

「脳を知る」

平成9年度採択研究代表者

松崎 文雄

(東北大学加齢医学研究所 教授)

「神経系の遺伝的プログラムと可塑的メカニズム」

1. 研究の概要

複雑な神経ネットワークは、素子として働く神経細胞が独自の個性をもつことによって成り立っている。その個性は、少数の神経幹細胞が非対称な分裂をくり返し、莫大な数の神経を生じる過程で形成されてゆく。このプロジェクトでは、ショウジョウバエと脊椎動物をモデル系として、神経幹細胞が多様性の形成に果たす役割を中心に、神経系の多様性形成の遺伝的プログラムを明らかにすることを目標としている。これまでに、神経幹細胞の非対称分裂に伴って、転写因子 *prospero* が非対称に分配されること、その分配を制御する因子 *Miranda* の存在を見い出してきた。さらに *Miranda* 変異体の解析から、神経幹細胞の分裂の非対称性が、神経の運命決定に決定的な役割を果たすことも世界に先駆けて明らかにしてきた。現在、これらの現象の根本的にあるもの、すなわち、神経幹細胞の非対称性の実体とはなにか、そして、それはいかにして形成されるのかを解き明かそうとしている。

2. 研究実施内容

1. 非対称分裂グループ

異なる二つの娘細胞を生じる"非対称分裂"は、少数の神経幹細胞から多様な個性を持つ神経細胞を生む基本的なプロセスである。我々は神経幹細胞の非対称分裂、それを支配する細胞極性、これらが神経系の多様性の形成にいかなる役割を果たすのかを解明することをめざしている。1995年、我々はショウジョウバエの神経発生の突然変異から同定した転写因子 *prospero* が、神経幹細胞の分裂に伴って2次前駆細胞に不等分配されることを見い出し、幹細胞の非対称分裂が、将来生じてくる神経細胞の個性の確立に大きな意味を持つ可能性を提示してきた。

平成9年度は、(1) まず、ショウジョウバエをモデル実験系として、神経幹細胞の非対称分裂に際して転写因子 *Prospero* を不等分配する因子を同定することを試み、これに成功した。(2) さらに、その因子 *Miranda* 遺伝子の突然変異を利用して、幹細胞の非対称分裂が神経細胞の個性の確立に必須な役割を果たすことを証明した。平成10年度は、(3) その *Miranda* が *prospero* mRNA の不等分配に

も必須であること、(4) これらの因子の細胞内局在を指標に、神経幹細胞の非対称分裂を制御する細胞極性が、上皮細胞に典型的な apical-basal 極性と共通点を持つことを明らかにした。さらに、(5) 神経幹細胞の非対称性を制御する遺伝子の同定、(6) 脊椎動物の Prospero の神経幹細胞における役割の推定という成果をあげることができた。培養細胞グループの項で詳しく述べられている(6)を除き、以下に順を追って説明を加える。

(1) Prospero を不等分配する因子 Miranda の同定

我々は Prospero 蛋白上に非対称分配に必要なドメイン(非対称分配ドメイン)を同定したが、このドメインは、神経幹細胞の分裂期に細胞内に形成される極性を認識すると考えられる。このドメインと相互作用する因子 Miranda を酵母 two-hybrid 法を用いて同定した。Miranda タンパクは Prospero と同様に、神経幹細胞の非対称分裂に伴って2次前駆細胞に不等分配される。miranda 遺伝子の突然変異体を複数同定し、Prospero の不等分配を解析したところ、それらは、

- (a) 神経幹細胞と2次前駆細胞に Prospero が等分配される変異。
- (b) Prospero の非対称分配はほぼ正常であるが、prospero が2次前駆細胞の核に移行できない変異。

という異なる表現形をもつグループに分類された。このことから、prospero の不等分配に関して Miranda が担っている機能は、

- (a) Prospero を結合し、細胞の cortex に局在させることにより不等分配する。
- (b) 神経母細胞の cortex から Prospero を核に放出する。

という二つの素過程に分離可能であることが判明した。

(2) 神経の運命決定における Prospero の不等分配の必要性

神経幹細胞と2次前駆細胞に Prospero が等分配される miranda 変異体を利用すれば、Prospero が等分配された場合、そこから生じる神経が正しい個性を獲得するかどうかを検証できる。そこで、miranda 変異体において、神経細胞の個性を決める遺伝子の発現や神経系の形態の解析を行った結果、Miranda の果たす二つの機能が共に神経細胞の個性の決定に必要なことが判明した。従って、神経幹細胞の非対称な分裂が、子孫細胞の遺伝子発現に非対称性を与え、神経系の細胞の運命決定に直接関与していることが明らかになった。

(3) prospero mRNA の不等分配における Miranda の役割

我々が Prospero タンパク質の非対称分配を見出した際、それには、prospero mRNA からタンパク質への翻訳が必要であることを示した。また、Miranda タンパクが Prospero タンパクを直接結合し、神経幹細胞の一部に局在することによって、Prospero の非対称分配が起きることも明らかにした。しかし、1997年に、Prospero タンパク質だけでなく、その mRNA も、神経幹細胞から神経母細胞

に不等分配されることが、Bill Chia らと Chris Doe らによって発見された。prospero mRNA の不等分配は、その 3'-noncoding 領域に結合した 2 重鎖 RNA 結合蛋白質 Staufen が非対称に分配されることによって引き起こされる。Staufen タンパク質は、ショウジョウバエの卵の前後軸が決定される際、その決定因子をコードする mRNA を、卵の前端あるいは後端に運ぶために必要な因子として、以前から知られていたものである。そこで、我々は、prospero mRNA/Staufen 複合体の不等分配が Prospero タンパク質/Miranda 複合体とどのような関係にあるのかを検討した。そして、prospero mRNA の非対称分配にも、Miranda 活性が必要とされることが判明した。さらに、prospero mRNA/Staufen 複合体の細胞内局在は Miranda によって決定され、Prospero と同じ制御を受けていることを、性質の異なる複数の miranda 変異体を用いて明らかにした。このように Prospero タンパク質だけではなく、prospero mRNA と Staufen タンパク質の複合体の局在をも決定する Miranda は、神経幹細胞が非対称分裂に伴う分化因子の非対称分配において中心的な役割を果たすことが明らかである。

(4) 神経幹細胞と上皮細胞に共通な細胞極性

Miranda は神経発生が開始される前から、胚を構成する上皮細胞で等しく発現する。これは、Miranda と結合する Prospero と Staufen にもあてはまる。この三者の発現が神経系に限定されてゆくのは、神経上皮から神経幹細胞が形成されてからのことである。そこで、発現が神経幹細胞に限局される以前の、上皮細胞層におけるこれらの因子の局在を検討してみた。細胞間期にある上皮細胞では、隣り合う細胞同士が接する lateral 側の細胞表層に、3 種のタンパク質は局在する。そして、分裂期に入ると、基底膜 (basement membrane) 側の細胞表層に局在が変化する。miranda 突然変異体の解析から、分裂期の Prospero と Staufen の局在は、神経幹細胞と同様に Miranda によって規定されていることが判明した。このように、分裂期の上皮細胞においても、Miranda 複合体が細胞表層の一部分に局在することから、神経幹細胞で Miranda 複合体を局在させるメカニズムは、その細胞を生じる上皮細胞にすでに存在することが示唆された。

(5) 神経幹細胞の非対称性を制御する遺伝子の同定

神経幹細胞の非対称分裂は、神経細胞の運命決定に必須なプロセスであるが、その非対称性を形成する仕組み、すなわち、細胞極性の分子メカニズムは不明である。そこで、神経幹細胞の非対称分裂を制御する因子の遺伝学的検索を開始した。具体的には、Miranda が神経幹細胞の非対称分裂の良い指標となることを利用して、その非対称分配に異常を示す突然変異のスクリーニングが可能かどうかを検討した。その過程で、Miranda が神経幹細胞とその姉妹細胞に等しく分配されてしまう突然変異を発見し、symmetric cell division (scd) 変異と名づけた。この

突然変異の原因遺伝子を明らかにすると同時に、今後、突然変異のスクリーニングを大規模に展開する予定である。

2. 細胞間相互作用グループ

我々のグループは、神経の発生分化にどのような細胞間・細胞基質間相互作用が関わっているのか、その分子実体を明らかにしようとしている。細胞基質間相互作用やその変換過程は、神経細胞の分化過程にその重要性が指摘されながら、その機構はあまり明らかにされていない。われわれは細胞基質間相互作用を制御する新しい膜蛋白質遺伝子群 ADAM (メタロプロテアーゼ・ディスインテグリン)ファミリーに着目して研究を進めてきた。

我々は、世界にさきがけて形態形成にかかわる ADAM メルトリン α 、 β 、 γ をクローニングし、現在、それらの遺伝子の解析をおこなっている。これらの遺伝子は、細胞外には、メタロプロテアーゼ・ディスインテグリンドメインを、細胞質領域には、SH-3(Src Homology) 結合ドメインを有する。メルトリン α に関しては、その過剰発現、アンチセンス RNA の発現などの解析により、筋形成を制御していることを明らかにした。これらの遺伝子は形態形成過程において、骨格筋のみならず骨・肺・末梢神経系などにおいて強く活性化されることがわかり、これら膜型プロテアーゼの発生における役割が示唆された。現在、それらの遺伝子のノックアウトマウスの作成をおこなっている。一方、神経・筋接合部の形成にかかわる膜型プロテアーゼの検索もおこなっている。

骨格筋は神経支配を受けることによって成熟し、機能的な筋肉を形成する。その神経・筋接合部のシナプス形成の重要なステップは、神経細胞の growth cone が筋細胞表面に到達するところである。そこで神経から ARIA という可溶性因子が放出され、筋細胞で発現するそのリセプターにシグナルを伝える。すると筋側に変化が誘導され、胎児期に筋細胞の上にまばらに分布していたアセチルコリンリセプターが、クラスターを作りはじめ、そこに機能的なシナプスが構築されていく。

では、これら一連の過程のはじめに、神経の growth cone が筋細胞表面に到達すると、どのようなメカニズムによって神経から ARIA が放出されるのだろうか。ARIA は、膜タンパク質として合成されるが、それが可溶性分子として活性化・放出される。従って、シナプス形成には、シナプス前神経において膜タンパク質として合成された ARIA が可溶性分子に変換され、放出されるプロセスが、ひとつの重要な鍵を握っていると考えられる。これまで ARIA がどのようにプロセッシングを受けて可溶性分子を産生するかは、よく分かっていない。我々は、マウス神経筋接合部のシナプス形成期に運動神経で強い発現が見られ、ARIA のプロセッシング活性を有する膜型プロテアーゼを見つけ、現在その解析をすすめている。

3. 脊椎動物神経発生グループ

高次脳機能の発現のためには、胎生期に多様な神経細胞集団が領域特異的に生み出され、それらが正確な回路網を形成する必要がある、初期脳の分節的構築がその基盤となっている。脳の分節構造は形態的な単位であるばかりでなく、多数の遺伝子発現領域にも一致する。本研究では実験発生学的手法と分子形態学的手法を駆使することにより、領域特異的発現を示す遺伝子が脳分節形成・維持、神経細胞の移動と特殊化、および軸索伸長に対して果たす役割を解析する。

哺乳類初期脳で領域特異的発現を示す遺伝子の一つである Pax-6 が神経細胞の特殊化に対して果たす役割を解析した。Pax-6 変異ラット胚菱脳部では体性運動 (SM) 神経である外転および舌下神経が欠損していることを発見した。これは運動ニューロンそのものが形成されないためではなく、軸索の走行が鰓弓性・内臓性運動 (BM/VM) 神経のもののようにになっていることが逆行性・巡行性標識により判明した。分子マーカーの検索からも、Pax-6 変異ラット胚では SM ニューロンのマーカーである Islet-2 の発現が消失していることが確かめられた。一方、菱脳・脊髄両レベルでは En-1 遺伝子を発現する介在ニューロンが形成されないことが見いだされた。これらのことから Pax-6 遺伝子は神経管腹側のパターンニングに重要な役割を果たしていることが分かった。

領域特異的遺伝子の中でとくに Pax-6 遺伝子に着目し、この遺伝子を発現する前脳分節の成立とその予定運命地図の作成について、胎齢 8 日 (E8) 培養マウス胚の前脳・中脳部神経上皮細胞を蛍光色素で標識し、詳細な解析を行った。さらに昨年度確立した電気穿孔法による培養哺乳類胚への遺伝子導入系を用いて、大脳皮質・線条体境界の維持にカドヘリン群が果たす役割を解析した。また、菱脳部における運動神経細胞の特殊化に関して Pax-6 が Wnt 遺伝子を介して、運動神経細胞サブタイプのマーカーとなっている Islet2 遺伝子の発現を制御していることを明らかにした。

4. 培養細胞グループ

哺乳動物中枢神経系の発生過程において、多分化能を保持した神経幹細胞より多様な神経系の細胞群が生み出される分子機構を明らかにするための研究を行った。齧歯類胎児脳より神経幹細胞を単離し、その増殖と分化を操作する培養系を確立した。この神経幹細胞の初代培養系ならびに不死化した細胞株を用いて、幹細胞の分化制御機構を解析した。その結果、幹細胞が自己複製の段階からニューロン・グリアへの分化の段階に移行する過程を、転写制御因子である Mash-1, Prox-1 が制御していることを明らかにした。さらに、Notch 受容体を介したシグナル伝達系が、幹細胞の分化の複数の過程で機能することを見出した。さらに Notch の作用機構の少なくともひとつは Mash-1 の機能阻害であり、この過程にシグナル分子 Deltex

が関与することが明らかになった。

ニューロン、グリアの共通の起源細胞である神経幹細胞の増殖と分化を制御する機構について、bHLH 型転写因子 Mash-1 およびホメオボックス型転写因子 Prox-1 に着目して解析した。まず、発生期神経上皮組織において Mash-1, Prox-1 が分化過程で一過的に出現する 2 次前駆細胞で発現することを見出した。次に培養系を用いて、Mash-1, Prox-1 は幹細胞の分化の最も初期段階で発現すること、Mash-1 を幹細胞に強制発現することにより幹細胞の特異的マーカーである nestin の発現が消失し、逆に Prox-1 の発現が誘導されることを示した。さらに、Mash-1 遺伝子欠損マウスの神経組織ではニューロンへの分化が阻害され、Prox-1 の発現が特異的に消失していることを見出した。以上の結果より、Mash-1, Prox-1 は自己複製している幹細胞が分化を開始する初期過程を制御することが明らかとなった。さらに重要な知見として、Mash-1, Prox-1 の発現が脳の領域特異性の決定に引き続いて特定の時期にその発現が誘導されることを見出した。従って、発生期脳における細胞分化の開始のタイミングは、それ以前に起こる領域特異性によって制御されており、この機構によって秩序だった脳の形態形成が進行するものと考えられた。

5. シナプス形成グループ

脳の回路形成は、軸索の神経細胞からの伸長に始まり、その特定経路の走行に引き続く標的細胞とのシナプス形成によって成立する。これらの軸索等の形態変化を伴う過程は、発生プログラムに基づく機構と神経活動に依存した可塑的機構によって制御されるが、多様な細胞外シグナルに応答する細胞内の情報伝達機構は共通している可能性が高い。この細胞内情報を伝達する分子群として Rho ファミリー GTPase が近年注目されている。われわれは、これらの分子の活性化因子であるグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) に着目し、その回路形成における役割を明らかにすることを目的として解析してきた。

ショウジョウバエの行動異常変異株の解析からわれわれが同定してきた SIF タンパク質は、今までにシナプス末端に局在が確認された唯一の Rho ファミリー GTPase に対する GEF である。変異型 SIF タンパク質は胚個体中の神経細胞の軸索伸長やシナプス形成に異常を引き起こし、またヒト由来の培養細胞の形をアクチン繊維の再構成を伴って変化させる。これらの結果は、SIF タンパク質がシナプスの形態的分化を制御することを示唆している。シナプス末端内における SIF タンパク質の局在をさらに明らかにするためレーザー顕微鏡を用いて神経・筋肉接合部を解析すると、SIF タンパク質はシナプス前末端に一樣に分布するわけではなく、網目状のパターンで局在していた。また、シナプス末端の断面を電顕で観察すると神経伝達のアクティブゾーンの側部に存在することから、SIF タンパク質はアクティブゾーンの周縁部 (ペリアクティブゾーン) に局在し、そこで Rho ファミリー

GTPases を活性化すると考えられる。この SIF タンパク質の機能をさらに明らかにするため、*sif* 遺伝子の機能が完全に欠損した変異の分離を試み、複数の変異株を得ることに成功した。変異株では神経筋接合部の数が野生型に比べ有意に減少していることがわかった。この結果は、SIF がシナプス形成の制御に関与していることを示している。今後、脳内におけるシナプス分岐パターン等を詳細に解析していく必要がある。また、この *sif* 遺伝子のマウスホモログと考えられる *stef* 遺伝子を単離し解析をすすめたところ、胚においては発生途上にある大脳皮質の移動中の神経細胞で最も強く発現することがわかった。

一方、われわれは神経細胞で発現する新たな GEF である DRIO を同定した。*drio* 遺伝子は表皮系と中枢神経系で発現が認められた。抗体を作成して DRIO タンパク質の分布を調べてみると、SIF がシナプスに局在するのに対し、軸索を含めた神経細胞全体に分布していることがわかった。この遺伝子の突然変異株を分離して表現型を調べて見ると、胚および一齢幼虫の中枢神経系における軸索走行に異常が見い出されることから、*drio* は神経発生の過程で軸索走行を制御していることが明らかとなった。

以上、われわれは2種の GEF を同定し、それぞれシナプス形成と軸索走行の制御に関わることを明らかにしてきた。いずれの分子も Rho ファミリー GTPase カスケードの起点に位置し、細胞内外の情報を集約してカスケードを活性化する重要な機能を持つ。これらの分子機能をさらに解析することにより回路形成における神経細胞の分化機構が明らかになっていくであろう。

6. シナプス構造グループ

平成10年度はシナプス形成における標的認識の過程を、電子顕微鏡法を用いて解析した。材料は、標的認識機構の分子生物学的解析が最も進んでいる、ショウジョウバエ胚の体壁筋系を用いた。これまでの研究から、ショウジョウバエの運動ニューロンは標的筋細胞が決まっており、この標的特異性にはニューロンの細胞膜と筋細胞膜に発現する複数の標的認識分子が必要であることがわかってきた。そこで、これらの分子がニューロンと筋細胞との接触部位でどのような構造変化ひき起こすのかを解析するために、単一ニューロンを標識して電子顕微鏡観察する方法を開発した。標識ニューロンの観察から、ニューロンの成長円錐及び糸状仮足が標的筋細胞に接触すると、筋細胞との間で数多くの接着構造が形成され、神経終末がシナプスを形成する部位に到達するまで標的筋細胞と密着していることや、筋細胞も突起をのぼしてニューロンと密着することがわかった。この過程は標的細胞に特異的であった。また、標的認識分子の異所発現実験から、FA の形成がこれらの分子によって制御されていることがわかった。このように、シナプスの標的認識過程でプレ及びポストシナプスの細胞構造が標的認識分子の制御を受けてダイナミックに変化

していることが明かとなった。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Nakagoshi, H., Hoshi, M., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F.: A novel homeobox gene mediates the Dpp signal to establish functional specificity within target cells. *Genes Dev.*, 12, 2724-2734(1998).
- Matsuzaki, F., Ohshiro, T., Ikeshima-Kataoka, H. and Izumi, H.: Miranda localizes staufer and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early *Drosophila* embryogenesis. *Development*, 125, 4089-4098(1998).
- Torii, M., Matsuzaki, F., Osumi, N., Kaibuchi, K., Nakamura, S., Casarosa, S., Guillemot, F. and Nakafuku, M.: Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development*, 126, 443-456(1999).

他 11 件