

「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. 研究実施の概要

複雑な機能を営む神経ネットワークは、素子として働く神経細胞の各々が独自の個性をもつことによって成り立ち、また、それは外界の刺激に応じて柔軟に変化する。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、神経の多様性を生む遺伝的プログラムと構造的可塑性の分子メカニズムを明らかにすることを目標にしている。神経細胞の個性は、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。本プロジェクトでは、ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂に伴って、姉妹細胞に非対称に分配される神経運命決定因子 Miranda を同定し、その解析から、神経幹細胞の非対称分裂が神経の運命決定に直接的な役割を果たすことを世界に先駆けて明らかにしてきた。さらに、2種類のがん抑制因子が幹細胞の非対称分裂を制御することを発見し、神経細胞の多様性の根本にある発生原理に迫ろうとしている。同時に、ショウジョウバエ神経系の発生原理が脊椎動物の神経発生においても機能しているかどうかを検討している。一方で、ショウジョウバエの行動学的手法と遺伝学を用いた神経回路形成の解析から、GTPase カスケードに働く因子 SIF と Trio を同定し、それらが神経回路形成の制御を行うことを明らかにしてきた。さらに、これらの因子の解析に基づいて、シナプスの構造的可塑性を担う新しいメカニズムを提唱し、神経回路形成における可塑性と機能的可塑性の両者を支える分子機構を明らかにしようとしている。

2. 平成12年度研究実施内容

1) 非対称分裂グループ

神経幹細胞の非対称分裂を制御する遺伝子の同定

ショウジョウバエの神経幹細胞は、それ自身と姉妹細胞に非対称に分裂する際、神経の運命決定因子である転写因子 Prospero や Notch シグナルの制御因子 Numb を姉妹細胞に不等分配する。これらの因子の不等分配は神経細胞の運命決定に必須なプロセスであり、本研究では、そのメカニズムと背後にある細胞極性の分子実体を明らかにすることを目標にしている。神経幹細胞の分裂に際し

て、アダプター分子である Miranda が Prospero に直接結合し、その細胞内分布と不等分配を規定することを我々は明らかにしているが、その Miranda の細胞内局在を指標として、神経幹細胞の非対称性を制御する因子を系統的に検索することを行った。その結果、Miranda が神経幹細胞とその姉妹細胞に等しく分配される突然変異をいくつか同定した。そのうち、ひとつについては、ショウジョウバエに脳腫瘍を引き起こすことが知られていたがん抑制遺伝子 giant larva(*lgl*) が原因遺伝子であることを突き止めた。さらに、他のがん抑制遺伝子を検索したところ、同じく脳腫瘍の原因遺伝子として知られる discs large(*dlg*) 遺伝子の変異が *lgl* と同一の表現型を示すことが判明した。両者は神経幹細胞の細胞表層に分布し、Prospero と Numb の不等分配の両方に必要とされる。これらの事実から、これまでに知られている全ての神経運命決定因子を局在させる共通なプロセスが神経幹細胞には存在し、そこに *dlg*, *lgl* が機能することが明らかにされた。遺伝的、および薬理的な解析からは、*lgl* が複数の myosin 分子種の活性を制御することにより、運命決定因子・アダプター分子複合体の細胞表層への局在に働くことが示唆される。この研究から、神経細胞の運命決定、分化因子の細胞内局在、がん抑制という従来関連が知られていなかった三つの現象に接点が見出された。

2) 細胞間相互作用グループ

本研究は、神経筋接合部形成に関わる細胞間相互作用の解明を目的とする。本年度は、メルトリン β 遺伝子のノックアウトマウスの作成・解析を中心とする研究成果を得た。

まず、このノックアウトマウスは、新生仔の段階で80~90%が死んでしまうことがわかった。詳しい解析から、これらのマウスでは心臓の心室中隔欠損がみられ、現在これが致死の原因であると考えているが、神経分化・神経筋接合部形成などにおける異常もみられるかどうか現在検討中である。

このメルトリン β 遺伝子のノックアウトマウスの表現型や発生過程における発現パターンの類似性から、心内膜の分化、神経筋接合部の形成や神経分化に関与することが知られる細胞膜貫通型増殖因子ニューレギュリンが、メルトリン β の基質となりうる可能性が考えられたので検討してきた。ニューレギュリンのプロセシングが野生型メルトリン β を共発現する事により増強し、プロテアーゼ活性を持たない変異型メルトリン β を共発現すると抑制されること、神経特異的な β タイプのニューレギュリンを効率良く切断するのに対し α タイプの切断は効率が悪く、メルトリン β のプロテアーゼ活性には基質特異性がみられることがわかった。さらに細胞表面のニューレギュリンの発現が、野生型メルトリン β の共発現によって消失し、いわゆる ectodomein shedding に関与しうることを示した。以上、メルトリン β が心内膜の分化制御にかかわることを明らかにし、その分化

に關与することが知られるニューレギュリンのプロセッシング能を有することを示した。

3) 脊椎動物神経発生グループ

本研究では哺乳類胚を材料とし、全胚培養下での脳組織に対し細胞標識法や電気穿孔法による遺伝子導入法を駆使して、領域特異的な神経分化機構を明らかにすることを目的とする。本年度は以下のような研究成果が得られた。

マウス胚予定終脳領域の神経上皮細胞を全胚培養下で標識・追跡することにより、胎齢10日に大脳皮質・線条体原基の神経上皮細胞の移動の制限が生じていることを明らかにし、電気穿孔法による遺伝子導入法を用いて異所性にカドヘリン分子を発現させることにより、大脳皮質・線条体境界維持にカドヘリン群が果たす役割を解析した。また、この時期に Pax6 の発現は大脳皮質原基特異的に認められ、Pax6 変異マウス大脳皮質原基では Rcadherin の発現が消失していることから、大脳皮質・線条体境界維持に関して、Pax6 の下流で Rcadherin が重要な働きをしている可能性が示唆された。

Pax6 は菱脳腹側で発現し、腹側神経管のパターニングに関わっているので、Pax6 変異ラット胚菱脳部において各種ニューロンおよびその前駆体のマーカーの発現を詳細に解析した。その結果、前駆体マーカーの発現境界が明瞭になっていることが領域特異的な神経細胞分化にとって必要である可能性が示された。

4) 培養細胞グループ

哺乳動物神経幹細胞において、ニューロン・グリアへの分化と、自己増殖との選択を制御する機構を明らかにすることめざしている。遺伝子欠損マウス、多能性神経幹細胞の培養系を用いた解析から、転写因子である Mash1 および Prox1 が神経幹細胞の自己複製から分化へのコミットメントの初期過程を正に制御する因子であることを明らかにした。さらに、細胞膜受容体分子 Notch を介したシグナルが、Mash1 の機能を抑制することにより幹細胞の分化を負に制御すること、そのシグナルは deltex 遺伝子の哺乳動物相同遺伝子として単離された Deltex1 (Dtx1) が担い、Mash1 の転写促進に必須な coactivator である p300 と直接に相互作用しその機能を阻害することを明らかにした。以上の結果から、脳神経系の発生の初期過程において、神経幹細胞の増殖・分化の運命選択は、Mash1 および Prox1 による正の制御ならびに Notch シグナル伝達系による負の制御が働いており、両者のバランスによって巧妙にコントロールされていることが明らかとなった。

5) シナプス形成グループ

機能的な神経回路の形成は、軸索とシナプスの遺伝的プログラムに従った発生と、さらには神経活動に依存した微調整により成し遂げられる。われわれは今ま

で神経繊維の伸長制御をする Trio とシナプスの成長を制御する SIF という 2 種類の Rho ファミリー GTPase 活性化因子の研究を機能欠損型変異の解析を中心に進めてきた。本年度は新たに、神経回路の形成を制御する遺伝子を強制発現系を用いたスクリーニング法により同定する実験システムの構築を行った。複雑な中枢神経系で回路形成の制御因子を同定していくために、まず第一に少数の神経繊維を可視化し、第二にその神経細胞でゲノム上の任意の遺伝子を強制発現させて神経繊維の形の変化を解析することを試みた。具体的にはショウジョウバエの GAL4/UAS 系を用い、ショウジョウバエ成虫の嗅覚記憶の中枢であるキノコ体中の少数の神経繊維を GFP により可視化し、可視化された神経細胞でゲノム上の任意の遺伝子を UAS 発現ライブラリー（都立大学、相垣研究室により作成）を用いて発現させた後にその効果を解析した。現在までにライブラリー 880 系統を調べたところ神経繊維の多様な変化が観察され、その中で特に神経繊維の過伸長を示す系統と繊維上に粒状の構造を引き起こす系統、あわせて 10 系統に焦点を定めた。これらの系統で強制発現される候補遺伝子は既に同定しており、今後さらに原因遺伝子を特定してその神経回路形成における役割を解明していく予定である。

6) シナプス構造グループ

われわれのグループは、シナプスの形成や可塑的变化の遺伝的制御過程が微細構造レベルでどのように具現されているのか、という問題を明らかにすることを研究のねらいとしている。これまでに、ショウジョウバエ胚体壁筋系をモデルとして解析したところ、神経成長円錐に対して、標的筋細胞から伸びた糸状突起 (myopodia) が密接に接着し、成長円錐を包み込むように細胞骨格や細胞表層の微細形態を変化させることを見出した。本年はこの筋細胞の形態変化が神経突起との接触に依存するかを調べる目的で、ニューロンが著しく減少する突然変異 *prospero* において、myopodia を観察したところ、myopodia の clustering およびその後の形態変化は、成長円錐が到達した少数の筋細胞でのみ認められ、これらの形態変化が神経突起との接触に依存していることがわかった。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Matsuzaki, F., Asymmetric division of *Drosophila* neural stem cells : a basis for neural diversity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 38-44 (2000)

Ohshiro, T., Yagami, Y., Zhang, C. and Matsuzaki, F. Role of tumor suppresser proteins in asymmetric division of *Drosophila* neuroblast. *Nature* 408, 593-596 (2000)

Kurohara, K., Matsuda, Y., Nagabukuro, A., Tsuji, A., Amagasa, T., and Fujisawa-Sehara, A., Chromosomal mapping of the meltrin β (ADAM19) gene, cloning

and analysis of its regulatory region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 522-527 (2000)

Shirakabe K, Wakatsuki S, Kurisaki T, Fujisawa-Sehara A., Roles of Meltrin beta /ADAM19 in the Processing of Neuregulin. *J Biol Chem.* 276, 9352-9358 (2001)

Ishii, Y., Nakamura, S. and Osumi, N.: Demarcation of early mammalian cortical development by differential expression of fringe genes. *Dev. Brain Res.* 119, 307-320 (2000)

Inoue, T., Nakamura, S. and Osumi, N.: Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate. *Dev. Biol.* 219, 373-383 (2000)

Fukuda, T., Kawano, H., Osumi, N., Eto, K., Kawamura, K.: Histogenesis of the cerebral cortex in rat fetuses with a mutation in the Pax-6 gene. *Dev. Brain Res.* 120, 65-75 (2000)

Nagase, T., Shimoda, Y., Sanai, Y., Nakamura, S., Harii, K., Osumi, N.: Differential Expression of Two Glucuronyltransferases Synthesizing HNK-1 carbohydrate epitope in the sublineages of the rat myogenic progenitors. *Mech Dev* 98, 145-149 (2000)

Inoue, T., Tanaka, T., Takeichi, M., Chisaka, O., Nakamura, S., & Osumi, N.: The role of cadherins in maintaining the compartment boundary between the cortex and striatum during development. *Development* 128, 561-569 (2001)

Takebayashi H, Yoshida S, Kominami R, Nakafuku M, Nabeshima Y. Olig family of basic helix-loop-helix factors includes Olig1 and Olig2 implicated in oligodendrogenesis and the third paralogous gene, Olig3. *Mech. Dev.* 99, 143-148 (2000)

Tabuchi, K., Sawamoto, K., Suzuki, E., Ozaki, K., Sone, M., Hama, C., Tanifuji-Morimoto, T., Yuasa, Y., Yoshihara, Y., Nose, A., and Okano, H. The GAL4/UAS-WGA System as a Powerful Tool for Tracing *Drosophila* Transsynaptic Neural Pathways. *J. Neurosci. Res.* 59, 94-99 (2000)

Awasaki, T., Saito, M., Sone, M., Suzuki, E., Sakai, R., Ito, K., and Hama, C. The *Drosophila* Trio Plays an Essential Role in Patterning of Axons by Regulating Their Directional Extension. *Neuron*, 26, 119-131 (2000)

Sone, M., Suzuki, E., Hoshino, M., Hou, D., Kuromi, H., Fukata, F., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Nabeshima, Y. and Hama, C. Synaptic development is controlled in the periaxonal zones of *Drosophila* synapses. *Development*, 127, 4157-4168 (2000)

Suzuki, E., Rose, D. and Chiba, A. The Ultrastructural interactions of identified pre- and postsynaptic cells during synaptic target recognition in *Drosophila*

embryos. *J. Neurobiol.* 43, 448-459 (2000)

Ritzenthaler, S., Suzuki, E. and Chiba, A. Postsynaptic filopodia in muscle cells interact with innervating motorneuron axons. *Nature Neurosci.* 3, 1012-1017 (2000)