

「脳を知る」

平成7年度採択研究代表者

堀田 凱樹

(国立遺伝学研究所 所長)

## 「神経系形成における Glial cells missing 遺伝子の機能」

### 1. 研究の概要

ショウジョウバエの神経系におけるグリアとニューロンとの分化のスイッチ遺伝子 *gcm* (*glial cells missing*) 遺伝子について、その産物が特定の 8 塩基を認識して結合する新規の転写調節因子であることを証明し、さらに転写・翻訳がグリア・ニューロン分化の分岐点でどのように調節されているかの詳細を明らかにした。また、同じ DNA 結合域をもつホモログが脊椎・無脊椎動物に広く存在し、さまざまな細胞分化分岐のスイッチとして働いている可能性について示した。

### 2. 研究実施内容

研究の背景：

本研究は多細胞生物の細胞が一つ一つ個性と多様性をもつこと、その個性の分化のスイッチ遺伝子機構を脳のニューロンとグリアの分化という代表的な例について示した点が重要である。ショウジョウバエでなければ不可能な詳細なメカニズムの研究だが、同じメカニズムがヒトなど哺乳類にも存在すると考えられ、今後の細胞分化の遺伝子解析に重要な示唆を与えるものとなったと言えよう。

われわれは分子生物学技術と発生生物学技術を駆使できるこのショウジョウバエの脳神経系を用い、ニューロンとグリアの分化機構および神経回路形成の分子機構を明らかにする目的で、エンハンサートラップ法を用いて脳神経系に異常を起こす多数の突然変異を分離する研究を行ってきた。その過程でわれわれは、共通の神経上皮母細胞からグリアとニューロン（神経細胞）とが分化する際のスイッチ遺伝子 *gcm* (*glial cells missing*) を発見した。この遺伝子を欠損する突然変異では中枢神経系および末梢神経系のすべてのグリア細胞がニューロンとなって軸索を伸ばすようになり、また GAL4-UAS 遺伝子導入法によってすべての神経幹細胞でこの遺伝子を発現させるとすべてのニューロンがグリア細胞型の遺伝子発現をするようになることを証明した。したがって *gcm* はニューロン・グリア間の分化運命を決定する binary switch 遺伝子であり、ニューロンとグリアとが共通の母細胞に由来することを確実に証明したといえる。

今年度は以下に示す研究成果を挙げた；

1) *gcm* 遺伝子産物タンパク質 (GCM) の転写調節因子としての性質

大腸菌に合成させた GCM の DNA 結合特性を解析した結果、その N 末部分に特異性の高い DNA 認識結合部位 (*gcm*-motif) が存在し、ランダムオリゴマーとの結合実験から [5' (A/G)CCC GCAT 3'] の 8 塩基列を認識して結合することを明らかにした。しかもこの配列が *gcm* によって強く誘導される標的遺伝子である *repo* 遺伝子上流に 11 個タンデムに並んで存在する。この結果から、GCM は転写調節因子であると結論された。また、同じような重要なスイッチ遺伝子がヒトなどでも働いている可能性を追及する目的で、われわれは現在マウスなどでのホモログ遺伝子の探索を行っている。これまでの結果から、マウスには *gcm* モチーフを持つ遺伝子少なくとも 2 個存在し、そのうちの 하나는胎生期の脳、腎臓などで発現していることが明らかとなっている。

2) ショウジョウバエの神経系以外における *gcm* 遺伝子の効果

*gcm* 遺伝子は上に述べたような強力な細胞分化スイッチ機能が神経系において証明された。そこで神経系以外で *gcm* を発現させた効果を調べるために GAL4-UAS システムを利用して上皮細胞および中胚葉性の筋細胞で *gcm* を強制的に発現する実験を行った。その結果、いずれにおいても *repo* の発現が誘導され、上皮特異的あるいは筋特異的な遺伝子 (*fasciclinIII*, *myosin* など) の発現が抑制されることを証明した。この事実から、*gcm* 遺伝子は神経系以外でも強い細胞運命転換機能を持つことが明らかとなった。

3) *gcm* の時間的・空間的発現パターンとグリア・ニューロン分化

*gcm* 遺伝子の性質から、この遺伝子はニューロン幹細胞(NB)とグリア母細胞(GB)がニューロン・グリア母細胞(NGB)から分岐する“不等分裂”に際して GB の側でのみ発現することが期待される。そこでわれわれは抗 GCM 抗体を作成して、*in situ* ハイブリダイゼーションとの二重染色により NGB の分裂と遺伝子発現との関連を解析する実験を行った。その結果、グリア・ニューロン分化のパターンが胸部体節腹部体節とで異なることが明らかになっている NB 6-4 において詳細に観察したところ、mRNA は NGB で既に産生しているが、NGB の分裂に先立ち細胞の正中線側に局在するようになり、その結果分裂してできる一方の娘細胞である GB へのみ分配され、もう一つの娘細胞である NB には引き渡されないことが証明できた。さらに GCM タンパク質は NGB では翻訳されず、その娘細胞のうち GB のみにおいて翻訳される結果、NB には GCM タンパクも存在しないことを明らかにした。

4) グリア細胞の軸索走行路の形成における機能

*gcm* 突然変異体中枢神経系の各ニューロンの軸索走行路解析から、われわれは神経回路形成におけるグリア細胞の役割についても興味深い知見を得た。要約すれ

ば、初期に分化するいわゆる pioneer neuron はグリアの存在しない環境でも正しく軸索路を発見できるが、それに続いて分化する一般のニューロンの軸索は多くの場合正しい路を発見できないのである。したがって、pioneer neuron がまずグリア非依存的に経路を発見し、そこに移動してきたグリアが「道路舗装」をしてハイウェイを完成する。その後後続の follower neuron の軸索がその上を渡るといった経過をたどるらしい。また、最終的にニューロンが正しい標的を発見する機構は、少なくとも運動ニューロンとその標的筋肉との関係の解析からグリアの存在を必要としないらしいことが明らかになりつつある。

#### 5) ショウジョウバエ gcm2 遺伝子の解析

ショウジョウバエにもさらに gcm 類似遺伝子がある可能性を考え、ゲノムを解析した結果、gcm-motif をもつ新規の遺伝子 gcm2 を発見した。gcm2 は染色体上で gcm の近傍にあるが独立の制御を受けており、初期胚の頭部中胚葉で発現するとともに、神経系では gcm 発現細胞の一部で発現している。頭部中胚葉での発現は gcm の頭部中胚葉での発現と同じ様に見えるが、同一の細胞で共発現しているのか否かは検討中である。頭部中胚葉由来の血球細胞の一部が gcm 突然変異体では減少するが、gcm gcm2 二重変異体ではその減少がより著しい。この結果は、マウスホモログが血球産生系で発現しているという知見とも合わせて興味深い。

#### 6) ショウジョウバエ gcm 遺伝子の発現調節

gcm 遺伝子の発現調節機構を調べる目的で、さまざまな neurogenic genes 突然変異体における gcm 発現パターンを解析した。その結果、Notch 遺伝子の下流に位置していることを示す結果が得られている。この解析には細胞密度が高い中枢神経系よりも末梢神経系が適していることが明らかとなったので、現在、胚および成虫の末梢ニューロンとグリアの分化と Notch シグナル伝達系との関連を解析中である。

### 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Akiyama-Oda, Y., Hosoya, T. and Hotta, Y.: Alteration of cell fate by ectopic expression of *Drosophila glial cells missing* in non-neuronal cells, *Dev. Genes & Evol.* 208, 578-585. (1998)
- Akiyama-Oda, Y., Hosoya, T. and Hotta, Y.: Asymmetric cell division of thoracic neuroblast 6-4 to bifurcate glial and neuronal lineage in *Drosophila*, *Development*, 126, 1967-1974. (1999)
- Kikuchi, Y., Segawa, H., Tokumoto, Y., Hotta, Y., Uyemura, K., and Okamoto, H.: Islet-3 in the regional specification of the brain. pp108-114, in *Neural Development*, Uyemura, K., Kawakami, K. and Yazaki eds., Springer. (1999)

他 18 件