

「脳を知る」
平成7年度採択研究代表者

岡野 栄之

(大阪大学大学院医学系研究科 教授)

「脳神経系を構成する細胞の多様性の形成機構」

1. 研究の概要

本研究は、脳・神経系の高次機能の基盤となる細胞の多様性の形成機構を、既存の技術をさらに高度に統合した形で駆使し、また独創的、新規的な技術をも開発しつつ、戦略的に解明することを目的とする。神経発生の初期過程を制御する遺伝子産物が、無脊椎動物から脊椎動物まで広く保存されていることを利用し、ショウジョウバエの神経発生過程における細胞の運命決定を制御する遺伝子産物を同定・解析することをスタート・ポイントとし、ショウジョウバエで同定された遺伝子産物の哺乳類相同分子を単離しその機能解析を行い、哺乳類脳神経系を構成する細胞の多様性形成のメカニズムを明らかにする。また、このような神経発生の研究から得られる基本的知見を、近い将来神経変性疾患の治療法開発へと応用する方向で研究を進める。上記の研究目的を達成するために、「2. 研究実施内容」に示す8項目にわたるプロジェクトを遂行している。これらのプロジェクトは、何れも神経発生過程における細胞運命決定や神経機能形成に関する遺伝子産物の機能解析を行うとともに、その知見を神経疾患の理解と治療法の開発へと応用しているもので、独立に進んでいるプロジェクト間にも密接な関連性があることが明らかになってきている。また、これら project の内、神経幹細胞 project (特に哺乳類神経幹細胞に関する基礎的研究および脳再生・修復を目指した治療法の開発) は、CREST 申請時の計画にはなかったが、CREST 開始以降の研究 project の成果の中から生まれてきた新しい潮流であり、現在力を入れて取り組んでいる。

2. 研究実施内容

2-1 <神経幹細胞 project>

哺乳類における神経幹細胞とは、発生中の脳原基において自己の複製 (self-renewal) と、ニューロンおよびグリア細胞のどちらをもつくりすることができる (multipotent) 細胞である。神経幹細胞が神経系を構成する細胞の多様性の形成機構を解析する上で、最も重要な研究対象の一つとなっていることは言うまでもない。また、神経幹細胞は、その特有の性質から、虚血や変性疾患によって脳のニュー

ーロンの大量喪失 (structural brain damage と総称する) に対する再生療法への切り札として注目を集めている。我々は、神経幹細胞の分化や非対称性分裂の制御などの基礎的研究を行なうと共に、独自の手法により哺乳類神経幹細胞の同定と大量調整法を確立しつつあり、近い将来に脳再生・修復を目指した治療法の開発を目指した研究を行っている。

昨年、本研究チームは、アメリカ Cornell 医科大学の Steven A. Goldman 博士のグループとの共同実験によって、神経幹細胞が大人の脳の中にも存在することを世界に先駆けて明らかにした。このことは動物では以前から知られていたが (Science 255, 1707-1710, 1998 など)、ヒトにおいても同じことがいえるということ初めて明らかにした。我々は Musashi1 というタンパク質が神経系の発生に関わる重要な分子であることを明らかにしたが、これがいよいよ、ヒトの脳においても機能していることが突き止められ、神経幹細胞のマーカーとしてヒトにおいても使えるということが証明されるに至った。また我々は、神経幹細胞のマーカーである Nestin の遺伝子のエンハンサー領域を用いて、Green Fluorescent Protein (GFP) という緑色の蛍光を発するタンパク質を神経幹細胞のみに発現させる技術を開発することに成功した。

2-2 <Notch 情報伝達系 project>

Notch 情報伝達系は、細胞間の直接的接触を介した細胞間相互作用に重要な機能をはたしており、極めて多様な細胞運命の決定を制御している。我々は、Deltex が Notch 情報伝達系を制御する生化学的機構と、発生におけるその機能を理解するための研究を行った。さらに、進化上保存されている Notch 情報伝達系の哺乳類発生における機能を理解することを目的として、deltex のマウスホモログに関する研究を行った。また中福グループが開発した前脳由来神経幹細胞の不死化細胞株である MNS 細胞を用いて、deltex 哺乳類相同分子の機能解析を行い、Deltex-1 は Notch1 の細胞内領域のうち ankyrin ドメインに特異的に結合するとともに、核内で Mash-1 およびその転写の co-activator である p300 とタンパク質レベルで相互作用する分子であることが明らかになった。

2-3 <ショウジョウバエ複眼における Ras シグナルと細胞分化制御 project>

多細胞生物の発生における細胞の増殖・分化・運動・細胞死等の機能は、細胞間のコミュニケーションによって厳密に制御されていると考えられている。Ras シグナル伝達経路はこうした他の細胞からのシグナルを核へ伝えるための基本経路の一つであり、進化の過程で保存されている。我々は、シグナル伝達研究の良いモデルであるショウジョウバエの発生過程において Ras シグナルを負に制御する分泌性蛋白質 Argos と、Ras の下流で機能する低分子量 GTP 結合蛋白質 Ral について解析し、以下のような成果を得た。Argos は、EGF モチーフを有する分泌性の

蛋白質で、変異体の表現型などから細胞分化抑制因子として機能することが知られていた。遺伝学的解析から、Argos が Ras/MAPK 経路を上流から負に制御することを見いだした。生化学的解析により、Argos が EGF 受容体に直接結合して二量体形成を抑制することを明らかにした。Argos を複眼特異的に過剰発現すると Ras シグナルの低下によりプログラム細胞死が誘導されることを見だし、Ras シグナルが細胞の生存を促進することを示した。この Argos の過剰発現によって生じる表現型を変化させる変異体をスクリーニングし複数の変異体を分離した。表現型の解析結果より、これらの系統の中には Argos と共通のシグナル経路を介して細胞死あるいは細胞分化の制御に関与する遺伝子の変異体が含まれているものと考えている。

2-4 <線虫 project>

線虫 *C. elegans* は、受精卵から個体に至るまでの全細胞系譜とゲノムの全 DNA 配列が解読され、遺伝学的な研究もやりやすい格好のモデル生物系である。我々は、線虫を用いて、細胞の非対称性分裂の制御機構の研究を行っている。これは、神経幹細胞の非対称性分裂の制御機構にも通じる研究として力を入れている。細胞分裂によって性質や運命の異なる細胞を生み出す非対称分裂は、生物の発生の際、細胞の多様性を作り出す普遍的な機構であるが、その機構は明らかではない。線虫 *C. elegans* においては、数多くの postembryonic に起こる非対称分裂が Wnt 様のシグナル分子 LIN-44 と Frizzled 様レセプター分子 LIN-17 によって制御されている。LIN-44 シグナルに基づいて細胞内に極性が形成され、その後の分裂が非対称になると考えられる。lin-17 変異体では例えば、尻尾にある T 細胞の分裂の非対称性が失われ、phasmid socket 細胞などの神経系の細胞が作られない。LIN-17 の下流で細胞極性の形成に関与する遺伝子を同定するため phasmid socket 細胞が存在しない変異体を検索している。その結果、phasmid socket 細胞が存在しない新たな変異体を 8 系統同定することに成功した。これらの変異体では T 細胞の細胞系譜が異常になっていると考えられる。このうち 4 系統については細胞系譜を解析し、T 細胞の分裂が対称になることを明らかにしている。このうち 2 系統は母性致死であり、遺伝子が初期発生にも必要なことがわかっている。現在これらの遺伝子のクローニングに向け、変異のマッピングと責任遺伝子のクローニングを行っている。

以上の 4 project 以外にも我々は、2-5<プログラム細胞死 project>、2-6<RNA 結合タンパク質 project>、2-7<神経回路網形成と glia 細胞の機能解析 project>、2-8<大脳皮質、小脳皮質形成機構解析 project>に関する研究を行っている。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○Sawamoto, K., Taguchi, A., Jin, M., Yamada, C. and Okano, H.: Argos

- induces programmed cell death in the developing *Drosophila* eye by inhibition of the Ras pathway. *Cell Death and Differentiation*, 5, 262-270 (1998)
- Hamada, S., Senzaki, K., Hamaguchi-Hamada, K., Tabuchi, K., Yamamoto, H., Yamamoto, T., Yoshikawa, S., Okano, H. and Okado, N.: Localization of 5-HT_{2A} receptor in rat cerebral cortex and olfactory system revealed by immunohistochemistry using two antibodies raised in rabbit and chicken. *Mol. Brain Res.*, 54, 199-211 (1998)
- Hisahara, S., Shoji, S., Yoshikawa, S., Okano, H. and Miura, M.: Functional expression of *bcl-2* family gene in *Drosophila* cells. *J. Cell Sci.*, 111, 667-673 (1998)
- Pincus, D.W., Keyoung, H., Restelli, C., Goodman, R.R., Fraser, R.A.R., Edgar, M., Sakakibara, S., Okano, H., Nedergaard, M. and Goldman, S.A.: FGF2/BDNF-responsive neuronal progenitor cells in the adult human subependyma. *Annals of Neurology*, 43, 576-585 (1998)
- Saito, T., Sawamoto, K., Okano, H., Anderson, D.J., and Mikoshiba, K.: Mammalian BarH homolog is a regulatory switch of proneural genes to establish neuromere identities. *Dev. Biol.*, 199, 216-225 (1998)
- Good, P., Yoda, A., Sakakibara, S., Yamamoto, A., Imai, T., Sawa, H., Ikeuchi, T., Tsuji, S., Satoh, H. and Okano, H.: The Human *Musashi homolog1 (MSI1)* gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells. *Genomics*, 52, 382-384 (1998)
- Tabuchi, K., Yoshikawa, S., Yuasa, Y., Sawamoto, K. and Okano, H.: Isolation and characterization of a novel *Drosophila* paired-like homeobox gene related to *Caenorhabditis elegans unc-4* and expressed in the subsets of developing neurons and epidermis. *Neurosci. Lett.*, 257, 49-52 (1998)
- Kanuka, H., Hisahara, S., Sawamoto, K., Shoji, S., Okano, H. and Miura, M.: Execution of programmed cell death in *Drosophila* by *C. elegans* Cell death gene *ced-4*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 145-150 (1999)
- Yoshihara, Y., Mizuno, T., Nakahira, M., Kawasaki, M., Watanabe, Y., Kagamiyama, H., Jishage, K., Ueda, O., Suzuki, H., Tabuchi, K., Sawamoto, K., Okano, H., Noda, T. and Mori, K.: Multi-synaptic neural pathways visualized with plant lectin transgenes. *Neuron*, 1, 33-41 (1999)
- Umemori, H., Kadowaki, Y., Hirosawa, K., Okano, H. and Yamamoto, T.: Stimulation of myelin basic protein gene transcription by Fyn tyrosine kinase

- for myelination. *J. Neurosci.*, 19, 1393-1397 (1999)
- Sawamoto, K., Yamada, C., Kisida, S., Hirota, Y., Kikuchi, Y. and Okano, H.: Ectopic expression of mutationally-activated Ral GTPase inhibits cell shape changes during *Drosophila* eye development. *Oncogene*, 18, 1967-1974 (1999)
- Nagata, T., Kanno, R., Kurihara, Y., Uesugi, S., Imai, T., Sakakibara, S., Okano, H. and Katahira, M.: Structure, backbone dynamics and interaction with RNA of RNA-binding domain of a mouse neural RNA-binding protein, Musashi-1. *J. Mol. Biol.*, 287, 314-330 (1999)
- Araki, T., Saruta, T., Okano, H. and Miura, M.: Caspase activity is required for nephrogenesis in the developing mouse metanephros. *Exp. Cell Res.*, 248, 423-429 (1999)

他 19 件

