
総 説

神経系細胞の損傷応答と分化— 転写調節因子の機能解析を通じて

奈良県立医科大学第2解剖学教室
和中明生

MOLECULAR MECHANISMS OF INJURY-RESPONSE AND DIFFERENTIATION OF CNS CELLS-WITH SPECIAL REFERENCE TO TRANSCRIPTION FACTORS

AKIO WANAKA

Department of Anatomy, Nara Medical University

Received December 27, 2002

抄録: 神経系細胞の損傷応答メカニズムと分化メカニズムについて、我々が同定した転写調節因子を軸に研究を行った。損傷応答に関しては特にグリア細胞の反応、グリオーシス現象に焦点を絞り培養細胞を用いたDifferential display法による遺伝子スクリーニングからCREBファミリーに属する新規遺伝子OASISの同定に成功した。OASIS蛋白はIn vitroの系で転写活性化能を持ち、in vivoでは脳損傷部位周囲のアストロサイトに発現する特徴を持つ。我々はOASISが従来から言われているグリオーシス組織の神経再生阻害作用に関与していると考え、現在この仮説を検証している。また脳損傷部位においては神経、グリア双方に分化しうる幹細胞の存在が注目されてきているが、我々も組織化学的手法を用いてこの幹細胞がアストロサイトへと分化する傾向が強いことを見出し、上記のOASISの機能と併せて損傷部位におけるグリア細胞の動態を検討している。分化メカニズムに関しては我々が同定したLIMホメオドメイン遺伝子ファミリーの一員であるL3/Lhx8の機能解析を行った。L3/Lhx8は胎生期の前脳基底部分と口腔周囲に特異的に発現する特徴を持つ。LIMホメオドメイン遺伝子群は押しなべて組織、細胞の分化の制御のキー因子であることがノックアウトマウスの作成により次々と明らかとされてきている。そこで我々も同遺伝子のノックアウトマウスを作成したところ、前脳基底部分から発生するアセチルコリン作動性神経細胞の特異的脱落と口蓋裂の発生を認めた。前脳基底部分のアセチルコリン作動性神経は記憶、学習機能に重要な役割を果たしており、L3/Lhx8遺伝子が高等動物の高次機能発現に不可欠な因子であることが示唆された。

Key words : gliosis, differential display, CREB, LIM-homeodomain gene, knock out mouse

はじめに

本稿は主に神経系における二つの現象、すなわち損傷に対する細胞応答と発生過程における細胞分化について我々がこれまで得てきた知見を中心にまとめてみたい。

したがっていわゆる通常の「総説」よりもトピックスが偏っていることを最初にお断りしておきたい。

- 1) 脳損傷に対する組織応答の遺伝子レベルでの解析
我々は以前より組織、細胞、時期特異的な遺伝子発現

に興味を持ち神経系細胞を中心に遺伝子レベルでの分化、損傷応答の研究を行ってきた。このような特異的遺伝子発現の解析法としてサブトラクション法、ジーントラップ法 differential display 法(以下 DD 法)などが挙げられ、現在ではこのような目的の解析法として cDNA マイクロアレイ法や SAGE 法などが、主流となっている。我々はこのような手法の中でも主に DD 法を用いて種々のモデルで特異的遺伝子の同定を行ってきた。詳細は省くが、大脳皮質の機械的損傷(ナイフカット)時に発現誘導される *sgk* 遺伝子の同定¹⁾、スナネズミの一過性前脳虚血モデルで虚血後に発現誘導されるプロテアーゼインヒビターの一つである SPI-3 の同定²⁾などが初期に取り組んだモデルと結果である。特に SPI-3 は海馬 CA1 (遅発性神経細胞死が発生する部位)を中心にアストロサイトに発現誘導されることを見出し、同部位の突起変性に伴い漏出するプロテアーゼの中和を行っているのではないかと考えられる。もちろん神経系には神経細胞、グリア細胞、血管内皮細胞などが混在しており、ナイフカットモデルや一過性脳虚血モデルではこれら多種多様の細胞の「反応」が同時に起こっていることになり、DD 法ではそれらの総和を見ていることになる。そこでもう少し純化した培養系で物をとることを考えるようになった。

アストロサイトは種々の刺激に反応して神経栄養効果のあるサイトカイン類(IL-6 など)を分泌することが知られている。また神経系の中では比較的培養が容易な細胞としても知られている。そこで培養アストロサイトを用いた脳虚血一再灌流の *In vitro* モデルにおいて DD 法により再酸素化特異的な遺伝子を検索したところ、再酸素化に伴って特異的且つ迅速に発現上昇する 2 種類の遺伝子 RA301,410 の同定に成功した³⁾。RA301 は正常酸素濃度、低酸素状態では発現が低い再酸素化後約 15 分より発現の急速な誘導が観察される。我々はまたこの RA301 が蛋白レベルでも発現していること、およびラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて閉塞側の大脳皮質を中心に実際の虚血脳でも RA301 が発現することを確認した。RA301 の全長 cDNA を取得しその構造解析を行ったところ RA301 蛋白は RNA 結合蛋白、特に RNA のスプライシングを調節する蛋白ファミリーに特徴的な構造を有することが明らかとなった。RA301 の機能を解析する目的で培養系においてアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた RA301 の一過性発現抑制系を構築しこの系における低酸素・再酸素化刺激の IL-6 分泌に対する効果を検定したところ、コントロール群が非処理群と同様に IL-6 の分泌亢進を示したのに対して、アンチセンス群では IL-6 の分泌が有意に抑制された。このことは RA301

が IL-6 の分泌経路に対して促進的な役割をしていることを示しており、具体的にどの因子に働きかけているかについては今後の課題であるが蛋白の構造から考えて促進因子(群)の RNA のスプライシング効率を高めることにより関与していることが考えられる。以上の解析からアストロサイトの再酸素化ストレスに対応して新規遺伝子群を動員して神経栄養因子、サイトカイン分泌にあたるという従来示唆されていた役割が分子レベルで明瞭になったと考えられる。

損傷脳におけるグリオシスの意義と *In vitro* model

古くより様々な脳損傷(変性、虚血、外傷)に対して脳組織はグリア細胞による瘢痕形成(グリオシス)を起こすことが知られている。グリオシスはそれ自体「正常」の組織修復反応ではあるが、また同時に神経再生にとって好ましくない環境を作り出すことが問題となってきている。グリオシスを形成するのは主に反応性アストロサイトの増殖、性質の変化によると考えられるが、どのような分子メカニズムが神経再生阻害の背景にあるかについては残念ながら多くは解明されていない⁴⁾。Silver らのグループ及び Fawcett らのグループを中心にコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)が神経再生阻害の主役として^{5,7,8)}。特に比較的再生能力に富んだ後根神経節細胞を成熟脳の白質(最も再生に不適な環境と考えられている)に移植した際に神経節細胞の軸索はよく再生すること、またそのような軸索がアストロサイトの増殖が起こっている部位で CSPG に富む領域に到達すると伸展しなくなることから CSPG の再生阻害能力が注目を浴びることとなった⁹⁾。更に最近 CSPG のコンドロイチン硫酸鎖を切断する chondroitinase ABC を脳損傷部位に注入することにより、神経再生が誘導できることが報告された⁷⁾。しかし CSPG と一口に言っても多数の分子が存在し、どれが再生阻害の責任分子か? また何が CSPG の発現上昇を起こさせているか? などについては不明である。我々はグリオシス部位で活性化されている遺伝子群を検索する目的で、上記の DD 法を応用し以下の遺伝子検索を行った。

OASIS の構造と発現、機能

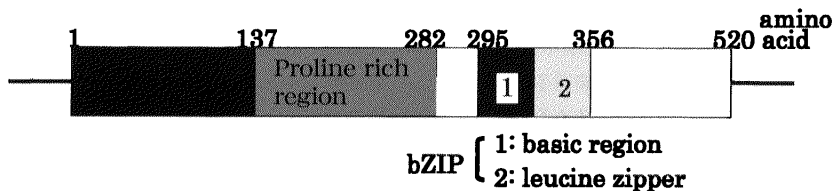
新規遺伝子 OASIS はグリオシスの *In vitro* モデルである長期培養アストロサイト¹⁰⁾に特異的に発現する遺伝子として我々が同定したものである¹¹⁾。OASIS 遺伝子は 520 個のアミノ酸からなる蛋白をコードしており、この蛋白は bZIP ドメインをほぼ中央に持つ新規の CREB/ATF ファミリーのメンバーと考えられた(図 1)。

培養細胞だけでなく損傷部のグリオシス組織において発現しているか否かを検討したところ、アストロサイ

OASIS

●新生マウス脳由来長期培養 astrocyteに特異的に発現上昇する遺伝子として OASIS (Old Astrocyte Specifically Induced Substance) をクローニング

●構造上OASISは、CREB (cAMP responsive element binding protein) ファミリーに属する転写調節因子
(Y Honma et al. Mol. Brain Res. 69: 93-103, 1999)



●脳損傷部位でOASISの発現が上昇

●胎生期の骨芽細胞、象牙芽細胞に一過性に発現

図 1

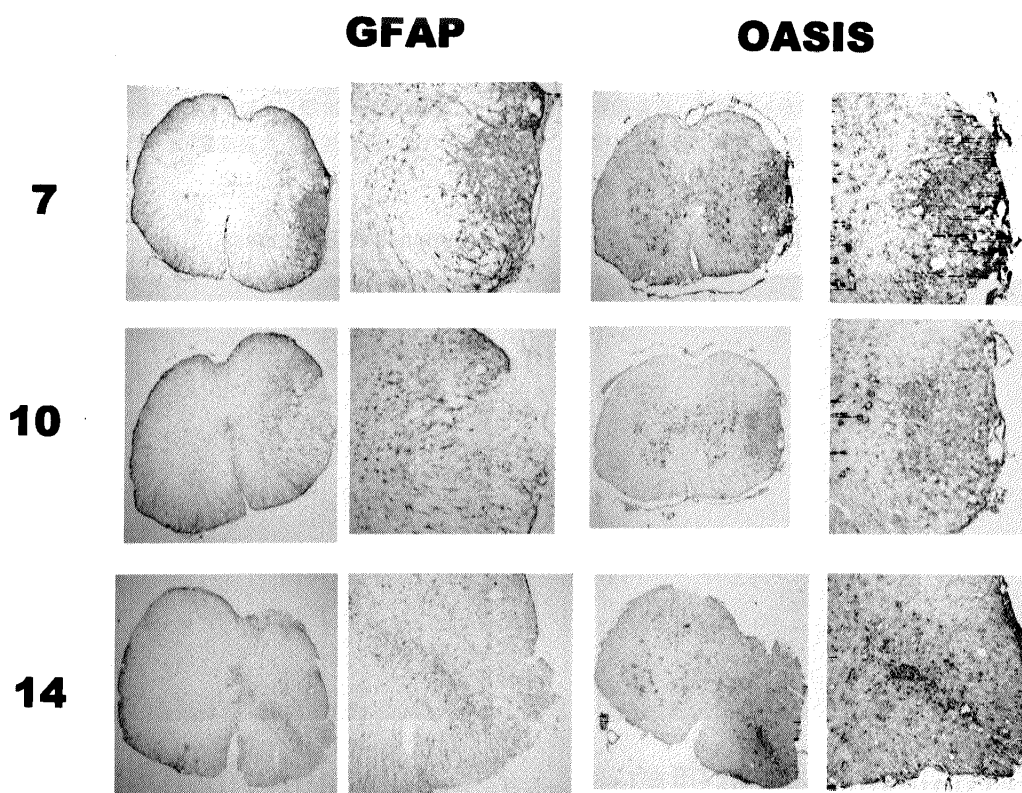


図 2

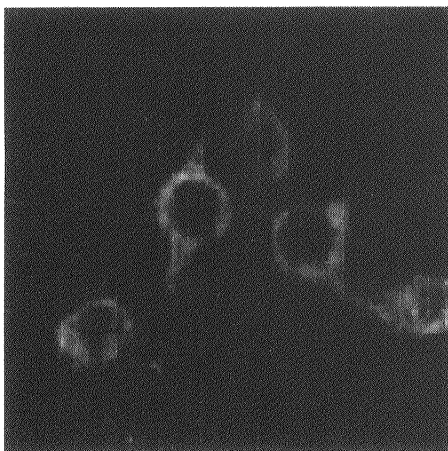
トが反応性に増殖してグリオーシス組織を形成する時期、部位に一致して発現していた¹¹⁾(図2)。さらに種々の細胞マーカーとの共存関係を検索したところ反応性アストロサイトのマーカーである TAPA/CD81 と一致した。またグリオーシス組織の再生阻害の大きな要因とされている CSPG 類の発現と比較検討したところ、OASIS は NG2 プロテオグリカン、Versican、Brevican と酷似した分布パターンを呈した。以上の事実は OASIS が反応性アストロサイトにおいて上記 CSPG の産生に関わっている可能性を示唆している(Iseki et al., 論文投稿中)。ここで問題となるのは OASIS 蛋白が真に転写調節因子として機能するか否か、また転写活性化因子であるか抑制因子であるかである。この問題にアプローチするためにまずゲルシフトアッセイにより OASIS 蛋白が CREB/ATF ファミリーに特異的な認識配列である CRE オリゴヌクレオチドに結合するか否かを検討したところ、実際に結合し且つこの結合は CRE 以外の Ap1, Sp1, NF- κ B 配列では抑制されなかった。次に転写活性を GAL4 融合蛋白の人工転写系で測定したところ、N 末端の 100 アミノ酸からなる部分に強力な転写活性能があることがわかった¹²⁾。また OASIS 蛋白の機能を考える上で興味深いデータが別のグループから最近報告された¹³⁾。彼らは OASIS 蛋白の bZIP ドメインより C 末端側に膜貫通ドメインが存在することをコンピューター解析から予測し、培養細胞を用いた強制発現系を用いて検証した。本来細胞質、核内

に局在すると想定される OASIS のような転写調節因子が膜貫通ドメインを有するのは奇異とも考えられるが、近年小胞体膜に局在する転写因子群が同定されその意義が注目されている。このような因子群のプロトタイプはコレステロール代謝を制御する SREBP だが、小胞体に対するストレスにตอบสนองして膜局在型のプロテアーゼにより切断され、核移行する ATF6(OASIS と同じく CREB/ATF ファミリーの一員)が OASIS の機能を考える上で参考となる。ATF6 は小胞体ストレスに対応するための一群の分子シャペロン蛋白の転写を活性化することが明らかとなっており、ストレス応答のスイッチ的な存在であると考えられる^{14,15,16)}。OASIS は ATF6 と同様の機能を担っているか否かについては現時点では明らかではないが、培養細胞における人工的小胞体ストレス(Tunicamycin 処理による糖鎖付加阻害)の系では ATF6 よりも遅い時間経過で活性化(切断)されること、及び OASIS 自体の転写の上昇を認めている(図3, 未発表)。今後 OASIS が CRE 以外に結合するであろう DNA 配列の同定や、直接の下流遺伝子の解析を進めていく必要がある。

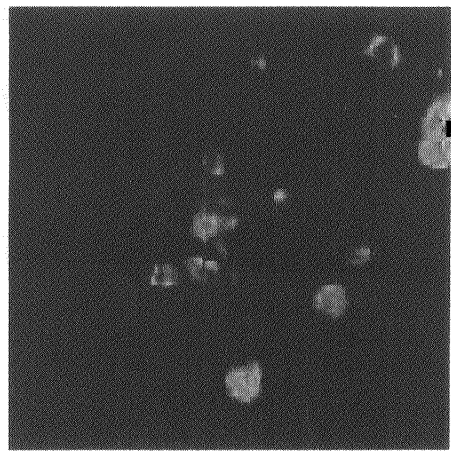
損傷部位における幹細胞(OPC)

OASIS の脳損傷時の発現解析を行う過程で、我々は凍結脳損傷モデルを用いた。これはマウスの頭蓋骨外から麻醉下に液体窒素で冷却した鉛ブロックを押し当てて作成するもので、再現性良く大脳皮質に一定の大きさの壊

Translocation of OASIS protein in response to ER stress



Tunicamycin 処理前



Tunicamycin 処理後

死巣を作成することができることと、複雑な外科手技を必要としないメリットがある。このような脳損傷部位には先に述べた反応性アストロサイト以外にもミクログリアや免疫系の細胞浸潤も存在するし、元々その部位に存在するオリゴデンドロサイト、神経細胞も当然ながら存在する。これらに加えて、損傷部位周辺には古くよりオリゴデンドロサイト前駆細胞(Oligodendrocyte progenitor cell : OPC)と呼ばれる未分化な細胞が出現することが繰り返し記述されてきている。その名前の通りオリゴデンドロサイトにゆくゆくは分化する細胞と考えられているが、この細胞の本態についてもグリオーシスのメカニズム同様に詳細は明らかとなっていない。この細胞集団をラベルするマーカーとしてはNG2-プロテオグリカン、A2B5抗原などが知られている。先にも述べたようにNG2-プロテオグリカンはOASISとの発現局在が似通っているため、我々が「反応性アストロサイト」と考えていた細胞集団の中にはOPCが含まれている可能性が考えられた。そこでこの問題にもう少し直接アプローチする目的で、現在様々な細胞マーカーによる染色とBrdUによる増殖細胞のバルスラベルを組み合わせせて解

析を行っている。例えばオリゴデンドロサイトの分化を制御しているbHLH型転写調節因子であるOlig1とOlig2の遺伝子発現を検討したところ損傷周囲部に陽性シグナルが検出され、これら陽性細胞の分布パターンはOASIS陽性細胞のパターンと酷似していた。また未分化アストロサイトのマーカーであるGLAST(グルタミン酸トランスポーターの一種)やCystatin C(プロテアーゼインヒビターの一種)もこの部位に発現することが認められた。これらの結果は損傷周囲部において未分化なグリア幹細胞の存在とそれらの組織内分化を示唆している。そこでBrdUと幹細胞マーカーであるNestin或いは成熟アストロサイトのマーカーであるGFAPの二重染色を行ったところ、損傷後早期で7割近い細胞がBrdUとNestinを共存していること、及び損傷後1-2週ではBrdUとGFAPの共存が高率に観察されることを見出した(図4, 辰己ら, 未発表)。以上のデータは損傷脳においてグリア幹細胞が増殖し、それらがアストロサイトへと分化促進されていることを示している。今後このような幹細胞の性質と組織内分化のメカニズムを明らかとし、分化の人為的制御(例えば幹細胞からオリゴデンドロサイト

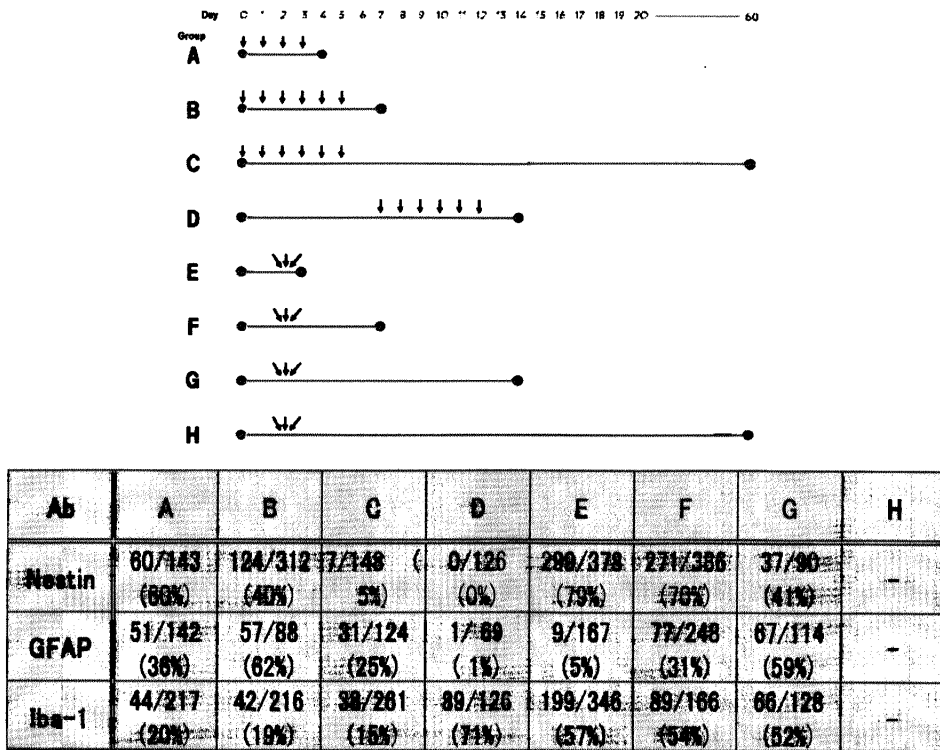


図4

への分化誘導など)を試みたいと考えている。

2) LIM-homeodomain 遺伝子ファミリーから見た胎生期神経系の領域特異化

まず簡単に LIM-homeodomain (Lhx) 遺伝子について解説したい。Lhx 遺伝子群にコードされる蛋白は N 末端側に LIM ドメインと呼ばれる Zn フィンガー様構造が 2 個存在し、C 末端側には LIM タイプのホメオドメインを有する。LIM ドメインはシステイン残基に富み、4 個のシステインか或いは 3 個のシステインとヒスチジンにより亜鉛イオンを配位結合する¹⁷⁾。LIM ドメインと言う名の由来は、80-90 年にかけて相次いで発見された 3 種類の Lhx 遺伝子が共通してこの構造を持つためにこれらの頭文字を取って LIM ドメインと名付けられた。これらはすなわち、線虫の陰門部の細胞分化を制御する *lin-11*¹⁸⁾、インスリン遺伝子のエンハンサーに結合する蛋白として同定された *isl-1*¹⁹⁾、線虫の触覚受容器の分化に関与する *mec-3*²⁰⁾ である。LIM ドメインは当初この様に Lhx 遺伝子群において発見されたが、その後 LIM ドメインのみを有する蛋白 (*Paxillin*, *Zyxin*, *CRP*, *rhombotin* など) や LIM ドメインとセリンスレオニンカイネースを合わせ持つ *LIMK*²¹⁾、或いは *Rho/rac-GTPase* 活性化ドメインを合わせ持つ *LRG1*²²⁾ などが報告されたことより、SH2, SH3 ドメインのように蛋白蛋白の相互作用に関与し、広く発生から情報伝達まで多くの生命現象に関わるのではないかと現在考えられているし事実そのことを示唆する研究結果が最近多数報告されている。LIM ドメインを持つ蛋白群の内の多くものが発生、形態形成を制御する因子であるのでこれら蛋白群の相互作用も総合的に

解析されなければならない。Lhx 遺伝子はこのような LIM ドメインに加えてより C 末端側に LIM タイプのホメオドメインを有する²³⁾。ホメオボックス遺伝子スーパーファミリーの中でこの様なサブファミリーを形成するものの特徴としてホメオドメインもある特定の配列を共有する。1988 年に三種のメンバーが同定されてからファミリーメンバーの同定、構造発現解析が広く行われてきた^{24,25,26,27,28,29,30,31,32)}。いろいろな種で多数のメンバーが同定されている関係上、初期には命名法及び種間のホモログ関係が混沌としていた。その後この遺伝子ファミリーの統一的な命名法が提唱され、現在は Lhx の後に 1-9 までの番号が付けられた(現時点で 9 種類)。図 5 にこの Lhx ファミリーのリストとそれぞれのノックアウトマウスの表現型をまとめた。現在も新たなメンバーが同定されつつありこの表も完全ではないことを強調しておきたい。

このファミリーの内多くのメンバーが神経系に強く発現することから神経発生に機能していることが考えられてきたが、1995 年に入って Lhx 遺伝子ファミリーの役割を示唆する報告が相次いでなされた。まずノックアウトマウスの系からは Lhx 遺伝子群の一つである *lim1* (*Lhx1*) を遺伝子ターゲティングで破壊した場合、前脳部を欠損した形で出生するマウスがでたことから、*lim1* が頭部の形態形成において「オーガナイザー」的役割を担っていることが示唆された³³⁾。以上の事実は *lim1* のホモログである *Xlim-1* がアフリカツメガエル受精卵の背側唇(シュベールマンオーガナイザー)に特異的に発現していることと良く符合する³⁴⁾。*lim1* は後述するように胎生中期以降は中枢神経系の中でも中脳より尾側に主に発現するのでノックアウトの表現型はこの時期の発現よ

神経系における Lhx ファミリーの機能、KO マウスの表現型

- Lhx1 原腸陥入期に形成体で発現する...頭部形態形成の Key molecule?
KO: 耳胞より前方の頭部構造の欠如 胎生致死 (E9.5)
- Lhx2 KO: 眼、大脳皮質の形成不全 胎生致死
- Lhx3 KO: 下垂体前葉, 中葉形態形成不全 ラトケ囊の形成は正常 出生前後に死亡
- Lhx4 KO: 下垂体形成不全 出生前後に死亡(呼吸不全)
- Lhx5 Lhx1 と overlap expression
KO: 海馬神経細胞の分化不全 出生後数日で死亡
- Lhx9 大脳皮質 pioneer neuron で発現
Lhx2 (cortical layer で発現) と遺伝子発現、機能が重複
- Isl1 脊髄運動神経の分化, 神経細胞特異性の決定
KO 脊髄運動神経の欠如

L3/Lhx8 mRNA
expression in the
developing CNS

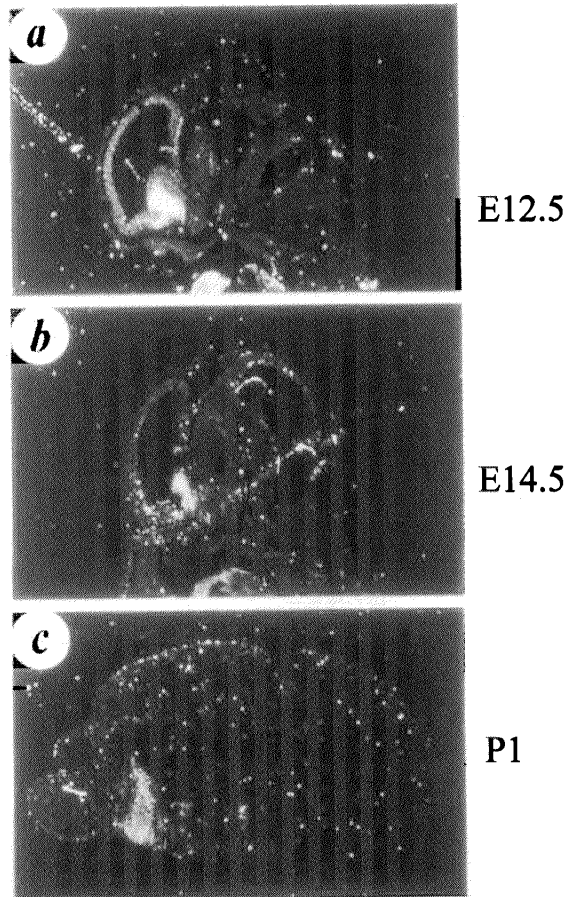
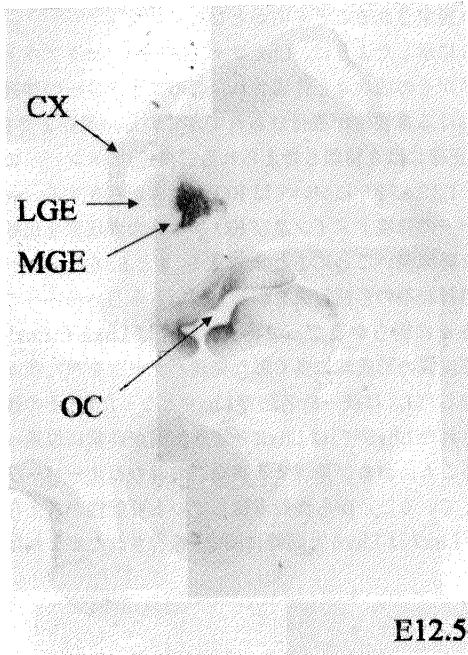


図6

りも初期の発現(lim1 は神経板の周囲の中胚葉組織に発現し、これが前脳部の発達を制御していることが最近明らかとなってきた)を反映したものと考えられる。よって時期特異的なノックアウトマウスの作成が中期以降のlim1 の機能を探る上で重要となってくる。この点については今後の課題である。

もう一つのインパクトはトリ脊髄の神経分化研究からもたらされた。コロンビア大学の Jessell らのグループは以前より脊髄の細胞分化に焦点を絞って研究を行ってきたが、Lhx 遺伝子である isl-1 を同定した Edlund らのグループと共同でこの isl-1 が発生過程の脊髄において運動神経へと分化する細胞群において発現し^{35,36)}、更にこのグループは同じ Lhx 遺伝子ファミリーのメンバー(isl-2, lim1, lim3)がこの細胞群において時間的空間的に制御された様式で発現していること、及び Lhx 遺伝子群の組み合わせで分けられる細胞のサブグループが異なる部位に投射することから運動神経の分化に Lhx 遺伝子群が深

く関与することを示した³⁷⁾。後脳分節構造における「Hox コード」に対して「Lhx コード」とでも呼ぶべき興味深い結果と考えられる³⁸⁾。さらに彼らは isl-1 のノックアウトマウスを用いて、運動神経細胞の初期分化に isl-1 遺伝子が必須であることを証明した³⁹⁾。

我々はマウスにおける Lhx 遺伝子群を網羅的に解析する目的で、変性オリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR 法により部分 cDNA を増幅しシーケンス解析を行ったところ、既存のメンバー(LH-2, lim1, lim2, isl-1)に加えて既存のどれとも相同性が低い新規メンバーと考えられるクローンを得た。我々はこれを L3 と名付け全長 cDNA を取得、構造解析を行った。その結果確かに L3 は 2 個の LIM ドメインと LIM-type のホメオドメインを持つ新規のファミリーメンバーであることが明らかとなった。次に我々はこの L3 cDNA をプローブとして in situ hybridization (ISH) により発現ドメインをマップした。L3 cDNA はマウス胎児において非常にユ

ニークな発現パターンをとる事が明かとなった²⁶⁾。図6に示すように、神経系においては前脳基底部、非神経系においては上下顎の中胚葉組織特に口腔周囲部に限局して発現が認められる。このような発現パターンは少なくともそれまで報告されていたLhx遺伝子群には認められないもので、この事実からもL3は新規メンバーであることが強く示唆された。この部位特異的な発現は、胚が成長するにつれて弱くなってくるものの生後脳においても継続して同部位に観察される。他のメンバー(LH-2, lim1)についても同様の傾向が観察された(未発表)。このようなことからLhx遺伝子ファミリーは胎生期の一過性の細胞分化だけではなくその後も引き続いて機能していることが考えられる。

L3の解析と並行して行ったマウスにおけるLhx遺伝子群の胎生期神経系における発現を検討から興味深い事実が明らかとなった。このファミリーメンバーは脳内において極めて相補的な発現パターンを取り、お互いの発現ドメインの間に明瞭な境界が存在する⁴⁰⁾。このような発現の機能的意義であるが、Rubensteinらにより提唱されたprosomeric modelと比較してみると、これら発現ドメインが完全ではないが前脳のコンパートメント(prosomere)に対応しており、かつこれらの間の境界が提唱さ

れている境界と一致することが認められた。特に視床における背側視床、腹側視床の境界であるzona limitans intrathalamicaによってLH-2とlim1の発現が区切られている。これ以外に彼らが提唱していない境界(medial ganglionic eminence内の表層と深層の境界や中脳における腹内側、背外側間の境界など)がLhx遺伝子群により規定されることも明かとなってきた。

図5に示したように、Lhxファミリーのノックアウトマウスがその後次々と作成され、このファミリーの神経系における重要性が裏付けられてきている。現在まで9種類(正確には8種類と考えられる。後述)のメンバーのうち、1,2,3,4,5,8,9についてはKOマウスが存在する。各メンバーの発現ドメイン及びKOマウスの表現型を比較すると興味深いことに1と3、2と9、4と5、6と8がペアで脳神経系の形態形成を制御しているらしいということが徐々に明らかとなってきた。例えばLhx2とLhx9は大脳皮質の形成時に良く似た発現パターンを³²⁴⁾。我々が同定したL3は統一命名法でLhx8となったが、その同定されたLhx6^{26,27)}はLhx8と塩基配列が非常に似通っていること、および発現する組織がおおむねオーバーラップしていることから機能重複している可能性が考えられた。Lhx7はLhx6と同時に同定、報告されたがこれは

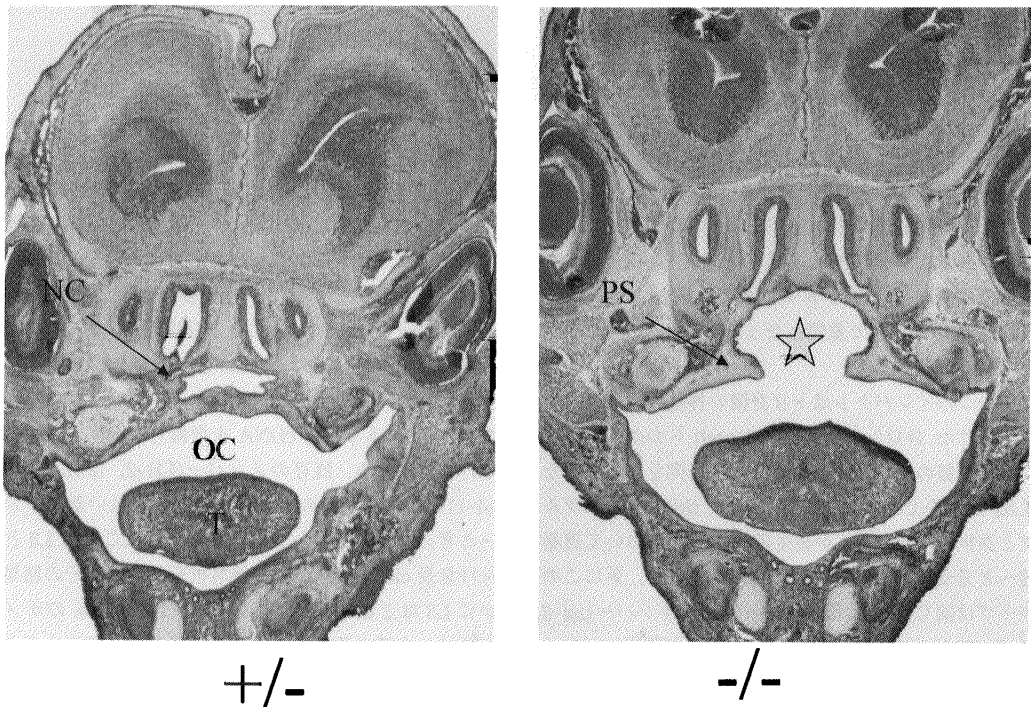
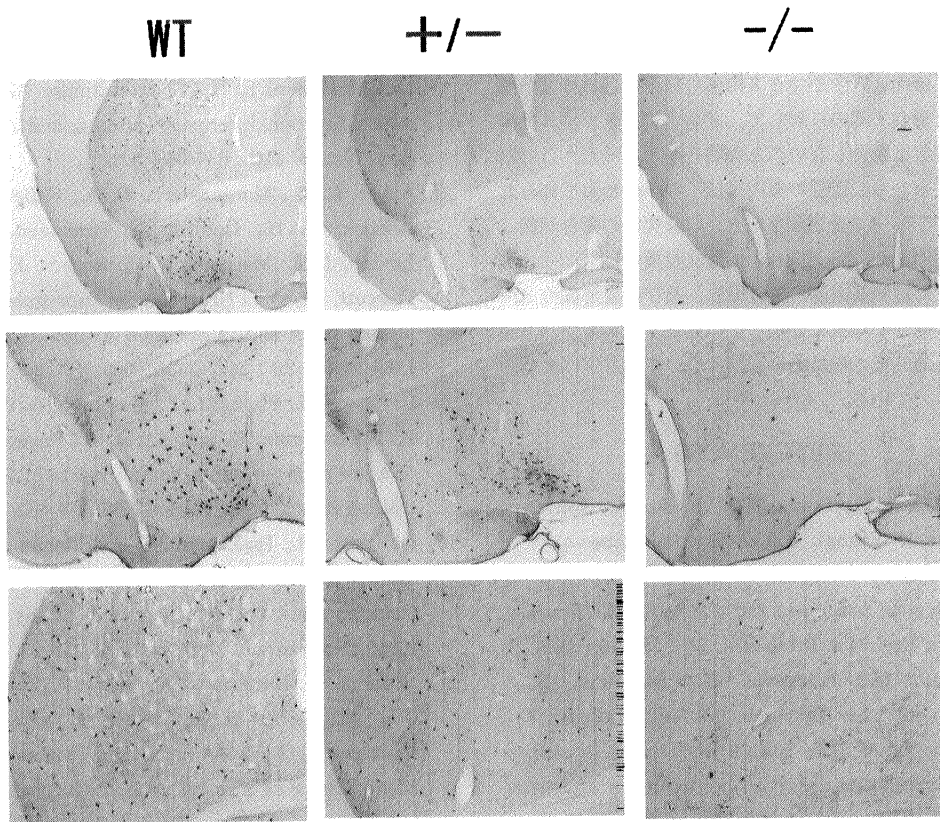


図7



線条体、無名質における ChAT 免疫反応

L3/Lhx KO マウスの一部はアダルトまで育ち、コリン作動性神経系の低形成とそれに由来すると考えられる学習障害を呈する。

図 8

Lhx8 とおそらく同一の遺伝子で塩基配列決定にミスがあったために別の遺伝子として登録されていたものと思われる。我々は L3/Lhx8 の KO マウスの作成を試みたが、残念ながら Westphal らが先にマウスを作成、報告した⁴²⁾。この Lhx8 ノックアウトマウスは神経系には明らかな異常を認めず、高率に口蓋裂を呈する。原因は確定されていないが、おそらくこの口蓋裂に起因する誤嚥により生直後にマウスは死亡してしまう。L3/Lhx8 の発現ドメインが口腔周囲部にあることから、口蓋裂の発生は想像に難くない結果と言える。しかし前脳基底部には特に異常を認めないのはなぜだろうか？我々は Westphal らの KO マウスと異なる部分の遺伝子を欠失したマウスを作成し、その解析を行った。Westphal らの KO マウスは Lhx8 の先頭部分が欠失しているのに対し、我々の KO マウスは Lim ドメインより後半が欠失している。この KO マウスは Westphal らのそれと同じく口蓋裂を発生する

が、発生頻度に違いがありほぼ 100% のホモ個体で口蓋裂が観察される (図 7, Zhang et al., 論文投稿中)。Lim ドメインが残存した形の KO マウスの方が、完全に遺伝子を欠失したマウスより、表現型が重篤であることになる。この原因についても確証は得られていないが、おそらく Lim ドメインが共存している Lhx (この場合発現ドメインがオーバーラップしている Lhx6) の機能をもブロックしてしまうことによるものと思われる。このマウスで神経系に異常が認められないか検索したところ、前脳基底部のアセチルコリン神経系が特異的に脱落していることを見出した (図 8, Mori et al., 論文投稿中)。よって Lhx6 と 8 は prosomere の形成というよりも、さらに分化の進んだ未分化神経細胞が神経伝達物質を選択する際に機能している可能性が高い。また我々は Lhx8 と Lhx6 が口蓋の形成において似通った発現をすることもマウス発生過程で詳細に検討することにより確認した⁴³⁾。

この結果を受けて、Lhx8のノックアウトマウスを用いて器官培養系でLhx8の口蓋形成における機能を検討したところ、確かに野生型マウス由来の口蓋突起は器官培養を行うと癒合するのに対して、ノックアウトマウス由来の口蓋突起は癒合しないことが明らかとなった。この培養系に由来から口蓋裂の原因遺伝子の一つとして知られているTGF- β 3を添加すると、口蓋突起の癒合が起こる事も判明した(Zhang et al. 論文投稿中)。

まだまだ前脳基底部の神経細胞、及び口蓋形成のメカニズムに関しては良く分からない点が多々あるが、Lhx8の解析を通してさらにその詳細について掘り下げて行きたいと考えている。

REFERENCES

- 1) Imaizumi, K., Tsuda, M., Wanaka, A., Tohyama, M. and Takagi, T.: Differential expression of sgk mRNA, a member of the Ser/Thr protein kinase gene family, in rat brain after CNS injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **26** : 189-196, 1994.
- 2) Tsuda, M., Kitagawa, K., Imaizumi, K., Wanaka, A., Tohyama, M. and Takagi, T.: Induction of SPI-3 mRNA, encoding a serine protease inhibitor, in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **35** : 314-318, 1996.
- 3) Matsuo, N., Ogawa, S., Takagi, T., Wanaka, A., Mori, T., Matsuyama, T., Pinsky, D. J., Stern, D. M. and Tohyama, M.: Cloning of a putative vesicle transport-related protein, RA410, from cultured rat astrocytes and its expression in ischemic rat brain. *J. Biol. Chem.* **272** : 16438-16444, 1997.
- 4) Matsuo, N., Ogawa, S., Imai, Y., Takagi, T., Tohyama, M., Stern, D. and Wanaka, A.: Cloning of a novel RNA binding polypeptide (RA301) induced by hypoxia/reoxygenation. *J. Biol. Chem.* **270** : 28216-28222, 1995.
- 5) Ridet, J. L., Malhotra, S. K., Privat, A. and Gage, F. H.: Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* **20**: 570-577, 1997.
- 6) Morgenstern, D. A., Asher, R. A. and Fawcett, J. W.: Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog. Brain Res.* **137** : 313-32.: 313-332, 2002.
- 7) Bradbury, E. J., Moon, L. D., Popat, R. J., King, V. R., Bennett, G. S., Patel, P. N., Fawcett, J. W. and McMahon, S. B.: Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* **416** : 636-640, 2002.
- 8) Asher, R. A., Morgenstern, D. A., Fidler, P. S., Adcock, K. H., Oohira, A., Braistead, J. E., Levine, J. M., Margolis, R. U., Rogers, J. H. and Fawcett, J. W.: Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J. Neurosci.* **20** : 2427-2438, 2000.
- 9) Davies, S. J., Fitch, M. T., Memberg, S. P., Hall, A. K., Raisman, G. and Silver, J.: Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* **390**: 680-683, 1997.
- 10) Ishikawa, M., Tsukamoto, T. and Yamamoto, T.: Long-term cultured astrocytes inhibit myelin formation, but not axonal growth in the co-cultured nerve tissue. *Mult. Scler.* **2** : 91-95, 1996.
- 11) Honma, Y., Kanazawa, K., Mori, T., Tanno, Y., Tojo, M., Kiyosawa, H., Takeda, J., Nikaido, T., Tsukamoto, T., Yokoya, S. and Wanaka, A.: Identification of a novel gene, OASIS, which encodes for a putative CREB/ATF family transcription factor in the long-term cultured astrocytes and gliotic tissue. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **69** : 93-103, 1999.
- 12) Nikaido, T., Iseki, K., Mori, T., Takaki, H., Yokoya, S., Hagino, S., Takeda, J., Zhang, Y., Takeuchi, M., Kikuchi, S. and Wanaka, A.: Expression of OASIS, a CREB/ATF family transcription factor, in CNS lesion and its transcriptional activity. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **108** : 129-138, 2002.
- 13) Omori, Y., Imai, J., Suzuki, Y., Watanabe, S., Tanigami, A. and Sugano, S.: OASIS is a transcriptional activator of CREB/ATF family with a transmembrane domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**: 470-477, 2002.
- 14) Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U. P., Prywes, R., Brown, M. S. and Goldstein, J. L.: ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* **6** : 1355-1364, 2000.

- 15) Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R. J. and Prywes, R. : Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* **275** : 27013-27020, 2000.
- 16) Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K. : Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* **10** : 3787-3799, 1999.
- 17) Dawid, I. B., Toyama, R. and Taira, M. : LIM domain proteins. *C. R. Acad. Sci. III* **318** : 295-306, 1995.
- 18) Freyd, G., Kim, S. K. and Horvitz, H. R. : Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature* **344** : 876-879, 1990.
- 19) Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T., Ohlsson, H. and Edlund, T. : Insulin gene enhancer binding protein *Isl-1* is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* **344**: 879-882, 1990.
- 20) Way, J. C. and Chalfie, M. : *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* **54** : 5-16, 1988.
- 21) Nunoue, K., Ohashi, K., Okano, I. and Mizuno, K. : LIMK-1 and LIMK-2, two members of a LIM motif-containing protein kinase family. *Oncogene* **11** : 701-710, 1995.
- 22) Muller, L., Xu, G., Wells, R., Hollenberg, C. P. and Piepersberg, W. : *LRG1* is expressed during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* and contains motifs similar to LIM and rho/racGAP domains. *Nucleic Acids Res.* **22** : 3151-3154, 1994.
- 23) Dawid, I. B. and Chitnis, A. B. : Lim homeobox genes and the CNS: a close relationship. *Neuron* **30**: 301-303, 2001.
- 24) Kitanaka, J., Takemura, M., Matsumoto, K., Mori, T. and Wanaka, A. : Structure and chromosomal localization of a murine LIM/homeobox gene, *Lhx8*. *Genomics* **49** : 307-309, 1998.
- 25) Matsumoto, K., Tanaka, T., Furuyama, T., Kashihara, Y., Mori, T., Ishii, N., Kitanaka, J., Takemura, M., Tohyama, M. and Wanaka, A. : *L3*, a novel murine LIM-homeodomain transcription factor expressed in the ventral telencephalon and the mesenchyme surrounding the oral cavity. *Neurosci. Lett.* **204** : 113-116, 1996.
- 26) Kimura, N., Ueno, M., Nakashima, K. and Taga, T. : A brain region-specific gene product *Lhx6.1* interacts with *Ldb1* through tandem LIM-domains. *J. Biochem. (Tokyo)* **126**: 180-187, 1999.
- 27) Grigoriou, M., Tucker, A. S., Sharpe, P. T. and Pachnis, V. : Expression and regulation of *Lhx6* and *Lhx7*, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development* **125** : 2063-2074, 1998.
- 28) Yamashita, T., Moriyama, K., Sheng, H. Z. and Westphal, H. : *Lhx4*, a LIM homeobox gene. *Genomics* **44** : 144-146, 1997.
- 29) Liu, Y., Fan, M., Yu, S., Zhou, Y., Wang, J., Yuan, J. and Qiang, B. : cDNA cloning, chromosomal localization and expression pattern analysis of human LIM-homeobox gene *LHX4*. *Brain Res.* **928** : 147-155, 2002.
- 30) Zhao, Y., Hermes, E., Yarolin, M. C. and Westphal, H. : Genomic structure, chromosomal localization and expression of the human LIM-homeobox gene *LHX5*. *Gene* **260** : 95-101, 2000.
- 31) Schmitt, S., Biason-Lauber, A., Betts, D. and Schoenle, E. J. : Genomic structure, chromosomal localization, and expression pattern of the human LIM-homeobox3 (*LHX 3*) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274** : 49-56, 2000.
- 32) Porter, F. D., Drago, J., Xu, Y., Cheema, S. S., Wassif, C., Huang, S. P., Lee, E., Grinberg, A., Massalas, J. S., Bodine, D., Alt, F. and Westphal, H. : *Lhx2*, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* **124** : 2935-2944, 1997.
- 33) Shawlot, W. and Behringer, R. R. : Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* **374** : 425-430, 1995.

- 34) **Taira, M., Otani, H., Saint-Jeannet, J. P. and Dawid, I. B.** : Role of the LIM class homeodomain protein Xlim-1 in neural and muscle induction by the Spemann organizer in *Xenopus*. *Nature* **372** : 677-679, 1994.
- 35) **Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T. M. and Yamada, T.** : Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* **256**: 1555-1560, 1992.
- 36) **Thor, S., Ericson, J., Brannstrom, T. and Edlund, T.** : The homeodomain LIM protein *Isl-1* is expressed in subsets of neurons and endocrine cells in the adult rat. *Neuron* **7** : 881-889, 1991.
- 37) **Varela-Echavarría, A., Pfaff, S. L. and Guthrie, S.** : Differential expression of LIM homeobox genes among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *Mol. Cell Neurosci.* **8** : 242-257, 1996.
- 38) **Lumsden, A.** : Neural development. A 'LIM code' for motor neurons? *Curr. Biol.* **5**: 491-495, 1995.
- 39) **Pfaff, S. L., Mendelsohn, M., Stewart, C. L., Edlund, T. and Jessell, T. M.** : Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* **84** : 309-320, 1996.
- 40) **Matsumoto, K., Tanaka, T., Furuyama, T., Kashihara, Y., Ishii, N., Tohyama, M., Kitanaka, J., Takemura, M., Mori, T. and Wanaka, A.** : Differential expression of LIM-homeodomain genes in the embryonic murine brain. *Neurosci. Lett.* **211**: 147-150, 1996.
- 41) **Bertuzzi, S., Porter, F. D., Pitts, A., Kumar, M., Agulnick, A., Wassif, C. and Westphal, H.** : Characterization of *Lhx9*, a novel LIM/homeobox gene expressed by the pioneer neurons in the mouse cerebral cortex. *Mech. Dev.* **81**: 193-198, 1999.
- 42) **Zhao, Y., Guo, Y. J., Tomac, A. C., Taylor, N. R., Grinberg, A., Lee, E. J., Huang, S. and Westphal, H.** : Isolated cleft palate in mice with a targeted mutation of the LIM homeobox gene *lhx8*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96** : 15002-15006, 1999.
- 43) **Zhang, Y., Mori, T., Takaki, H., Takeuchi, M., Iseki, K., Hagino, S., Murakawa, M., Yokoya, S. and Wanaka, A.** : Comparison of the expression patterns of two LIM-homeodomain genes, *Lhx6* and *L3/Lhx8*, in the developing palate. *Orthod. Craniofac. Res.* **5** : 65-70, 2002.