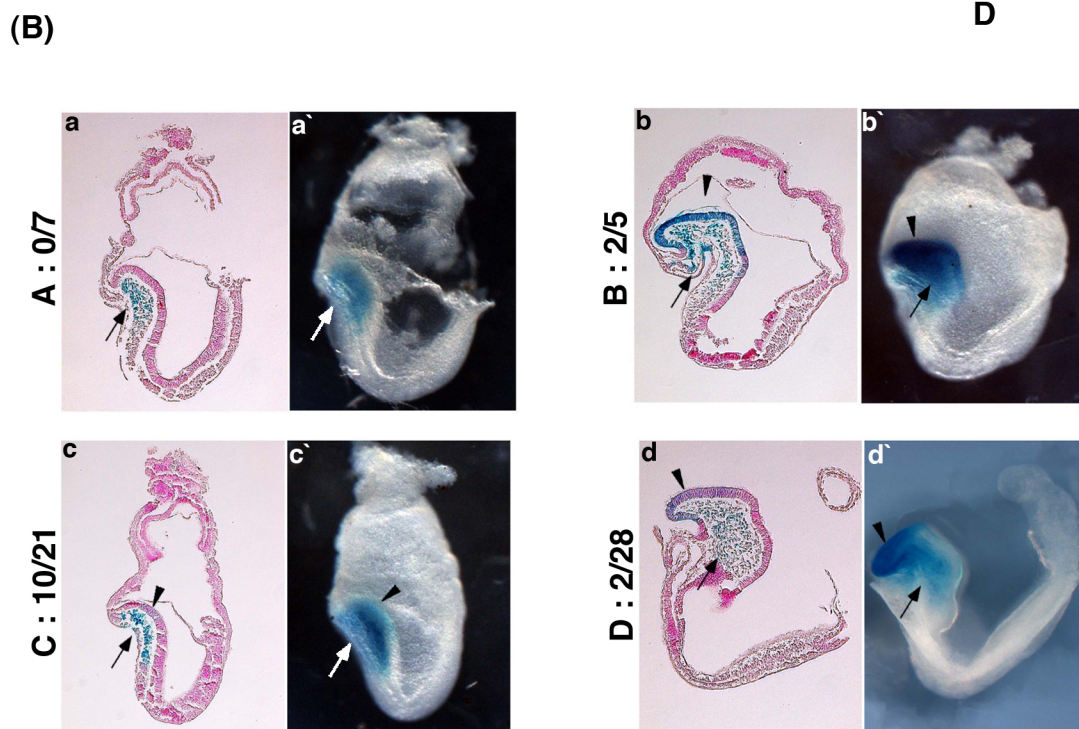
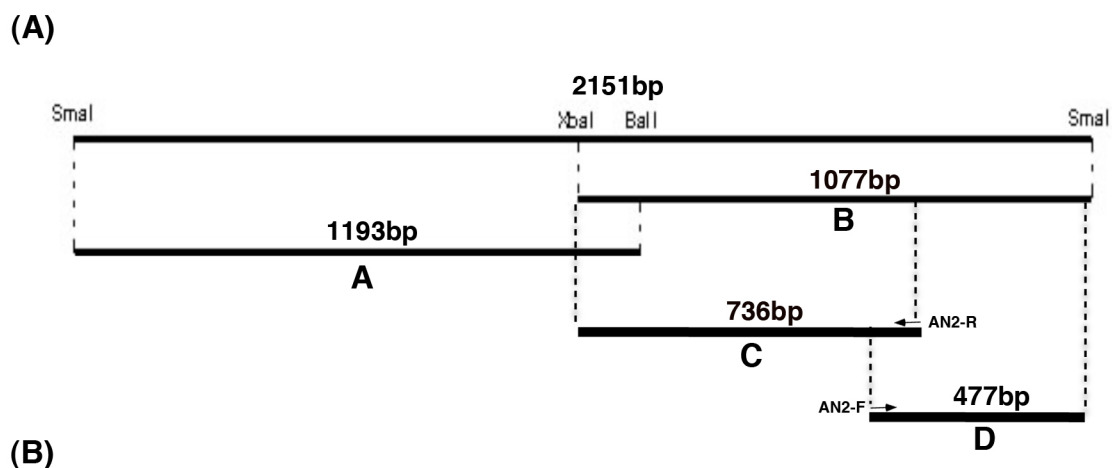


図17 AN2エンハンサー必須配列の決定

(A) AN2エンハンサーを含むSmal-Smal間2.2kbの制限酵素地図。A(1193bp)、B(1077bp)、C(736bp)、D(477bp)の4つの断片に分割し、それぞれのエンハンサー活性を検討した。矢印はC、D断片のPCR増幅に用いたプライマー(AN2-F、AN2-R)の位置を示す(4-10項参照)。

(B) A~D断片の神経外胚葉におけるエンハンサー活性。各断片を含むレポーター遺伝子の胎生7.75日胚の矢状断切片(a-d)と全体像(a'-d')。(a, a')A断片、(b, b')B断片、(c, c')C断片、(d, d')D断片。矢印はプロモーターに含まれるVE、CMエンハンサーによるAMEでの発現。矢尻はそれぞれの断片による神経外胚葉における発現を示す。PCRにより遺伝子導入が確認された個体に対するβガラクトシターゼ陽性の個体の割合をそれぞれの写真下に示す(LacZ陽性/PCR陽性)。

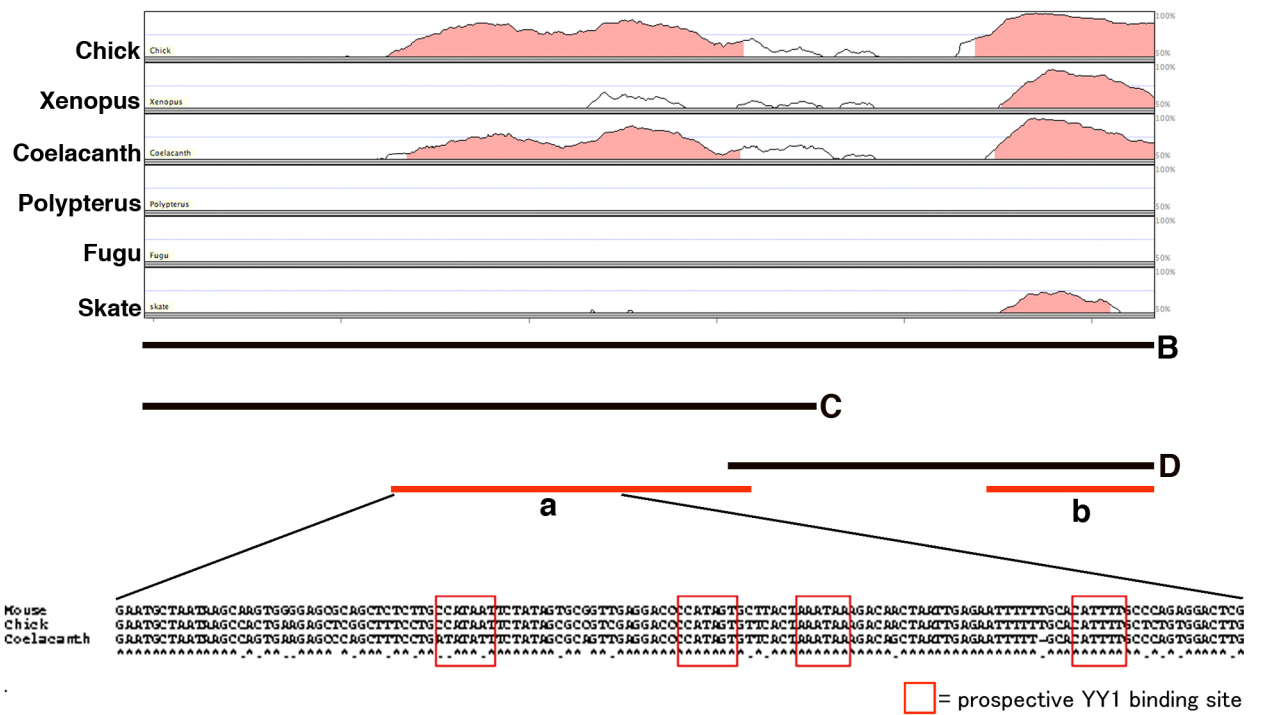


図18 AN2エンハンサー活性を示したゲノム領域の脊椎動物間の保存性

図17 (A)に示したマウスB断片のゲノム配列をベースにニワトリ、ニシツメガエル、シーラカンス、ポリプテルス、フグ、エイの当該領域と比較したVISTA plot。(中段) B~D断片中で100bp以上に渡り75%の相同性を示す領域を赤で示す(a, β)。(下段) α領域5'側のマウス、ニワトリおよびシーラカンスの塩基配列のアライメント。3種で保存された配列を*で、YY1結合サイトを赤枠で示す。