

「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(松崎文雄)

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、Miranda 分子は Prospero に直接結合し、その細胞内分布と不等分配を規定するアダプター分子であるが、この因子のダイナミックな細胞内の局在は、神経幹細胞の細胞極性を敏感に反映する。この 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の系統的な検索を行っている。このスクリーニングは、まだ途中の段階だが、Miranda の局在に異常

をきた突然変異を現在までに24系統分離し、10遺伝子座に分類した。そのうち、以下の3つの突然変異グループは全く新しい表現形を示す。(1)がん抑制遺伝子である giant larvae と似た表現形を示し、遺伝的な相互作用を持つ。(2)神経幹細胞は正常な極性を保っているが、その方向がランダムになる。(3)神経幹細胞とその姉妹細胞の大きさが非対称性を失い、形態的な等分裂を行う。(1)のグループに属する突然変異の原因遺伝子は運命決定因子の局在のメカニズムに機能する未知の因子と予想される。(2)の表現形は、神経幹細胞が自律的に極性を維持すること、また、その極性を外部から方向付けする仕組みのあることを示唆している。形態的な等分裂を引き起こす変異(3)は、細胞軸上に、収縮環の位置を非対称に指定する遺伝子の変異であると考えられ、その原因遺伝子の解析は、細胞内の位置情報の形成に新しい視点を提供する。本研究で行っている突然変異のスクリーニングと解析が非対称分裂と細胞極性の理解に大きな貢献を果たすことを以上の結果は期待させる。

2. 細胞間相互作用グループ (瀬原淳子)

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 遺伝子の形態形成における役割の解析、およびその制御機構に関する研究を中心とする研究成果を得た。

まず、この遺伝子は、マウスの発生過程において、三叉神経などの脳神経系や運動神経などの神経系で強い発現があるが、それに加えて心臓で発現が見られること、心臓に遊走してくる神経冠細胞がその発現細胞であることがわかった。メルトリン β ノックアウトマウスでは心臓の心室中隔欠損がみられたが、この心室中隔膜性部の形成には神経冠細胞がかかわっていることがわかっていことから、神経冠細胞の分化、あるいは神経冠細胞と心内皮や心筋など他の細胞との相互作用に、メルトリン β が必須であると考えられる。さらに、神経冠細胞の遊走にはメルトリンは必須ではないが、この細胞が産生するファイブロネクチンの発現が著しく低いことから、この遺伝子が神経冠細胞のかかわる心内膜床の形成に必要であることが判った。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。

メルトリン β は神経細胞で発現し、グリアの分化や心臓形成にかかわる増殖因子ニューレギュリンを膜型から可溶型に変換するプロテアーゼ活性を有することをこれまでに報告した。本年度はそのプロテアーゼ活性の制御機構を明らかにすべく、活性に必要なドメインを特定するとともに、このプロテアーゼが発生にともなってい細胞内局在を変化させることを明らかにすることができた。

3. 脊椎動物神経発生グループ (大隅典子)

本研究では哺乳類胚を材料とし、全胚培養下もしくは子宮内手術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することにより、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。

1) 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ため、Pax6 変異ラットホモ接合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、前駆体ドメインが維持されることが領域特異的な神経細胞分化にとって必要であり、Pax6 はこの前駆体ドメイン維持に関わる可能性が示された。

2) Pax6 変異ラットホモ接合個体は出生直後に死亡するが、Pax6 変異ラットヘテロ接合個体は成体まで成長し、正常に交配して子孫を残すことができる。ところが、上記研究の為にこの Pax6 変異ラットヘテロ接合個体の系統を維持している間に、行動異常が認められることに気が付いたため、詳細な解析を行った。その結果、恐怖心の低下や感覚ゲート機構の異常が認められた。Pax6 変異ラットヘテロ接合個体は薬物投与によらずヒト精神分裂病に対応する症状を呈することから、モデル動物として有用である可能性が示唆された(下記申請特許参照)。

4. 培養細胞グループ(中福雅人)

哺乳動物神経系において神経幹細胞から多様なニューロン・グリアが生み出される機構を明らかにすることをめざしている。本年度は以下の2つの課題について成果を得た。

1) 運動ニューロンおよびオリゴデンドロサイトの発生制御:発生期脊髄において時期および領域特異的に発現する basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子 Olig2, Ngn2, Mash1 が、神経管腹側における運動ニューロンとオリゴデンドロサイトの逐次的な発生を制御していることを明らかにした。

2) 成体神経組織におけるニューロン再生の誘導:完成された成体の神経組織においても神経幹細胞・前駆細胞が残存している。この成体前駆細胞群が、上記の bHLH 型因子および種々の homeodomain 型転写因子を特異的に発現することを見出した。外傷性脊髄損傷、虚血性海馬損傷などの疾患モデルを用いて、これら因子を発現する神経幹細胞・前駆細胞の増殖・分化を個体レベルで操作することにより、損傷組織に新たなニューロンの再生を誘導することに成功した。さらに、虚血損傷後の再生海馬ニューロンはシナプス形成を介して既存の神経回路に組み込まれ、空間学習・記憶機能の回復に貢献し得ることを明らかにした。

5. シナプス形成グループ (浜 千尋)

神経回路は神経細胞間の機能的な結合により成立する。回路の構築単位である神経細胞はそれぞれ固有の発生プログラムを持ち、時間と共に多様な形態変化を示す。すなわち神経繊維が細胞体から伸長して特定経路上を走行し、最終的に標的細胞と特異的なシナプス結合を形成する。さらに、シナプス結合は発生途上および発生後に神経活動に依存して微調整されることも知られている。このようなダイナミックな現象は細胞内に目を転じると種々のシグナリングによって制御を受ける細胞骨格の編成、細胞内輸送などの問題に基礎を置いている。われわれは、神経発生において神経細胞が機能的回路を形成する過程に生じる多様な現象を捉え、そこに潜む制御機構と原理の解明にアプローチしている。

神経細胞から伸長する神経繊維は細胞骨格タンパク質に支えられてその繊維としての構造を保つだけでなく、それぞれ固有のパターンで枝分かれした後にシナプス構造を形成する。われわれはこのような神経繊維の維持と形態を制御する因子の同定を目指して特定の神経細胞内でゲノム上の任意の遺伝子を発現させる異所発現スクリーニングを行ってきた。

まず Gal4/UAS 発現系を用いてショウジョウバエの嗅覚記憶学習の中核であるキノコ体中の少数の神経繊維を GFP で視覚化すると共に、その細胞内でゲノム上の任意の遺伝子を 880 の異所発現系統(都立大学、相垣研究室により作成)とかけあわせることにより強制発現させた。その結果、

視覚化された神経繊維は多くの遺伝子の発現に対して鋭敏に形態変化を示すことがわかった。その中から繊維上に varicosity 様の構造を示すショウジョウバエの系統に絞って解析を続けた。原因遺伝子の候補となる遺伝子の欠失変異を作成したところ、そのホモ接合体ではキノコ体中の一部の繊維束が欠損していることが判明した。はたしてこの表現型が、該当する神経細胞自体が存在しないことによるのか、細胞体からの軸索伸長の異常によって生じるのかは今後の解析を待つ必要がある。

6. シナプス構造グループ(鈴木えみ子)

われわれのグループは、シナプスの形成や可塑的変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、シナプスの標的選択においてシナプス前細胞とシナプス後細胞とがダイナミックに相互作用する事を明らかにした。本年はこの相互作用において、どのような細胞表面分子が関わっており、それらが3次元的にどのように表現されているのかを解析する目的で、胚体壁筋系の免疫走査電子顕微鏡法を開発した。本年度に購入したオスミウムコーターを用いることにより、神経突起の表面に表現されている分子を免疫標識し3次元的な解析を行うことが可能になった。また、本年度はシナプスにおけるシグナル伝達系蛋白質の局在化機構を解析する目的で、視細胞の diacylglycerol kinase (DGK) の局在化機構について解析を行った。その結果、DGK に共通して存在するがその機能が不明であった cyctein-rich domain が DGK の細胞内局在に関与していることが分かった。

3. 研究実施体制

(1) 研究者名

非対称分裂グループ

松崎 文雄 東北大学加齢医学研究所・神経機能情報研究分野 教授

細胞間相互作用研究グループ

藤沢(瀬原)淳子 (財)京都大学再生医科学研究所・再生増殖制御学分野 教授

脊椎動物神経発生グループ

大隅典子 東北大学医学部器官構築学分野 教授

培養細胞グループ

中福雅人 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻
基礎神経医学大講座神経生物部門 助教授

シナプス形成グループ

浜 千尋 理研発生再生科学総合研究センター チームリーダー
神経回路発生研究チーム

シナプス構造グループ

鈴木えみ子 東京大学医科学研究所微細形態学研究部 助手

(2) 研究項目

非対称分裂グループ	神経幹細胞の非対称分裂の解析
細胞間相互作用研究グループ	細胞間相互作用による神経分化の解析
脊椎動物神経発生グループ	脊椎動物神経発生の組織化学的解析
培養細胞グループ	培養幹細胞株を利用した神経系の 遺伝子発現パターン解析
シナプス形成グループ	シナプスの形成と可塑性の分子機構の解析
シナプス構造グループ	シナプスの微細形態的解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

研究代表者 松崎文雄(非対称分裂グループ)

発表論文:なし

共同研究者

瀬原(藤沢)淳子(細胞間相互作用グループ)

発表論文:

- Shirakabe, K., Wakatsuki, S., Kurisaki, T., and Fujisawa-Sehara, A.: Role of Meltrin β in the processing of neuregulin. *J. Biol. Chem.*, 276, 9352-9358 (2001)
- Hiroyuki, A., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., and Yahara, I.: Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nature Neurosci.*, 4, 367-73 (2001)

大隅典子(脊椎動物神経発生グループ)

発表論文:

- 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)
- Yamasaki, T., Kawaji, K., Ono, K., Bito, H., Hirano, T., Osumi, N., & Kengaku, M.: *Pax6* regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. *Development*, 128, 3133-3144 (2001)
- Nagase, T., Nakamura, S., Harii, K., & Osumi, N.: Ectopically localized HNK-1 epitope perturbs migration of the midbrain neural crest cells in *Pax6* mutant rat. *Devel. Growth Differ.*, 43, 683-692 (2001)
- Shimoda, Y., Tajima, Y., Osanai, T., Katsume, A., Kohara, M., Kudo, T., Narimatsu, H., Takashima, N., Ishii, Y., Nakamura, S., Osumi, N., & Sanai, Y.: *Pax6* controls the expression of Lewis x epitope in the embryonic forebrain by regulating $\alpha 1,3$ -fucosyltransferase IX

expression. J. Biol. Chem., 277, 2033-2039 (2002)

英文総説

- Inoue, T., Nakamura, S., & Osumi, N.: Current topics in comparative developmental biology of vertebrate brains. Neurosc. Res., 39, 371-376 (2001)
- Osumi, N.: The role of Pax6 in brain patterning. Tohoku J. Exp. Med., 193, 163-180 (2001)
- Osumi, N. & Inoue, T.: Gene Transfer into Cultured Mammalian Embryos by Electroporation. Methods, 24, 35-42 (2001)

著書(分担執筆)

- 大隅典子、野地澄晴:別冊実験医学ザ・プロトコールシリーズ「ポストゲノム時代の免疫染色・*in situ*ハイブリダイゼーション」第2章-II 組織切片に対する免疫染色法 pp85-113, 2001 羊土社
- 大隅典子、野地澄晴:別冊実験医学ザ・プロトコールシリーズ「ポストゲノム時代の免疫染色・*in situ* ハイブリダイゼーション」第2章-III ホールマウント免疫染色法 pp114-126, 2001 羊土社
- 若松義雄、大隅典子:神経堤細胞のボディープラン 現代化学増,39, 28-39, 2001
- 野村 真、大隅典子:前脳の発生と関与遺伝子 生体の科学,52,182-186 (2001)
- 野村 真、大隅典子:哺乳類長期培養系における遺伝子導入 遺伝子医学,5, 101-105, (2001)

中福雅人(培養細胞グループ)

発表論文:

- Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K, Nakafuku M.: Combinatorial roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. Neuron, 31, 757-771 (2001)
- Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M.: Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. Exp. Neurol .,172, 115-127 (2001)
- Yamamoto N, Yamamoto S, Inagaki F, Kawaichi M, Fukamizu A, Kishi N, Matsuno K, Nakamura K, Weinmaster G, Okano H, Nakafuku M.: Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. J. Biol. Chem. ,276, 45031-45040 (2001)
- Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Kosako H, Nakatomi H, Yamamoto N, Takebayashi H, Nabeshima Y, Kitamura T, Weinmaster G, Nakamura K, Nakafuku M. :Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. J. Neurosci., 21, 9814-9823(2001)
- Kato M, Seki N, Sugano S, Hashimoto K, Masuho Y, Muramatsu M, Kaibuchi K, Nakafuku

M.: Identification of Sonic hedgehog-Responsive Genes by Using cDNA Microarray. BBRC. ,289, 472-478 (2001)

- Kobayashi D, Kobayashi M, Ogura T, Nakafuku M, Shimamura K.: Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. Development, 129, 83-93 (2002)
- Imai T, Tokunaga A, Yoshida T, Hashimoto M, Mikoshiba K, Weinmaster G, Nakafuku M, Okano H.: The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates the *m-numb* gene expression by interacting with its mRNA. Mol. Cell Biol., 21, 3888-3900 (2001)
- Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M, Miyazono K, Kishimoto T, Kageyama R, Taga T.: BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. PNAS,98, 5868-5873 (2001)
- Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Takebayashi H, Nakafuku M, Richardson W, Qiu M.: Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. Development, 129, 681-693 (2002)
- Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker K L, Hack M A, Chapouton P, Barde Y-A, Gtz M.: Glial cells generate neurons: The role of the transcription factor Pax6 Nat. Neurosci., 5, 308-315 (2002)

浜 千尋(シナプス形成グループ)

発表論文:なし

鈴木えみ子(シナプス構造グループ)

発表論文:

- S. Tsunoda, Y. Sun, E. Suzuki, C. Zuker., Independent anchoring and assembly mechanisms of INAD-Signaling complexes in *Drosophila* photoreceptors. J. Neurosci., 21,150-158 (2001)

(2) 特許出願:

国内1件