

「脳を知る」

平成8年度採択研究代表者

藤澤 肇

(名古屋大学大学院理学研究科 教授)

「神経結合の形成、維持、再編成を制御する分子機構の解明」

1. 研究の概要

神経ネットワークの形成を制御する分子機構を明らかにするため、神経線維のガイダンスや神経結合の形成に関与する因子、分子の検索とその機能解析を行った。神経線維抑制因子セマフォリン III/D、ならびにそのレセプターであるニューロピリン1の遺伝子機能破壊マウスの作出に成功し、ニューロピリン1を介したセマフォリン III/D シグナルが秩序だった末梢神経回路の形成に不可欠であることを証明した。さらに、ニューロピリン1が血管内皮増殖因子 (VEGF) の co-receptor として機能し、胚の血管形成を制御することを明らかにした。一方、マウスで神経系膜分子プレキシンの発現解析を行い、プレキシシンが発生時の特定の神経回路で選択的に発現することを明らかにした。さらに、神経回路形成を制御する新たな分子の単離を試み、新たなカドヘリン様膜分子ファミリー CNR を得ることに成功した。プレキシシン、CNR による神経ネットワーク形成の制御の解析が今後の大きな課題である。

2. 研究実施内容

脳機能発現は神経結合の構造的な再編成をも伴う神経結合の可塑的变化に依存している。従って、脳機能の発現機構を理解するためには、神経結合の形成とその維持、精密化、強化、再編成を制御する分子機構の解明が重要である。このような観点にたって、神経線維のガイダンスや神経結合の形成に関与する因子、分子の検索とその機能解析を行った。

分子機能解析グループでは遺伝子機能解析グループと共同で神経系膜分子ニューロピリン1の遺伝子をノックアウトしたマウス、ならびに、神経線維の伸張を抑制する反発因子として知られているセマフォリン III/D 遺伝子をノックアウトしたマウスの作出に成功し、ニューロピリン1がセマフォリン III/D のレセプターとして機能していること、ニューロピリン1を介したセマフォリン III/D の神経線維反発シグナルが秩序だった末梢神経回路の形成に不可欠であることが証明できた。さらに、ニューロピリン1が血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; V

EGF) と結合し、co-receptor として機能し、胚での血管形成を制御することも明らかにした。一方、神経系膜分子プレキシンの解析も進行し、マウスで4種類のプレキシシ遺伝子が存在すること、それぞれのプレキシシが発生時の特定の神経回路で選択的に発現することを明らかにし、プレキシシが神経回路の形成に関与する可能性を明らかにした。プレキシシの機能を明らかにするため、プレキシシ遺伝子機能欠損マウスの作製、線虫を用いた分子遺伝学的解析を進めている。

遺伝子機能解析グループでは、Fyn キナーゼの機能解析を Fyn キナーゼの機能欠損マウスを用いて調べ、アルコール摂取時に海馬のシナプスで Fyn が活性化され、学習・記憶に重要な役割を持つ NMDA 受容体をリン酸化し、アルコールにより機能が低下した NMDA 受容体の機能を回復させていることを明らかにした。さらに、Fyn チロシンリン酸化酵素をプローブとして、新規な神経回路の形成機能分子の単離を試みた。その結果、新たなカドヘリン (CNR: cadherin-related neural receptor) ファミリーを得ることに成功し、解析を行った。

生理機能解析グループでは、大脳皮質切片を視床組織片と共培養する方法を考案し、大脳皮質の層特異的シナプス結合を規定する膜結合型因子の検索と機能解析を行い、皮質表層に発現する軸索伸長抑制因子が層特異的な視床皮質投射に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

分子機能解析グループ

1) ニューロピリン1・セマフォリン III/D シグナルによる神経線維ガイダンスの機構の解析

セマフォリン III/D (semaphorin III/D)は神経線維の伸張方向を制限する反発性のガイダンスシグナルであると考えられている。しかしながら、生体内でセマフォリン III/D が神経線維の伸長をどのように制御しているか不明であり、また、神経細胞側のセマフォリン III/D レセプターも不明であった。我々は、ニューロピリン1遺伝子ノックアウトマウス、セマフォリン III/D 遺伝子ノックアウトマウスの作出と表現型の解析を行い、ニューロピリン1がセマフォリン III/D のレセプターとして機能し、ニューロピリン1・セマフォリン III/D シグナルが神経回路の形成に不可欠であることを示す結果を得た。

ニューロピリンは眼神経、上顎神経、下顎神経、顔面神経、舌咽神経、迷走神経など特定の脳神経、ならびに、脊髄神経で発現する。ニューロピリン1欠損マウスではこれら末梢神経の走行経路が無秩序となり、投射部位も異常となることが明らかとなった。また、大変驚いたことに、これらニューロピリン1ノックアウトマウスが示す末梢神経系の異常ときわめて酷似している異常がセマフォリン III/D ノックアウトマウスでも認められた。このような表現型の類似は、ニューロピリン1とセマフォリン III/D が機能的に関連していることを示唆している。このことをより

直接的に検証するため、ニューロピリン1欠損マウスニューロンの培養にセマフォリン III/D を加えた。その結果、過剰量のセマフォリン III/D を加えてもニューロピリン1欠損マウスニューロンの成長円錐は全く崩壊しないことが明らかになった。これら一連の解析結果から、ニューロピリン1がセマフォリン III/D のレセプター、ないしは、レセプター複合体の不可欠構成分子であると結論する事ができる。

末梢神経系はきわめて秩序立ったパターンを示すためニューロンネットワーク形成の機構を明らかにするための良い実験系で、ふるくから数多くの研究がなされてきている。しかしながら、末梢神経ネットワークの形成を制御する分子機構は全く不明であった。我々の研究成果は、ニューロピリン1がセマフォリン III/D のレセプターとして機能し、ニューロピリン1を介したセマフォリン III/D の神経線維反発シグナルが末梢神経線維の伸張方向を制限し、その結果、生体で見られる秩序だった分節的な末梢神経ネットワークが作り出されてくることを完璧に証明したもので、末梢神経ネットワーク形成を制御する分子機構の一端が初めて明らかにされたといえる。

2) ニューロピリン1・VEGFシグナルによる血管形成の制御

ニューロピリン1機能欠損マウスは胎生致死である。その原因を明らかにするため、ニューロピリン1機能欠損マウスの血管系の詳細な解析を行った。

その結果、ニューロピリン1機能欠損マウス胚では血管形成が低下し、神経組織への血管進入が極度に低下すること、また、心臓血管系の形成異常が見られ、全ての胚で肺動脈が欠損し、更に、70%以上の胚で動脈弓が体の右側に転移することが明らかとなった。ニューロピリン1が血管内皮増殖因子 (asclular endothelial growth factor; VEGF) と結合し、co-receptor として機能する可能性が報告されており、このようなニューロピリン1機能欠損マウスが示す心臓血管系の低形成は、生体内でもニューロピリン1がVEGFの co-receptor として機能して血管形成を制御している事を示していると考えられ、ニューロピリン1が神経線維反発シグナル因子セマフォリン III/D のみならずVEGFシグナルをも伝える多機能性分子であることを明らかにすることができた。

3) 神経系膜分子プレキシンの機能解析

神経系膜分子プレキシンの機能を明きらかにするため、以下の研究を実施した。

・マウスプレキシンファミリー分子の分離

プレキシン(plexin)は、当初、アフリカツメガエルの神経系で見出された細胞接着能を持つ膜分子である。この分子の神経回路形成時で果たす役割を解明するため、神経回路の解剖学的知見が豊富で、かつ、遺伝子操作が可能なマウスでプレキシンホモログの分離を試みた。アフリカツメガエルプレキシン cDNA をプローブとしてマウス胎児脳より調整した cDNA ライブラリーを検索し、3種類のマウスプ

レキシシンホモログ (plexin-A1, plexin-A2, plexin-A3) を見出し、その一次構造を明らかにした。更に、得られた3種のマウスプレキシシンファミリー分子で保存度の高い領域の cDNA の塩基配列を参考にしてプライマーを設計し、RT-PCR を行い、新たなマウスプレキシシンファミリー分子 (plexin-A4) を見出した。いずれのマウスプレキシシンもその細胞外領域に3個の C-rich Domain を持つ。plexin-A1 はアフリカツメガエルプレキシシンと最も高い相同性 (アミノ酸配列で84%の相同性) を示し、これがアフリカツメガエルプレキシシンのマウスホモログであると考えられた。マウスプレキシシンファミリー間では59%–66%の相同性があった。また、プレキシシン分子の細胞内領域はマウスプレキシシン間で、あるいは、マウスとアフリカツメガエル間で良く保存されている (アミノ酸配列でおよそ80%の相同性)。また、plexin-A1 と plexin-A3, plexin-A2 と plexin-A4 とが相同性が高かった。以上の結果は、マウスではプレキシシンは少なくとも4種の分子からなるファミリー (プレキシシンファミリー Plexin family) を構成していることを示している。

・マウスプレキシシンの発現様式の解析

マウス神経系でプレキシシンファミリー分子の神経系での発現動態を明らかにするため、プレキシシン分子にたいする特異抗体の作成、ならびにこれを用いた免疫組織化学的解析と *in situ hybridization* とによる解析を実施した。その結果、各々のマウスプレキシシンが異なった神経回路に発現することが明らかになった。例えば、聴覚系では主として plexin-A1 が、一般体性感覚系では主として plexin-A2 が発現する。plexin-A3 は神経系の比較的広い領域にわたって発現するが、特に、脳神経節、脊髄神経節で強く発現する。plexin-A4 は一般体性感覚神経回路を構成する神経節と神経核に強く発現し、その発現領域は plexin-A2 と部分的に重複していた。しかしながら、嗅覚系、網膜、聴覚平衡覚系での発現パターンは plexin-A2 と明瞭に異なっていた。plexin-A1 に特異的なモノクローン抗体を作製し、plexin-A1 はニューロンに発現すること、plexin-A1 蛋白質がニューロンの細胞体ならびにニューライトの膜表面に分布することを明らかにした。

・標的組み換え法によるプレキシシン遺伝子機能欠損マウスの作製

遺伝子機能解析グループとの共同研究で、標的組み換えによりプレキシシンファミリー遺伝子を破壊したマウスを系統的に作出する試みを行っている。

・線虫におけるプレキシシン機能の解析

データベースの検索から線虫のゲノムには2種類のプレキシシン遺伝子が存在している事が明らかになっている。線虫ではマウスに比べ遺伝学的な解析が容易に行えるので、プレキシシン変異マウスの作製と平行して、線虫プレキシシンの分子遺伝学的な解析を実施している。これまでに、線虫プレキシシン遺伝子 (*Cep1*) の遺伝子

構造、cDNAの分離、Cep1 特異抗体の作製を行い、Cep1 が特定のグループの神経細胞に発現することを明らかにした。現在、Cep1 遺伝子破壊株の分離を試みている。

4) 嗅覚神経回路の形成機構の解析

神経回路形成の新たなモデル実験系を開発するため、マウス嗅覚神経回路を培養下で再構成する技術を確立した。この培養系を用いて、嗅球僧帽細胞の軸索が伸張する領域に局在する Lot と命名された特殊なニューロンを見いだした。Lot 細胞を破壊すると僧帽細胞の軸索伸張が停止することから、Lot 細胞が軸索をガイドするガイドポストニューロンであると考えられる。

遺伝子機能解析グループ

1) 神経回路形成での Fyn キナーゼの機能解析

神経回路形成での機能がシナプス及び成長円錐で想定されている Fyn キナーゼの機能を遺伝子欠損マウスを用いて調べた結果、アルコール摂取時にマウス脳の海馬のシナプスでこの Fyn が活性化され、学習・記憶に重要な役割を持つ NMDA 受容体をリン酸化し、アルコールにより機能が低下した NMDA 受容体の機能を回復させていることが明らかとなった。この研究は、アルコールがどのように脳の機能を変化させるか、またアルコールによる依存症及び痴呆がどのような分子メカニズムでおこるかを解析する手がかりを与えるものとして重要な成果である。

Fyn 欠損マウスでは嗅球のシナプスにおいて長期増強が抑制され、抑制性の GABA 受容体の機能が異常になっていることが明らかとなった。Fyn 欠損マウスでは床敷きの匂いによる哺乳行動の異常が明らかとなっており、Fyn が匂いの識別に関連する神経回路形成でのシナプス領域で機能している結果として注目される。

2) 新規 Fyn 結合分子の分離

神経回路の形成、再編成、維持に関わる分子機能が想定される Fyn チロシンリン酸化酵素をプローブとして、新規な神経回路の形成機能分子の単離を試みた。その結果、新たなカドヘリン (CNR: cadherin-related neural receptor) ファミリーを得ることに成功し、以下の解析を行った。

・ Fyn 結合分子の解析

Fyn のN末端の Src ファミリー間で保存されていない領域、SH2、SH3 を bait (餌) として、この領域と結合する分子を酵母 2 ハイブリッド系を用いて単離した。その結果、154 クローンを得ることに成功した。この内、膜蛋白質を探索する目的で、全 cDNA の塩基配列決定を行った。その結果、1 クローンに疎水性アミノ酸クラスターが存在しており、膜蛋白質であることが予想された。このクロンの全長の蛋白質構造を決定する目的で、cDNA のクローニングを行ったところ約 5 Kb の cDNA が単離された。この塩基配列には予想細胞外領域にカドヘリンモチーフ

が6回繰り返されており、新たなカドヘリン分子であることが明らかとなった。Fyn と結合するカドヘリン様分子であることより CNR1: cadherin-related neural receptor 1 とした。また、最初のカドヘリンモチーフは、カドヘリンの研究より細胞接着活性に重要な領域であることが示唆されているが、この領域にはインテグリンのファイブロネクチンとの結合配列である RGD 配列が存在していた。カドヘリンでは細胞内領域が細胞接着活性の獲得に必要であり、この領域でカテニンと結合しアクチンフィラメント系との相互作用が可能となることが知られている。興味深いことに CNR1 は細胞内領域ではカドヘリンやプロトカドヘリンと全くアミノ酸配列上相同性が無いことより、分子機能が異なることが予想される。予想細胞内領域には規則的なシステイン残基が存在する。また、SH3 領域と結合する PxxP 配列が4カ所存在していた。

・ CNR1 の発現様式の解析

CNR1 の発現様式を解析する目的で、成体マウスの各組織より mRNA を抽出し、ノーザンブロット法により各組織での発現様式を解析した。その結果、神経組織で発現量が多いことが明らかとなった。また、発生段階での発現様式を解析した結果、胎生 15 日には発現が認められ、生後 10 日目で発現量がピークとなり、成体になるに従い発現量がゆっくりと減少することが明らかとなった。

・ Fyn との結合能の解析

CNR1 の細胞外領域でモノクローナル抗体を作製し、マウス脳のタンパク抽出液を用いて Fyn の抗体による免疫沈降を行った。その結果、Fyn とともに CNR1 が共沈してくることが明らかとなった。この結果をより確かなものとするため、myc-tag を付けた Fyn の全長と CNR1 の全長を HEK293 細胞に cotransfection して、myc 抗体及び Fyn 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、両者ともに CNR1 と共沈してくることが明らかとなった。Fyn は細胞膜直下に存在するので、CNR1 の細胞内領域と結合していることが予想される。CNR1 の細胞内領域を欠失させた cDNA を用いて同様の免疫沈降を行った結果、この細胞内欠失 CNR1 は共沈してこないことより、予想どおり CNR1 は Fyn と細胞内領域で結合していることが明らかとなった。

・ CNR ファミリーの解析

CNR1 が Fyn と結合する新規な受容体型分子であることより、相同な分子がファミリーとして存在していることを予想し、ゲノミック DNA を用いてサザンブロット法にて相同遺伝子の解析を行った。その結果、5'側のプローブを用いて約 20 本のバンドが確認された。これらの相同遺伝子の単離を行った結果、新たに 7 種類の cDNA の単離に成功した。これらの分子のタンパク質の構造を解析したところ、興味深いことに C 末端の 153 アミノ酸配列が完全に一致していた。このアミノ酸

配列には PXXP 配列が 4 箇所存在していることより Fyn と結合する領域であることが想定される。

・ CNR ファミリーの発現様式の検討

CNR がファミリーとなっていることが明らかとなったことより、これらファミリーの発現様式の違いについて解析を行った。その結果、CNR ファミリーのそれぞれが、嗅球、海馬、小脳、大脳皮質で発現しており、大まかな脳領域での発現様式に差が認められなかった。また、Fyn の分布とも一致していた。CNR ファミリーの発現が神経細胞レベルでも一致しているかどうかについて、ディゴケシゲニンを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法で解析したところ、興味深いことに神経細胞レベルでは発現に差が認められた。しかし、同一の神経細胞中に 2 種類のプローブが確認されたことより、細胞 1 個に 1 種類の CNR ファミリーの発現があるのではなく、数種類の CNR ファミリーの組み合わせが異なることが考えられた。

以上の研究により、チロシンリン酸化酵素の Fyn と結合する新たなカドヘリン様受容体を得ることができた。しかし、この分子は他のカドヘリンファミリーと異なり、培養細胞中での発現で細胞膜に局在せず、細胞内膜系で止まってしまうことより、細胞接着活性については今後の検討が必要である。また、生体内で CNR 分子がシナプス膜に存在することより、今後は、シナプス膜への輸送系を明らかにする必要がある。現在、神経回路の形成、維持、再編成過程での CNR ファミリーの生体内分子機能を明らかにして行く目的で、遺伝子欠損マウスの作製を行っている。

3) 遺伝子欠損マウスの作製技術の開発

神経回路形成に関わる分子の遺伝子欠損マウスの作製が順調に進行しており、制限遺伝子欠損法の開発も平行して行っている。Cre を発現しているマウス胚幹細胞を効率よく選別する新たな方法を開発し、セマフォリン III について 3 種類の遺伝子欠損マウスを作製することに成功した。

生理機能解析グループ

大脳皮質の層特異的シナプス結合を規定する膜結合型因子の検索と機能解析

大脳皮質は特有の層状構造を有し、これに基づく整然とした神経結合が存在することが示されている。我々はこれまでに皮質入力線維が標的層で神経結合を形成する過程を組織構築が維持される培養系を用いて調べ、培養下においても主な入力線維の起源となる視床ニューロンの軸索が皮質標的層で枝分かれを形成し、機能的なシナプス結合を作ること、さらに、標的である皮質 4 層に軸索成長を停止させたり枝分かれを作り出す要因が局在することを示唆している。そこで、これら軸索の停止や枝分かれを担うであろう細胞膜表面分子あるいは細胞外マトリックス分子の特性を調べ、皮質入力線維の標的認識の制御機構を明らかにすることを目的とした。

上記の研究目的を遂行するために、大脳皮質切片をホルマリンで一旦固定してか

ら生きた視床組織片と共培養する方法を考案した。この方法により、大脳皮質細胞から放出される液性因子の効果を排除して、膜結合型の軸索成長制御因子の作用を調べることが可能となる。また、この切片に様々な酵素処理を施すことによって、その因子の生化学的な特性を調べることも可能である。実際、固定した切片上でも視床組織片からの軸索伸長が生じ、その成長の度合いは層ごとに異なっていた。即ち、視床ニューロンの軸索は深層で成長が著しかったのに対して、表層では低かった。定量的な解析によって、深層では浅層での軸索成長の約2倍程度あることが判明した。次に、蛋白分解酵素や各種糖鎖を特異的に分解する酵素を固定大脳切片に作用させた後、同様にして軸索伸長を観察したところ、トリプシンとヘパリチナーゼで表層での軸索伸長が増大し、深層との差異が消失した。以上の結果から、特定の糖鎖あるいは糖蛋白が視床ニューロンの軸索伸長を抑制することが示唆された。このように表層に発現する軸索伸長抑制因子が層特異的な視床皮質投射に重要な役割を果たしていると考えられる。

一方、視床ニューロン軸索の枝分かれも固定した皮質切片上で生じ、分枝の位置を調べるとその大多数が標的層に分布していた。従って、層特異的な枝分かれも軸索伸長と同様に膜結合型の因子で制御されていると考えられる。現在、酵素処理によって枝分かれの制御を担う因子の特性を研究しているところである。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Y. Sato, T. Hirata, M. Ogawa and H. Fujisawa: Requirement for early-generated neurons recognized by monoclonal antibody lot1 in the formation of lateral olfactory tract. *J. Neurosci.*, 18, 7800-7810 (1998)
- T. Nomura, A. Kawakami and H. Fujisawa: Correlation between tectum formation and expression of two *PAX* family genes, *PAX7* and *PAX6*, in avian brains. *Dev. Growth & Differ.*, 40, 485-495(1998)
- T. Hirata and H. Fujisawa: Environmental control of collateral branching and target invasion of mitral cell axons during development. *J. Neurobiol.*, 38, 93-104(1999)

他6件