

「生物の発生・分化・再生」
平成14年度採択研究代表者

広海 健

(情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 教授)

「細胞内パターンニングによる組織構築」

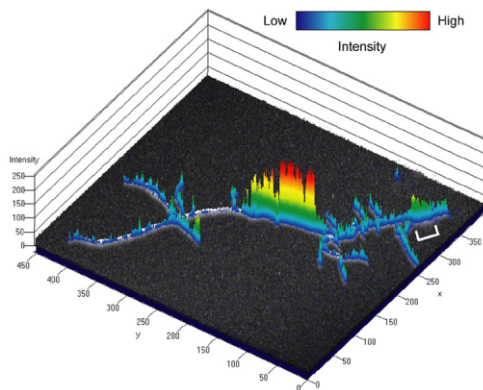
1. 研究実施の概要

組織構築に必要な様々な細胞運命の決定や個々の細胞に特異的な形態・運動の制御は、細胞間相互作用や細胞外の分泌因子による長距離作用によって担われていると考えられている。しかし、長い突起を持つ細胞では、細胞「内」の物質の分布が広範囲に影響を及ぼすことが可能である。我々は、「個々の細胞が組織全体のために何ができるか」という視点で組織構築をみなおし、発生原理の新しいフレームワークを構築しようとしている。そのため、長い細胞突起の代表例である神経軸索に焦点を絞り、「軸索内にはどのようなパターンがあり、それはどうやって形成されるか?」、「軸索内のパターンは組織構築にどのように寄与するか?」という二つの問題を解析している。

2. 研究実施内容

(1) 神経軸索の細胞自立的パターンニング

神経軸索の主要な役割は神経信号伝達であるから、軸索は信号を伝えるための一様なケーブルであると考えられがちである。しかし、神経系の中では軸索束などと相関して軸索の特定の区画のみに分子が局在できることは以前から知られていた。このような軸索内局在が細胞間相互作用の「結果」生じたものなのか、それとも細胞内に自立的にパターンが生じうるのかは今までほとんど解析されていない。そこで、ショウジョウバエ胚の低密度培養を用い、培養下で他の細胞との接触なしに軸索伸長を行った神経細胞軸索内の分子の分布を解析した。その結果、複数の分子種が細胞自立的に軸索内の区画に局在しうることが判明した(図参照)。局在のパターンは軸索の細胞体側 (proximal)、成長円錐側 (distal)、軸索中央部 (middle) の3種に分類でき、分子種により、局在パターンに違いがあった。しかし、異なる分子が局在する区画の境界は一致することが多く、軸索内には複数の分子によって認識される共通の位置情報や区画の境界があることが示唆された。



神経軸索に存在する「区画」。培養下の単一のショウジョウバエ神経細胞で、ある膜分子の存在量を定量化したもの。この分子は軸索中程の領域（区画）に集積している。このような分子局在は、神経系内での大局的な位置情報になりうる。かっちは細胞体。

（２）軸索ガイド分子ROBOによる縦走神経ガイダンス

細胞内分子局在が神経軸索のような長い細胞突起の中でおこれば、神経系全体の様な広い領域に位置情報を提供することができる。たとえば、分泌性の軸索ガイド分子Netrinはその受容体Frazzledが横行神経軸索内に局在することによって中枢神経系の側方の領域に集積する。我々はこのNetrin局在が縦走神経の走行に対するガイダンス情報を築くことを示してきた（*Nature* 406, 886-889, 2000）。一方、縦走神経の正確な道筋決定に必要な因子の一つには、正中線由来の反発性リガンドSlitの受容体ROBOがある。ROBO変異体では縦走神経が正中線方向に間違っ軸索を伸ばす。Frazzled依存的Netrinによる縦走軸索ガイダンスにおけるROBOの役割を解析するために、ROBOとFrazzled・Netrinの遺伝解析を行った。その結果、ROBOの変異症状はNetrinあるいはFrazzled変異によって抑制されることがわかった。ROBO変異での縦走神経の正中線への走行は、横行神経束上でFrazzledによって提示されたNetrinに沿っておこる。これらの結果は、ROBOはFrazzledによって提示されたNetrinへの反応性を抑制することを示唆している。Netrinによる縦走神経ガイダンス情報は各体節毎に繰り返し存在する。ROBOによるNetrin反応性の制御は、この繰り返し構造を貫いて縦走神経を走らせることに寄与しているのだろう。

（３）軸索側枝形成のプロテオーム解析

軸索内の位置情報を用いて行われることが予想される細胞現象の一つは、軸索の側枝の形成である。そこで、側枝形成に関与する分子を網羅的に同定する試みを開始した。嗅球軸索の側枝形成はある発生ステージになると急にはじまるので、側枝形成に係わる分子もこのステージの前後では劇的な発現変化がおこる可能性が高い。側枝が形成される前と後のステージの嗅球軸索を分取して、タンパク質の2次元電気泳動解析を行った結果、いくつか発現量に変化の見られるスポットが見つかった。

（４）線虫Netrin経路の分子遺伝解析

ショウジョウバエで見つかったNetrin受容体の細胞内局在によるNetrin再配置機構の普遍性を探るため、線虫のNetrin受容体であるUNC-5の細胞内局在の遺伝解析を開始した。unc-5はunc-51とunc-14との間で遺伝的相互作用があることを発見し、unc-51、unc-14変異体においてUNC-5の局在異常を見出した。UNC-51は出芽酵母のautophagyに必要なapg1p分子と相同なリン酸化酵素であるので、UNC-5の細胞内局在にはautophagyあるいはそれと

類似した小胞輸送の制御が重要である可能性が考えられた。さらに、UNC-51とLET-92 (PP2A触媒サブユニット) の結合およびその遺伝的相互作用が見いだされ、UNC-5の小胞輸送にリン酸制御を受ける可能性が示唆された。

(5) 軸索ガイダンスシグナルによる軸索内輸送の制御

軸索内のパターンニングには軸索内輸送が重要な働きをしている可能性が高い。そこで、軸索ガイド分子Sema3Aの刺激によって軸索内輸送が亢進するという現象を基盤とし、その分子機構の解明と輸送分子の同定を始めた。軸索内輸送の亢進には成長円錐部での蛋白翻訳開始因子eIF4Eの活性化を介する局所的蛋白合成系が関与することが判明した。さらに、Sema3Aの刺激によってその受容体複合体であるNeuropilin-1とPlexin-A4が細かい粒子状の形態で順行性及び逆行性に軸索輸送されることを見いだした。

(6) 新しいタンパク質機能破壊法の開発

分子の細胞内局在の生理的意義を解析するためには、細胞内の限られた領域だけで特定の分子の機能を破壊する技術の開発が必要である。そこで、蛍光蛋白質と融合した標的タンパク質の機能を蛍光蛋白質に対するレーザー分子不活性化法 (FP-CALI法) で破壊する方法の開発を開始した。現在、緑色蛍光蛋白質GFPの変異体cDNAライブラリーの中からCALI法のニーズに適った分子特性を有する変異体の同定を進めている。

3. 研究実施体制

遺伝研グループ

① 研究分担グループ長：広海健 (国立遺伝学研究所, 総合研究大学院大学, 教授)

② 研究項目

- (1) 神経軸索の細胞自立的パターンニング
- (2) 軸索ガイド分子ROBOによる縦走神経ガイダンス
- (3) 軸索側枝形成のプロテオーム解析

横浜市大グループ

① 研究分担グループ長：五嶋良郎 (横浜市立大学, 教授)

② 研究項目

- (1) 線虫Netrin経路の分子遺伝解析
- (2) 軸索ガイダンスシグナルによる軸索内輸送の制御
- (3) 新しいタンパク質機能破壊法の開発

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文 (原著論文) 発表

- Niwa, N., Hiromi, Y. and Okabe, M. (2004). A conserved developmental program for sensory organ formation in *Drosophila melanogaster*. **Nature Genet.** 36, 293-297.
- Yamada, T., Okabe, M., and Hiromi, Y. (2003). EDL/MAE regulates EGF-

mediated induction by antagonizing Ets transcription factor Pointed. **Development** *130*, 4085-4096.

- Yuasa, Y., Okabe, M., Yoshikawa, S., Tabuchi, K., Xiong, W.-C., Hiromi, Y. and Okano, H. (2003). Drosophila homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. **Development** *130*, 2419-2428.
- Liu, Q-X, Jindra, M. Ueda, H., Hiromi, Y. and Hirose, S. (2003). Drosophila MBF1 is a coactivator for Tracheae Defective and contributes to the formation of tracheal and nervous systems. **Development** *130*, 719-728.
- Cheng, Q., Sasaki, Y., Shoji, M., Sugiyama, Y., Tanaka, H., Nakayama, T., Mizuki, N., Nakamura, F., Takei, K., Goshima, Y. (2003). Cdk5/p35 and Rho-kinase mediate ephrin-A5-induced signaling in retinal ganglion cells. **Mol. Cell. Neurosci.** *3*, 632-645.
- Yau, D. M., Yokoyama, N., Goshima, Y., Siddiqui, Z. K., Siddiqui, S. S., Kozasa, T. (2003). Identification and molecular characterization of the G α 12-Rho guanine nucleotide exchange factor pathway in *Caenorhabditis elegans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** *100*, 14748-14753.
- Nishiyama, M., Hoshino, A., Tsai, L., Henley, J. R., Goshima, Y., Tessier-Lavigne, M., Poo, M. M., Hong, K. (2003). Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. **Nature** *424*, 990-995.
- Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T., Mizuno, K. (2003). Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. **J. Neurosci.** *23*, 2527-2537.
- Suto, F., Murakami, Y., Nakamura, F., Goshima, Y., Fujisawa, H. (2003). Identification and characterization of a novel mouse plexin, plexin-A4. **Mech. Dev.** *120*, 385-396.
- Goshima, Y. (2003). CRMP-2: an intracellular mediator protein for Semaphorin3A signaling. **Neurosci. Res.** *46*, Suppl.1, S24.