

中枢神経系のパターン形成に関与する分泌性因子
Sonic hedgehog の細胞内シグナル伝達機構の研究

加藤 真樹

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞内情報学講座

(塩坂 貞夫 教授)

平成14年 1月 8日提出

目次

第一章 Shh シグナル伝達系における濃度依存的な作用と Gli 転写因子群の関係

序論	1
材料と方法	4
結果	
Shh のシグナル伝達系における Gli 転写因子の関与	7
Gli 転写因子群の機能的相異	7
Gli 転写因子群の発現調節	8
Gli 転写因子群による Shh 標的遺伝子群の発現制御	9
底板の分化誘導因子 HNF-3 β による Gli-1 の機能の抑制	9
Shh による濃度依存的な遺伝子発現制御	10
考察	
Hedgehog シグナル伝達系における Ci/Gli	12
脊椎動物 Gli とショウジョウバエ Ci の発現および機能の比較	12
Shh の濃度依存的な遺伝子発現制御機構	14
遺伝子発現カスケードと Shh の濃度依存的な作用機構	15

第二章 cDNA マイクロアレイを用いた Shh 応答性遺伝子群の探索

序論	21
材料と方法	23
結果	
cDNA マイクロアレイによる Shh 応答性遺伝子群のスクリーニング	27
Gli 転写因子群による新規 Shh 応答性遺伝子の発現制御	28
発生期脳における Cp の領域特異的遺伝子発現	28
考察	
cDNA マイクロアレイを用いた Shh 応答性遺伝子の同定	29
Gli に依存しない Shh シグナル伝達経路の存在の可能性	30
Shh の下流における ITIH3 の生物学的機能	31

Shh の下流における Cp の生物学的機能	31
謝辞	33
参考文献	34
表	45
図の説明	46
図	49

第 1 章

Shh シグナル伝達系における濃度依存的な作用と **Gli** 転写因子群の関係

序論

ヒトを含む哺乳動物の脳は、それぞれ異なる領域特異性をもった多種多様な細胞群によって構成されている。この脳細胞の領域特異性を決定する分子メカニズムを明かにすることは、脳の形態形成を理解する上で極めて重要な課題の一つである。

脳神経系の領域特異性決定の最も初期の過程は、未分化な前駆細胞よりなる神経上皮組織が、胎児のもつ前一後（あるいは頭一尾）、背一腹の2つの体軸に沿ってパターン化されることである (Lumsden and Krumlauf, 1996)。特に神経板あるいは神経管の背腹軸に沿った特異性決定の過程においては、周囲組織から作用する分泌性シグナル分子が極めて重要な役割を果たしていることが、最近明らかになりつつある。すなわち、腹側化の誘導においては、胎児の腹側正中部に位置する中軸中胚葉組織である脊索より Sonic hedgehog (Shh) と呼ばれる因子が分泌され、これが神経板ならびに神経管に作用することによって、底板、運動ニューロン、腹側介在ニューロンなどの腹側ニューロン群が誘導される。一方、神経管の背側部に位置する外胚葉組織ならびに間葉組織からは TGF- β スーパーファミリーに属する Bone morphogenetic protein (BMP) が作用し、Shh と拮抗的に働くことで神経管の背側に位置する一群のニューロンを誘導するとされている (Roelink, 1996; Tanabe and Jessell, 1996)。

ここで Shh あるいは BMP のシグナル分子としての特異な点は、両者がいずれもいわゆるモルフォジェン (Morphogen) として機能することである (Johnson and Tabin, 1995; Lawrence and Struhl, 1996)。特に Shh については、濃度依存的に複数の異なる細胞種の分化を誘導し得ることが、これまでの様々な研究から明かにされている (Hammerschmidt *et al.*, 1997; Johnson and Tabin, 1995)。Shh タンパク質は約 35 kDa の前駆体として合成され、自身の持つプロセッシング活性によって約 20kDa の N 末端ドメイン (Shh-N) とそれ以外の C 末端ドメインに切断される (Bumcrot *et al.*, 1995; Fan *et al.*, 1995; Marti *et al.*, 1995; Roelink *et al.*, 1995)。Shh のもつ生物活性は全て Shh-N 断片にあるとされており、その一部は細胞外に分泌され、また一部は発現細胞の膜表面にアンカーされた形で保持される。これまでに良く解析されているニワトリ脊髄ニューロンの分化誘導においては、まず初期過程で脊索に発現する Shh が最も近位に位置する神経管腹側正中部に対して最も高濃度で作用し、ここに底板を誘導する。この分化した底板はさらに Shh を分泌するようになるが、この作用によって底板に隣接する部位に運動ニューロンが分化する (Marti *et al.*, 1995; Roelink *et al.*, 1995)。底板の分化誘導には運動ニューロンよりもより高濃度の Shh が必要とされることが、実験的に示されている (Hynes *et al.*, 1995; Marti *et al.*, 1995;

Roelink *et al.*, 1995)。さらに運動ニューロンの背側部には、より低濃度の Shh に依存して腹側介在ニューロンが誘導される (Ericson *et al.*, 1996)。Shh のもつモルフォジェンとしての作用は、脊髄レベルに留まらず神経管の前後軸に沿った様々な領域で観察されており、神経系の領域特異性の決定過程における極めて重要な機構のひとつと考えられる (Ericson *et al.*, 1995; Hynes *et al.*, 1995)。また Shh を含む Hedgehog ファミリーに属する因子群のモルフォジェンとしての機能は、神経系に限らず、中胚葉組織である体節、あるいは肢芽の形成など、様々な組織の発生過程に関与しており、形態形成の多様な局面で極めて重要な役割を担っていると考えられている (Hammerschmidt *et al.*, 1997; McMahon, 2000)。

以上のような Shh の持つ特異な生物学的活性から、その細胞内シグナル伝達機構が注目を集めている。元々脊椎動物の Shh 遺伝子は、ショウジョウバエの segment-polarity 遺伝子群に属する hedgehog (Hh) の相同遺伝子ファミリーのメンバーのひとつとして単離された (Echelard *et al.*, 1993; Hammerschmidt *et al.*, 1997; Krauss *et al.*, 1993; Roelink *et al.*, 1994)。これまでの解析から、ショウジョウバエの Hh ならびに脊椎動物の Shh は、いずれも細胞膜上に存在する Smoothed (Smo) および Patched (Ptc) と呼ばれる 2 種類の膜貫通型タンパク質で構成される受容体を介して、細胞内にシグナルを伝達するとされている (Alcedo *et al.*, 1996; Chen and Struhl, 1996; Goodrich *et al.*, 1996; Hooper and Scott, 1989; Ingham *et al.*, 1991; Marigo *et al.*, 1996a; Marigo *et al.*, 1996b; Nakano *et al.*, 1989; Stone *et al.*, 1996; van den Heuvel and Ingham, 1996)。また、ショウジョウバエにおいては、Cubitus interruptus (Ci) と呼ばれる転写因子が Hh のシグナル伝達系において極めて重要な役割を担っていることが示されている (Alexandre *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1996; Hepker *et al.*, 1997; Von Ohlen *et al.*, 1997)。Ci の脊椎動物における相同遺伝子は Gli 転写因子ファミリーと呼ばれ、特に哺乳動物においてはこれまでに GLI (本論文では以降 Gli-1 と表記)、Gli-2, Gli-3 の 3 種類のメンバーの存在が知られている (Hui *et al.*, 1994; Kinzler *et al.*, 1988; Ruppert *et al.*, 1988)。Ci および Gli 転写因子は、ともに分子の N 末端約 1/3 の領域に C2H2-type の Zinc-finger motif を有し、この部分で特異的 DNA 配列を認識することで遺伝子発現の制御を行うと考えられている (Kinzler and Vogelstein, 1990; Vortkamp *et al.*, 1995)。最近になって、Shh の底板における標的遺伝子である HNF-3 β の発現に必須の制御領域に Gli の結合配列が見出され、この配列が Shh 応答性を規定するエレメントのひとつであることが明かにされた (Sasaki *et al.*, 1997)。また、マウスあるいはアフリカツメガエルを用いた Gli-1 の異所的な高発現によって、Shh 標的遺伝子の発現が誘導されることが示されている (Hynes *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997)。しかしながら、脊椎動物において

Shh の下流で 3 種類の Gli 転写因子がどのような生理的な機能を担っているのかについては、未だ多くの点が不明のまま残されている。また、異なる濃度の Shh がどのようなシグナル伝達機構を介して、最終的に異なる細胞運命を誘導するのかという最も重要な問題についても、未だほとんど明かになっていない。そこで本研究では、我々の研究グループにおいて樹立された Shh 応答性の神経前駆細胞株 MNS-70 (Nakafuku and Nakamura, 1995; Nakagawa *et al.*, 1996) をモデル系として、Shh の細胞内シグナル伝達の分子機構の詳細を解明することを目的とした研究を行った。

材料と方法

プラスミド

マウス Shh タンパク質のうち、アミノ酸残基 1 番目から 198 番目までを含む Shh-N 断片 (Bumcrot *et al.*, 1995) をコードする cDNA を、マウス Shh 全長 cDNA (ハーバード大学、A. McMahon 博士より供与) を鋳型とした polymerase chain reaction (PCR) 法により得た。用いたプライマーは、sense: 5' - ATG-CTG-CTG-CTG-CTG-GCC-AG - 3'、 antisense: 5' - GGA-ATC-AGC-CGC-CGG-ATT-TGG - 3' である。得られた cDNA 断片を、EF-1 α プロモーターを持つ哺乳動物細胞発現ベクターである pEF-BOS (Mizushima and Nagata, 1990)、あるいは組み換え型 baculovirus 作成用に構築されたプラスミド pACYM1 (Matsuura *et al.*, 1987) に組み込んだ。SR α プロモーターを持つ発現ベクター pME18S に組み込んだヒト Gli-1 (Kinzler *et al.*, 1988) および Gli-3 (Ruppert *et al.*, 1988) cDNA は理化学研究所の石井俊介博士から、Cytomegaro virus (CMV) 由来プロモーターを持つ発現ベクター pCDNA3 に組み込んだマウス Gli-1 および Gli-2 cDNA (Hughes *et al.*, 1997; Hui *et al.*, 1994) およびラット HNF-3 α および HNF-3 β cDNA (Lai *et al.*, 1990; Lai *et al.*, 1991) は、それぞれ大阪大学の佐々木洋博士、熊本大学 (現・千葉大学) の滝口正樹博士より供与された。また、ニワトリ δ crystallin 遺伝子プロモーターの上流に Gli 結合配列を含むオリゴヌクレオチドをクローン化したレポータープラスミド δ Gli α -BS Luciferase は、同じく佐々木洋博士より供与されたものである (Sasaki *et al.*, 1997)。

細胞培養と遺伝子導入

神経前駆細胞株 MNS-70 は、ラット胎生 11.5 日胚の前脳、中脳領域の神経上皮組織の初代培養より樹立された不死化細胞株である (Nakafuku and Nakamura, 1995; Nakagawa *et al.*, 1996)。この細胞株は、c-Myc とエストロゲン受容体のリガンド結合ドメインとの融合タンパクをコードする c-Mycer 遺伝子を導入して樹立された。MNS-70 細胞は、標準培地 (Dulbecco's Eagle's medium 培地 [DMEM] と F-12 培地を 1 : 1 で混合した培地 [三光純薬] に 10% fetal bovine serum [FBS ; 三光純薬]、5% horse serum [HS ; GIBCO BRL]、100 units/ml penicillin [萬有製薬]、100 μ g/ml streptomycin [明治製薬] を添加して作成) を用いて、単層培養にて継代した。その培養、ならびに Shh 発現 CV1 細胞の培養上清による処理は、既に報告されている方法に従った (Nakagawa *et al.*, 1996)。遺伝子導入には、標準的なリン酸カルシウム法を用いた (Chen and Okayama, 1987)。

レポーターアッセイ

Shh および Gli 転写因子の遺伝子発現に対する効果を検討するため、Gli 結合配列を持つレポータープラスミド δ Glix8-BS Luciferase を用いた解析を行った。6 ウェルプレート上で $3 \times 10^5/\text{cm}^2$ の密度で培養した MNS-70 細胞に、 δ Glix8-BS Luciferase (2 μg) を各種 cDNA 発現プラスミドとともに導入した。遺伝子導入効率を検定するための内部標準として、 β -ガラクトシダーゼ発現ベクター (pEF-BOS- β -gal; 3 μg) を同時に導入した。遺伝子導入後 48-72 時間培養した細胞をリン酸緩衝液[PBS(-)]にて 2 回洗浄後に回収し、250 μl の Lysis Buffer (25mM Tris/ PO_4 pH 7.8, 2mM dithiothreitol, 10% glycerol, 1% Triton X-100) に懸濁、溶解した。得られた細胞溶解液を 13000 x g で 5 分間遠心し、その上清をルシフェラーゼおよび β -ガラクトシダーゼの酵素活性の測定に用いた (Chihara *et al.*, 1997)。 β -ガラクトシダーゼの活性測定には、上清 50 μl を反応液 (60mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 40mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10mM KCl, 1mM MgCl_2 , 48mM 2-mercaptoethanol, 330 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside) と混合し、37°C で反応させた。酵素反応を 1M Na_2CO_3 を 50 μl 加えて停止させた後、反応液の吸光度 420nm で測定した。またルシフェラーゼの活性測定には、上清 50 μl を反応液 (20mM Tricine/ NaOH pH 7.8, 1.07mM $(\text{MgCO}_3)_4$ $\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2.67mM MgSO_4 , 0.1mM EDTA, 33.3mM dithiothreitol, 270 μM coenzyme A, 530 μM 5'-ATP $\cdot$ 2Na, 477 μM D-luciferin potassium salt) と混合し、ルミフォトメーター (Model TD-4000, Labo Science) で測定した。各サンプルのルシフェラーゼの酵素活性を β -ガラクトシダーゼの酵素活性の値で標準化し、相対的な遺伝子発現量の比較に用いた。

組み換え型 Shh-N の調整

マウス Shh-N cDNA 断片を組み込んだ組み換え型 baculovirus を、昆虫細胞 Tn5 に感染させ、無血清培地 (EX-CELL405, GIBCO BRL) を用いて培養した。培養上清中に分泌された Shh-N タンパク質を回収し、Centriprep-10 (Amicon) を用いて濃縮した。調製した試料中の Shh-N の濃度は、GST 融合タンパク質として発現させ精製した Shh-N を標準試料として、ウサギ抗 Shh 抗体 (ハーバード大学 McMahon 博士より供与) (Bumcrot *et al.*, 1995) を用いた Western blot 解析により求めた。調整した Shh-N 試料は、SDS 電気泳動したサンプルのクマシーブルー染色の結果から約 30% の精製度であった。Shh-N cDNA 断片を組み込まない baculovirus を感染させた Tn5 の培養上清を同一の手法を用いて調製し、総タンパク質濃度を揃えてコントロール標品として用いた。

定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法による遺伝子発現の解析

組み換え型 Shh-N によって処理、あるいは各種発現ベクターを遺伝子導入した MNS-70 細胞より、Quick Prep Total RNA Extraction Kit (Pharmacia Biotech) を用いて、total RNA を抽出した。発現レベルのコントロールとして、胎生 11.5 日胚神経上皮組織より同様の手法で RNA を調製した。得られた total RNA より、SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase (GIBCO BRL)を用いて逆転写し cDNA を得た。この cDNA を鋳型として、既に報告されている手法 (Nakagawa *et al.*, 1996)に準拠して定量的 RT-PCR 法を行い、各種遺伝子の発現を解析した。PCR 反応は Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim)を用い、95°C 30 秒-56°C 30 秒-72°C 60 秒の反応を 1 サイクルとして、28 サイクル行った。Primer は、表 1 に示したものを使用した。各プライマーセットを用いて特異的に増幅された PCR 産物を 6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、0.01% の濃度で SYBER Green I (Amersham)を含む溶液で 30 分間染色した。得られたバンドの蛍光強度は、FluorImager SI (Molecular Dynamics)を用いて定量した。各遺伝子の発現量は、 β -actin の発現量を内部標準とした相対値として比較した (Nakagawa *et al.*, 1996)。また各 Primer セットを用いて増幅された PCR 産物は、pBluescriptII SK-にクローン化し、その塩基配列を蛍光プライマーを用いたジデオキシ法 (ABI 377 DNA sequencer, Parkin-Elmer) により決定した。いずれの PCR 産物も、目的の遺伝子をコードする mRNA に由来して Primer 特異的に増幅されたことが確認されている。

結果

Shh のシグナル伝達系における Gli 転写因子の関与

まず、哺乳動物細胞における Shh のシグナル伝達系における Gli ファミリーの転写因子の生理機能を明らかにするため、Gli に依存した遺伝子発現制御の解析系を構築した。我々のグループではこれまでに、底板において特異的に発現する遺伝子 HNF-3 β の Shh 応答性エンハンサー領域の中に Gli の認識・結合配列と相同な配列を見出している (Sasaki *et al.*, 1997)。そこで、この Gli 結合配列を含む 32 bp のオリゴヌクレオチドを 8 個並列にクローン化した、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子とするプラスミド (δ Glix8-BS Luciferase) を作成した (Sasaki *et al.*, 1997) (図 1 A)。このレポーターを、Shh-N をコードする cDNA 断片発現プラスミドとともに MNS-70 細胞に導入すると、Shh-N 依存的な転写活性化が認められた (図 1 B)。コントロールプラスミド (δ Luciferase) では、このような活性化は起こらないことから、ここで観察される Shh による活性化は Gli 結合配列を介していると結論された。以上の結果より、Shh のシグナル伝達系の下流で Gli 転写因子ファミリーが機能していることが示唆された。同様の系を用いて 3 種類の Gli 因子の発現プラスミドを導入すると、Gli-1 あるいは Gli-2 の発現によってレポーターの強い活性化が観察されたが、Gli-3 の場合は逆に発現の抑制が認められた (図 1 C)。従って Shh による遺伝子発現制御において、Gli-1、Gli-2 は正の制御因子として機能し、一方 Gli-3 は負の制御因子である可能性が考えられた。

Gli 転写因子群の機能的相違

次に、3 種類の Gli 因子の生理機能の相違を明らかにするための手がかりとして、Gli-1 あるいは Gli-2 の活性を特異的に抑制するツールを用いた解析を行った。我々は、Gli-2 の一連の欠失変異体を作成する過程で、Gli-2 の N 末端近傍のみをコードする cDNA 部分断片 (Gli-2-DN) の発現プラスミドが、Gli-1 によるレポーターの活性化を強く阻害することを見出した (図 2 A)。図 2 B に示すように、Gli 結合配列を持つレポーターは、同時に遺伝子導入した Gli-1 あるいは Gli-2 発現プラスミドの量に依存して活性化が観察された。ここに Gli-2-DN を共発現させると、Gli-1 による活性化が強く阻害されるのに対して、Gli-2 による活性化はほとんど抑制されなかった (図 2 B)。Gli-2-DN の発現プラスミドの量依存性を解析した場合にも、同様の結果が得られた (図 2 C)。従ってこの Gli-2-DN は、ここで用いた実験条件下で Gli-1 に特異的な抑制因子として機能すると考えられた。この Gli-2-DN を Shh-N 発現プラスミドとともに共発現させると、Shh による

レポーターの活性化は阻害されないことが明らかになった (図 2 D)。このことは、ここで観察された Shh によるレポーターの活性化は Gli-1 に依存していないことを強く示唆している。さらに、Gli-3 発現プラスミドを共発現させた場合には、Shh、Gli-1、Gli-2 いずれによるレポーターの活性化も阻害された。しかしながら、同一実験条件下では Gli-1 の活性が Gli-3 によって極めて強く阻害されるのに対して、Shh あるいは Gli-2 の活性の阻害は部分的であった (図 2 D)。マウスあるいはアフリカツメガエルを用いた Gli-1 の異所的な発現によって Shh 標的遺伝子の発現が誘導されることが示されており、このことから Gli-1 が Shh シグナルの伝達を行うとするモデルが提唱されている (Hynes *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997)。しかしながら以上の結果から、少なくとも MNS-70 細胞においては、Shh が作用した際の初期シグナルは Gli-1 ではなく主に Gli-2 によって伝達されていると考えられた。また高発現した Gli-3 は、Gli-2 あるいは Gli-1 を介した Shh のシグナル伝達に対して抑制的な効果を持つことが示された。

Gli 転写因子群の発現調節

次に、MNS-70 細胞における Shh 受容体および Gli 転写因子群の発現動態を RT-PCR 法を用いて解析した (図 3)。未処理の MNS-70 細胞において、Shh 受容体複合体を構成する Ptc と Smo、ならびに Gli-2、Gli-3 の mRNA は、胎生 11.5 日胚の神経上皮組織 (NE) とほぼ同程度の生理的なレベルで発現していた。一方、Gli-1 mRNA はコントロールレベルの 1/100 以下しか検出されなかった。これは上記のレポーター遺伝子を用いた解析の結果と良く一致しており、MNS-70 細胞における Shh シグナルの伝達の少なくとも初期過程においては、Gli-1 ではなく Gli-2 が主要な機能を果たしていると結論された。

次に Shh-N 発現 CV1 細胞の培養上清を用いて、これら遺伝子の発現に対する Shh の効果を検討した。MNS-70 細胞に Shh-N を作用させると、Ptc および Gli-1 の mRNA レベルの著明な増加が観察された。また、Gli-2 および Gli-3 の発現レベルは処理前に対して約 2 倍増加し、一方 Smo の発現レベルは約 1/2 に低下していた。このような *in vitro* の培養系で観察された Gli および Ptc、Smo の発現は、これまで報告されている *in vivo* における遺伝子発現パターンとよく一致している (Goodrich *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997; Marigo *et al.*, 1996b; Sasaki *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1996)。すなわち、脊索あるいは脊索前板において Shh が発現し神経板に作用し始める時期では、Gli-2、Gli-3、Ptc、Smo はすでに構成的に発現している。発生が進行すると、Shh の作用によって神経板正中部 (後の神経管腹側部) に Gli-1、Ptc の強い発現誘導が認められる。また、Shh の異所的な発現によって周囲組織における Ptc および Gli-1 の発現が増加することが報告されており、Gli-1、

Ptc は Shh の標的遺伝子であると考えられる (Goodrich *et al.*, 1996; Grindley *et al.*, 1997; Hynes *et al.*, 1997; Marigo *et al.*, 1996b; Marigo *et al.*, 1996c)。Gli-1 の発現が Shh によって誘導されること、および上記のレポーターを用いた解析で Gli-1 が Gli-2 と同様に Shh のシグナルを伝達し得る活性をもつことを合わせて考えると、両転写因子には機能的な役割分担があり、Shh の作用の初期過程では Gli-2 が機能し、この Gli-2 の作用によって発現が誘導される Gli-1 がさらに時間的に後期のシグナル伝達に参画する、というモデルが考えられた。

Gli 転写因子群による Shh 標的遺伝子群の発現制御

次に、内在性遺伝子の発現を指標として、Gli 因子群の生理機能をさらに解析した。MNS-70 細胞に Shh-N 発現プラスミドを遺伝子導入することで、上記の結果と一致して、Ptc ならびに Gli-1 mRNA レベルの増加が観察された (図 4 A)。さらに、Gli-1 あるいは Gli-2 発現プラスミドを導入すると、内在性の Gli-1 遺伝子の発現誘導が観察された。次に、Shh 応答性遺伝子群のうち、細胞の領域特異性を反映する分化マーカー遺伝子として、Hepatocyte Nuclear Factor-3 β (HNF-3 β) ならびに Nkx2.1 について解析した (図 4 B)。Shh-N、Gli-1、Gli-2 の各発現プラスミドを MNS-70 細胞に導入した場合、いずれも Nkx2.1 mRNA の発現誘導が観察された。これに対して HNF-3 β は、Gli-1 の高発現によってのみその発現が検出可能なレベルで誘導された。また Gli-3 の高発現によつては、上記のいずれの遺伝子の誘導も検出されなかった。以上の結果は、Gli-1、Gli-2 の高発現がそれぞれ単独の活性で Shh による遺伝子発現の誘導を再現し得ることを示している。従つて、本実験によつて、Gli 転写因子が Shh の下流で機能する主要なシグナル伝達分子であることが直接的に示された。また、この内在性遺伝子の発現誘導における 3 種類の Gli 遺伝子の機能は、レポーター遺伝子を用いた解析結果と良く一致している。すなわち、Gli-1 及び Gli-2 が Shh のシグナルを媒介して遺伝子発現を正に制御する転写因子であるのに対し、Gli-3 には転写の正の制御因子としての活性は認められず、むしろ高発現すると Gli-1、Gli-2 の機能に対して抑制的に作用すると考えられる。また、Nkx2.1 と HNF-3 β という 2 種類の異なる Shh 標的遺伝子に対して、Gli-1 と Gli-2 が異なる特異性を持つことが示唆された。

底板の分化誘導因子 HNF-3 β による Gli-1 の機能の抑制

先に述べたように、発生初期にまず脊索に発現する Shh は、神経板正中部 (後の神経管腹側部) に Gli-1 の強い発現を誘導する。一方これまでの報告では、さらに発生が進

行し腹側正中部で底板が分化する時期になると、それ以前に最も強い発現が見られた正中部での Gli-1 の発現はかえって低下する現象が観察されている (Lee *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1997)。この底板の分化に先だって Shh により腹側正中部に誘導され、底板の分化に必須の役割を果たす遺伝子が HNF-3 β である (Altaba *et al.*, 1993; Ruiz i Altaba *et al.*, 1995; Sasaki and Hogan, 1994)。前項の結果より、HNF-3 β の発現は Gli-1 によって直接的に誘導されることが明かになった。そこで、HNF-3 β と Gli の底板での発現消失との間には何らかの関連があるのではないかと考え、HNF-3 β の Gli の機能に及ぼす影響を検討した。その結果、HNF-3 β の高発現によって、Gli-1 あるいは Gli-2 のもつ転写活性化の機能が顕著に抑制されることが明かになった (図 5 A)。また、HNF-3 β は Shh による転写活性化も強く阻害した (図 5 B)。HNF-3 β に依存して底板で発現し、HNF-3 β に類似の構造を持つ HNF-3 α (Lai *et al.*, 1990; Sasaki and Hogan, 1994)も、同様に Gli-1、Gli-2 を阻害する活性を有していた。Gli-1 の発現が Gli-2 あるいは Gli-1 自身の活性に強く依存していることを考え合わせると、将来底板になる腹側正中部において Shh によって誘導される HNF-3 β は、底板の分化を誘導するとともに Gli-1 の機能を抑制し、結果的に Gli-1 の発現をも抑制するように機能していると考えられた。

Shh による濃度依存的な遺伝子発現制御

先に述べたように、Shh はいわゆるモルフォジェンとして機能しており、異なる濃度で作用することによって異なる細胞運命を誘導すると考えられている。この Shh のモルフォジェンとしての作用の実体を明かにするために、種々の濃度で処理した細胞の応答性の違いを遺伝子発現を指標として解析した。ここでは特に、Shh の標的遺伝子のうち、Shh のシグナル伝達に直接関与する Ptc および Gli-1 の発現を解析した。Shh タンパク質としては、組み換え型 Shh-N タンパク質を Baculovirus ベクター系を用いて昆虫細胞で発現させ、精製した標品を用いた。種々の濃度の Shh-N によって細胞を処理後、total RNA を単離し、遺伝子発現レベルを定量的 RT-PCR 法により解析した (図 6A)。その結果、Shh 受容体分子である Ptc は、0.2-0.5nM という低濃度の Shh によって発現誘導が観察され ($EC_{50} \div 0.25nM$)、0.5nM から 10nM の間の濃度変化ではそのレベルはほぼ一定であった。さらに Ptc の発現は 2 相性を示し、25nM 以上の濃度の Shh を作用させるとその発現レベルは著明に上昇した ($EC_{50} \div 11.5nM$)。一方、Gli-1 mRNA の発現は低濃度の Shh によっては誘導されず、25nM 以上の濃度ではじめて顕著な増加が認められた ($EC_{50} \div 12.0nM$)。両遺伝子の発現パターンを比較すると、1nM あるいはそれ以下の低濃度の Shh-N によっては、Ptc の発現のみが誘導されていた。1-10nM の濃度では Ptc の発現レ

ベルに大きな変化はなく、Gli-1 の発現が濃度依存的に弱く誘導された。さらに、10nM を越える Shh-N が細胞に作用すると、Ptc, Gli-1 とともに著明な発現誘導が起こった。ここで特徴的な点は、この実験条件下では 10nM から 25nM へという Shh-N 濃度の 2.5 倍の変化によって、遺伝子発現レベルに大きな変化が認められたことである。このことから、Shh が Ptc と Gli-1 という異なる標的遺伝子の発現を誘導する際には、それぞれ異なる閾値 (Ptc の場合は約 0.1nM ; Gli-1 の場合は約 1nM) が存在するものと考えられた。また、両遺伝子ともに約 12nM の閾値を持って、Shh による非常に強い発現誘導が観察された。以上の結果から、異なる濃度の Shh が作用することによって、細胞内において質的に異なる遺伝子発現応答が起こることが明かになった。

考察

Hedgehog シグナル伝達系における Ci/Gli 転写因子の機能

本研究によって、神経系の背腹軸決定に重要な役割を担う Shh のシグナル伝達系において、Gli ファミリーの転写因子が主要な機能を果たしていることが明らかになった。ショウジョウバエにおいては、Gli の相同遺伝子である Ci の機能欠損型変異のホモ接合体で Hh のシグナル機能がほぼ完全に失われること、Ci の強制高発現によって Hh の機能欠損型変異の表現型が回復すること等から、Ci が Hh のシグナル伝達において必要かつ十分な機能を持つ因子と考えられている (Alexandre *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1996; Hepker *et al.*, 1997; Von Ohlen *et al.*, 1997)。本研究において、哺乳動物の Ci 相同遺伝子である Gli-1 あるいは Gli-2 によって、Shh の標的遺伝子としてこれまでに同定されている多くの遺伝子 (Ptc, Gli-1, Nkx2.1, HNF-3 β) の発現が直接的に誘導されることが示された (図 4)。従って無脊椎動物であるハエと哺乳動物において、Hedgehog のシグナル伝達系の基本的な機構は、下流で働く Ci/Gli 転写制御因子の構造と機能のレベルで極めて良く保存されていることが明かとなった。

脊椎動物 Gli とショウジョウバエ Ci の発現および機能の比較

しかし本研究での解析から、ショウジョウバエの Ci と哺乳動物の Gli との間には幾つかの相違点が見出された。まずこれまでの報告では、ショウジョウバエにおいて Ci の相同あるいは類似遺伝子はみつかっていない。一方今回の我々の研究により、哺乳動物細胞では少なくとも 3 種類の Gli が Shh のシグナル伝達に関与しており、各々が異なる機能を有していることが明らかになった。また Ci と 3 種類の Gli では、その活性あるいは発現制御にそれぞれ特色がみられる。Hh が形態形成に重要な役割を果たすショウジョウバエの翅の原基においては、Ci の mRNA レベルでの発現は Hh からのシグナルとは独立して構成的に起こるとされている (Alexandre *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1996; Hepker *et al.*, 1997)。このことから、Hh の作用は Ci タンパク質の何らかの形での post-translational な修飾・活性化を介しているものと推定されている。実際、最近になって、Ci タンパク質は Hh の作用していない状態の細胞において、N 末端から 703/704 番目のアミノ酸残基の間で切断を受け、Zinc-finger domain を含む N 末端部分断片 (Ci-N) が核内に蓄積して、転写の repressor として機能していると報告されている (Aza-Blanc *et al.*, 1997)。そして Hh の作用機構として、全長の Ci が Ci-N へ分解される過程を抑制し、結果的に転写の repressor から activator へと変換するとするモデルが提唱されている。MNS-70 細胞にお

いて、Shh の作用する以前から mRNA レベルでの発現の認められる Gli-2 が、Shh の初期シグナルの伝達に機能していることが明かになった (図 2、3)。従って Gli-2 を介した Shh のシグナル伝達においては、Ci と同様になんらかの post-translational な活性化機構が働いていることが推定される。一方 Gli-1 は、Gli-2 あるいは Ci とは明かに異なり、Shh によって転写レベルでの正の制御を受けていた (図 3、6)。従って哺乳動物の Shh シグナルは、その機能だけでなく発現制御機構が異なる 2 種類の Gli 因子によって伝達されていると考えられる。最近になって、Gli-2 の変異マウスの報告がなされ (Ding *et al.*, 1998; Matise *et al.*, 1998)、Gli-2 の変異マウスでは底板が欠失し、Gli-1 の発現の減少が観察された。また、Gli-1 の変異マウスでは顕著な表現系が現れないことから、Shh の下流では Gli-2 が主なシグナル伝達分子として機能しているとされており、本研究における結果と一致する。

さらに、ショウジョウバエの Ci は、転写の活性化と抑制の両方の機能を有することが示されている。すなわち、Ci は翔原基の anterior compartment において Dpp, Ptc などの遺伝子発現を誘導するのに対して、posterior compartment では Hh の発現を抑制する (Alexandre *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1996; Hepker *et al.*, 1997)。一方本研究で用いた MNS-70 細胞においては、Gli-1 および Gli-2 が転写活性化因子として機能し得るのに対し、Gli-3 は活性化因子としての機能は観察されず、むしろ高発現することで Gli-1 あるいは Gli-2 に対して抑制的に作用するという結果が得られた (図 1、2、4)。この Gli-3 による Gli-1 あるいは Gli-2 の抑制は、3 種類の Gli 因子が同じ DNA 配列を認識し得ることから (Kinzler and Vogelstein, 1990; Vortkamp *et al.*, 1995)、標的 DNA 配列に対する競合的な結合による可能性が高いと考えられる。別の可能性としては、Gli-3 が Gli-1 と Gli-2 とヘテロ複合体を形成することでその機能を抑制していることも考えられる。最近、アフリカツメガエルにおいて単離された Gli-3 が転写の抑制因子として機能することが報告されており、本研究の結果と一致する (Marine *et al.*, 1997)。Gli-3 遺伝子に変異を持つマウス extra toes (Xt) の肢芽においては、Shh による Ptc の誘導は正常に観察されており、Shh のシグナル伝達に Gli-3 が必須でないことを示唆している (Buscher *et al.*, 1997; Masuya *et al.*, 1995)。またニワトリ肢芽において Shh を異所的に発現させると、Gli-1 の発現誘導とともに Gli-3 の発現抑制がおこることが報告されている (Marigo *et al.*, 1996c)。このような一連の結果は、Gli-3 が Shh のシグナル伝達に抑制的に作用する因子であるとする仮説を支持している。さらにニワトリ脊髄神経管では、背側のマーカー遺伝子である Pax-3、Pax-6、Pax-7 遺伝子がいずれも Shh の作用によって発現が抑制される現象が観察されている (Ericson *et al.*, 1996)。また最近、上述の Gli-3 の変異した Xt マウスの肢芽

において異所的な Shh の発現とそれに伴う Ptc の発現誘導が認められることが示されている (Buscher *et al.*, 1997; Masuya *et al.*, 1995)。これらの知見は、Shh シグナルによって発現が抑制される一群の遺伝子が存在し、この遺伝子発現の抑制に Gli-3 が関与する可能性を示唆している。しかし現時点では、他の組織あるいは異なる標的遺伝子の制御に関して、Gli-3 が Gli-1 あるいは Gli-2 と同様に Shh シグナルの下流で遺伝子発現に促進的に働く可能性が否定されたわけではない。最近報告されたノックアウトマウスの解析では、骨格系の形態形成過程において Gli-2 と Gli-3 がある程度重複した機能を担っていることを示唆する知見が得られている (Mo *et al.*, 1997)。いずれにしても、本研究の結果より、ショウジョウバエ Ci の持つ転写の活性化と抑制の 2 つの機能が、哺乳動物細胞の場合は 3 種類の Gli によって機能分担されていることが強く示唆される。

Shh の濃度依存的な遺伝子発現制御機構

シグナル分子としての Shh の特異な点は、そのモルフォジェンとしての作用である。すなわち、Shh は異なる濃度で作用することによって異なる細胞運命を誘導すると考えられている。その背景には当然濃度依存的な遺伝子発現レベルでの応答が関与していると考えられるが、これまでにこの問題に対してアプローチした研究は、脊椎動物ではほとんど行われていない。その主な理由は、Shh の濃度依存的な作用の解析が胎児期の微小組織片の培養系を用いてのみ行われてきたためである。本研究では、Shh 応答性を持つ均一な集団よりなる不死化細胞 MNS-70 を用いることにより、この点を詳細に解析することが可能となった。

Shh シグナル伝達系の特徴のひとつは、シグナル伝達系の構成分子である Ptc あるいは Gli-1 そのものの遺伝子発現が、Shh によって制御されていることである。そこで本研究では両遺伝子の発現制御機構に着目し、Shh に対する濃度依存な応答性を検討した (図 6)。その結果、受容体分子をコードする Ptc 遺伝子の発現が 0.1-0.5nM という低濃度の Shh-N によって誘導されるのに対し、Gli-1 の発現は約 1nM の閾値を持って誘導され、両遺伝子の発現誘導には明かな閾値の違いが認められた。また、さらに高濃度の Shh で細胞を処理した場合、Ptc, Gli-1 とともに 10 nM から 25 nM というわずか 2.5 倍の濃度変化に応じて著明な発現レベルの上昇が観察された。先に述べたように、Shh が MNS-70 細胞に作用した際の初期シグナルは Gli-2 によって伝達されと考えられる。従って、10 nM 以下の Shh-N によって誘導される Ptc, Gli-1 mRNA の弱い発現誘導は、主に Gli-2 を介した直接的なものであると考えられる。一方より高濃度の Shh-N が作用した際には、Gli-2 によって誘導された Gli-1 がさらに Gli 結合配列を含むエンハンサーに作用して、Gli-1

自身の転写を促進する positive auto-regulation が働くことが推定される。このような auto-regulation の機構は、Gli-1 発現プラスミドの導入によって Gli-1 自身が誘導されるという結果から支持される (図 4)。この Gli-1 による Gli 自身の発現に対する効果は、初期シグナルを伝える Gli-2 によって誘導される Gli-1 の発現レベルに大きく依存すると想定される。従って、本実験で観察された Ptc, Gli-1 の高いレベルでの発現誘導に必要な Shh-N 濃度の閾値は、この Gli-1 の positive auto-regulation が作動する閾値を反映していると考えられる。また Ptc の 2 相性の発現誘導のうち、より高濃度の Shh-N による高レベルの発現は、auto-regulation を介して高発現した Gli-1 に依存した現象によると解釈することが出来る。

遺伝子発現カスケードと Shh の濃度依存的な作用機構

ここで以上の結果をまとめて、Shh の下流で働く遺伝子発現カスケードに関して改めて考察し、Shh のモルフォジェンとしての作用、すなわち濃度依存的な異なる細胞応答の誘導機構に関するモデルを提唱する (図 7 参照)。本研究によって明かになった Shh のシグナル伝達系のコンポーネントである Ptc, Gli, HNF-3 β の発現と機能の相互作用を順に議論する。

I. Ptc, Gli-3 による抑制機構と閾値の設定

Ptc は Smo とともに Shh 受容体を構成し、リガンドである Shh と直接に結合する分子であることが生化学的解析により明かにされている (Mrigo *et al.*, 1996a; Stone *et al.*, 1996)。また遺伝学的解析から、ショウジョウバエにおいて Ptc は Hh の受容体として機能するだけでなく、シグナルの負の制御因子である考えられている (Chen and Struhl, 1996; Hepker *et al.*, 1997)。すなわち、Ptc の機能欠損変異個体では Hh シグナルの効果がより強く、広範囲に及び、逆に Ptc の異所的な高発現によって Shh の作用が強く抑制される (Chen and Struhl, 1996; Ingham *et al.*, 1991; Johnson and Tabin, 1995)。さらに最近のノックアウトマウスの解析において、Ptc 遺伝子の欠損によって Shh 依存的な遺伝子発現が顕著に増強されることが観察されている (Goodrich *et al.*, 1997)。また、MNS-70 細胞に Ptc を高発現させると Shh 依存性の転写応答が強く抑制されることが明らかになっている (図 5C)。従って脊椎動物においても、Shh によって Ptc の発現レベルが上昇することが逆に Shh のシグナル伝達を遮断する効果を持つと考えられる。このことから、図 6 に示すように MNS-70 細胞で観察された 0.1-0.5 nM という低濃度の Shh によって誘導される Ptc は、Shh による標的遺伝子の発現を抑制するように働いていると推定される。このような Ptc を介した negative feed-back の機構は、shh の濃度依存的な作用の閾値の設定に

貢献する。すなわち、低濃度の Shh が作用した細胞では、まず初期反応として構成的に発現している Gli-2 の活性化によって Ptc を含む特定のセットの遺伝子発現誘導が起こる。Ptc の発現レベルの上昇は、細胞膜レベルで以降のシグナル伝達に対し抑制的に作用する。この negative feed-back 機構によって、細胞外の Shh の濃度が比較的低いレベルで変化しても（例えば本実験図 6 の場合、0.1-10 nM の範囲）、細胞内の転写応答はごく小さな変動に留まると考えられる。この場合、Ptc が Gli-2 に応答して発現される他の標的遺伝子と比較してより低濃度の Shh によって誘導されることが極めて重要なポイントとなる。この点はショウジョウバエにおける遺伝学的な解析からは仮想的なものであったが、本研究によって初めて生化学的に確認された（図 6）。また上述のように、少なくとも MNS-70 細胞においては、Gli-3 が Gli-1 あるいは Gli-2 の機能を抑制する因子として機能すると考えられる。Gli-3 は Gli-2 とともに構成的に発現していることから、Gli-3 の構成的な発現レベルは Gli-2 あるいは Gli-1 によって誘導される標的遺伝子の発現に必要な Shh の閾値濃度の設定に重要な役割を担っていることが推定される。今回の MNS-70 を用いた解析では、Shh の作用によって Gli-2, Gli-3 の mRNA レベルでの発現がともに約 2 倍に上昇し、また Shh のシグナルを細胞内に伝達する分子と考えられている Smo の発現は約 1/2 に低下していた（図 3）。このような mRNA 発現レベルの変動が Shh のシグナル伝達にどの程度の影響を及ぼすかは、現在のところ不明である。

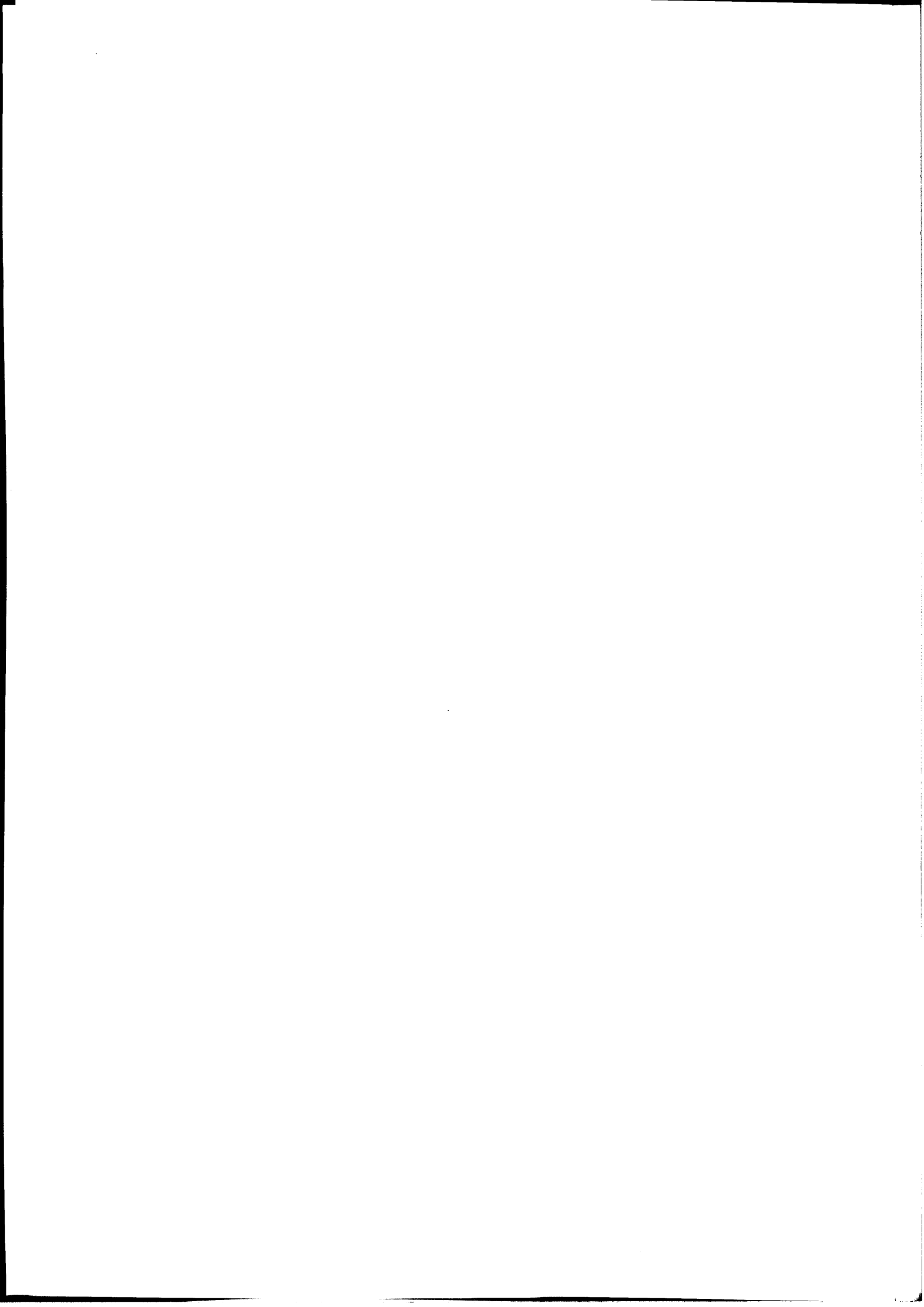
II. Gli-1 の auto-regulation

Shh の濃度がこのようにして設定された転写応答の閾値を超えた高い濃度で作用すると、Gli-2 によって誘導される Gli-1 の発現レベルが一定閾値以上に達し、Gli-1 の positive feed-back 機構によって Gli-1 のみならず他の Shh 標的遺伝子の発現は強く誘導されるようになる。図 6 で観察された、25 nM 以上の濃度の Shh が作用した細胞における Gli-1、Ptc mRNA の高発現がこれに相当すると考えられる。この Gli-1 の auto-regulation が一旦惹起されると、細胞外からの Shh のシグナルの入力あるいは高発現した Ptc による抑制といった細胞膜レベルでのシグナル伝達系の作用を受けないであろう。このシステムが作動することで、Shh によって誘導される遺伝子発現応答には明確な閾値が設定され、閾値前後では小さな濃度変化で大きな細胞応答の変化が引き起こされることになる。さらに、MNS-70 細胞に Gli-1 あるいは Gli-2 を高発現した際には、Nkx2.1 遺伝子の誘導が両遺伝子でともに認められるのに対して、HNF-3 β の誘導は Gli-1 でのみ検出可能であった。従って、Gli-1 が誘導される閾値の前後では、遺伝子発現の量的な差のみならず、質的な差も同時に起こっているものと考えられる。

III. HNF-3 β による Gli 活性の抑制と底板の分化

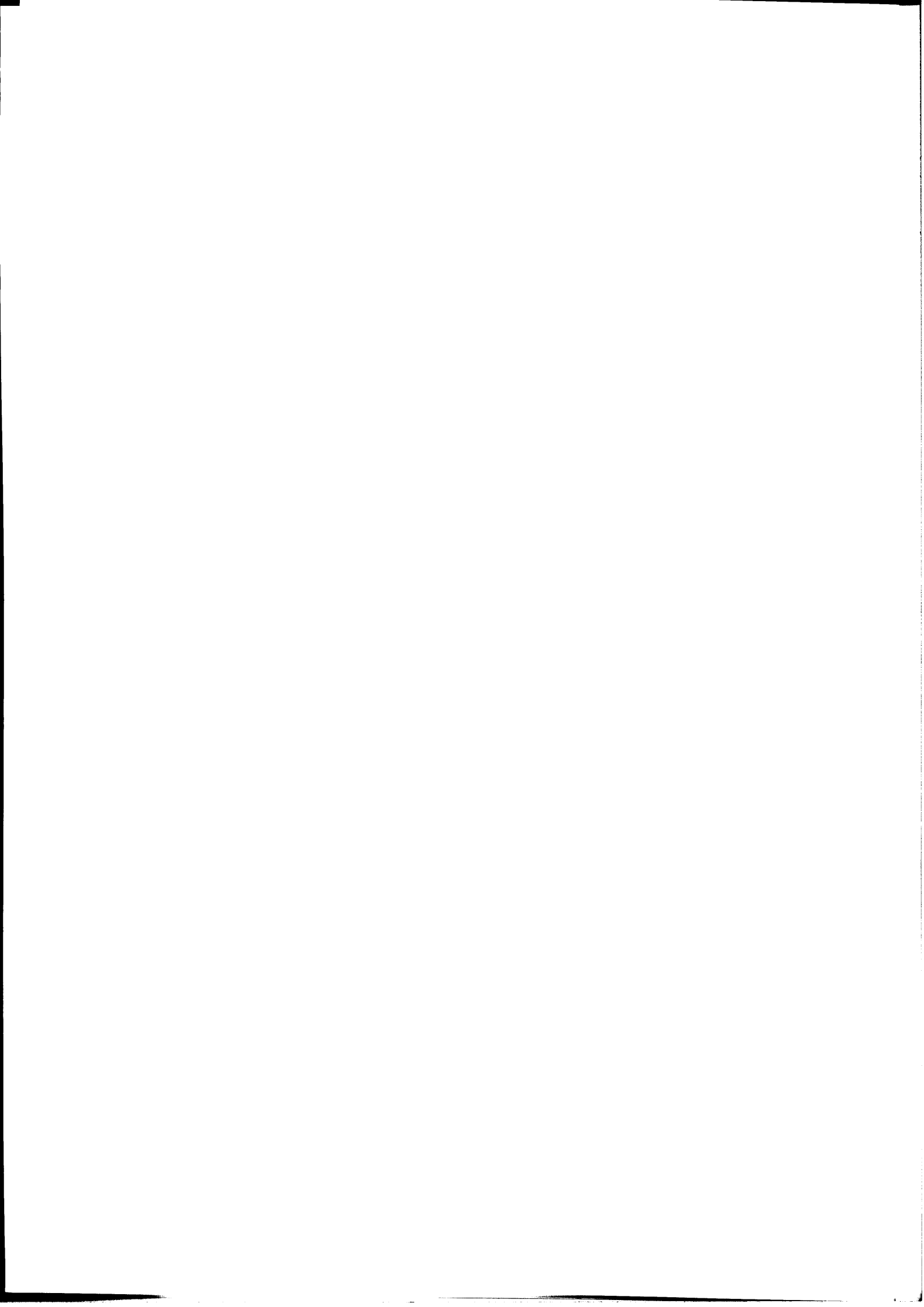
さらに、非常に高い濃度の Shh が作用した場合、自身の positive feed-back によって高いレベルで発現した Gli-1 が、底板の分化制御因子である HNF-3 β を誘導する活性を持つ(図4)。これまでの報告では、底板における HNF-3 β の発現誘導には実際に非常に高濃度の Shh が必要であるとされている (Marti *et al.*, 1995; Roelink *et al.*, 1995; Hynes *et al.*, 1995)。本研究では、MNS-70 細胞に 1mM という高い濃度の Shh-N を作用させた場合でも、Gli-1 の強い誘導は認められるものの、HNF-3 β の発現誘導は観察されなかった (data not shown)。これらのことから、Gli-1 による HNF-3 β の発現誘導が起こるためには、細胞外の Shh の濃度、ひいては細胞内での Gli-1 の発現レベルに、かなり高い閾値が設定されているものと推定される。また、Gli-1 によって誘導される HNF-3 β が逆に Gli-1 あるいは Gli-2 の活性を阻害し、Gli の発現を抑制することが明かになった(図5A)。底板での HNF-3 β の発現には、Gli-1 の場合と同じような positive feed-back 機構により自分自身の発現をさらに上昇させる現象が知られている (Ruiz i Altaba *et al.*, 1995; Sasaki and Hogan, 1994)。従って、非常に高濃度の Shh によって誘導される底板細胞(あるいは予定底板細胞)では HNF-3 β が高発現し、これによる Gli-1, Gli-2 の機能の抑制によって結果的に Gli-1 の発現が消失する。一方周囲の細胞集団では HNF-3 β の発現は誘導されず、Gli-1 の発現が持続することになる。従って、初期には同じ Shh によって誘導される細胞群であっても、両者の細胞内では極めて異なった遺伝子発現がおこることになる。このメカニズムは、底板という最も高い濃度の Shh によって誘導される組織とその周囲の細胞群の間での異なる細胞運命決定に、極めて重要な役割を果たしているものと推定される。

以上述べてきたように、本研究では神経系の領域特異性の決定に関与する分泌性因子 Shh のシグナル伝達機構の解析を行い、Zinc-finger 型転写因子である Gli-1, Gli-2, Gli-3 が Shh の下流で遺伝子発現制御を行っていることを明らかにした。3種類の Gli 転写因子はそれぞれ異なる機能を担い、また異なる発現調節を受けていた。これら Gli 遺伝子産物ならびに受容体分子 Ptc によって構成される細胞内シグナル伝達ネットワークのダイナミックな調節機構が、Shh がモルフォジェンとしての多彩な生理機能を発揮する上で極めて重要な役割を担っているものと考えられる。



第2章

cDNA マイクロアレイを用いた Shh 応答性遺伝子群の探索



序論

第1章で述べたように、Shhのシグナル伝達機構においてGli-1, Gli-2, Gli-3がそれぞれ異なる機能を担い、異なる発現調節を受けていることを明らかにした。これら3種類のGli転写因子と、Shhの受容体であるPtcによる精巧な制御機構により、Shhのモルフォジェンと呼ばれる多彩な生理機能が構成されていると考えられた。

しかしながら、脊椎動物においてShhの下流でどのような遺伝子が制御されているのか未だ多くの点が不明のまま残されている。Shhは、中枢神経系に限らず、形態形成の過程で非常に重要な役割を果たしており、また、そのシグナル伝達に関わる分子の変異は、全前脳胞症、基底細胞癌、基底細胞母斑症候群、髄芽腫、神経膠腫等、ヒトの様々な疾患に関与していることが知られている (Villavicencio *et al.*, 2000)。このように重要なシグナル分子の細胞内シグナル伝達機構について不明な点が残されている原因の一つには、これまで行われてきた実験系では、一度に扱える遺伝子の数に限界があったことが挙げられる。

一方、国際的に進められてきたゲノムプロジェクトによって、ヒトゲノム中には約3~4万個の遺伝子が存在することが推定され (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001)、マウスにおいても既に2万個以上の完全長cDNAが報告されている。このようにヒトやマウスを含む様々な生物種のゲノム配列が明らかにされつつあるなかで、従来用いられてきた分子生物学的手法は、研究対象である数種の遺伝子の解析に焦点を絞ったものが多く、ある生命現象の諸過程に関与する数百個の遺伝子群の発現変動を網羅的に解析するには適していなかった。ところが、ポストゲノムシーケンス時代ではこれまでのように遺伝子を個々に捉えるだけではなく、数百から数千個の遺伝子群の機能とそのネットワークを網羅的に解析する技術が求められた。このような状況を背景にして、数千~数万個の遺伝子の発現変動を一度の実験で解析できる技術としてcDNAマイクロアレイが開発された (Schena *et al.*, 1995)。この技術は、表面を特殊加工したスライドガラスなどの固相基盤上に多数の異なったcDNAプローブを高密度に固定化し、その上で各々異なる蛍光色素で標識した2種類のmRNA由来のターゲットcDNAを競合的にハイブリダイズさせて、個々のcDNAプローブからの蛍光シグナルを自動検出器で取り込み、コンピュータで大量解析するものである。このようなcDNAマイクロアレイの登場により、一度に数千もの遺伝子の発現動態を視覚化、数値化することが可能となった。

先に述べたように、Shhは発生分化に重要な役割を果たしているながら、その下流のシグナル伝達機構については不明の部分が多いことから、Shhによって制御されている未

知の遺伝子（新規、既知）が存在している可能性は十分にあると考えられる。Shh 応答性遺伝子の同定は、中枢神経系の発生・分化および、先に述べた疾患のメカニズムを解明するにあたって、非常に重要である。そこで、本研究ではもう一つのテーマとして、cDNA マイクロアレイを用いて Shh により制御される遺伝子群の同定を試みた。

材料と方法

cDNA マイクロアレイの作製 (図 8A)

国立感染症研究所遺伝子資源室より供与されたマウス成体脳由来の cDNA クローン (sugano mouse brain mnch) 及び、マウス胎生 14 日胚由来 cDNA クローン (sugano mouse embryo mewa)を用いて cDNA マイクロアレイを作製した (Kato *et al.*, 2001; Yoshikawa *et al.*, 2000)。まず、これらのクローンの末端塩基配列情報を元にクラスタリングを行った。クラスタリングにはシークエンスデータ分類解析管理システム DYNACLUST (DYNACOM)を用いた。クラスタリングの結果を基に、重複度 1 の遺伝子セットを整備した。これらのクローンより、ベクターのマルチクローニングサイトの両端にデザインしたプライマーを用いて 96°C 3 分- (96°C 20 秒-72°C 6 分) x10 サイクル- (96°C 20 秒-60°C 30 秒-72°C 2 分) x25 サイクル-72°C 10 分の PCR によって cDNA を増幅した。PCR 産物をエタノール沈殿し、12µl の蒸留水に溶解した (およそ 2µg/µl)。96°C で 3 分間熱変性後急冷し、0.7mg/ml ニトロセルロース/100% DMSO と等量ずつ混合し、これをマイクロアレイ作製装置 SPBIO2000 (日立ソフトウェアエンジニアリング)を用いてカルボジイミドコートされたスライドガラス (日清紡)にスポットした。このとき同時にコントロールとして house keeping gene であるマウスβ-actin の cDNA を、ネガティブコントロールとしてヒト Cot-1 DNA (GIBCO BRL)をスポットした。スポット後一晩放置し、UV クロスリンカーを用いて 60mJ で架橋した。

ターゲット cDNA の調製 (図 8B)

マウス Shh-N 発現プラスミドまたはコントロールプラスミドを MNS-70 細胞に導入し 48 時間培養後、Trizol reagent (GIBCO BRL)を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA より、Oligotex dT30 (Takara)を用いて poly(A)+ RNA を精製した。2µg の poly(A)+RNA を反応液[6µg ランダムヘキサマー、5x 1 st strand buffer 6µl、0.1M DTT 3µl、50 x dNTP (10mM dTTP、25mM dATP、25mM dCTP、25mM dGTP)溶液 0.6µl、蛍光色素 (1mM Cy3-dUTP または 1mM Cy5-dUTP) 3µl]と混合し、SuperscriptII (200U/µl)を 2µl 加えて 42°C で 1 時間逆転写反応し、さらに 1µl の SuperscriptII (200U/µl)を加えて 1 時間 42°C で反応させることにより、Cy3 または Cy5 で標識した。これらのサンプル中の残存 RNA を分解するために、それぞれ 5µl の 0.5M EDTA と 10µl の 1N NaOH を加え、65°C で 30 分間処理し、1M Tris-Cl pH7.5 を 25µl 加えて中和した。Cy3、Cy5 で標識された cDNA を混合し、TE で 600µl にメスアップし、Microcon YM-30 (Milipore)で 10µl まで濃縮した。

濃縮したサンプルに 500 μ l の TE と 20 μ g の Salmon sperm DNA を加えてもう一度 10 μ l に濃縮した。濃縮したサンプルに、50 μ g の Yeast tRNA と、50 μ g の poly(A)、20xSSC を 6.8 μ l、10%SDS を 1.2 μ l 加え蒸留水で 40 μ l にメスアップし、これをターゲット cDNA とした。

マイクロアレイハイブリダイゼーション (図 8)

マイクロアレイをブロッキング溶液 (3% BSA, 0.2M NaCl, 0.1M Tris-Cl pH 7.5, 0.05% Triton X-100) に浸し、室温で 30 分間放置し、その後 37°C で風乾した。乾燥させたマイクロアレイを TE (pH8.0) で 5 分間 x3 回洗浄し、風乾した。96°C で 2 分間熱変性し 30 分間室温で放置したターゲット cDNA をこのマイクロアレイに加え、カバーガラスをかぶせて、55°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションを行った後、マイクロアレイを洗浄溶液 A (2xSSC, 0.1% SDS) に浸し、カバーガラスをはがれるまで振盪した。はがれたカバーガラスを除去し、さらに新しい洗浄溶液 A でさらに 10 分間振盪した。次に、洗浄溶液 B (0.2xSSC, 0.1% SDS) でさらに 10 分間ずつ 2 回洗浄し、2000rpm で 1 分間遠心して水分を除去した。

データ解析

ハイブリダイゼーションを終えたマイクロアレイの蛍光シグナルは、共焦点レーザー型検出器 ScanArray4000 (GSI Lumonics) を用いて検出した。Cy3 と Cy5 のシグナルの標準化は β -actin のスポットのシグナル値で行った。得られたスキャン画像からマイクロアレイ解析ソフト QuantArray (GSI Lumonics) を用いてそれぞれのスポットのシグナルを数値化し、Cy3、Cy5 のシグナル値を比較した。

定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法による遺伝子発現の解析

各種発現ベクターを MNS-70 細胞に導入し 48 時間培養後、Trizol reagent (GIBCO BRL) を用いて total RNA を抽出した。得られた total RNA より、SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase (GIBCO BRL) を用いて逆転写し cDNA を得た。この cDNA を鋳型として、既に報告されている手法 (Nakagawa *et al.*, 1996) に準拠して定量的 RT-PCR 法を行い、各種遺伝子の発現を解析した。PCR 反応は Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim) を用い、95°C 30 秒 62°C 60 秒の反応を 1 サイクルとして、28 サイクル行った。Primer は、表 1 に示したものを使用した。各プライマーセットを用いて特異的に増幅された PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドを含む溶液で 15 分間染色

した。得られたバンドの蛍光強度は、NIH Image を用いて定量した。各遺伝子の発現量は、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH)の発現量を内部標準とした相対値として比較した。また各 Primer セットを用いて増幅された PCR 産物は、pBluescriptII SK-にクローン化し、その塩基配列を蛍光プライマーを用いたジデオキシ法 (ABI 377 DNA sequencer, Parkin-Elmer) により決定した。いずれの PCR 産物も、目的の遺伝子をコードする mRNA に由来して Primer 特異的に増幅されたことが確認されている。

in situ ハイブリダイゼーション

プローブの作製

Shh, Ptc, Cp の cDNA 断片 [Shh (604-1314bp: Genbank Accession No. X76290)、Ptc (2680-4305bp: U46155)、Cp (73-1477bp: U49430)] を pBluescriptII SK+ にクローニングした。これらのプラスミドを制限酵素にて直鎖状 DNA とし、これをジゴキシゲニン (DIG) 標識 cRNA プローブ作製の鋳型 DNA とした。これらの鋳型 DNA 1 µg に、反応液 [10 x DIG nucleotide mix 2 µl (ベーリンガー), 5x Transcription buffer 4 µl, 40U/µl RNase Inhibitor 1 µl, 40U/µl T7RNA ポリメラーゼ 1 µl] を加え、滅菌蒸留水で 20 µl にメスアップし、37°C で 2 時間反応させた。反応後、80 µl の反応停止溶液 (20mM Tris pH7.5, 20mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS) を加え、Sephadex G-50 カラムを用いて精製した。精製した反応液をエタノール沈殿し、20 µl の滅菌蒸留水に溶解させ、20 µl のホルムアミドを加え、これをプローブ溶液とした。

マウス胚の固定

妊娠 14 日目の ICR マウスから胎児を摘出し、4% パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS(-) 溶液で一晩 4°C にて固定した。その後、5% Sucrose/PBS(-), 10% Sucrose/PBS(-), 20% Sucrose/PBS(-) の順に浸漬し、胎児が沈むまで 4°C にて浸漬した。その後、OCT Compound に包埋し、-80°C にて保存した。包埋した試料から、20 µm の厚さの凍結切片を作製した。凍結切片は APS コートスライドガラスに貼り付け、室温にて 30 分風乾させ、-80°C にて保存した。凍結切片を PBS(-) に 5 分浸漬後、4% PFA/PBS(-) に 15 分浸漬した。次に PBS(-) に 5 分ずつ 2 回浸漬したのち、1 µg/ml Proteinase K/PBS(-) に 10 分浸漬した。Proteinase K 処理後、4% PFA/PBS(-) に 20 分浸漬し再固定した。次に、アセチル化溶液 (0.25% acetic anhydride, 1.5% triethanolamine, 2.5N HCl) に 15 分間浸漬した。PBS(-) で 5 分間ずつ 3 回洗浄後、プレハイブリダイゼーション溶液 [50% ホルムアミド、5xSSC (pH4.5)] に室温で 1 時間浸漬した。その後、ハイブリダイゼーション溶液 (50% ホルムアミド, 5xSSC pH4.5,

100 μ g/ml Yeast tRNA, 1%SDS, 50 μ g/ml Heparin, 1 μ g/ml DIG 標識 cRNA プローブ) を切片に加え、70°Cで一晩静置した。ハイブリダイゼーション後、70°Cの洗浄溶液 (50%ホルムアミド, 2xSSC pH4.5)で 30 分間ずつ 2 回洗浄した。次に (10mM Tris-Cl pH8.0, 500mM NaCl) で 2 回洗浄し、RNase 溶液 (20 μ g/ml RNase A, 10mM Tris-Cl pH8.0, 500mM NaCl) に浸漬し 37°Cで 30 分間処理した。(10mM Tris-Cl pH8.0, 500mM NaCl)で 5 分間ずつ 2 回洗浄し、50%ホルムアミド/1xSSC に 65°Cで 30 分間ずつ 2 回浸漬した。次に溶液 A (0.1M Tris pH7.5, 150mM NaCl)で 15 分間ずつ 3 回浸漬し、ブロッキング溶液 1.5%Boeringer Blocking Reagent/溶液 A に 1 時間室温で浸漬した。ブロッキング溶液に 1/2000 容量の Anti-DIG fab を加えたものを切片に添加し、一晩 4°Cにて静置した。

溶液 A で 20 分間ずつ 3 回洗浄し、溶液 B (0.1M Tris-Cl pH9.5, 0.1M NaCl, 50mM MgCl₂) で 5 分間ずつ 2 回洗浄し、発色基質溶液 (4.5 μ l NBT, 3.5 μ l BCIP)/1ml 溶液 B で発色させた。適当な発色が確認できた時点で 1mM EDTA/PBS(-)溶液で洗浄して発色反応を停止し、Glycerol で封入した。

結果

cDNA マイクロアレイによる Shh 応答性遺伝子群のスクリーニング

まず、Shh 応答性遺伝子のスクリーニングのために cDNA マイクロアレイを作製した。マイクロアレイの作製に必要なマウス cDNA ライブラリーは国立感染症研究所から供与されたものを使用した。オリゴキャップ法により作製された cDNA ライブラリーで、マウス成体脳由来の sugano mouse mnch (mnch)とマウス 14.5 日胚由来の sugano mouse mewa (mewa)を使用した(Maruyama and Sugano, 1994; Suzuki *et al.*, 1997)。それぞれのクローンの末端塩基配列情報をシーケンスデータ分類解析管理システム DYNACLUST (DYNACOM)に投入し、クラスタリングを行った。その結果、遺伝子の重複度は mnch が 1.96 で、mewa が 2.17 であった。それぞれ重複しているクローンの中から代表クローンを選び出し、2304 個の cDNA クローンをを用いてマイクロアレイを作製した。この cDNA マイクロアレイを用いて、Shh-N で処理した MNS-70 細胞とコントロールの MNS-70 細胞における遺伝子発現変動を解析した。それぞれの細胞から抽出した mRNA を鋳型に逆転写酵素を用いて cDNA を合成する際に Cy3-dUTP または Cy5-dUTP を添加することによって標識した。Cy3-dUTP と Cy5-dUTP の取り込みの違いによる擬陽性シグナルを排除するため、サンプル間で蛍光色素を入れ替えた cDNA プローブを合成し、それぞれ独立の cDNA マイクロアレイでハイブリダイゼーションを行った。どちらの蛍光色素を取り込ませて作製したプローブでも同様の変化がみられたスポットを陽性と判定し、この実験を 3 回くりかえした。それぞれ共焦点レーザー型検出器 ScanArray で取り込んだ画像から、マイクロアレイ画像解析ソフト QuantArray によってシグナルを数値化し、ネガティブコントロールであるヒト Cot-1DNA のシグナル値以下のスポットについてはバックグラウンド以下として削除した。3 回の繰り返し実験で同じように発現変動がみられた cDNA をデータから抽出した。その結果、3 つのスポットにおいて、常に発現変動が認められた。全てのスポットともに Shh-N によって発現量が亢進していた (図 9A)。ひとつは Shh 応答性遺伝子として知られる Ptc であった。残りの二つは、銅結合たんぱく質として知られている Ceruloplasmin (Cp) (Klomp *et al.*, 1996)と、セリンプロテアーゼインヒビター的一种である Inter- α -trypsin Inhibitor (ITI)の構成分子、Inter- α -trypsin Inhibitor heavy chain H3 (ITIH3) (Bost *et al.*, 1998)であった。これらの遺伝子について、マイクロアレイに比べてより定量性のある RT-PCR 法を用いて検討を行った。マイクロアレイのハイブリダイゼーションに用いたものと同じ RNA サンプルを用いて RT-PCR を行ったところ、マイクロアレイの結果と一致してそれぞれコントロールに比べ発現量が増加して

いた (図 9B)。

Gli 転写因子群による新規 Shh 応答性遺伝子の発現制御

Shh のシグナル伝達系において、Gli が主要な機能を果たしていることは第 1 章で示した。そこで、今回マイクロアレイを用いて得られた Shh 応答性を有するとみられる遺伝子が Gli を介して制御されているか否かを検討した。MNS-70 細胞に Shh-N、Gli-1、Gli-2、Gli-3 の発現プラスミドをそれぞれ導入し、Cp, ITIH3 および種々の Shh 応答性遺伝子の発現量を前述の RT-PCR 法により検出した。MNS-70 細胞に Shh-N 発現プラスミドを導入したところ、Ptc 及び Gli-1 の誘導が確認され、さらに Cp と ITIH3 の発現量が増加していた (図 10)。Gli-1, Gli-2 を MNS-70 細胞に強制発現させたところ、ITIH3 の発現量は増加していたが、Cp の発現量は変化が見られなかった (図 10)。この結果から、Shh の下流において ITIH3 は Gli を介して制御されている可能性が示唆された。一方、Shh-N でのみ発現誘導が起こった Cp は ITIH3 とは異なり、Gli を介さずに別の経路で制御されている可能性が考えられた。

発生期脳における Cp の領域特異的遺伝子発現

Shh は初期発生において腹側化を誘導する主要なシグナル分子であり、その作用は前後軸に沿って影響する。しかし、同じ Shh というシグナル分子に対して、応答する遺伝子群は、さまざまな領域で特異的な発現パターンを示すことが知られている (Ericson *et al.*, 1995; Ericson *et al.*, 1995; Nakagawa *et al.*, 1996; Shimamura *et al.*, 1995)。そこで、Cp の生体内における発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて検討した (図 11)。マウス胎生 12 日胚において、Cp は視床下部、後脳腹側部 (図 11D)、眼柄、眼胞 (図 11A) において発現が見られた。これらの領域において、Cp は Shh に隣接する形で発現しており、その発現境界は一致していた。Ptc は Cp の発現領域を含む広い範囲で発現していた (図 11C, D)。Ptc は低濃度の Shh によっても発現誘導が起こることから、Shh の作用が及んでいることを示すインジケータとしても知られている。これらの発現パターンから、生体内においても Cp は Shh によって制御されている可能性が示唆された。

考察

cDNA マイクロアレイを用いた Shh 応答性遺伝子の同定

脊椎動物において Shh の下流でどのような遺伝子が制御されているのか未だ多くの点が不明のまま残されている。Shh は、中枢神経系に限らず形態形成の過程で非常に重要な役割を果たしており、また、そのシグナル伝達に関わるコンポーネントの変異は、ヒトの様々な疾患に関与していることが知られている (Villavicencio *et al.*, 2000)。このように重要なシグナル分子の細胞内シグナル伝達機構について不明な点が残されている原因の一つには、実験系の問題から、一度に扱える遺伝子の数に限界があったことが挙げられる。これまで、脊椎動物で Shh によって制御されているとされる遺伝子のスクリーニングは、ショウジョウバエによる遺伝学的解析から Hh シグナルに関連すると考えられる遺伝子について、その相同遺伝子を同定する場合と、遺伝子の発現パターンから推定される場合がほとんどであった。したがって、それぞれの実験系において登場する遺伝子の種類は多くて十数種類であった。しかし、近年ゲノムプロジェクトの進行に伴って遺伝子のカタログ化が進められ、さらにゲノム配列情報は飛躍的に増加しており、これまでに、酵母や線虫の全ゲノム配列が解明されている。また、2001 年には全ヒトゲノム配列が報告された。今後は残された希少遺伝子や、全長遺伝子の同定に拍車がかかると考えられる。ポストゲノム時代の解析ツールとして開発されたマイクロアレイは、数千 - 数万の遺伝子の発現量を一度に調べることができる。cDNA マイクロアレイの登場により、一度に数千もの遺伝子の発現動態を視覚化、数値化することが可能となった。先に述べたように、Shh は発生分化に重要な役割を果たしているながら、その下流のシグナル伝達機構については不明の部分が多いことから、Shh によって制御されている未知の遺伝子（新規、既知）が存在している可能性は十分にあると考えられる。そこで、Shh 応答性の MNS-70 細胞とマウス胎児 cDNA ライブラリー及び成体脳 cDNA ライブラリー由来の 2304 遺伝子から成る cDNA マイクロアレイを用いて、Shh 応答性遺伝子の探索を行った。

まず、Shh-N 発現プラスミドと遺伝子が組み込まれていないコントロールプラスミドを MNS-70 細胞に導入した。72 時間後にそれぞれの細胞を回収し、mRNA を抽出した。mRNA から cDNA を合成する過程において、それぞれ異なる色素 (Cy3-dUTP または Cy5-dUTP) を用いて標識し、競合的マイクロアレイハイブリダイゼーションを行った。cDNA マイクロアレイ上にスポットされている cDNA は、その長さも配列も異なる遺伝子から構成されているため、全ての cDNA に最適の条件でハイブリダイゼーション反応

を行うことは非常に困難である。そのため、非特異的なハイブリダイゼーションが起こり、擬陽性のシグナルが検出される可能性が考えられた。また、プローブの作製における逆転写反応で、Cy3-dUTP と Cy5-dUTP の取り込み効率の違いから擬陽性シグナルが検出されることもある。このような擬陽性のシグナルを排除するために、標識を入れ替えてプローブを調製し、それぞれ別々のマイクロアレイにハイブリダイズさせ、どちらでも再現性のあるデータのみを抽出した。その結果、3 スポットにおいて有意なシグナルの差が検出された (図 9A)。ひとつは Shh 応答性遺伝子としてすでに知られている Ptc であり、残りの 2 種類の遺伝子は新たに Shh に応答する遺伝子であることが示された。ひとつは、銅結合たんぱく質として知られている Ceruloplasmin (Cp) であり (Klomp *et al.*, 1996)、もうひとつは plasma protease inhibitor の inter- α -trypsin inhibitor (ITI) ファミリーの構成分子であり、細胞外マトリックスの構成分子のひとつであるヒアルロン酸との結合が示唆されている inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 3 (ITIH3) であった (Bost *et al.*, 1998)。マイクロアレイによって得られた結果を確認するために、より感度の高い RT-PCR 法により検討し、同様の結果を得られた (図 9B)。両遺伝子とも Shh による刺激によって転写量が増大したことから、Shh の下流で正に制御されていると考えられた。

Gli に依存しない Shh シグナル伝達系路の存在の可能性

第 1 章で述べたように、Shh の下流では Gli 転写因子ファミリーが主要な役割を果たしていることが明らかになったが、Cp、ITIH3 は Gli による制御を受けているか否かを検討した。その結果、ITIH3 は Shh-N, Gli-1, Gli-2 によって発現誘導が観察されたが、Cp は Shh-N によってのみ発現が増加した (図 10)。Shh-N, Gli-1, Gli-2 によって増大した ITIH3 の発現量を比較してみると、Gli-2 よりも Gli-1 による発現亢進が著しいことがわかる。これは、Nkx2.1 の発現パターン (図 4B) と非常によく似ており、Gli を介して同様の経路によって制御されている可能性が考えられた。また、遺伝子導入効率が 30-40% 程度と考えると、Shh-N は培地中に放出されれば全ての細胞に作用するが、Gli は転写因子なので、Gli 発現プラスミドが導入された細胞にのみ作用すると考えられる。それらを勘案すると、Gli-1, Gli-2 による ITIH3 の発現誘導は Shh-N に比べてかなり強いと考えられた。

一方、Cp は Shh-N を作用させた場合でのみ発現の亢進が見られ、Gli-1 や Gli-2 を過剰発現させても発現量に変化が生じなかった。このことから、Cp は ITIH3 や、Nkx2.1 等とは異なり、Gli に非依存的な経路によって Shh の制御を受けていると考えられた。これまでに、chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (CoupTFII) と呼ばれる遺伝子が Gli を介さずに Shh の制御を受けていることが知られている (Krishnan *et al.*,

1997; Krishnan *et al.*, 1997)。CoupTFII 遺伝子の上流に Shh 応答領域の存在が示されているが、そこに Gli の結合配列が見られないことから、未知の転写制御因子の存在が示唆されている。Cp は Gli-1、Gli-2、Gli-3 のいずれによっても Cp の発現量は増加しなかったことから、Gli 以外の転写制御因子によって制御されている可能性が考えられた。

Shh の下流における ITIH3 の生物学的機能

ITIH3 はセリンプロテアーゼインヒビターのひとつである ITI ファミリーを構成する分子のひとつである (Bost *et al.*, 1998)。ITI ファミリーは酵素活性部位を有する bikunin と呼ばれる遺伝子産物に、ITIH1, ITIH2, ITIH3 と呼ばれる 3 種類の heavy chain がそれぞれ結合することによって機能しており、主に肝臓で発現している。ITIH3 は脳でも発現しており、視床下部、小脳において発現している事が報告されているが (Daveau *et al.*, 1998)、これらの領域で bikunin とは共発現していないことから、脳において ITIH3 はプロテアーゼインヒビターとしては機能していないと考えられる。これらの heavy chain はヒアルロン酸に対する結合能を有しており、細胞外基質の安定化に関与しているとされている。細胞外基質は形態形成において重要な役割を果たしており、最近では細胞外基質を構成する主要な糖たんぱく質の一つとして知られている vitronectin と Shh との関与が報告されており (Martinez-Morales *et al.*, 1997; Pons and Marti, 2000)、Shh により誘導された ITIH3 と vitronectin 等の細胞外基質構成分子との関連が考えられた。ITIH3 の発現が報告されている視床下部、小脳はその発生過程において Shh の影響を受けていることが知られており (Dahmane and Ruiz-i-Altaba, 1999; Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999)、生体内においても ITIH3 は Shh によって制御され、細胞外基質を構成して細胞や組織の形態形成に関与している可能性が考えられた。

Shh の下流における Cp の生物学的機能

本研究において、Cp と Shh, Ptc の生体内における発現パターンを比較するために *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、Cp は Shh の近傍に隣接して領域特異的な発現パターンを示していた (図 11)。Cp は銅結合たんぱく質として知られ、主に肝臓において産生され、血清中に放出される (Klomp *et al.*, 1996)。Cp は血清中の銅の 95% と結合しており、その主な生理作用は鉄イオンの酸化であり、有害なフリーラジカルの産生に作用する 2 価の鉄イオンを 3 価の鉄イオンに酸化する ferroxidase 活性を持っている。Cp には 2 種類の alternative splicing form が存在し、一つは肝臓で産生され血清中に存在する分泌型と、C 末端に Glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー付加シグナルをもつ GPI アンカ

一型 (GPI-Cp)がある (Patel and David, 1997; Patel *et al.*, 2000)。GPI-Cp は GPI の修飾を介して細胞膜に結合している。これまでに、脳で発現している Cp はほとんどが GPI 型であることが報告されているが、その機能については、血清中の分泌型 Cp は脳の血液関門を通過できないため、脳内の鉄イオンの代謝を GPI-Cp が担っていると考えられている。Cp 遺伝子の変異による遺伝性疾患である無セルプラスミン血症の患者では、肝臓や脳で鉄の沈着がおこることが報告されている。鉄の沈着は脳において神経変性を引き起こすが、それは鉄の沈着によるフリーラジカルの産生によって神経細胞がダメージを受けると考えられている。無セルプラスミン血症の患者では視床下部や網膜に鉄の沈着が見られることが知られており、本研究におけるマイクロアレイの結果及び、Cp の *in situ* ハイブリダイゼーションにおいて、視床下部、眼胞で発現が認められた事から (図 11A, D)、これらの領域において、Shh の下流で Cp による鉄代謝が行われている可能性が考えられた。

一方、GPI アンカー型タンパク質は、細胞膜上でラフトと呼ばれるスフィンゴ糖脂質が集合して形成するマイクロドメインに局在していることが報告されている (Rietveld *et al.*, 1999)。ラフトは、シグナル伝達の中継点として機能していることが明らかになりつつあり、GPI アンカー型タンパク質の他に、Src ファミリーチロシンキナーゼや三量体 G タンパク質が会合していることが知られている (Rietveld *et al.*, 1999)。マイクロドメインは受容体やリガンドを細胞膜の両側へ集めることによって、シグナル伝達の効率を上げ、他のシグナルとの非特異的なクロストークを防いでいると考えられている。Shh の受容体である Smo は G 蛋白質共役型受容体に似た構造を持つことから、Shh のシグナル伝達に G 蛋白質の関与が予想されており、GPI-Cp が鉄イオンの代謝以外に、シグナル伝達を担っている可能性が考えられた。

このように、cDNA マイクロアレイを用いることにより、2 種類の Shh 応答性遺伝子の同定に成功した。ヒトの全遺伝子数が 4 ～ 6 万種類と推定されていることから、今回用いた 2304 種類の遺伝子からなる cDNA マイクロアレイは、全遺伝子数の 1/20 について解析したに過ぎないが、これまでの研究方法を考えると、一度遺伝子資源を整備することによって、簡便な方法で新たな Shh シグナル伝達的一端を解明することができたのは画期的である。これから遺伝子資源の整備が進むにつれて、今後さらに Shh による複雑な遺伝子制御機構の詳細が明らかにされていくと考えられる。

謝辞

Gli-2 cDNA 発現プラスミド、Gli のレポータープラスミドを分与して頂いた大阪大学細胞工学センターの佐々木洋博士、Gli-1、Gli-3 cDNA 発現プラスミドを分与して頂いた理化学研究所の石井俊輔博士、HNF-3 α 、HNF-3 β を分与して頂いた熊本大学医学部（現千葉大学医学部）の滝口正樹博士、CV-1Shh 安定高発現株を分与して頂いた奈良先端科学技術大学院大学動物代謝調節学講座の小椋利彦博士、マウス Shh cDNA 及び、抗 Shh 抗体を分与していただいたハーバード大学の A. McMahon 博士、Baculovirus ベクター系の実験で御助力を頂いた国立予防衛生研究所ウイルス第 2 研究室の松浦善治博士、マイクロアレイを用いた実験でご助力を頂きましたヘリックス研究所（現千葉大学医学部）の関直彦博士、MNS-70 細胞株を用いた実験で御助力を頂きました国立精神神経センターの中村俊博士に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、終始、御懇篤なる御指導と御助言を賜りました、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞内情報学講座（現名古屋大学医学部細胞情報薬理学講座）の貝淵弘三教授に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、一から実験、研究をご指導いただきました東京大学医学部神経生物学講座の中福雅人助教授に深く感謝致します。

最後になりましたが、日々の研究生活において、様々なご助力を頂きました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞内情報学講座（現名古屋大学医学部細胞情報薬理学講座）の皆様、東京大学医学部神経生物学講座の皆様、ヘリックス研究所の皆様、日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社ライフサイエンス推進部の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M., and Hooper, J. E. (1996). The *Drosophila* *smoothed* gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* 86, 221-232.
- Alexandre, C., Jacinto, A., and Ingham, P. W. (1996). Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev* 10, 2003-2013.
- Altaba, A. R., Cox, C., Jessell, T. M., and Klar, A. (1993). Ectopic neural expression of a floor plate marker in frog embryos injected with the midline transcription factor *Pintallavis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8268-8272.
- Aza-Blanc, P., Ramirez-Weber, F. A., Laget, M. P., Schwartz, C., and Kornberg, T. B. (1997). Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89, 1043-1053.
- Bost, F., Diarra-Mehrpour, M., and Martin, J. P. (1998). Inter- α -trypsin inhibitor proteoglycan family--a group of proteins binding and stabilizing the extracellular matrix. *Eur J Biochem* 252, 339-346.
- Bumcrot, D. A., Takada, R., and McMahon, A. P. (1995). Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1995 May;15(5):2904]. *Mol Cell Biol* 15, 2294-2303.
- Buscher, D., Bosse, B., Heymer, J., and Ruther, U. (1997). Evidence for genetic control of Sonic hedgehog by Gli3 in mouse limb development. *Mech Dev* 62, 175-182.
- Chen, C., and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7, 2745-2752.
- Chen, Y., and Struhl, G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog.

Cell 87, 553-563.

Chihara, K., Amano, M., Nakamura, N., Yano, T., Shibata, M., Tokui, T., Ichikawa, H., Ikebe, R., Ikebe, M., and Kaibuchi, K. (1997). Cytoskeletal rearrangements and transcriptional activation of c-fos serum response element by Rho-kinase. *J Biol Chem* 272, 25121-25127.

Dahmane, N., and Ruiz-i-Altaba, A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126, 3089-3100.

Daveau, M., Jean, L., Soury, E., Olivier, E., Masson, S., Lyoumi, S., Chan, P., Hiron, M., Lebreton, J. P., Husson, A., Jegou, S., Vaudry, H., and Salier, J. P. (1998). Hepatic and extra-hepatic transcription of inter- α -inhibitor family genes under normal or acute inflammatory conditions in rat. *Arch Biochem Biophys* 350, 315-323.

Ding, Q., Motoyama, J., Gasca, S., Mo, R., Sasaki, H., Rossant, J., and Hui, C. C. (1998). Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development* 125, 2533-2543.

Dominguez, M., Brunner, M., Hafen, E., and Basler, K. (1996). Sending and receiving the hedgehog signal: control by the Drosophila Gli protein Cubitus interruptus. *Science* 272, 1621-1625.

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.

Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., and Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87, 661-673.

Ericson, J., Muhr, J., Jessell, T. M., and Edlund, T. (1995). Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube. *Int J Dev Biol* 39, 809-816.

- Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T. M., and Edlund, T. (1995). Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube [published erratum appears in Cell 1995 Jul 14;82(1):following 165]. Cell 81, 747-756.
- Fan, C. M., Porter, J. A., Chiang, C., Chang, D. T., Beachy, P. A., and Tessier-Lavigne, M. (1995). Long-range sclerotome induction by sonic hedgehog: direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signaling pathway. Cell 81, 457-465.
- Goodrich, L. V., Johnson, R. L., Milenkovic, L., McMahon, J. A., and Scott, M. P. (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. Genes Dev 10, 301-312.
- Goodrich, L. V., Milenkovic, L., Higgins, K. M., and Scott, M. P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. Science 277, 1109-1113.
- Grindley, J. C., Bellusci, S., Perkins, D., and Hogan, B. L. (1997). Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development. Dev Biol 188, 337-348.
- Hammerschmidt, M., Brook, A., and McMahon, A. P. (1997). The world according to hedgehog. Trends Genet 13, 14-21.
- Hepker, J., Wang, Q. T., Motzny, C. K., Holmgren, R., and Orenic, T. V. (1997). Drosophila cubitus interruptus forms a negative feedback loop with patched and regulates expression of Hedgehog target genes. Development 124, 549-558.
- Hooper, J. E., and Scott, M. P. (1989). The Drosophila patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. Cell 59, 751-765.
- Hughes, D. C., Allen, J., Morley, G., Sutherland, K., Ahmed, W., Prosser, J., Lettice, L., Allan, G., Mattei, M. G., Farrall, M., and Hill, R. E. (1997). Cloning and sequencing of the mouse Gli2 gene: localization to the Dominant hemimelia critical region. Genomics 39, 205-215.

Hui, C. C., Slusarski, D., Platt, K. A., Holmgren, R., and Joyner, A. L. (1994). Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, and *Gli-3*, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Dev Biol* 162, 402-413.

Hynes, M., Porter, J. A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P. A., and Rosenthal, A. (1995). Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* 15, 35-44.

Hynes, M., Stone, D. M., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Goddard, A., Gurney, A., and Rosenthal, A. (1997). Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene *Gli-1*. *Neuron* 19, 15-26.

Ingham, P. W., Taylor, A. M., and Nakano, Y. (1991). Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling. *Nature* 353, 184-187.

Johnson, R. L., and Tabin, C. (1995). The long and short of hedgehog signaling. *Cell* 81, 313-316.

Kato, M., Seki, N., Sugano, S., Hashimoto, K., Masuho, Y., Muramatsu Ma, M. A., Kaibuchi, K., and Nakafuku, M. (2001). Identification of sonic hedgehog-responsive genes using cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 472-478.

Kinzler, K. W., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., and Vogelstein, B. (1988). The *GLI* gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature* 332, 371-374.

Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1990). The *GLI* gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol* 10, 634-642.

Klomp, L. W., Farhangrazi, Z. S., Dugan, L. L., and Gitlin, J. D. (1996). Ceruloplasmin gene expression in the murine central nervous system [see comments]. *J Clin Invest* 98, 207-215.

Krauss, S., Concordet, J. P., and Ingham, P. W. (1993). A functionally conserved homolog of the

Drosophila segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 75, 1431-1444.

Krishnan, V., Elberg, G., Tsai, M. J., and Tsai, S. Y. (1997). Identification of a novel sonic hedgehog response element in the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II promoter. *Mol Endocrinol* 11, 1458-1466.

Krishnan, V., Pereira, F. A., Qiu, Y., Chen, C. H., Beachy, P. A., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (1997). Mediation of Sonic hedgehog-induced expression of COUP-TFII by a protein phosphatase. *Science* 278, 1947-1950.

Lai, E., Prezioso, V. R., Smith, E., Litvin, O., Costa, R. H., and Darnell, J., Jr. (1990). HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes Dev* 4, 1427-1436.

Lai, E., Prezioso, V. R., Tao, W. F., Chen, W. S., and Darnell, J., Jr. (1991). Hepatocyte nuclear factor 3 α belongs to a gene family in mammals that is homologous to the *Drosophila* homeotic gene fork head. *Genes Dev* 5, 416-427.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissole, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., and Branscomb, E. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. , 860-921.

Lawrence, P. A., and Struhl, G. (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *drosophila*. *Cell* 85, 951-961.

Lee, J., Platt, K. A., Censullo, P., and Ruiz i Altaba, A. (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124, 2537-2552.

Lumsden, A., and Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274, 1109-1115.

Marigo, V., Davey, R. A., Zuo, Y., Cunningham, J. M., and Tabin, C. J. (1996a). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 384, 176-179.

Marigo, V., Scott, M. P., Johnson, R. L., Goodrich, L. V., and Tabin, C. J. (1996b). Conservation in hedgehog signaling: induction of a chicken patched homolog by Sonic hedgehog in the developing limb. *Development* 122, 1225-1233.

Marigo, V., Johnson, R. L., Vortkamp, A., and Tabin, C. J. (1996c). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol* 180, 273-283.

Marine, J. C., Bellefroid, E. J., Pendeville, H., Martial, J. A., and Pieler, T. (1997). A role for *Xenopus* Gli-type zinc finger proteins in the early embryonic patterning of mesoderm and neuroectoderm. *Mech Dev* 63, 211-225.

Marti, E., Bumcrot, D. A., Takada, R., and McMahon, A. P. (1995). Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants [see comments]. *Nature* 375, 322-325.

Martinez-Morales, J. R., Barbas, J. A., Marti, E., Bovolenta, P., Edgar, D., and Rodriguez-Tebar, A. (1997). Vitronectin is expressed in the ventral region of the neural tube and promotes the differentiation of motor neurons. *Development* 124, 5139-5147.

Maruyama, K., and Sugano, S. (1994). Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* 138, 171-174.

- Masuya, H., Sagai, T., Wakana, S., Moriwaki, K., and Shiroishi, T. (1995). A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants. *Genes Dev* 9, 1645-1653.
- Matise, M. P., Epstein, D. J., Park, H. L., Platt, K. A., and Joyner, A. L. (1998). Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development* 125, 2759-2770.
- Matsuura, Y., Possee, R. D., Overton, H. A., and Bishop, D. H. (1987). Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J Gen Virol* 68, 1233-1250.
- McMahon, A. P. (2000). More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* 100, 185-188.
- Mizushima, S., and Nagata, S. (1990). pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* 18, 5322.
- Mo, R., Freer, A. M., Zinyk, D. L., Crackower, M. A., Michaud, J., Heng, H. H., Chik, K. W., Shi, X. M., Tsui, L. C., Cheng, S. H., Joyner, A. L., and Hui, C. (1997). Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 124, 113-123.
- Nakafuku, M., and Nakamura, S. (1995). Establishment and characterization of a multipotential neural cell line that can conditionally generate neurons, astrocytes, and oligodendrocytes *in vitro*. *J Neurosci Res* 41, 153-168.
- Nakagawa, Y., Kaneko, T., Ogura, T., Suzuki, T., Torii, M., Kaibuchi, K., Arai, K., Nakamura, S., and Nakafuku, M. (1996). Roles of cell-autonomous mechanisms for differential expression of region-specific transcription factors in neuroepithelial cells. *Development* 122, 2449-2464.
- Nakano, Y., Guerrero, I., Hidalgo, A., Taylor, A., Whittle, J. R., and Ingham, P. W. (1989). A protein with several possible membrane-spanning domains encoded by the *Drosophila* segment polarity gene patched. *Nature* 341, 508-513.

Patel, B. N., and David, S. (1997). A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J Biol Chem* 272, 20185-20190.

Patel, B. N., Dunn, R. J., and David, S. (2000). Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J Biol Chem* 275, 4305-4310.

Pons, S., and Marti, E. (2000). Sonic hedgehog synergizes with the extracellular matrix protein vitronectin to induce spinal motor neuron differentiation. *Development* 127, 333-342.

Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K., and Eaton, S. (1999). Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J Biol Chem* 274, 12049-12054.

Roelink, H. (1996). Tripartite signaling of pattern: interactions between Hedgehogs, BMPs and Wnts in the control of vertebrate development. *Curr Opin Neurobiol* 6, 33-40.

Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T. M., and et, a. (1994). Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76, 761-775.

Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A., and Jessell, T. M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81, 445-455.

Roskams, A. J., and Connor, J. R. (1992). Transferrin receptor expression in myelin deficient (md) rats. *J Neurosci Res* 31, 421-427.

Ruiz i Altaba, A., Jessell, T. M., and Roelink, H. (1995). Restrictions to floor plate induction by hedgehog and winged-helix genes in the neural tube of frog embryos. *Mol Cell Neurosci* 6, 106-121.

- Ruppert, J. M., Kinzler, K. W., Wong, A. J., Bigner, S. H., Kao, F. T., Law, M. L., Seuanez, H. N., O'Brien, S. J., and Vogelstein, B. (1988). The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol Cell Biol* 8, 3104-3113.
- Salzer, J. L., Lovejoy, L., Linder, M. C., and Rosen, C. (1998). Ran-2, a glial lineage marker, is a GPI-anchored form of ceruloplasmin. *J Neurosci Res* 54, 147-157.
- Sasaki, H., and Hogan, B. L. (1994). HNF-3 β as a regulator of floor plate development. *Cell* 76, 103-115.
- Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M., and Kondoh, H. (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3 β floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh *in vitro*. *Development* 124, 1313-1322.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
- Shimamura, K., Hartigan, D. J., Martinez, S., Puellas, L., and Rubenstein, J. L. (1995). Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121, 3923-3933.
- Stone, D. M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T. A., Gu, Q., Johnson, R. L., Scott, M. P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., Noll, M., Hooper, J. E., de Sauvage, F., and Rosenthal, A. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384, 129-134.
- Suzuki, Y., Yoshitomo-Nakagawa, K., Maruyama, K., Suyama, A., and Sugano, S. (1997). Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. *Gene* 200, 149-156.
- Tanabe, Y., and Jessell, T. M. (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord [published erratum appears in *Science* 1997 Apr 4;276(5309):21]. *Science* 274, 1115-1123.

van den Heuvel, M., and Ingham, P. W. (1996). *smoothed* encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature* 382, 547-551.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., and Salzberg, S. (2001). The sequence of the human genome. , 1304-1351.

Villavicencio, E. H., Walterhouse, D. O., and Iannaccone, P. M. (2000). The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* 67, 1047-1054.

Von Ohlen, T., Lessing, D., Nusse, R., and Hooper, J. E. (1997). Hedgehog signaling regulates transcription through cubitus interruptus, a sequence-specific DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2404-2409.

Vortkamp, A., Gessler, M., and Grzeschik, K. H. (1995). Identification of optimized target sequences for the GLI3 zinc finger protein. *DNA Cell Biol* 14, 629-634.

Wallace, V. A. (1999). Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* 9, 445-448.

Wechsler-Reya, R. J., and Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22, 103-114.

Yoshikawa, T., Nagasugi, Y., Azuma, T., Kato, M., Sugano, S., Hashimoto, K., Masuho, Y., Muramatsu, M., and Seki, N. (2000). Isolation of novel mouse genes differentially expressed in brain using cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 532-537.

表1

本研究において、定量的RT-PCR法による
遺伝子発現解析に使用したプライマーセット

Gene	Primer	Accession
<i>Gli-1</i>	Sense: 5' TGC GTG GTA GAG GGA ACT CCA 3' Antisense: 5' ACT GGG GGT AAA GCA TCA TTG 3'	AF026305
<i>Gli-2</i>	Sense: 5' TGA CTG TAA GCA GGA GGC CGA 3' Antisense: 5' ACA GTC TTC ACA TGC TTG CGG 3'	X99104
<i>Gli-3</i>	Sense: 5' CAG GAG GCT GAA GTC ATC TAC 3' Antisense: 5' CTG TGA ATG GCT GCC GGA ATC 3'	X95255
<i>Ptc</i>	Sense: 5' GCA GGA GGA GTT GAT TGT GGG 3' Antisense: 5' GAG CAA GAA ACG GCA AAA CCT G 3'	U46155
<i>Smo</i>	Sense: 5' CTC CAT CAA GAG CAA CCA CC 3' Antisense: 5' GAG AAG GCC TTG GCA ATC ATC 3'	U84402
<i>HNF-3β</i>	Sense: 5' ATG ACA GGC TGA GTG GAA ACA 3' Antisense: 5' CTC CTG GTC ATT TAT ACC AGA C 3'	NM_012743
<i>Nkx2.1</i>	Sense: 5' GGC CAT CTC TGT GGG CAG C 3' Antisense: 5' CTC AGG CGC GTC CCA CAT C 3'	X53858
<i>GPI-Cp</i>	Sense: 5' ATA GAC CTG CAC ACT GTA CAC 3' Antisense: 5' CTA GTT GGT GTT CTG TGT GTC 3'	AF202115
<i>Secreted-Cp</i>	Sense: 5' ATA GAC CTG CAC ACT GTA CAC 3' Antisense: 5' TCA GCC AGA CTT AGT CTC TTG 3'	L33869
<i>ITIH3</i>	Sense: 5' ACT ATT ATG TGG ATG GGG ACC 3' Antisense: 5' TTC TTC CAA ACC TGG TGT AGG 3'	X83231
<i>β-actin</i>	Sense: 5' TGC CCA TCT ATG AGG GTT ACG 3' Antisense: 5' TAG AAG CAT TTG CGG TGC ACG 3'	V01217
<i>GAPDH</i>	Sense: 5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3' Antisense: 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3'	M33197

図の説明

図1 Shhのシグナル伝達系におけるGli転写制御因子の関与 A. δ Glix8-BS Luciferaseの構造 ニワトリ δ crystallin 遺伝子プロモーターの上流に、Gli 結合配列(下線)を含む32 bpのオリゴヌクレオチドを8個並列にクローン化した、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子とするプラスミド(δ Glix8-BS Luciferase)を作成した(Sasaki *et al.*, 1997)。 B. Gli 結合配列を介したShh依存的なレポーターの転写活性化 Gli 結合配列を有するレポーター(δ Glix8-BS Luciferase: 2 μ g)及びコントロールレポーター(δ Luciferase: 2 μ g)をShh-N cDNA 断片発現プラスミド(5 μ g)とともにMNS-70細胞に導入し、レポーターの転写活性化を検出した。各サンプルのルシフェラーゼの酵素活性を、同時にMNS-70に導入したpEF-BOS β -gal (4 μ g)より発現した β -ガラクトシダーゼの酵素活性の値で標準化した。(平均値 $\pm$ SD, n=3) C. 図1Bと同様の方法によりGli cDNA 発現プラスミド(1.5 μ g)によるレポーターの転写活性化を検討した。(平均値 $\pm$ SD, n=3)

図2 Gli-2-DNによるGli-1特異的抑制効果の検討 A. Gli-1特異的抑制作用を持つGli-2-DNの構造 Gli-2-DNはGli-2のZinc finger motifの一部を含むN末端側(アミノ酸残基318-535番目)をコードする。 B, C. Gli-2-DNによるGli-1特異的な抑制効果 B. 図1Bと同様の方法を用いてGli-1、Gli-2のcDNA発現プラスミド量に依存的なレポーターの転写活性を測定した。Gli-2-DN発現プラスミド(8.5 μ g)を共発現させると、Gli-1が特異的に抑制された。(平均値 $\pm$ SD, n=3) C. 図1Bと同様の方法を用いてGli-2-DN発現プラスミドの量に依存したGli-1、Gli-2(1.5 μ g)の転写活性化の抑制効果を測定した。(平均値 $\pm$ SD, n=3) D. Gli-2-DN、Gli-3による、Shh-N、Gli-1、Gli-2の転写促進活性の抑制 図1Bと同様の方法を用いてShh-N cDNA断片発現プラスミド(5 μ g)、Gli-1、Gli-2 cDNA発現プラスミド(1.5 μ g)に対して、Gli-2-DNあるいはGli-3 cDNA発現プラスミドの持つ抑制効果を測定した。図中の括弧内の数値はShh、Gli-1、あるいはGli-2単独の発現によって得られるルシフェラーゼ活性を1.0とした場合の相対値を示した。(平均値 $\pm$ SD, n=3)

図3 MNS-70細胞におけるShh受容体及びGli転写因子群の発現動態の解析 胎生11.5日の神経上皮組織(NE)及び、未処理のMNS-70細胞、Shh発現CV1細胞の培養上清で処理したMNS-70細胞(詳細は、Nakagawa *et al.*1996を参照)より、total RNAを抽出し、Gli-1、Gli-2、Gli-3、Ptc、Smo、について、それぞれ定量的RT-PCR法によりその

遺伝子発現レベルを比較した。それぞれの遺伝子の発現レベルは、 β -actin の発現レベルで標準化した。図中に NE の発現レベルを 1.0 とした相対値を示した。

図 4 Gli 転写因子群による Shh 標的遺伝子群の発現制御 A. Shh-N、Gli-1、Gli-2、及び Gli-3 の cDNA 発現プラスミド (15 μ g) を MNS-70 細胞に導入し 72 時間処理した MNS-70 細胞から total RNA を抽出し、図 3 と同様の方法で内在性の Ptc と Gli-1 の mRNA の発現レベルを RT-PCR 法により解析した。 B. 図 4A と同様の方法で各遺伝子の導入による Nkx2.1、HNF-3 β mRNA の発現誘導を解析した。

図 5 HNF-3 β 、HNF-3 α による Gli を介した Shh シグナルの抑制 A. 図 1B と同様の方法で Gli-1、Gli-2 cDNA 発現プラスミド (1.5 μ g) に対する HNF-3 β 、HNF-3 α cDNA 発現プラスミド (8.5 μ g) による転写活性化の抑制効果を検討した。図中の括弧内の数値は Gli-1、あるいは Gli-2 単独の発現によって得られるルシフェラーゼ活性を 1.0 とした場合の相対値を示した。 B. パネル A と同様の方法で Shh-N cDNA 断片発現プラスミド (5 μ g) に対する HNF-3 β 、HNF-3 α cDNA 発現プラスミド (5 μ g) による転写活性化の抑制効果を検討した。 C. パネル A と同様の方法で Shh-N cDNA 断片発現プラスミドに対する Ptc、Ptc-CTD cDNA 発現プラスミド による転写活性化の抑制効果を検討した。

図 6 定量的 RT-PCR 法による Shh の濃度依存的な遺伝子発現誘導の解析 種々の濃度の組み替え型 Shh-N タンパク質で 72 時間処理した MNS-70 細胞から、それぞれ total RNA を抽出し、Gli-1(▲) と Ptc (■) の mRNA 発現レベルについて、図 3 と同様の方法を用いて解析した。(平均値 $\pm$ SD, n=3)

図 7 Gli を介した Sonic hedgehog の濃度依存的なシグナル伝達機構のモデル 本研究により明らかになった各遺伝子産物間の活性化(実線)及び抑制(点線)の機能的相互関係をまとめた。詳細は本文を参照のこと。

図 8 cDNA マイクロアレイ解析の原理 A. cDNA マイクロアレイ解析の手順(本文参照) B. マイクロアレイハイブリダイゼーションの原理(本文参照)

図 9 cDNA マイクロアレイを用いた Shh 応答性遺伝子のスクリーニング A. cDNA マイクロアレイの 2 色擬似カラー画像を示す。左の図は Shh 処理したサンプル

が Cy3(赤)、コントロールが Cy5 (緑)、右の図は標識を入れ替えたもの。黄色は両サンプル間で同等の発現量であったことを示す。矢印 (赤) : β -actin; 矢印 (白) : human Cot-1; 矢頭 1 : Cp; 矢頭 2 : Ptc; 矢頭 3 : ITIH3 B. RT-PCR 法によってマイクロアレイで得られた結果を検証した。図 4 と同様の方法で RT-PCR 法を行った。

図 10 Shh, Gli による ITIH3, Cp の発現制御

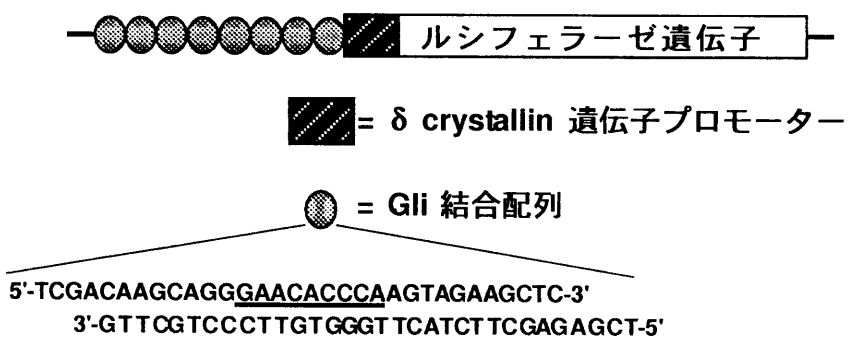
Shh, Gli-1, Gli-2, Gli3 の発現プラスミドを MNS-70 細胞に導入し、図 4 と同様の方法で種々の遺伝子の発現レベルを RT-PCR 法により解析した。

図 11 Cp, Shh, Ptc の発現パターン

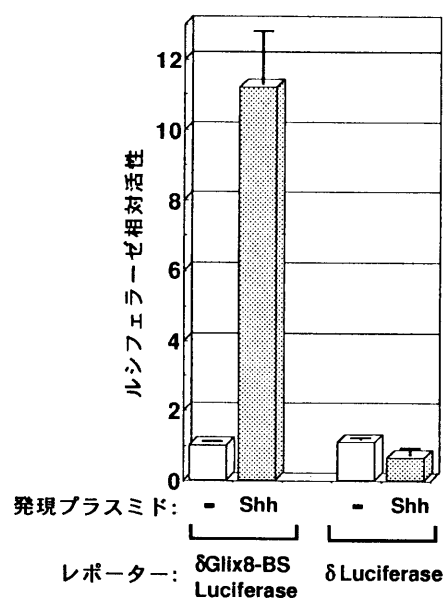
胎生 12 日胚の凍結切片を用いて *in situ* hybridization 法により、Cp, Shh, Ptc の発現パターンを比較検討した。それぞれ、(A, D): Cp; (B, E): Shh; (C, F): Ptc の発現パターンを示す。A-C および、D-F はそれぞれ連続した切片を用いた。矢頭は Cp と Shh の境界を示す。太線は Cp の発現領域を示す。Cp は眼柄 (A)、視床下部 (D)、後脳腹側部(D)において Shh と隣接して発現していた。fp: 底板; hb: 後脳; hy: 視床下部; ge: 基底核; os: 眼柄; ov: 眼胞

A

δGlix8-BS Luciferase



B



C

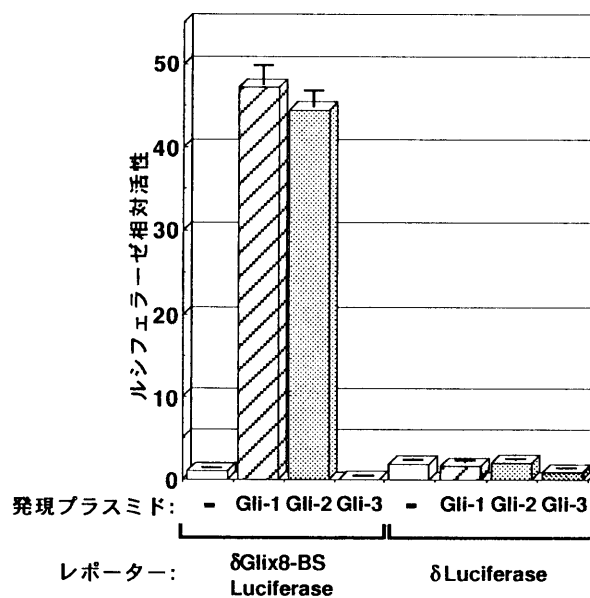
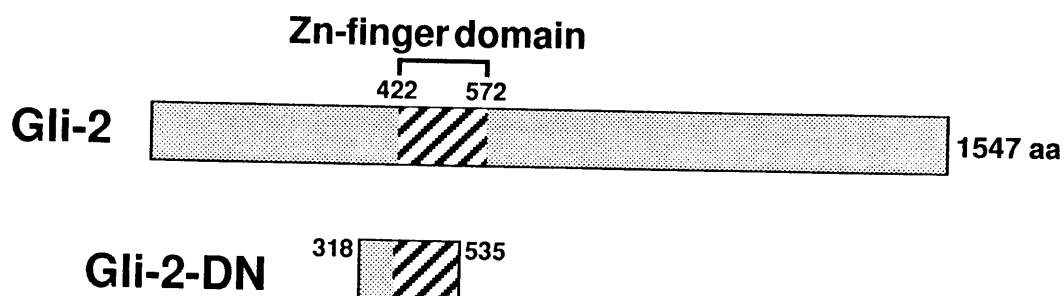
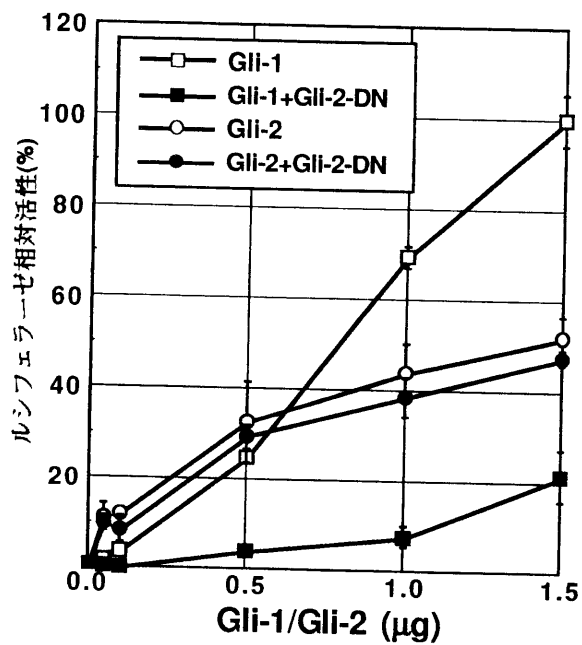


図1

A



B



C

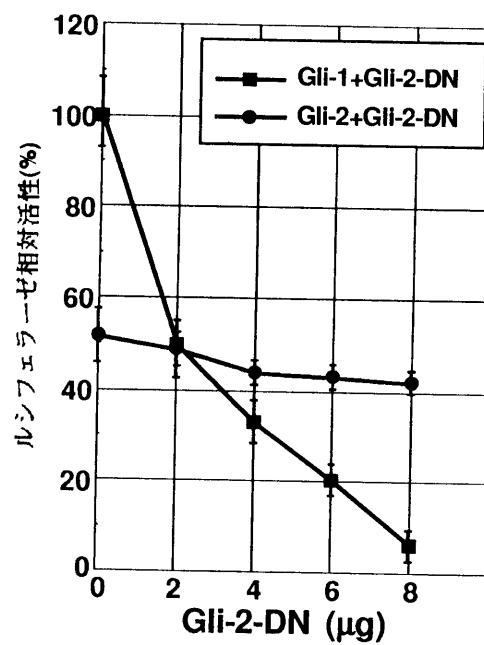


図2

D

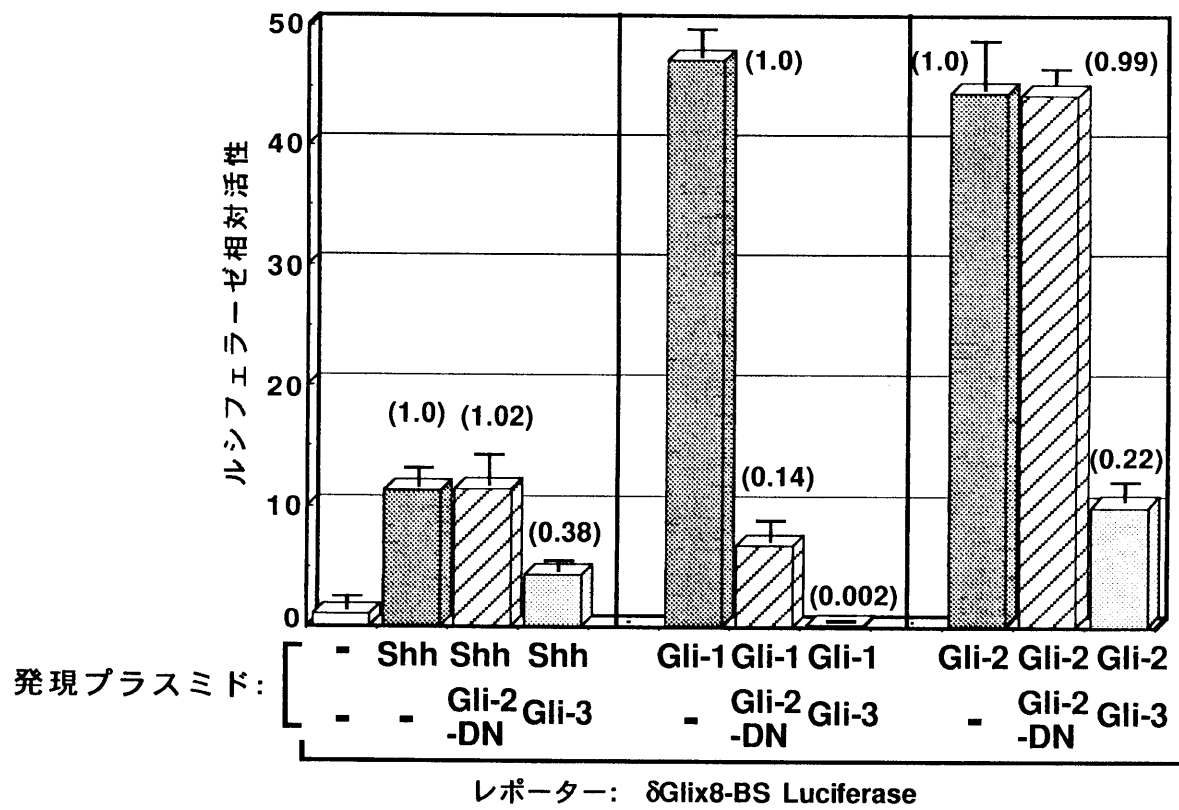


図2

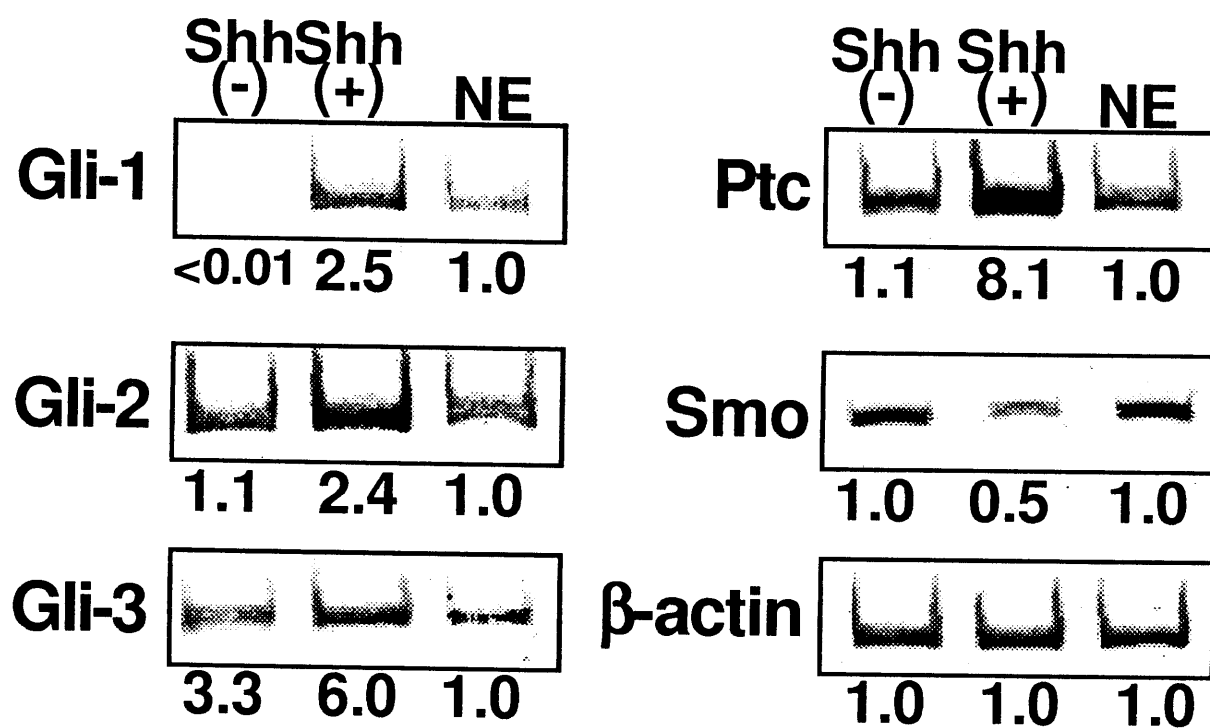
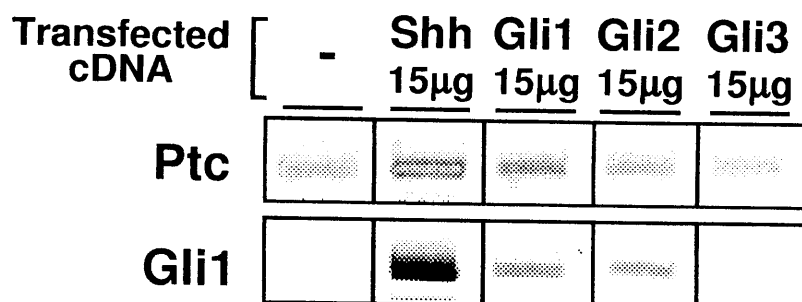


图3

A



B

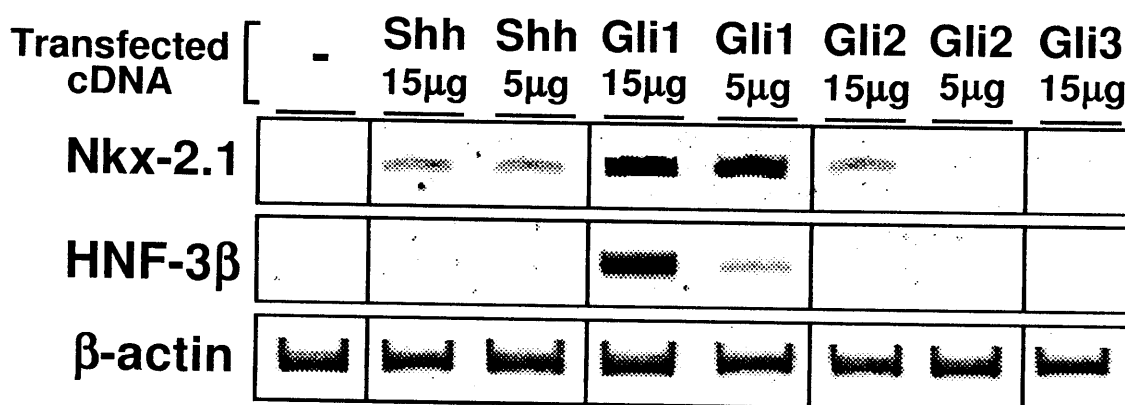
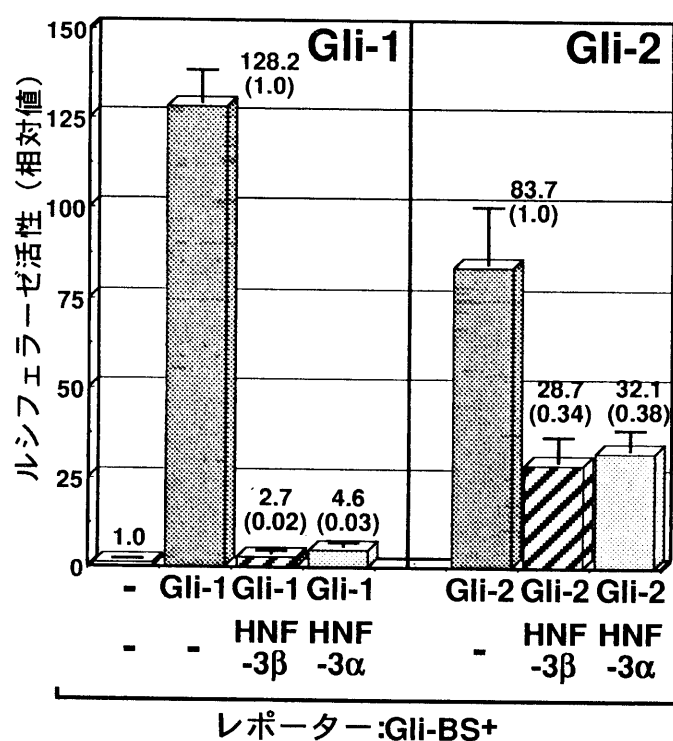


图4

A



B

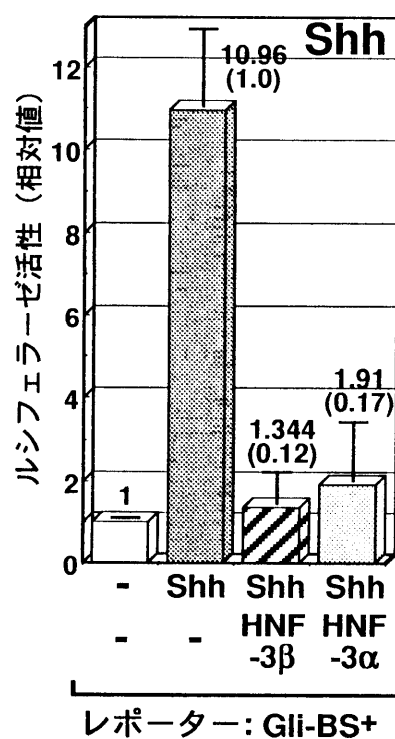


図5

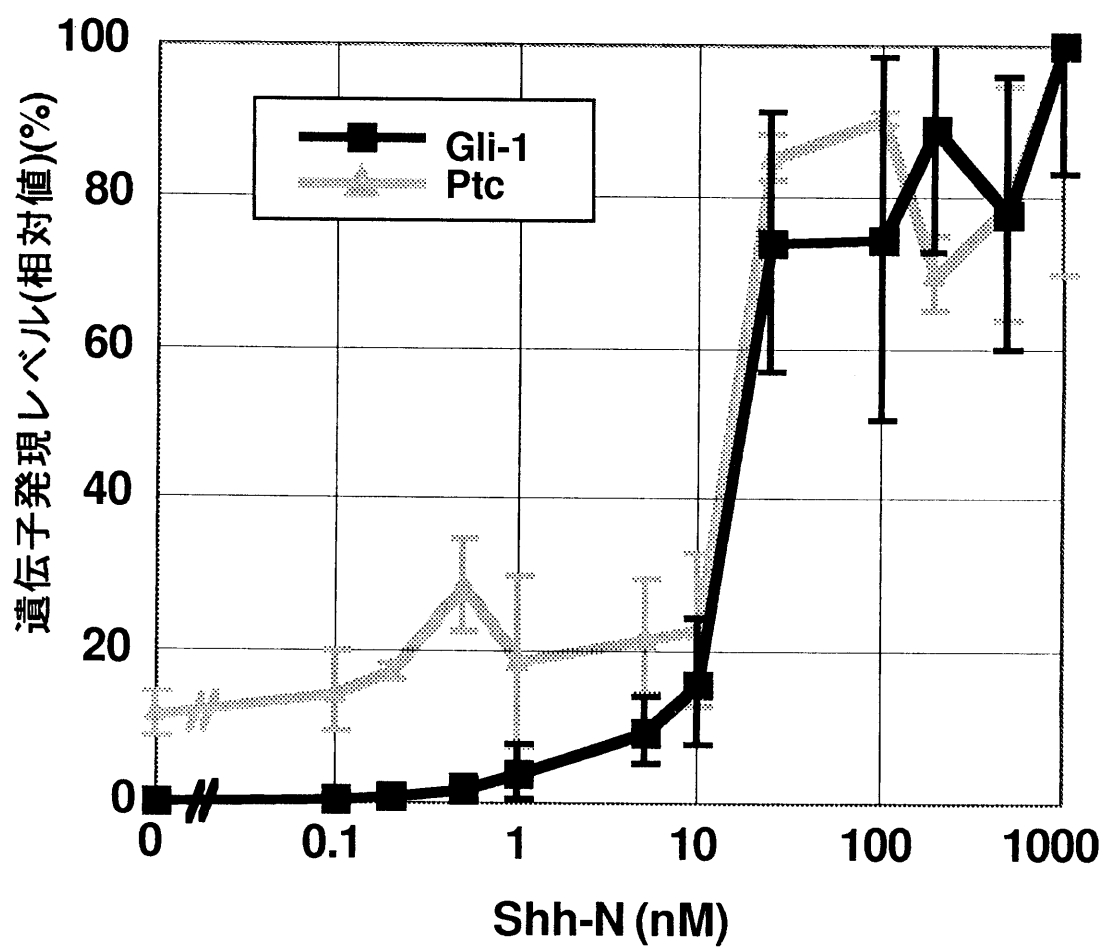


図6

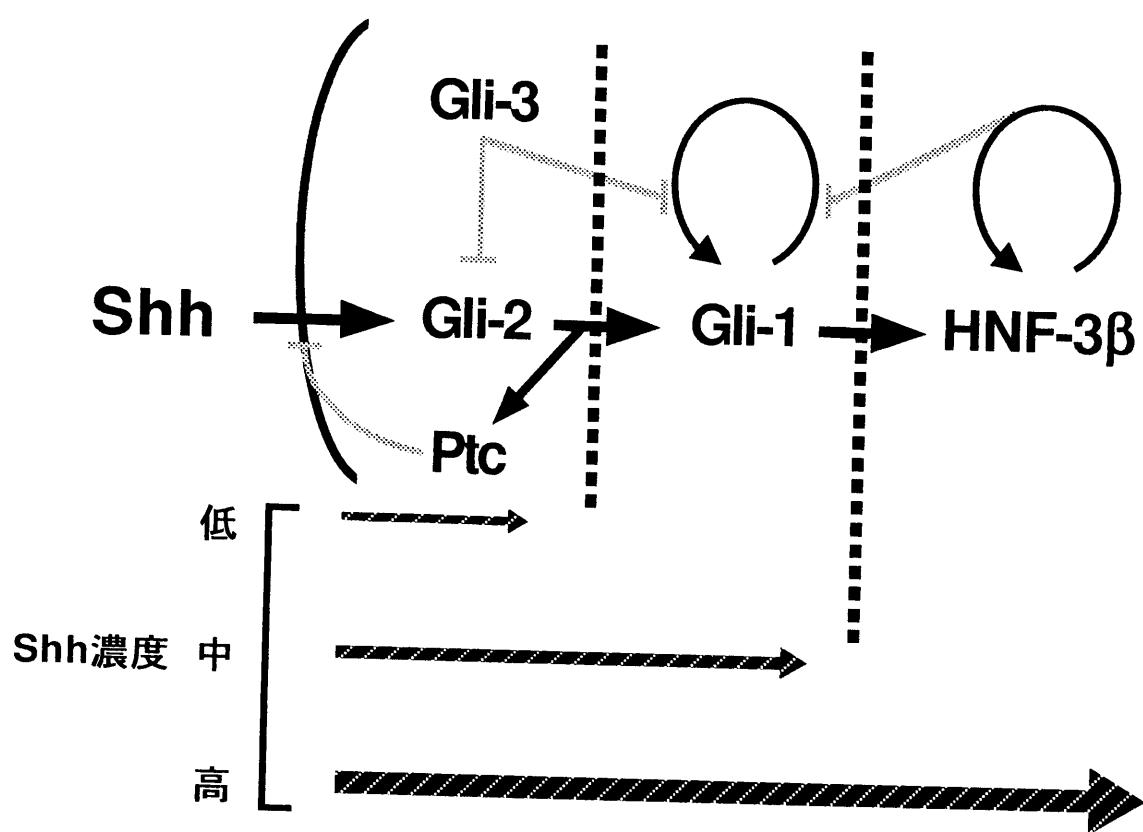
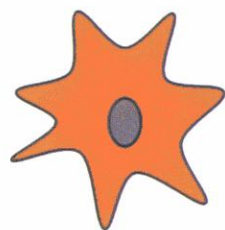
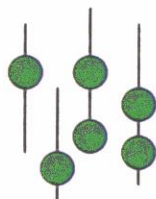


图7

A



逆転写反応
標識核酸取込



標識cDNA

mRNA抽出

標識cDNA
の調製

cDNAの調製

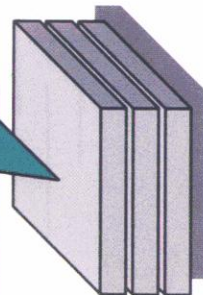
スライドグラス
への固定化

ハイブリダイ
ゼーション

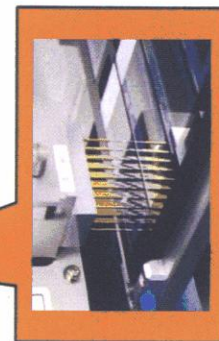
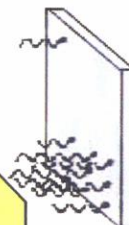
イメージ
取得

データ解析

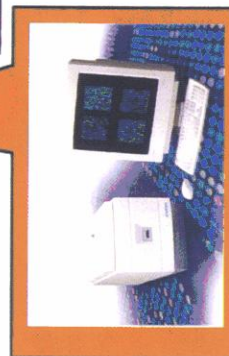
DNA調製
PCR



マスタープレート



マイクロアレイ作製装置
(SPBIO2000)



共焦点レーザー型検出器
(ScanArray)

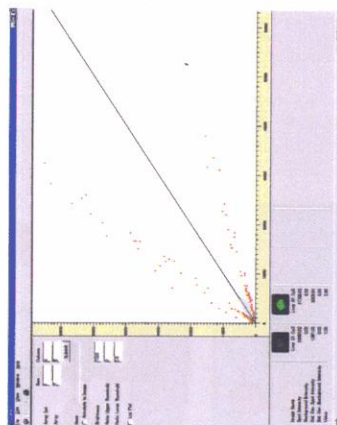
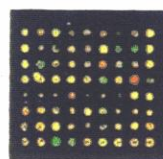
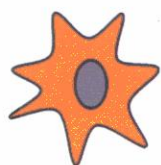


図8

B

Shh-N発現プラスミド

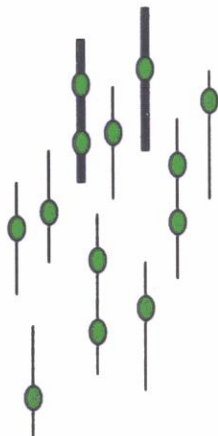


MNS-70細胞



mRNA抽出

逆転写反応
蛍光ラベル
(Cy3, Cy5)



MNS-70細胞

コントロールプラスミド

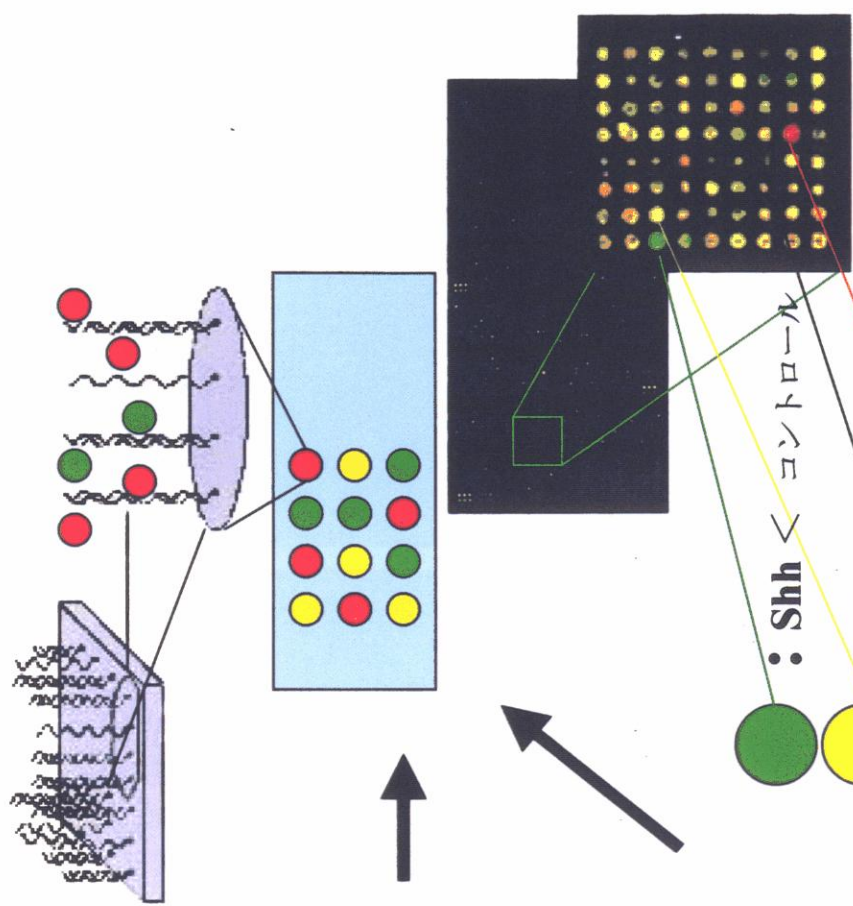
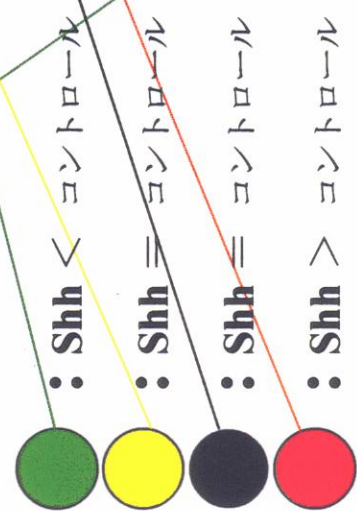


図8

A

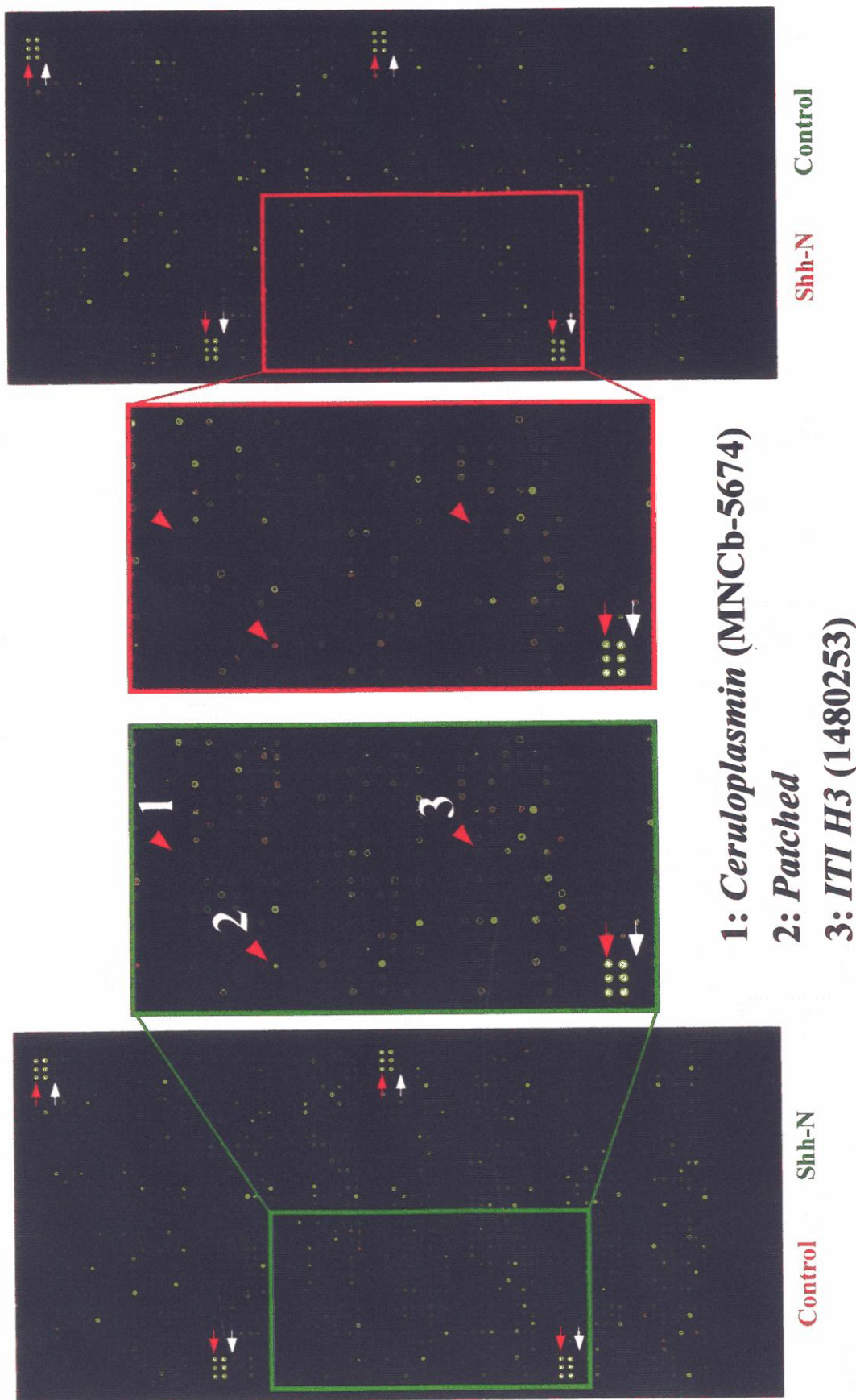


图9

B

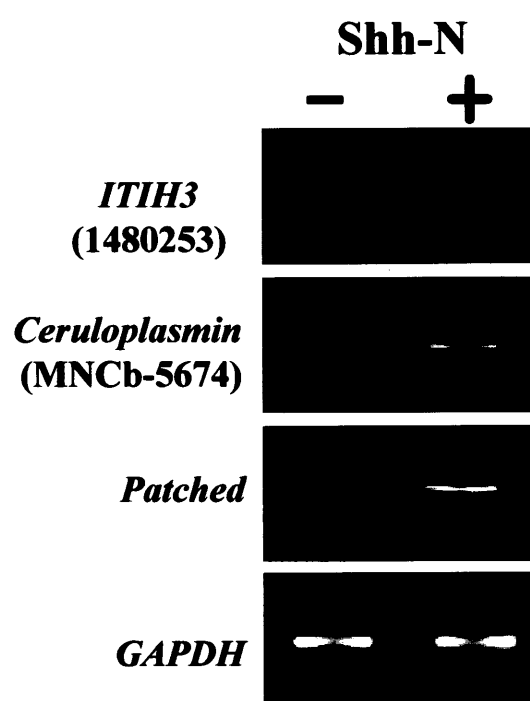


图9

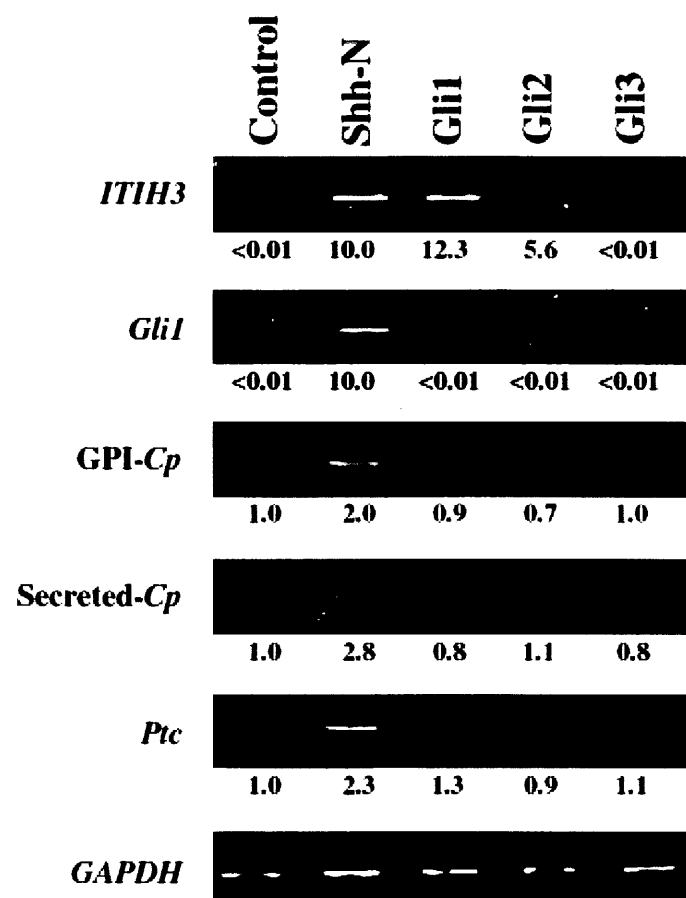


図10

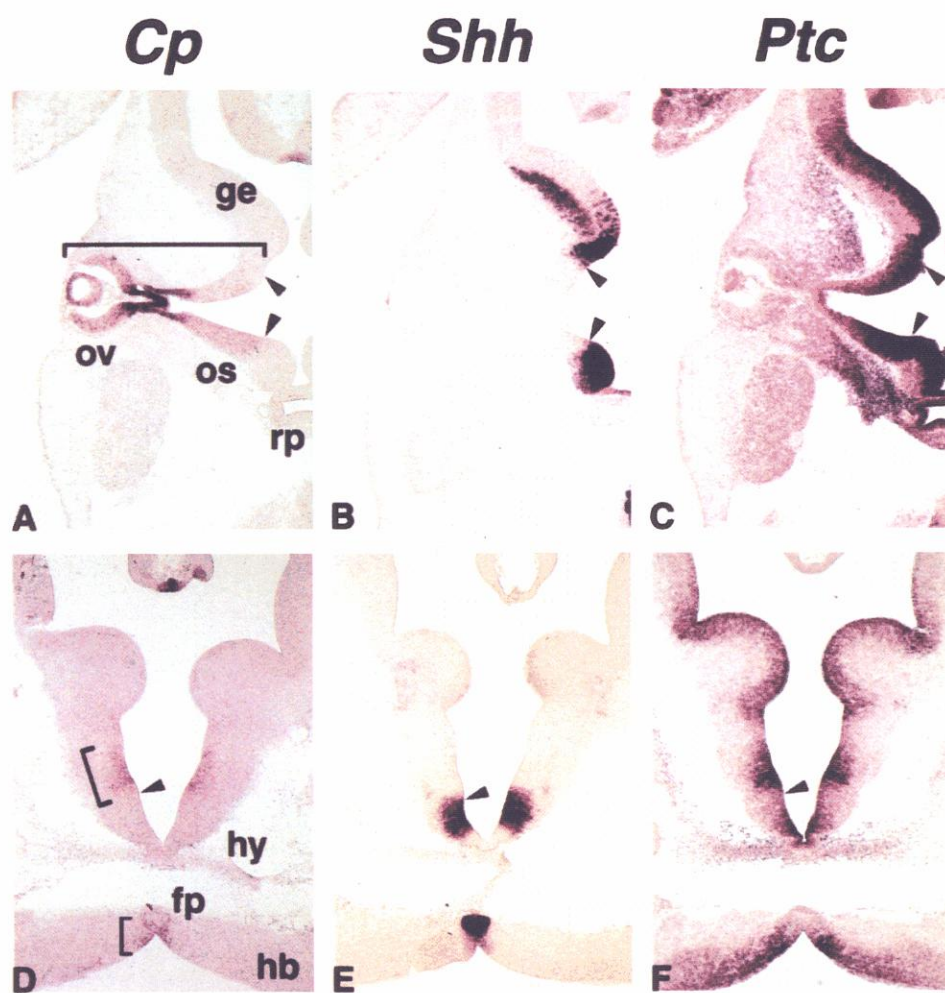


图11