

「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・教授)

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

1. 研究実施の概要

神経回路網の形成機構を明らかにすることは脳の機能解明にとって極めて重要であるが、分子レベルでは未だ未解明な点が多い。我々は、ショウジョウバエの glial cells missing (gcm) という遺伝子がニューロンとグリアの間の分化を制御することを見出した。gcm 遺伝子は新規の転写調節因子をコードし、進化的に保存されている。本研究では、gcm とその関連遺伝子の機能解析を通して神経系を中心とした発生分化の機構を調べることを目的としている。特に(1) gcm 関連遺伝子の機能、(2) ニューロン・グリア分化過程、(3) 軸索走行メカニズム に焦点を絞った研究を行っている。

gcm 関連遺伝子の機能については、まずショウジョウバエの gcm とその関連遺伝子 gcm2 が血液系の細胞分化に関与しているらしいことが分かってきた。またマウスの GCM 遺伝子は血球系でも一過的な発現を示すことが分かった。マウスの GCM 遺伝子の強制発現を目的として高力価のウイルスを作成し、大脳半球から作成した初代培養細胞に感染させ、さまざまなマーカーで染色して観察している。ゼブラフィッシュ gcm-b は受精後3日目頃には鰓弓上皮に限局して発現する。gcm-b を強制発現したところ、顎骨が肥大した稚魚が得られ、この組織の分化で機能しているかもしれないニワトリの GCMa は未分化な神経上皮細胞に現局した発現を示唆されている。gcm の DNA 結合領域の構造解析のために、NMR スペクトルの取得を行い、解析を進めている。

ニューロンとグリアの分化過程については、末梢神経系のある細胞系譜では、Numb タンパクによって非対称的な Notch シグナルの活性化がおこり、これが gcm 遺伝子の発現を正に制御していることが明らかとなった。神経細胞・グリア細胞の分化に関与する新たなタンパクとして solo (snapped outer longitudinals) を単離した。solo は BTB/POZ ドメインと zinc finger を持ち、転写因子だと考えられる。ほとんどすべての神経細胞で発現するがグリア細胞に発現せず、神経細胞の正常分化に必須である。

軸索走行におけるグリア細胞の機能を解析した。グリアの分化に異常を持つ突然

変異体では軸索とグリア細胞との会合が異常となって軸索走行に異常が生じることなどから、グリア細胞と神経軸索は相互依存的に神経系を形成すると考えられた。さらに軸索ガイダンス分子ネトリンおよびその受容体フラッツルドの作用機構を解析し、Frazzledはネトリンを捕捉し特定のパターンで再配列させ、位置情報を形成することを発見した。

2. 研究実施内容

神経回路網の形成機構を明らかにすることは脳の機能解明にとって極めて重要であるが、分子レベルでは未だ未解明な点が多い。我々のグループでは、ショウジョウバエを実験動物とした神経発生の分子メカニズムの研究によって glial cells missing (gcm) という遺伝子を同定・単離し、これがニューロンとグリアの間の分化決定スイッチ遺伝子であることを示した。gcm 遺伝子は新規の転写調節因子をコードし、進化的に保存した関連遺伝子が存在して転写調節因子ファミリーを形成している。本研究では、gcm とその関連遺伝子の機能解析を通して神経系を中心とした発生分化の機構を調べることを目的としている。特に(1)gcm 関連遺伝子の機能、(2)ニューロン・グリア分化過程、(3)軸索走行メカニズム に焦点を絞った研究を行っている。

(1) gcm 関連遺伝子の機能

gcm はアミノ末端に gcm モチーフという新規の DNA 結合部位を持つ転写調節因子である。様々な動物でこれまでに gcm モチーフを持つ分子が単離されている。ショウジョウバエには gcm 以外にもう一つ gcm モチーフを持つ gcm2 が存在する。gcm は中胚葉の血球系細胞で一過的に発現し血球の分化に必要であることがわかっているが、gcm2 もこの領域で一過的に発現する。gcm と gcm2 の両方を欠失する系統ではgcm 単独の欠失に比べて血球の異常が重くなる傾向がみられ、これら2つの遺伝子の両方が血球の分化に関与している可能性があることがわかった。マウスの GCM 遺伝子の強制発現を目的として、遠心分離によって高力価のウイルスを作成した。このウイルスにはマーカーとして LacZ 遺伝子も組み込んであるので、感染細胞を追跡できる。このようなウイルスを胎生12日の大脳半球から作成した初代培養細胞に感染させ、さまざまなマーカーで染色することにより、GCM 遺伝子の強制発現の効果を観察している。またマウスの GCM 遺伝子は血球系でも一過的な発現を示すことが分かった。

ゼブラフィッシュからgcm-bに相当するcDNAを単離している。ゼブラフィッシュ gcm-bは受精後24時間頃には、神経系、特に脳に広範に発現するが、受精後3日目頃には鰓弓上皮に限局して発現する。本cDNAとGreen Fluorescent Protein cDNAとの融合遺伝子を熱ショック蛋白のプロモーターを用いて強制発現したところ、顎骨が肥大した稚魚が得られた。また、同じ組み換え遺伝子によるラン

スジェニック系統を1系統単離することに成功した。最近顎骨の発達障害を示す突然変異suckerが、endothelin-1遺伝子の欠損に依ることが明らかになった。endothelinも鰓弓上皮に発現することが知られており、gcmとendothelinとの関係にも注意を払いながら、gcmの機能解明に向けて研究を進めていく計画である。

ニワトリのGCMa 相同遺伝子 cGCMAを単離した。中枢神経系では、ニューロンの分化が始まりつつある時期に神経上皮で均一な発現が見られた。この後ある程度のニューロンが分化している時期になると、分化したニューロンが存在する領域での発現が消失する。従ってcGCMA は未分化な神経上皮細胞に現局した発現をすることが示唆された。

gcmのDNA結合領域 gcm-motif は新しいタイプの進化的に保存された DNA 結合モチーフであり、どのようなコンフォーメーションでDNAと結合しているのか極めて興味深い。そこでX線結晶回折とNMRを用いてgcm-DNA複合体の構造解析を行っている。これまでに高純度のgcm-motif を精製して、種々のパルス系列を用いたNMRスペクトルの取得を行い、解析を進めている。

(2) ニューロン・グリア分化過程

神経細胞・グリア細胞の分化決定機構をさらに調べるために、gcm の発現調節機構を解析した。末梢神経系の dorsal bipolar dendritic (dbd) の細胞系譜では1個の前駆細胞が分裂して1個の神経細胞と1個のグリアを生じることが知られている。この系譜における細胞運命の決定は、gcm 遺伝子に依存しており、gcm 遺伝子はグリア前駆細胞で一過的に発現し、グリア運命決定を行ない、gcmを発現しなかった細胞は神経細胞となる。gcm 遺伝子の発現は転写レベルで調節されており、Notch シグナルによって正に制御されていることが明らかとなった。また、この系譜におけるニューロン・グリアの細胞運命は、神経前駆細胞ではNumbがNotchに対して阻害的に働くことによって、その結果、非対称的なNotch シグナルの活性化がおこることによって決定されていることが明らかとなった。

神経細胞・グリア細胞の分化に関与する新たな遺伝子の同定を目的とした突然変異体のスクリーニングを行ない、軸索の異常が観察されるsolo (snapped outer longitudinals) 系統を単離した。soloタンパクはBTB/POZ ドメインおよびzinc finger を持ち、ショウジョウバエ tramtrackとまったくも相同性が高く、転写因子として機能することが強く示唆された。solo はほとんどすべての神経細胞で発現が観察されるが、グリア細胞に発現していないことがわかった。soloの突然変異体の胚では、CNSの外側の縦の軸索束が正常に形成されず、軸索正常に異常があることがわかった。また、PNSにおいては、dbd neuron の軸索走行に異常がみられた。以上のことから solo は神経細胞が正常に分化し軸索が形成されるために必須であることが明らかになった。

(3) 軸索走行メカニズム

ショウジョウバエ胚の腹部神経節では、グリア細胞は神経細胞が軸索を伸長する時期に移動し、軸索と接することから、グリア細胞と神経軸索とのクロストークが回路形成に重要であると考えられる。この過程の解析を行った。gcm 突然変異体では、幹細胞の分裂は正常だが、その後の移動や、軸索束を覆う過程が異常であった。またグリア細胞の分化に異常を持つ突然変異体では軸索とグリア細胞との会合が異常となり、軸索走行に異常が生じることが明らかとなった。また、逆に神経軸索の走行に異常を持つ突然変異体では、グリア細胞の移動に異常を持つことも明らかとなった。これらのことから、グリア細胞と神経軸索は相互依存的に神経系を形成することが推論される。

軸索走行の制御機構の解析をさらに明らかにするため、軸索ガイダンス分子ネトリンおよびその受容体フラッツルドの作用機構を解析した。これまでネトリン受容体であるDCC/Frazzledファミリーはネトリンシグナルを受容する受容体と考えられていた。しかし我々はショウジョウバエ胚においてFrazzledはネトリンを捕捉すること、Frazzledには軸索の特定の領域に局在する性質があり、ネトリンを特定のパターンで再配列させる機能を持つこと、腹部神経節の前後方向のパイオニアニューロンdMP2はこの再配列されたネトリンを位置情報として用いることを発見した。またこれらの結果は、受容体が分泌性リガンドを再配置させ、別の受容体に対する位置情報を形成するという新たなパターンニングメカニズムが存在する事を示している。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

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)

Izsvak, Z., Ivics, Z., Shimoda, N., Mohn, D., Okamoto, H., Hackett, P. B. : Short inverted-repeat transposable elements in teleost fish and implications for a mechanism of their amplification. *J. Mol. Evol.* 48, 13-21(1999)

Umesono, Y., Watanabe, K. and Agata, K.: Distinct structure domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes, *Dev. Genes Evol.*, 209 , 18-30 (1999)

Kobayashi M, Takezawa S, Hara K, Yu RT, Umesono Y, Agata K, Taniwaki M, Yasuda K, Umesono K, Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U S A, 96, 4814-9 (1999)

Mieda, M., Kikuchi, Y., Hirate, Y., Aoki, M., and Okamoto, H. : Compartmentalized expression of zebrafish ten-m3 and ten-m4, homologues of the Drosophila tenm/odd Oz gene, in the central nervous system . Mech. Devel., 67, 223-227 (1999)

Kramer, S., Okabe, M., Hacohen, N., Krasnow, M. A. and Hiromi, Y.: Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in Drosophila. Development, 126, 2515-2525 (1999)

Higashijima, S., Hotta, Y., and Okamoto, H.: Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing GFP under the control of the Islet-1 promoter/enhancer. J. Neurosci., 20, 206-218 (2000)