

「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. 研究実施の概要

脳機能発現は神経結合の構造的な再編成を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、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のレセプターであるプレキシンファミリー解析を行い、新たなマウスプレキシンの機能の解明、プレキシンのリガンドの同定を行った。さらに、プレキシン遺伝子欠損マウスの作製、線虫を用いた分子遺伝学的解析を行った。

嗅覚回路形成解析グループでは、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、この系を用いて、嗅球軸索伸長に関与する分子機構の解析を行った。

遺伝子機能解析グループでは、Fyn に結合する新たなカドヘリンファミリー CNR (cadherin-related neural receptor) を見出し、その脳の初期発生段階における役割の解析を明らかにした。

### 2. 研究実施内容

#### 分子機能解析グループ

##### 1) マウスプレキシンの解析

これまでにマウス脳で発現するプレキシンAサブファミリーに属する4種のプレキシン(プレキシンA1、プレキシンA2、プレキシンA3、プレキシンA4)を見出し、その一次構造、発現パターンを明らかにしてきた。また、プレキシンA1、プレキシンA2は直接クラス3セマフォリンとは結合しないが、ニューロピリンと複合体を構成してこれらセマフォリンのシグナルを細胞内に伝えることを証明した。

本年度は、これらマウスプレキシンAファミリーのうちプレキシンA4に焦点を合わせ、株細胞、培養神経細胞にプレキシンA4あるいは細胞内領域を欠失させたプレキシンA4を強制発現させる手段で、プレキシンA4がクラス3セマ

フォリンの受容体として機能するか否かの検討を行った。その結果、プレキシ  
ンA4 はプレキシシンA1、プレキシシンA2 と同様にニューロピリン-1 と複合体  
を構成し、クラス3セマフォリンの受容体として機能することが明らかになっ  
た。

さらに、プレキシシンAサブファミリーと直接相互作用するセマフォリンの検  
索を行い、クラス6ファミリーに属するセマフォリン6A、セマフォリン6B、セ  
マフォリン6C が高親和性でプレキシシンA1、プレキシシンA2、プレキシシンA4 に  
結合することを明らかにした。

これらの結果は、プレキシシンAサブファミリーは単独でクラス6セマフォリ  
ンのシグナルを、ニューロピリンと複合体を構成してクラス3セマフォリンの  
シグナルを伝える多重セマフォリン受容体であることを示している。

また、標的組み換えによりプレキシシンAサブ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も行った。

## 2) 線虫におけるプレキシシン機能の解析

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。そこで、線虫  
プレキシシンの分子遺伝学的な解析を実施し、これまでに、2つの線虫プレキシ  
ン遺伝子 *cep-1* と *cep-2* の遺伝子構造、cDNA の分離、特異抗体の作製を行っ  
た。

本年度は *cep-2* 遺伝子の破壊株の分離とその表現形の解析を行った。トラ  
ンスポゾンを利用して2株の機能欠失変異体を作成した。変異体は個体の運動  
に軽微な異常を示した。また、雄尾部の感覚器官である ray をはじめとする表  
皮由来の器官に形態異常を示し、*cep-2* 遺伝子が表皮形態形成に関与するこ  
とが明らかになった。GFP をレポーターに用いた解析から、*cep-2* 遺伝子は一部  
の神経細胞と表皮細胞に発現することが明らかになった。

## 3) 線虫神経系の形態形成に関与する新たな遺伝子の検索

プレキシシンの研究とは別に、神経系の形態形成に関与する新たな遺伝子を探  
るために、神経線維束形態に異常を示す変異体の検索を行った。この結果、腹  
側神経束が体壁から遊離するという表現型 Ven を発見、新規な3遺伝子座と既  
知の *mua/mup* 遺伝子座の変異が Ven 異常を引き起こすことを明らかにした。

## 嗅覚回路形成解析グループ

### 1) 僧帽細胞の突起伸長を阻害するモノクローナル抗体の作成とその抗原の解析

H1-1B4 は僧帽細胞の突起および成長円錐に結合し、培養シャーレ上での僧  
帽細胞の突起伸長を阻害した。また、H1-1B4 は、終脳器官培養系においても、  
僧帽細胞の軸索伸長を強く抑制し、LOT 形成を阻害した。H1-1B4 抗体の神経  
突起伸長の阻害効果を Time-Lapse システムを用いて解析し、H1-1B4 抗体を添

加すると、すみやかに成長円錐の前進が停止することを明らかにした。しかし、この時、成長円錐の崩壊は起こらず、糸状突起の運動性も維持されていた。この点は、これまで知られている軸索反発因子類の活性とは大きく異なる。

H1-1B4 抗体の認識する抗原遺伝子を得るために、COS 細胞を用いて発現スクリーニングを行い、H1-1B4 抗体に強く結合するたんぱく質をコードした cDNA クローンを単離し、その塩基配列を決定したところ、35kd の 4 回膜貫通蛋白質 M6a をコードしていることが明らかとなった。

## 2) 僧帽細胞軸索のガイダンスと軸索反発因子 Slit との関係の解析

僧帽細胞の軸索は道標的細胞 (lot 細胞) によりガイドされて、LOT という軸索束を形成する。この際の軸索ガイドの分子機構は未だ不明である。最近、分泌性たんぱく質 Slit が僧帽細胞軸索の伸長を反発させる作用を持つことが示された (Li et al., Cell 96, 1999)。この結果から、lot 細胞による軸索ガイドが Slit を介して行われている可能性が考えられた。また逆に、Slit が lot 細胞の挙動を制御することで、僧帽細胞軸索をガイドしている可能性も示唆されていた。

そこで、lot 細胞による軸索ガイダンスの機構と Slit との関係を、終脳器官培養系を用いて検討した。具体的には、Slit を強制発現させた細胞を lot 細胞の近傍に移植して、僧帽細胞軸索のガイドや lot 細胞の分布に対する影響を検討した。また Slit の合成源であると考えられる終脳の中隔部を除去し、さらに残存する Slit の活性を阻害して、僧帽細胞軸索の伸長の様子を検討した。その結果、lot 細胞による軸索のガイダンスと Slit とは無関係である可能性が示唆された。すなわち、この 2 種のガイド機構は、それぞれ独立に、僧帽細胞軸索に作用していると考えられた。本研究は、さらに、生体内での僧帽細胞軸索のガイダンスに中隔部からの Slit 活性が必要ない可能性を示唆した。

## 遺伝子機能解析グループ

### 1) 新規 Fyn 結合分子 CNR の分離と機能解析

昨年度までに、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、新たなカドヘリンファミリー CNR (cadherin-related neural receptor) を得ることに成功し、その発現様式、マウス及びヒトのゲノム構造、CNR と Reelin との相互作用について明らかにした。

本年度は CNR のゲノム構造の解析を引き続き行なった。CNR の可変領域と不変領域がどのようなメカニズムで連結しているのかを確かめる為に、C57BL/6 と DBA/2 で遺伝子配列の異なる CNR3 の可変領域を用いて、C57BL/6 と DBA/2 の F1 マウスでの連結パターンを解析した。その結果、成体マウスで 85% は同じ染色体上の可変領域と不変領域でのシス型の連結が認め

られるものの、15%は染色体の異なるトランス型であった。この結果は、CNRの発現にはシスのスプライシング以外のメカニズムが関与している可能性が示唆された。また、CNR3mRNAの遺伝子配列を解析した結果、興味深いことに突然変異が脳の発達段階で蓄積されていることも明らかとなった。

さらに、Reelin 結合型でない CNR ファミリーの解析を行った。CNR ファミリーの遺伝子クラスターにおいてもっとも3'側にある CNR の c1 と c2 は遺伝子配列が CNR1-8 と異なり、EC1 領域が保存されていない。このファミリーの発現様式と Reelin との結合活性を測定したところ CNRc1 と c2 は、CNR1-8 と同様の不変領域と連結しており、スプライシングヴァリエントである A 型と B 型も同様に発現していることが明らかとなった。これらの脳の発達段階での発現様式は CNR1-8 とは微妙に異なることも明らかとなった。また、Reelin とは結合活性を示さないことが明らかとなり、CNRc1 と c2 は CNR1-8 とは異なった機能をもつ可能性が高く示唆された。

### 3 . 主な研究成果の発表 ( 論文発表 )

M. Shibata, T. Fujii, J. A. Dent, H. Fujisawa and S. Takagi : EAT-20, a novel transmembrane protein with EGF motifs, is required for efficient feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 154, 635-646 ( 2000 )

M. Shimizu, Y. Murakami, F. Suto and H. Fujisawa : Determination of cell adhesion sites of neuropilin-1. *J. Cell Biol.*, 148, 1283-1294 ( 2000 )

T. Nomura and H. Fujisawa : Alteration of the retinotectal projection map by the graft of mesencephalic floor plate or Sonic hedgehog. *Development*, 127, 1899-1910 ( 2000 )

N. Tomioka, N. Osumi, T. Inoue, S. Nakamura, H. Fujisawa and T. Hirata : Neocortical origin and tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. *J. Neurosci.*, 20, 5802-5812 ( 2000 )

T. Ito, M. Kagoshima, Y. Sasaki, C. Li, N. Udaka, T. Kitsukawa, H. Fujisawa, M. Taniguchi, T. Yagi, H. Kitamura and Y. Goshima : Repulsive axon guidance molecule Sema3A inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung. *Mech. Dev.* 97, 35-45 ( 2000 )

H. Nagao, Y. Yoshihara, S. Mitui, H. Fujisawa and K. Mori : Two mirror-image sensory maps with domain organization in the mouse main olfactory bulb. *NeuroReport*, 11, 3023-7 ( 2000 )

Y. Murakami, F. Suto, T. Kameyama, M. Shimizu, T. Shinoda and H. Fujisawa : Differential expression of plexin-A subfamily members in the mouse nervous system. *Dev. Dyn.*, 220, 246-258 ( 2001 )

- Y. Yamada, N. Takakura, H. Yasue, H. Ogawa, H. Fujisawa and T. Suda : Exogenous clustered neuropilin-1 enhances vasculogenesis and angiogenesis. *Blood*, 97, 1671-1678 ( 2001 )
- G. Shioi, M. Shoji, M. Nakamura, T. Ishihara, I. Katsura, H. Fujisawa and S. Takagi : Mutations affecting nerve attachment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 157, 1611-1622 ( 2001 )
- H. Sugino, S. Hamada, R. Tasuda, A. Tuji, Y. Matsuda, M. Fujita and T. Yagi : Genomic organization of the family of CNR cadherin genes in mice and humans. *Genomics*, 63, 75-87 ( 2000 )
- Y. Yamazaki, T. Yagi, T. Ozaki and K. Imoto : In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. *J. Exp. Zool.*, 286, 212-218 ( 2000 )
- T. Yagi and M. Takeichi : Cadherin superfamily genes : functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes & Development* 14, 1169-1180 ( 2000 )
- Y. Shima, T. Yagi, Y. Isojima, N. Okumura, M. Okada and N. Nagai : Changes in circadian period and morphology of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus in fyn kinase-deficient mice. *Brain Res.*, 870, 36-43 ( 2000 )
- H. Kitazawa, A. Katoh, T. Yagi and S. Nagao : Dynamic characteristics and adaptability of reflex eye movements of Fyn kinase-deficient mice. *Neurosci. Lett.*, 280, 179-182 ( 2000 )
- C. Seiwa, I. Sugiyama, T. Yagi and H. Asou : Fyn tyrosine kinase participates in the compact myelin sheath central nervous system. *Neurosci. Res.*, 37, 21-31 ( 2000 )
- T. Ito, M. Kagoshima, Y. Sasaki, C. Li, N. Udaka, T. Kitukawa, H. Fujisawa, M. Taniguchi, T. Yagi, H. Kitamura and Y. Goshima : Repulsive axon guidance molecule Sema3A inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung. *Mechanisms of Development*, 97, 35-45 ( 2000 )
- E. Kawase, Y. Yamazaki, T. Yagi, R. Yanagimachi and R. A. Pedersen : Mouse embryonic stem ( ES ) cell lines established from neuronal cell-derived cloned blastocysts. *Genesis*, 28, 156-163 ( 2000 )
- T. Hirayama, H. Sugino and T. Yagi : Somatic mutations of synaptic cadherin ( CNR family ) transcripts in the nervous system. *Genes to Cells*, 6, 151-164 ( 2001 )
- J. Nakahara, K. Tan-Takeuchi, C. Seiwa, T. Yagi, S. Aiso, K. Kawamura and H.

Asou : Related Articles Myelin basic protein is necessary for the regulation of myelin-associated glycoprotein expression in mouse oligodendroglia. *Neurosci. Lett.*, 298, 163-166 ( 2001 )

K. Nakamura, T. Manabe, M. Watanabe, T. Mamiya, R. Ichikawa, Y. Kiyama, M. Sanbo, T. Yagi, Y. Inoue, T. Nabeshima, H. Mori and M. Mishina : Related Articles Enhancement of hippocampal LTP, reference memory and sensorimotor gating in mutant mice lacking a telencephalon-specific cell adhesion molecule. *Eur. J. Neurosci.*, 13, 179-189 ( 2001 )

Y. Takei, S. Hamada, K. Senzaki, T. Mutoh, H. Sugino and T. Yagi : Two novel CNRs from the CNR gene cluster have molecular features distinct from those of CNR1 to 8. *Genomics* 72, 321-330 ( 2001 )