「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．研究実施の概要

脳形成機構の分子レベルでの解明は、脳が他の臓器と較べて多くの異なる過程を経て形成されることからも、困難な課題であることが推測される。我々は特に、神経系における領域特異性獲得の分子機構の解明に向けた研究を、網膜における領域特異性の形成をモデルとして行っている。これは脳における領域特異的神経結合形成の基盤を明らかにする研究でもある。具体的には、まず網膜において領域特異的発現を示す分子群を網羅的に単離・同定し、それらの機能と分子間の相互関係を明らかにすることを通じて、脳の他の領域にも当てはまる普遍的なメカニズムの解明を目指している。これまでに多くの新規分子を含むトポグラフィック分子群を同定し、その詳細な発現様式を解析するとともに、引き続いて、各分子の構造、機能、分子間の相互関係を明らかにする研究を展開している。また、脳における特異領域の形成、並びに特異機能の発現という関点から、プロテインチロシンホスファターゼ β/ζ および機能未知の Na チャンネルの生理的役割の解明に向けた研究も併せて行っている。

２．研究実施内容

<u>網膜視蓋投射グループ</u>

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、平成９年度 Restriction Landmark cDNA Scanning（RLCS）法を用いた大規模スクリーニングを行った。その結果、網膜の前後（鼻耳）軸方向について33個、背腹軸について20個のトポグラフィックな発現を示す分子群を同定した。これらはその構造から、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。現在解析中の主な分子について簡単に報告する。

ａ）前後軸方向に発現量の異なる分子

１）T/BglII #2

本分子は神経特異的カルシウム結合タンパク質ファミリーに属する分子であり、E8 ニワトリ胚網膜では耳側神経節細胞に多く発現している。

2）T/BsiWI #2（bHLH 型転写因子）

E8 ニワトリ胚網膜の耳側に発現する bHLH 型転写因子のファミリーに属する新規分子であることが判明した。網膜を構成する６種類の神経細胞のうち、２種類の細胞でのみ特異的に発現が認められた。

3）T/NcoI #1（CRMP3）

E8 ニワトリ胚網膜の耳側に多く勾配状に発現している分子として単離し、１次構造解析により、CRMP（collapsin response mediator protein）ファミリーの一員である CRMP3 と同定した。平成12年度において、我々は、これまでに知られている CRMP1-4 の他に、さらに５つの CRMP アイソフォームの存在を確認し、そのすべての cDNA 配列を決定した。そのうちの１つは CRMP5 として今年度発表した。

4）CBF-1 及び CBF-2

CBF-1 と CBF-2 は網膜のそれぞれ鼻側、耳側に発現する転写調節因子であり、我々は既に、その異所的な発現によって視神経の投射が前後軸方向に変化することを示している。本年度は、その分子機構を明らかにする為、特に EphrinA2, A5 との関係について解析を加え、CBF-1 がその発現を制御している可能性を示唆する知見を得た。

b）背腹軸方向に発現量の異なる分子

1）D/Bsp120I #1

構造解析の結果、N 末端にシグナルペプチド配列、続いて２個の Ig 様ドメインを有し、分泌性タンパク質と推測される。*In situ* ハイブリダイゼーションでは、E8 ニワトリ胚網膜神経節細胞層の背側に強い発現が認められた。また、視神経の標的器官である視蓋の背腹軸に沿って、勾配状に発現が観察された。

2）V/BamHI #1

E8 のニワトリ胚網膜の腹側に特異的に発現する新規分子である。我々はこの分子の発現場所に因んで Ventroptin と命名した。この分子はシステインリッチな繰り返し配列を３つ有し、BMP-4 と結合することが判明した。またアフリカツメガエルの初期胚の腹側にこの mRNA を注入すると、コルディンと同様に２次軸を誘導することがわかった。従って、Ventroptin は BMP-4 と結合することによって、その活性を阻害することが明らかになった。

興味深いことに、この分子は E6 からは前後軸方向にも発現量が変化してくる。 Ventroptin の強制発現による視神経の投射の変化は背腹軸方向だけでなく、前後軸方向にも観察された。このように両軸方向の投射の制御に関

与する分子はこれまでに報告がなく、これが最初の例である。

3）V/BglII #2（retinaldehyde dehydrogenase）

網膜の腹側でレチナールからレチノイン酸を合成する酵素 retinaldehyde dehydrogenase（RALDH）と判明し、RALDH-3 と命名した。これまでに、目の背腹軸形成には、発生初期のレチノイン酸の濃度勾配（腹側に多く、背側では少ない）が重要であることが知られていたが、その合成酵素が同定されたのはこれが初めてである。さらに RALDH-3 は Pax6 の下流に位置していることが明らかになった。

4）D/EcoRI #4

構造解析の結果、short chain dehydrogenase/reductase（SDR）の一種であることが明らかになった。SDR はアルコールからアルデヒドへの酸化反応およびその逆の還元反応を触媒する酵素群である。レチノイン酸は生体内では主にレチノールからレチナールを経てレチノイン酸に変換される。我々は D/EcoRI #4 がレチノールからレチナールの合成に関わる酵素ではないかと考え、RALDH-3 との関連を含めて解析を進めている。

上記の分子を含め多くの新規分子が見い出されているが、これらの分子の機能と相互関係を明らかにすることによって、時間はかかるものの網膜領域特異化の全体像の解明という当初の目的を達成する目度が立ったと考えている。

<u>チロシンホスファターゼグループ</u>

本グループは、脳神経系に多量に発現する受容体型チロシンホスファターゼ PTPζ（RPTPβ）の機能と情報伝達機構の解明を目的として研究を進めている。本年度の主な進展は以下の通りである。

a）PTPζ の情報伝達機構を明らかにするために、酵母 two-hybrid system を基盤にしたスクリーニング法（酵母 substrate-trapping system）を開発し、本ホスファターゼの細胞内基質の同定を試みた。ラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、いくつかの基質候補分子を同定した。その内の一つ GIT1/Cat-1 は、$p60^{c\text{-}src}$ の良い基質になるとともに、in vitro で PTPζ によって効率良く脱リン酸化されることが明らかになり、生理的基質であることが示唆された。GIT1/Cat-1 は、p21-activated serine threonine kinase（Pak）の調節を介して、細胞骨格系を制御していると考えられており、PTN により誘導される神経細胞移動や神経突起伸長において重要な役割を果たしていることが示唆される。

b）UMR106 細胞（骨芽細胞株）を用いて MK による細胞移動のメカニズムを解析した。種々の阻害剤を用いた解析により、MK→PTPζ→Src→PI3K→MAPK

という情報伝達カスケードの存在が示唆され、PDGF との相乗効果も見出された。また、MK の細胞移動促進活性は、これらの細胞のみならず、血管再狭窄においても中心的に機能していることが明らかになった。

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、タンパク質チロシンフォスファターゼ（PTPζ）及び Nav2 イオンチャンネルの遺伝子欠損マウスの表現型解析を中心に進めている。またこれに加えて、中枢神経系の神経回路網の発生工学的可視化も進めている。網膜視蓋投射グループが発見した遺伝子についても、主なものは遺伝子ノックアウトマウス作製の実験を開始しているが、その解析は更に数年を要する。

ａ）PTPζ 遺伝子欠損マウス

PTPζ 遺伝子欠損マウスは平成10年度に完成した。本年度の進捗は以下の通りである。

１）中枢モノアミン神経系における PTPζ の生理機能

これまで PTPζ 遺伝子欠損マウスの行動表現型としては、⑴新奇フィールドに対する慣れの遅延、⑵マウス活動時間帯であるサーカディアン暗期における自発運動量の低下、⑶ストレス刺激に対する反応性の増大（強制遊泳試験）を同定している。その後の解析からは、これら行動全てに関係する神経系として着目した、モノアミン（MA）性神経系の機能障害が明らかになった。

電気生理学的な解析においては、単離した中脳 DA 神経細胞の Na^{+} 電流は、チロシンホスファターゼの阻害剤、２mM pervanadate 添加により約30％程度減少することが示された。最近我々が PTPζ の基質分子として同定した GIT1 に関して、Single-Cell RT-PCR 法により、DA 神経細胞で PTPζ と共発現していることを確認した。

２）学習記憶における PTPζ の生理学的機能

PTPζ 欠損マウスでは、海馬依存性学習と関係する長期増強（LTP）が変化していることが電気生理学的に示されている。海馬 CA1 領域の LTP は２ヶ月齢まで野生型と同等であるが、３ヶ月齢以上で有意な亢進を示す。

３）胃潰瘍と PTPζ

ヘリコバクターピロリの細胞空胞化毒素（VacA）をマウスに経口投与すると、胃粘膜に炎症細胞浸潤や潰瘍形成が引き起こされることから、本毒素がヘリコバクター・ピロリの病原性に関わることが示唆されている。VacA を野生型マウスに経口投与すると、48時間後、胃腔内での著しい出血と重篤な胃潰瘍形成が観察された。驚くべきことに、PTPζ 遺伝子欠損マウスでは、

同じ条件下で全く組織に障害が認められなかった。胃では、レセプター型のPTPζ-B type が主に発現していること、胃粘膜細胞由来の細胞株を VacA で刺激すると、基質分子である GIT1 のチロシンリン酸化が、容量依存的に低下することを見い出した。

b）Nav2 チャンネル遺伝子欠損マウス

Nav2 チャンネル遺伝子欠損マウスは、平成11年度に完成した。

1）c-fos タンパク質による脳室周囲器官の神経活動の解析

最初期遺伝子の一つである c-fos タンパク質の発現を指標にして、絶水時の脳室周囲器官の神経細胞の活動を解析した。野生型マウスと遺伝子欠損マウスを０時間、12時間、24時間、48時間の絶水条件下におき、それぞれ c-fos タンパク質の発現を調べたところ、脳弓下器官、終板脈管器官、視索上核、正中視索前核、室房核のいずれの神経核でも c-fos の発現の上昇が観察された。しかしながら、脳弓下器官と終板脈管器官においては、遺伝子欠損マウスにおいて、野生型マウスに較べて約２倍程度の過剰な上昇が観察された。この実験結果は、Nav2 が、脳弓下器官、終板脈管器官の神経活動を通常抑制的に制御しており、遺伝子欠損マウスの過剰な塩分摂取は、脳弓下器官と終板脈管器官の過剰な神経活動によるものであることを示唆している。

2）イオンイメージングによる Nav2 チャンネル特性の解析

野生型マウス及び遺伝子欠損マウスの一次培養系を利用してイオンイメージングを行った。脳弓下器官から単離した神経細胞では、約30%の細胞が外部のナトリウムイオン濃度の上昇に応答して細胞内のナトリウム濃度が上昇した。抗 Nav2 抗体によってこれらの測定した細胞を染色したところ、外部ナトリウムイオン濃度の上昇に応答する細胞は全て Nav2 陽性であり、応答しない細胞は全て Nav2 陰性であることが確認された。すなわち、Nav2 チャンネルは、細胞外ナトリウム濃度の上昇を感知して開口し、ナトリウムイオンを細胞内に流入させせる働きをするイオンチャンネルであることが示された。

c）中枢神経投射の遺伝子工学的可視化マウス

網膜視蓋投射で働くトポグラフィック分子の生体内での機能を明らかにする目的で、網膜神経節細胞特異的プロモーターとして Brn3b を選びプロモーター領域のゲノムクローンの単離と軸索可視化リポーター遺伝子（GAP-lacZ）の開発を行った。更に、Brn3b プロモーターとニューロフィラメントプロモーターで駆動させた軸索可視化リポーター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製を行った。網膜の背側神経節細胞および腹側神経節細胞でそれぞれ特異的に GAP-lacZ が発現するマウスラインを確立した。これらのマウスでは、

視神経のトポグラフィックな投射パターンをリポーター遺伝子により可視化することができた。その他、橋核小脳系、副嗅球神経系、聴覚神経系といった軸索回路網も可視化する事に成功した。

３．主な研究成果の発表（論文発表）

○Watanabe, E., Fujikawa, A., Matsunaga, H., Yasoshima, Y., Sako, N., Yamamoto, T., Saegusa, C. & Noda, M.; Na_v2/NaG channel is involved in control of salt intake behavior in the central nervous system. J. Neurosci., 20, 7743-7751 (2000)

○Fukada, M., Watakabe, I., Yuasa-Kawada, J., Kawachi, H., Kuroiwa, A., Matsuda, Y. & Noda, M.: Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family. J. Biol. Chem., 275, 37957-37965 (2000)

○Suzuki, R., Shintani, T., Sakuta, H., Kato, A., Ohkawara, T. and Noda, M.: Identification of RALDH-3, a novel retinaldehyde dehydrogenase, expressed in ventral region of the retina. Mech. Develop., 98, 37-50 (2000)

○Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., Kallen, R. G., Mandel, G., Meisler, M. H., Netter, Y. B., Noda, M., Tamkun, M. M., Waxman, S. G., Wood, J. N. & Catterall, W. A.: Nomenclature of voltage-gated sodium channels. Neuron, 28, 365-368 (2000)

○Shintani, T., Maeda, N. & Noda, M.: Receptor-like protein tyrosine phosphatase γ (RPTPγ), but not PTPζ/RPTPβ, inhibits NGF-induced neurite outgrowth in PC12D cells. Dev. Neurosci., 23, 55-69 (2001)