

「脳を知る」

平成8年度採択研究代表者

野田 昌晴

(岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 教授)

## 「神経ネットワーク形成の遺伝子プログラム」

### 1. 研究の概要

脳における領域特異的神経結合形成の分子的基盤を明らかにするためには、領域特異的な発現を示す遺伝子サブセットをシステムティックに検出・同定することが必要である。我々はそのモデル系として網膜における領域特異化を取り上げ、ニワトリ網膜においてトポグラフィックな発現を示す遺伝子を網羅的に検出・同定することを試みた。その結果、数多くの新規分子を含む転写調節因子、細胞外分泌分子、細胞膜分子、シグナル伝達分子等を同定することに成功した。現在、これらの分子の機能と相互関係を明らかにする研究を展開している。この研究によって、脳における領域特異的神経結合形成における新しい分子機構が明らかになるとともに、その全体像が捉えられると考えている。また、併せて脳形成・脳機能における蛋白質チロシンリン酸化の役割についても研究を行っている。この研究では特にシナプス形成、シナプス可塑性に関わる分子とその調節機構を明らかにすることを目指している。

### 2. 研究実施内容

#### 網膜視蓋投射グループ：

脳における特異的神経結合形成の分子的基盤は、脳の発生過程における領域特異性を生み出す遺伝子発現パターンの違いと捉えることができる。従って、発生の過程を追って領域特異的（トポグラフィック）な発現を示す遺伝子をシステムティックに検出、単離することができれば、その領域の構造的、機能的特異性を決定づけている分子的基盤が明らかになると考えられる。本グループは、このような観点から、ニワトリの網膜視蓋投射系をモデルシステムとして研究している。

これまでの研究で、ニワトリ胚網膜の前側（鼻側）と後側（耳側）領域について cDNA サブトラクションを行うことにより、発生初期において眼の前後軸決定に関与していると考えられる2つの winged-helix 転写因子 CBF-1、CBF-2 を同定している。昨年度確立した *in ovo*（卵内）エレクトロポレーション法により、CBF-1、CBF-2 を発生初期胚の網膜組織に異所的に強制発現させ、両者の相互関係を調べ

るとともに、網膜視蓋投射系において前後軸方向の領域特異的神経結合形成に関与していると考えられている EphA3 (Cek4)の網膜内での発現に及ぼす影響を解析した。その結果、CBF-1がCBF-2の発現を抑制すること、CBF-2はなんらかの中間因子を介して間接的にEphA3の発現に変化を及ぼすことが明らかになった。この結果は、CBF-1あるいはCBF-2を安定に発現するウズラ胚網膜由来不死化細胞株を用いた解析からも支持された。

一方、網膜の前後軸あるいは背腹軸方向においてトポグラフィックな発現を示す分子を網羅的に単離・同定することを目指して、昨年度 Restriction Landmark cDNA Scanning (RLCS) 法を用いた大規模なスクリーニングを行った。本法はサブトラクション法の欠点を補うとともに網羅的単離に適する。網膜の両軸方向についてスクリーニングを行い、前後軸方向に関して約20個、背腹軸方向に関しては約30個のトポグラフィックな発現をする cDNA スポット（重複を含む）を見出した。本年度はこのおのおの分子に関して全長 cDNA の単離と構造解析を行った。その結果、網膜において領域特異的な発現を示す分子群は新規分子も含め、転写因子、接着因子、細胞内シグナル伝達分子など、多様な分子で構成されていることが判明した。また同定された分子の中には、前後軸では CBF-2、EphA3、また背腹軸方向では aldehyde dehydrogenase、ephrin-B2 (ELF-2)、EphB3 (Cek10) など既知のトポグラフィック分子も含まれており、本法の有効性も示された。

RLCS 法により得られた分子の網膜および中枢神経系における発現パターンを解析したところ、いくつかのトポグラフィック分子については網膜だけではなく、視神経の標的領域である視蓋においても発現していることが判明した。一方、網膜内での発現パターンが、発生が進むにつれ動的に変化するものも存在した。例えば、前後軸方向から得られたものの中には、8日目胚では網膜の後側に片寄った発現を示すが、10日目になると前後の差がない、均一な発現を示す分子が存在した。また背腹軸方向については、発生の進行とともに眼杯裂の周囲に発現が限局するようになる分子が認められた。さらに網膜内での発現部位に関しては、神経節細胞層のみに発現する分子、神経節細胞層と内顆粒層に発現する分子、また内顆粒層にのみ発現する分子などさまざまなタイプに分類することができた。

得られた分子群の中には、上記の発現パターン解析の結果から、網膜視蓋投射の領域特異的神経結合形成に関与する分子だけでなく、網膜内の神経回路形成に関与している分子も含まれていると考えられる。また、背腹軸方向から得られた分子の中には神経系のみならず、肢芽や体節などでも発現しているものが存在した。このことは網膜の背腹軸決定が体軸決定と少なくとも部分的には共通のメカニズムで行われていることを示唆している。今回のスクリーニングにより同定した各トポグラフィック分子の機能を解明すべく、現在レトロウイルスベクターや *in ovo* エレク

トポレーション法を用いて異所的強制発現を行うとともに、アンチセンス DNA やドミナントネガティブ型分子の強制発現によって発現阻害や機能阻害を試みている。これらの遺伝子導入胚において、新規分子を中心として網膜視蓋投射の領域特異的な投射パターンあるいは網膜自体の発生にどのような異常が起こるかを様々な観点から解析中である。

ところで網膜視蓋投射系における神経結合には、トポグラフィックな特異性と並んでもうひとつの特異性がある。それは、網膜からの入力が見蓋の特定の層において神経結合を形成する層特異性である。網膜神経節細胞の軸索突起は視蓋の表層を伸長し、トポグラフィックに正しい位置で内部に向かって潜りはじめる。網膜神経節細胞は異なるサブセットから構成されており、約15層からなる視蓋の3~4つの網膜受容層の内、それぞれ特定の層で樹枝状化し神経結合を形成する。このような層特異的投射を決定づけている分子メカニズムは良くわかっていない。我々は視蓋の網膜受容層の内、特定の一層だけを選択的に染色するモノクローナル抗体、TB5 (B層を認識)、TB2 (D層を認識)、TB4 (F層を認識) を単離した。このうちTB4が認識する分子について、cDNA クローニングと免疫化学的解析を行い、それがERM (Ezrin-Radixin-Moesin) ファミリーのひとつであるエズリンという、細胞膜裏打ちタンパク質であることを明らかにした。エズリンはF層に特異的に投射する網膜神経節細胞サブセットに選択的に発現しており、発生と共に視蓋にF層が形成されるのと並行してF層に集積することが判明した。同様のサブセット特異的な発現は、dorsal root ganglion 中に存在する感覚ニューロンの脊髄への層特異的投射系においても観察された。すなわちエズリンは、皮膚性感覚ニューロンとその脊髄内の投射標的層に選択的に分布していたが、骨格筋性感覚ニューロンには見出されなかった。エズリンは上皮系においては細胞膜の細胞接着分子と細胞骨格の結合を担うことによって細胞形態や細胞接着を修飾していることが知られている。このことからエズリンが視覚系及び体性感覚系等の神経系においても層特異的な神経結合の形成や維持に関わっている事が示唆された。

#### チロシンホスファターゼグループ

本研究グループは、脳神経系に発現する蛋白質チロシンホスファターゼである、PTP $\zeta$  (RPTP $\beta$ )と RPTP $\gamma$ の脳形成における役割を明らかにすることを目的として研究を進めている。PTP $\zeta$ は中枢神経系に特異的に発現するコンドロイチン硫酸プロテオグリカン分子であるのに対し、RPTP $\gamma$ は神経系のみならず末梢の組織にも発現し、プロテオグリカンではない。我々はこれまでに、ヘパリン結合性成長因子プレイオトロフィン(PTN)が、PTP $\zeta$ の特異的リガンドであることを明らかにしている。

初期発生期の脳において、PTNは神経細胞が移動する際の足場となる radial glial

fiber 上に存在し、一方、PTP $\zeta$ は移動中の神経細胞に発現する。このことは、PTN と PTP $\zeta$ の相互作用が神経細胞の細胞移動に重要な役割を果たしていることを示唆している。そこで、神経細胞移動における PTP $\zeta$ の機能を顕微鏡タイムラプス画像取込システムを用いた glass fiber assay 及び Boyden chamber cell migration assay により解析した。その結果、PTN はどちらのアッセイ法においても、大脳神経細胞の細胞移動を顕著に促進することが明らかになった。このような細胞移動は、PTP $\zeta$ の細胞外領域に対する抗体や PTP $\zeta$ の細胞外領域自体を培養液中に添加することにより阻害された。また、チロシンホスファターゼ阻害剤 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>にも顕著な阻害活性が観察された。このことは、大脳神経細胞上の PTP $\zeta$ が PTN 受容体として、神経細胞移動に関与していることを示している。また、マウス繊維芽細胞株 L cell に PTP $\zeta$ を構成的に発現させ、その細胞内局在を解析した結果、本分子は細胞突起やラメリポジウムにおいてアクチン結合蛋白質であるコルタクチンと共存していることが明らかになった。神経細胞の成長円錐においてもコルタクチンと PTP $\zeta$ の共存が観察されており、PTP $\zeta$ がアクチン繊維の動態を調節することによって、細胞移動や神経突起伸長を制御している可能性が示された。

さらに PTP $\zeta$ は、PTN と高い相同性を示すミッドカイン(MK) 分子とも結合することが示された。その結合特性は、PTN-PTP $\zeta$ 間のそれと良く一致すること、さらに MK-PTP $\zeta$ 間の結合は PTN により拮抗的に阻害されることが明らかになった。すなわち PTP $\zeta$ は、PTN と MK の共通の受容体であると考えられる。さらに、PTP $\zeta$ と MK の高親和性結合には、MK のヘパリン結合部位とされる二つの塩基性アミノ酸クラスター (クラスター I, II) の内、クラスター I が必須であることが明らかになった。特に、クラスター I の R78Q の変異は、PTP $\zeta$ との結合および神経細胞移動誘導活性を著しく抑制し、MK の機能発現におけるクラスター I の重要性が確認された。

次に、PTP $\zeta$ の細胞内情報伝達機構を明らかにする目的で、本分子のチロシンホスファターゼ領域を bait として、酵母 two hybrid system によりラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、いくつかの蛋白質が PTP $\zeta$ の C 末端領域に結合し得ることが明らかになった。現在、これらの蛋白質が実際に *in vivo* で PTP $\zeta$ と複合体を形成しているかについて検討している。また、PTP $\zeta$ 遺伝子ノックアウトマウスにおいて、特異的にチロシンリン酸化が亢進している蛋白質の検索を行うことにより、直接的に PTP $\zeta$ の基質を同定することを試みている。

また、PTP $\zeta$ と高い相同性を示す RPTP $\gamma$ の機能を明らかにする目的で、本分子を構成的に発現する PC12D 細胞を作製した。本細胞においては、NGF により誘導される神経突起伸長がほぼ完全に抑制されており、RPTP $\gamma$ が NGF の情報伝達経路を遮断することが示された。NGF は MAP キナーゼの活性化を介して神経突

起を伸長させると考えられているが、本細胞においても NGF 刺激により MAP キナーゼは正常に活性化されており、RPTP $\gamma$ は MAP キナーゼの下流または別経路に影響を及ぼしているものと考えられる。

ところで MK と結合する細胞膜蛋白質として p400+ (以前 600kDa 蛋白質と呼んでいたもの) を見い出している。p400+はヨードラベルした MK とクロスリンクされるだけでなく、固相化した MK と結合し、さらに PTN ともクロスリンクされる。p400+を膜画分から可溶化し、MK セファロースアフィニティークロマトグラフィー、ヘパリンセファロースクロマトグラフィー、スーパーデクス 200 クロマトグラフィーを用いて高度に精製した。現在、その蛋白質化学的同定と cDNA クローニングに取りかかっている。p400+は免疫化学的に PTP $\zeta$ とは異なる分子であり、MK と PTN には複数の受容体が存在する可能性が示された。このような可能性を考えると、PTP $\zeta$ 、MK、PTN のノックアウトマウスを掛け合わせたダブルノックアウトマウスの表現型は興味深く、現在このようなダブルノックアウトマウスの作製を試みている。さらに、前述の MK の塩基性アミノ酸クラスター I と II の内、クラスター II が MK の血管内皮線溶系亢進に重要で、神経突起伸長にはクラスター I、II の両者が重要である事を示した。特に、クラスター I の R78Q の変異は神経突起伸長を強く抑制した。一方、ヒト大腸癌において MK は高頻度に高発現するが、PTP $\zeta$ と PTN はむしろ発現が低くなることを明らかにした。これらのことは、中枢神経とそれ以外の組織において、MK が受容体を使い分けている可能性を示唆している。

昨年に引き続いて大脳皮質の発生過程における PTP $\zeta$ の発現様式を、PTP $\zeta$ に対する抗体を用いた共焦点レーザー走査顕微鏡ならびに電子顕微鏡レベルの免疫組織化学により解析した。その結果、ラット胎仔の終脳において、放射状グリアの放射状突起とこの突起を足場として移動する神経細胞の細胞膜表層に、本分子が存在することが明らかになった。また、ニワトリ胚並びにヒト胚を用いて、嗅窩上皮から発生した神経細胞が嗅神経または鋤鼻神経を足場として移動し脳に侵入する過程においても、移動する神経細胞の細胞膜表層と足場に本分子が存在することを示した。

また、マウス初期胚における PTP $\zeta$ の発現をみると脳幹において将来外側網様体核および外側楔状束核を形成する神経細胞が、腹側部の脳軟膜に沿って接線方向に移動している時に PTP $\zeta$ 陽性であることを示した。また、大脳皮質原基において脳軟膜に沿って接線方向に移動している神経細胞にも PTP $\zeta$ が発現していることを示し、PTP $\zeta$ が細胞移動に関与していることを示唆した。現在、PTP $\zeta$ ノックアウトマウスを用いて、これらの神経細胞の移動、分化について免疫組織化学的に検討を進めている。一方、ヒト胎仔の大脳皮質においても、移動中の神経細胞が PTP

と陽性であることを示唆する結果を得ており、現在、より詳細な解析を進めている。  
遺伝子ノックアウトマウスグループ

遺伝子ノックアウトマウスグループは、PTP $\alpha$ 及び NaG ナトリウムチャンネルの遺伝子欠損マウスの作製を完了した。現在、遺伝子欠損マウスの解析を進めている。

PTP $\alpha$  遺伝子ノックアウトマウスは、PTP $\alpha$  遺伝子の翻訳開始コドン直後に $\beta$ -ガラクトシダーゼ (LacZ) をリポーター遺伝子として導入しており、ヘテロ接合体マウスでの LacZ の発現を調べることにより PTP $\alpha$  遺伝子の発現パターンを詳細に解析することができる。その結果、PTP $\alpha$  は胎生期の極めて早い時期 (胎生 8 日目) から中枢神経系で発現が見られ、成獣では海馬や小脳、嗅球等で高い発現が見られた。また、LacZ 染色と免疫抗体染色を組み合わせることにより、PTP $\alpha$  が神経細胞とアストロサイトの両方で発現することを初めて示した。現在ホモノックアウトマウスの表現形について、解剖学的、生化学的、生理学および行動学的手法を用いて解析を行っている。解剖学的解析については、胚時期より発生を追って脳の様々な部位における野生型マウスとの差異について詳細に検討している。生化学的解析については、脳内でチロシンリン酸化により活性が調節されると考えられているシグナル伝達分子群について、PTP $\alpha$  の欠損の影響を解析している。生理学解析については、電気生理学的手法を用いて海馬、小脳における PTP $\alpha$  の欠損によるシナプス伝達の変化を調べている。特に、チロシンリン酸化が密接に関与することが知られている海馬における長期増強 (LTP) について詳しい解析を行っている。行動学的解析については、自発運動の測定、学習行動の解析等を行っている。いずれの解析においても、PTP $\alpha$  ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して明らかな異常を示す結果が得られている。今後は以上の解析を推し進め、PTP $\alpha$  の脳内での機能を総合的に明らかにする。

一方、NaG 遺伝子ノックアウトマウスに関しても、LacZ 遺伝子によるターゲティングベクターを作製、PTP $\alpha$  と同様の手法で遺伝子ノックアウトマウスを完成させた。また NaG 遺伝子に関しては、ネオマイシン耐性遺伝子を NaG 遺伝子の翻訳開始コドン直後に挿入した遺伝子ノックアウトマウスも完成させた。まず LacZ 遺伝子導入マウスによって NaG 遺伝子の発現分布を検討した。その結果、胎生 15 日頃から生後 10 日頃においては、三叉神経節、背根神経節の神経細胞及び肺に発現が見られた。成熟するに従い交感神経線維や、舌、心臓、腸、膀胱などの各種臓器の末梢感覚神経束でも発現が見られるようになった。凍結切片の観察から、これらは成熟に従って出現した感覚神経線維を取り巻くシュワン細胞の出現によるものであることが判明した。また、成獣においては中枢神経系の一部、特に pituitary, anterior hypothalamus, medial habenular nucleus, tegmental area, perirhinal cortex などに発現が見られた。pituitary 以外は神経細胞に発現が見られ、このチ

チャンネル分子が中枢神経系の特定の機能にも関与していることが示唆された。引き続き、さらに詳しい発現分布解析を行うと共に、これらヘテロマウス同士の交配によって遺伝子を完全に欠損したホモマウスを得て、チャンネル分子の生理機能解析に着手する予定である。

### 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Nishiwaki, T., Maeda, N. and Noda, M. : Characterization and developmental regulation of proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase  $\zeta$  /RPTP  $\beta$  isoforms. *J. Biochem.*, 123, 458-467 (1998)
- Shintani, T., Watanabe, E., Maeda, N. and Noda, M.: Neurons as well as astrocytes express proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase  $\zeta$  /RPTP  $\beta$  : Analysis of mice in which the *PTP $\zeta$  /RPTP $\beta$*  gene was replaced with the *LacZ* gene. *Neurosci. Lett.*, 247, 135-138 (1998)
- Maeda, N. and Noda, M.: Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase  $\zeta$  /RPTP  $\beta$  and its ligand pleiotrophin/HB-GAM in neuronal migration. *J. Cell Biol.*, 142, 203-216 (1998)
- Yamagata, M. and Noda, M.: The winged-helix transcription factor CWH-3 is expressed in developing neural crest cells. *Neurosci. Lett.*, 249, 1-4, (1998)
- Takahashi, M., Yamagata, M. and Noda, M.: Specific expression of ezrin, a cytoskeletal-membrane linker protein, in a subset of chick retinotectal and sensory projections. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 545-558 (1999)
- Yamakawa, T., Kurosawa, n., Kadomatsu, K., Matsui, T., Itoh, K., Maeda, N., Noda, M. and Muramatsu, T.: Levels of expression of pleiotrophin and protein tyrosine phosphatase  $\zeta$  are decreased in human colorectal cancers. *Cancer Lett.*, 135,91-96 (1999)
- Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Kimura, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T. and Noda, M.: A receptor-like protein tyrosine phosphatase PTP  $\zeta$  /RPTP  $\beta$  binds a heparin-binding growth factor midkine: Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTP  $\zeta$  . , *J. Biol. Chem.*, 274, 12474-12479 (1999)
- Revest, J.-M., Falvre-Sarralib, C., Maeda, N., Noda, M., Schachner, M. and Rougon, G. The interaction between F3 immunoglobulin domains and protein tyrosine phosphatase  $\zeta$  / $\beta$  triggers bidirectional signalling between neurons and glial cells. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 1134-1147 (1999)
- Kawachi, H., Tamura, H., Watakabe, I., Shintani, T., Maeda, N. and Noda, M.

Protein tyrosine phosphatase  $\zeta$  /RPTP  $\beta$  interacts with PSD-95/SAP90 family. *Mol. Brain Res.*, 72, 47-54 (1999)

- Yamagata, M., Mal, A., Pollerberg, G.E. and Noda, M. Regulatory interrelations among topographic molecules CBF1, CBF2 and EphA3 in the developing chick retina. *Dev. Growth Differ.* 41, 575-587 (1999)

他 3 件