

「脳を知る」

平成9年度採択研究代表者

村上 富士夫

(大阪大学大学院基礎工学研究科 教授)

「脳の神経回路形成と可塑性の分子機構」

1. 研究の概要

脳の機能を支える神経回路形成の機構を明らかにすることは脳の機能の解明にとって極めて重要なことである。我々は脳の基本回路の一つである交叉性神経回路形成の機構を明らかにした。すなわち神経管の腹側正中線にある底板が、軸索の誘引活性を有し、そのために軸索が正中線までガイドされることを示した。また、底板の誘引活性によって正中線に到達した軸索がそこに留まらないのは、軸索が底板の誘引活性に対する反応性を消失するためであることを明らかにした。また最近の研究においては、脳の前後軸方向への軸索の伸長方向を規定するメカニズムに関して、局所的なかつ極性をもったガイド因子が中脳のニューロンのガイドに重要な役割を果たしていることを明らかにした。今後はこれらの研究をさらに発展させ、脳における神経回路形成の基本原理を解明するとともに、その分子機構に迫りたい。そしてその知見をもとに可塑性の分子機構を明らかにして行く予定である。

2. 研究実施内容

回路形成、可塑性研究グループ

1) フロアプレートによる軸索の誘引

神経管の腹側正中線にあるフロアプレートは、その前後軸方向に中脳部付近まで伸びているが、小脳出力線維の軸索は腹側正中線にあるフロアプレートを通り、対側へと投射するが、我々は、ラット胚の神経細胞のコラーゲンゲル培養をおこない、フロアプレートが小脳遠心性線維に対して軸索誘引活性を有し、その成長円錐の正中線へのガイドに寄与していることを示した。そればかりかフロアプレートは中脳、後脳、髄脳、脊髄の全てのレベルの交連性ニューロンに対しても同様な活性を示し、これらのニューロンの腹側正中線へのガイドにも寄与している可能性を示す証拠を得た。また軸索誘引の責任分子として脊髄の交連ニューロンに対する拡散性誘引因子として同定されたネトリンが有力な候補であることが明らかになった。

2) フロアプレートにおける成長円錐の反応性の変化

しかし拡散性誘引因子による軸索のガイドという考えには根本的な疑問があった。

この考えによると成長円錐は因子の濃度を何らかの機構によって検知し、濃度の高い方に向かって伸びて行くものと考えられているが、上述の成長円錐はフロアプレートで止まらずに正中線を越えて対側へと伸びて行くのである。我々は成長円錐がフロアプレートの細胞に遭遇することによりその反応性を変えるのではないかと考え、これを確かめるための培養系を開発した。この培養系では後脳の交差性ニューロン（将来小脳の出発細胞となる）と正中部（フロアプレート）を含む短冊状の標本を用い、それに加えて他の部位から切り出してきた第二のフロアプレート移植片を並べておいた。こうする事によって正中線を一度交差した成長円錐が二度目にフロアプレートに遭遇したときの反応を調べることが出来ると考えた。このような培養下で、まず成長円錐がフロアプレート由来の拡散性誘引因子に反応することを確かめた後、正中線を一度交差した成長円錐の挙動をしらべたところ、このような成長円錐はフロアプレート移植片を無視して伸長する様子を観察できた。また正中部のフロアプレートを切り取った標本を作り、フロアプレートに遭遇することなく成長円錐が対側にたどり着けるような標本をつくったところ、成長円錐はフロアプレート移植片に向かって伸びていった。このように成長円錐の拡散性誘引因子に対する反応はフロアプレートの細胞に遭遇することにより失われることが明らかとなった。恐らく成長円錐のキューに対する反応性はここで見られたように（これまで考えられていたように）一定ではなく、伸長しながらダイナミックに変化してゆくのであろう。

3) フロアプレートにおける反応性の変化と前後軸に沿った軸索の走行

フロアプレートを通じた軸索は、その後直角に曲がって吻側及び尾側に向かって走行を始める。どのような機構でこのような方向転換が起こるのかは神経発生の基本的課題の一つである。我々はこの問題にアプローチする事を可能にする *in vitro* のシステムの開発に成功した。現在このシステムを用いて研究を進めている。

4) 前後軸方向への軸索の伸長方向を規定するメカニズムに関する研究

管状の構造をしている発生初期の脳（神経管）において、軸索が伸長し、標的に投射するために必要な軸索の伸長方向成分は、単純化すると背腹軸方向と前後軸方向の2成分と考えることができる。これまで背腹軸方向への軸索の伸長方向を規定するメカニズムに関しては研究が進んできた。しかし、前後軸方向への軸索の伸長方向を規定するメカニズムに関しては殆ど研究が進んでいなかった。中脳ドーパミン作動性ニューロン（MDN）は、成熟脳では標的領域が、細胞体が存在する中脳より前側に存在しており、上述の前後軸方向への問題を解明するのに適した系であると考えられる。そこで”前後軸方向への軸索の伸長方向を規定するメカニズムを明らかにする”ことを目的に、MDNの軸索が前方向に伸長することを決定する時期の軸索投射パターンを *in vivo* で明らかにし、更にMDNの軸索投射パターンを

再現する培養系を創り出し、その培養系を用いてメカニズムの解析を行った。

そのために神経管の前後軸及び背腹軸と軸索投射パターンの位置関係を正確に知ることができるラット脳の2次元展開標本を作製し、MDNの特異的なマーカーである抗チロシン水酸化酵素抗体を用いて *in vivo* のMDNの軸索投射パターンを解析した。その結果、中脳の腹側部で誕生したMDNは、胎生12日目(E12)正午の標本で軸索が前方向に伸長する傾向が見られ始め、E13の標本では全ての軸索が前方向に向かって伸長していることが観察された。以上の *in vivo* の結果を受け、MDNの軸索が前方向に伸長することを決定し始める時期であるE12正午の標本を以下の培養実験に用いた。

E12正午の2次元展開標本を1日培養すると、培養系で *in vivo* のE13様にMDNの軸索が前方向に伸長することが確認できた。そこでMDNが存在する中脳以外の領域がそのメカニズムに寄与しているかを検討するため、中脳の後側に位置する橋や前側に位置する間脳を除去した標本を作成し培養を行った。その結果中脳だけの標本においても、MDNの軸索が前方向に伸長することが確認できた。更に、MDNが軸索を前方向に伸長するために必要な"前後軸に関する極性"を保持しているのが、軸索が伸長していく神経管の基質なのかを明らかにする為、左脳由来のMDNの軸索を、細胞体自身の本来の前後軸とは180度反転した前後軸を持つ右脳の神経管上を伸長させる実験を行った。その結果、左脳のMDNの軸索は、左脳の神経管内を伸長する時は左脳の神経管の前方向に向かって伸長するが、一旦右脳の神経管内に侵入すると、伸長方向を変化させ右脳の神経管の前方向にむかって伸長する様子が観察された。この結果は神経管の基質が前後軸に関する何らかの極性を有しており、その極性が中脳ドーパミン作動性ニューロンの軸索を前方向に伸長する事を規定するメカニズムであることを示唆している。

- 5) 大脳皮質における入力線維の標的認識や枝分かれを担う膜結合型因子の特性を明らかにすることを目的として、ホルマリンで一旦固定した大脳皮質切片上で視床ニューロンの軸索伸長パターンの解析を行った。その結果、皮質表層に発現する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。

中枢神経系では細胞構築に基づいた特異的な神経回路が存在している。最近になって、網膜から視蓋へのトポグラフィックな結合の特異性が、受容体型チロシンキナーゼとそのリガンドの量的なマッチングによって説明できる可能性が挙げられているが、細胞構築に基づく離散的な神経結合パターンはトポグラフィックな連続的な特異性とは質的に異なり、別の分子メカニズムによって制御されると考えられる。さらに、最終的に軸索の枝分かれからシナプス結合に至る過程については全く未知と言ってよい。本年度は皮質入力線維が標的層で軸索成長を停止し枝分かれを形成するために必要な細胞・分子レベルのメカニズムを解明することを目的とし、化学

的に一旦固定した大脳皮質切片上で視床組織片を培養し、視床からの軸索伸長について調べた。この条件下では、拡散性分子の影響を排除して細胞膜表面あるいは細胞外マトリックスに存在する糖鎖やタンパク質などの分子の機能を解析できる。さらに、固定皮質切片に酵素処理を施すことによって軸索の枝分かれがどのように変化するかを調べることも可能である。その結果、視床軸索は固定皮質切片上においても標的である4層で特異的に枝分かれを形成することが分かった。次にノイラミニダーゼ、コンドロイチナーゼ、ヘパリチナーゼ、PI-PLC など細胞膜表面や細胞外マトリックスの環境に変化を与える酵素で皮質切片をあらかじめ処理してから視床との培養を行った。ヘパリチナーゼや PI-PLC 処理では未処理のものと比較して枝分かれの層分布にほとんど変化がみられなかったのに対し、ノイラミニダーゼおよびコンドロイチナーゼ処理を施したものにおいては枝分かれの標的層特異性が若干弱まった。またノイラミニダーゼ処理によって分枝の数、中でも $20\mu\text{m}$ 以下の細かい分枝の数が有意に増加した。これらの結果から、層特異的な膜結合型の因子が枝分かれの形成を担っていること、ならびにノイラミニダーゼによって除去されるシアル酸の成分とコンドロイチナーゼによって処理されるコンドロイチン硫酸が、標的層以外で軸索の分枝形成を抑制することによって層特異的な枝分かれの形成に貢献している可能性が示唆された。

ガイド因子探索グループ

神経回路の形成機構の解析と神経細胞の形成過程の分子機構を明らかとすることを主な目的として実験をおこなっている。

- 1) 神経回路形成機構に関しては、皮質橋路をモデルとして実験を進めており、本年度も従来より得られている橋組織発現遺伝子の解析を引き続き行った。橋由来因子については、候補3クローンを取得した。当初、このうち2クローンについてはほぼ全長を取得したと考えられたが、詳細な解析の結果、全長の cDNA は現在取得しているものより、長いものである可能性が高いことが判明した。現在、再度その全長の取得を試みている。
- 2) 神経細胞分化の場である神経上皮に強い発現を示す因子の探索を行い、新規因子4クローンを取得した。これらの因子を軸に、神経細胞の分化の分子メカニズムを明らかにする事を目指している。4つの分子の内、Neurepin 及び KI と我々が仮称している分子を主な対象としてその解析をすすめた。なお、残りの2つの分子は一つが哺乳類で4番目にあたる新しい adenylate kinase であり、もう一つが新しいシャペロン様分子であった。

Neurepin は神経上皮にその発現がほぼ限局していることが特徴であり、その細胞内局在は細胞周期に関連しており、通常では細胞質にその局在を認めるが、細胞周期を M 期で強制的に止めると、その局在が染色体に一致し発現する様子が観察

された。Neurepin に関しては、in vitro での解析の系としてセルライン P-19 の系を立ち上げ、同時に動物レベルでの検討を進めるべく neurepin 遺伝子変異マウスの作製実験を進めた。KI に関しては、神経上皮に発現する新規細胞骨格関連蛋白質であることが細胞レベルでの実験により考えられた。

- 3) 神経の発達・回路の成熟の分子機構を解析するとの観点より、脳内に発現する因子として、Pancortin という因子群をクローニングした。これは共通部分を互いに含む4種の分子種よりなるファミリーであり、成熟動物においては大脳皮質に強い発現を観察する。一方、個体発生に伴い、脳内に一過性に発現する分子種があることも我々は観察している。今回、Pancortin ファミリー全分子が有する共通部分に対する新たな抗体を作製し、Western blot により、これら4種の発現を同時に検討することができるようになり、遺伝子レベルのみならず蛋白質レベルでの発現動態の検討を行った。また、幾つかの dominant negative 分子を作成し、これらの分子を用い、Pancortin 分子の機能の解析を細胞レベルで試みた。但し、本分子に対するアンチセンス DNA 投与により細胞死が in vitro の系において確認されていたが、同様の現象は dominant negative 分子では確認されなかったため、その詳細を現在検討中である。

上記の実験系に加え、(神経)発生と疾病の双方に関連が深いと思われる因子を取り上げ、その因子を中心に(神経系の)発生の問題と疾病の病態解析へのアプローチを試みている。

- 4) 発生と疾病の両方に関係する因子として Cbfa-1 (これはショウジョウバエの runt 遺伝子の哺乳類のホモログである)に着目し、その欠損動物の発現系を解析し、この因子が骨形成に重要であることを、共同実験の結果あきらかにした。
- 5) 細胞周期などのコントロールに重要である 26S プロテアソームの構成分子の一つである TBP-1 の発現動態を脳内にて観察した。また、この因子に結合する新規因子 TBPIP をクローニングし、TBP-1 の活性を変えうる作用を有することを確認した。さらに、これら分子のヒトホモログの取得を行うとともに、TBP-1 と TBPIP が相互作用する機構について変異分子種を作製し検討している。
- 6) 発生に重要である trithorax の mammalian ホモログ All-1 の遺伝子変異動物を解析し、脳内に異常とくに、頸部の神経走行に異常があることを見出した。同時に、遺伝子欠損動物では頸椎に異常があることを見だし、関連する事項として Hox 遺伝子の発現に変化がみられないか検討している。

トランスジェニック動物作製グループ

本研究では、中枢カテコールアミン神経および運動神経をモデルに脳内における神経回路形成の機構の解明を目的とし、複数の研究課題に取り組んでいる。第一に、green fluorescence protein (GFP) を用いた神経発生のモニター系を利用し、中脳

ドーパミンニューロンの誘導、細胞移動、軸索ガイダンスの過程を脳の培養系において観察することに成功した。このシステムは、中脳ドーパミンニューロンの神経回路形成に関与する因子の探索に極めて有効である。第二に、中脳ドーパミンニューロンの神経回路形成を制御する新規遺伝子の単離のため、本ニューロンを含む脳領域より調製した膜分画を利用してモノクローナル抗体の作成を進めている。今後、脳の展開培養系を利用し、中脳ドーパミンニューロンの軸索ガイダンスを阻害する抗体をスクリーニングする計画である。第三に、条件的遺伝子ターゲティング法を用いて、特定神経細胞においてグリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカータンパク質の欠損および低分子量 GTPase Rho の活性阻害を誘導するための実験系を確立した。交感神経および運動神経における GPI 合成の欠損により、生後発育期の動物に運動および自律神経機能の異常が観察された。ミュータントにおける目的の神経細胞の核形成、軸索伸長パターン、生存は正常であり、ミュータントの表現型は両者の神経細胞の機能不全によるものと推察された。また、Rho の神経細胞特異的な機能阻害により、複数の運動神経の軸索伸長パターンに障害が認められた。Rho は、少なくとも運動神経の軸索走行に重要な役割を持つことが明らかとなった。

細胞内信号伝達グループ

昨年度に引き続き、コラプシン-1/セマフォリン III (SemaIII/collapsin-1) のシグナルの性質を 1) 軸索輸送系 2) 肺分岐形成 においてさらに詳細に検討するとともに、3) 新たに 線虫において CRMP ホモログを同定し、その発現分布を検討するなどの成果が得られた。

- 1) SemaIII/collapsin-1 による軸索輸送の促進は成長円錐に局在するニューロピリン-1 を介する。我々は、SemaIII/collapsin-1 結合能をもち、同分子の活性発現に必須の膜分子ニューロピリン-1 の関与を検討することを目的として、新たに膜貫通領域を欠失した可溶性ニューロピリン-1 (sNP-1) を作成した。sNP-1 は SemaIII/collapsin-1 の成長円錐退縮応答を競合的に阻害することを初めて証明した。マウス後根神経節 (DRG) における SemaIII/collapsin-1 の軸索輸送促進作用は sNP-1 により阻害された。さらに同促進作用は機能的抗ニューロピリン-1 抗体によっても阻害され、SemaIII/collapsin-1 の軸索輸送促進作用もまたニューロピリン-1 を介することが証明された。SemaIII/collapsin-1 アルカリフォスファターゼ融合蛋白 (Sema-AP) を用いた染色により、DRG におけるニューロピリン-1 の局在を検討した。Sema-AP による染色は細胞体、軸索、成長円錐部全般に観察された。一方、SemaIII/collapsin-1 によるこの促進作用は成長円錐部に SemaIII/collapsin-1 を局所適用した場合のみ再現され、軸索および細胞体部への適用は無作用であった。従って、ニューロピリン-1 以外の成長円錐部に局在 (化)

する何らかの因子が必要であることが示唆された。

- 2) SemaIII/collapsin-1 による肺分岐抑制作用は、上記の sNP-1 処置により阻害された。この結果はこの肺分岐抑制作用がニューロピリン-1 を介することが証明された。
- 3) 線虫 CeCRMP-1/DRP-1, CeCRMP-2/DRP-2 の同定: CRMP-62 の線虫ホモログをデータベースより見出し、部分配列をもとに線虫 cDNA ライブラリーより 2 種の CeCRMP/DRP-1, CeCRMP/DRP-2 を単離した。DRP (dihydropyrimidinase related) は、dihydrouracil から、 β -ureidopropionic acid の生成を触媒する酵素 dihydropyrimidinase (DHPase) 関連分子として独立にクローニングされた分子である。CRMP/DRP-1,2 それぞれの cDNA に GFP (green fluorescence protein) をつなぎ、線虫卵巣に微量注入してトランスジェニック線虫を作成し、分布を検討した。その結果、CeCRMP/DRP-1 は筋タイプ、CeCRMP/DRP-2 は神経および下皮タイプであることが判明した。さらに CeCRMP/DRP-1 は、180 細胞期より成虫まで、CeCRMP/DRP-2 は 幼若期に発現し成虫において著しく抑制される。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- R. Shirasaki, R. Katsumata and F. Murakami; Change in chemoattractant responsiveness of developing axons at an intermediate target, *Science*, 279, 105-107 (1998)
- W.-J. Song and F. Murakami; Development of functional topography in the corticorubral projection: an in vivo assessment using synaptic potentials recorded from fetal and newborn cats, *J. Neurosci.*, 281, 9354-9364 (1998)

他 20 件