

「生物の発生・分化・再生」
平成14年度採択研究代表者

松崎 文雄

((独) 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
非対称細胞分裂研究グループ グループディレクター)

「脳構築の遺伝的プログラム」

1. 研究実施の概要

脳の発生に際立った特徴である神経細胞の多様性はいかなる遺伝的プログラムによって形成され、いかにして機能的な脳構築に組み込まれるのであろうか。複雑な脳の構築と機能を理解する上で、これらは根本的な問題である。

神経発生は、一層の神経上皮という2次元的情報が、多様な細胞からなる3次元の脳構築に変換される過程と捉えることができる。そこには3つの素過程、

1. 神経上皮の位置情報により、幹細胞が異なる個性を獲得する過程
2. 相異なる娘細胞を生じる非対称な細胞分裂によって多様性を増幅する過程
3. 幹細胞が順次異なる姉妹細胞を生じることにより多様性が増幅される過程

の存在することがショウジョウバエの研究から知られている。

脊椎動物の脳発生の場合、神経幹細胞は極めて複雑でダイナミックな運動を伴って分裂する。その非対称分裂は神経の運命決定にいかに関与しているのか。また、脊椎動物に固有な構築である階層構造やカラム構造などの機能的な構築は神経幹細胞システムからどのように発生するのだろうか。このような問題は未知の領域である。

本研究では、遺伝的解析の容易なショウジョウバエとマウスを実験系として、

1. 神経幹細胞が多様な神経細胞を生じる機構
2. 多様な神経細胞が秩序構造を形成する仕組み

を追求し、脳発生に共通の論理を導き出すと同時に、脊椎動物に固有な仕組みを発見することをめざす。

2. 研究実施内容

1) 脳構築プログラム解析グループ (松崎文雄)

a) ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂の解析。ショウジョウバエの神経幹細胞は娘細胞の運命と大きさの異なる典型的な非対称分裂を行う。娘細胞の大きさの違いを作り出すメカニズムを明らかにするため、神経幹細胞の非対称性に異常をきたす変異のスクリーニングで分離された系統のなかで、娘細胞の大きさが非対称性を失う二つの変異系統に

ついて解析を行った。その結果、3量体G蛋白質の β , γ サブユニットをそれぞれコードする遺伝子の変異であること、G $\beta\gamma$ シグナルが紡錘体の非対称性の形成に必須であることを見出した。一方、神経幹細胞では、細胞極性を制御するaPKC-Par3複合体とG α i-Pins複合体という二つのシグナル伝達系がapical側に局在し、娘細胞のサイズの非対称についても、両者が平行して機能することが知られている。G $\beta\gamma$ シグナルとapicalシグナルの関係を解析したところ、G $\beta\gamma$ シグナルはG α i-Pinsの非対称局在に必要とされるが、aPKC-Par3の局在には関与しないことが判明した。さらに、これらの突然変異系統の解析から、aPKC-Par3シグナル伝達系は主に運命決定因子の局在に機能し、G α i-Pinsは分裂軸の方位の決定に関与することが判明した。すなわち、これら2つのapicalシグナル系は互いに協調しながらも機能を分担している。

b) マウス神経形成の解析。神経前駆細胞からニューロンが形成される過程で、どのように細胞の運命決定がなされニューロンの個性が確立するのかを知ることを目的に、発生途上の前脳のスライス培養系で、神経上皮からニューロンの形成過程を3細胞周期にわたってリアルタイムで連続的に解析するシステムを確立した。その結果、subventricular (intermediate) zone で1度だけ分裂する中間的な前駆細胞から過半数のニューロンが産生されること、神経上皮細胞からニューロンにいたる細胞系譜のなかで、70%以上の分裂が非対称であることを見出した。この結果は、マウス前脳の神経細胞系譜が、ショウジョウバエの神経発生と極めて類似していることを示している。

2) 脳細胞構築研究グループ (宮田卓樹)

脳と網膜の細胞構築機構に関する研究を以下のように発展させた。(1) それまで起源および役割が謎であった大脳の「非脳室面分裂」に関して、蛍光色素を散発的に施した脳原基スライスの中に標識された前駆細胞を連続観察することで、その形態、細胞周期依存的移動、娘細胞の種類などについて前年度からの継続としてさらに探査し、ニューロン産生および配置に重要な存在であることを見出した。(2) 同じく大脳の「非脳室面分裂」に関して、15年度に新たに遺伝子導入による機能実験を数多く行ない、細胞運命決定に重要と知られてきた Neurogenin2 が分裂位置決定にも関わっていることを見出した。

(3) 網膜前駆細胞の分裂時の形態をスライス培養によって詳細に解析し、30年ほど前から電子顕微鏡など固定標本に対する研究結果にもとづいて信じられていた「前駆細胞は分裂中に突起を失い球状になって分裂する」という概念を覆す結果、すなわち「前駆細胞は突起をもったまま分裂し、娘細胞がその突起を相続し、相続された突起は娘細胞の移動に役立てられる」という結果を論文に発表した。(4) 同じく網膜スライスに対する長時間観察によって、従来手法的限界によって「対称」とみなさざるを得なかった「前駆細胞2つをつくる分裂」が、高頻度に「非対称」であること、すなわち、ペアになった娘前駆細胞の細胞周期進行速度、細胞周期依存的運動の軌跡、細胞産生能が異なることを見出し、上記論文に報告した。(4) 胎生期小脳のスライス培養を立ち上げ、ニューロンの誕生および移動を大脳、網膜と同様に解析していくための基盤を確立した。

3) 細胞移動研究グループグループ (大隅典子)

a) 神経幹細胞の細胞周期と核の移動の制御機構の解析

神経幹細胞として機能する神経上皮細胞の細胞周期と核のエレベーター運動は巧妙にコーディネートされており、幹細胞から適切な前駆細胞や神経細胞を生じるために重要な役割を果たしていると予想されるが、その制御機構はほとんどわかっていない。転写因子であるPax6は大脳皮質原基の神経上皮細胞に強く発現しているが、*Pax6*変異マウス胚の大脳皮質原基では、S期の細胞の分布異常、脳室帯での細胞分裂の増加が報告されている。*Pax6*変異胚においてエレベーター運動に異常が生じている可能性を検証するため、抗リン酸化ヒストン抗体による免疫染色によってラット胚大脳皮質原基における分裂期の細胞の分布を定量化したところ、*Pax6*変異ラット胚では正常胚に比べ脳室面での細胞分裂が少なく、脳室帯での細胞分裂が多いことが分かった。また、ラット胚大脳皮質のスライス培養標本を作製し、正常胚と*Pax6*変異胚のエレベーター運動を蛍光顕微鏡によりタイムラプス観察した結果、*Pax6*変異胚では核が脳室面に到達する前に分裂する細胞と、核が脳室面から離れる途中で分裂する細胞が多数観察された。以上から、*Pax6*変異胚ではエレベーター運動に異常が生じ、これが異所的な細胞分裂を引き起こしていると考えられた。また、タイムラプス観察により脳室面側 (apical) の細胞突起の固定に不具合が生じている可能性が考えられたため、今後Pax6の下流遺伝子を中心に細胞間接着装置や細胞内物質輸送マシナリーの局在様式について調べる予定である。

b) 神経細胞の移動を制御する分子機構の解析

*Pax6*変異ラットでは終脳の前部に嗅球が形成されず、異所性に終脳側面に嗅球様構造物が形成される。全胚培養および終脳器官培養を駆使して、神経前駆細胞を標識し、その移動様式を解析したところ、*Pax6*変異ラットでは嗅球を形成すべき僧帽細胞の移動が異常であることを突き止めた。さらに細胞移植により、この移動の異常は細胞非自律的であることを明らかにするとともに、*Pax6*変異ラット終脳に対して電気穿孔法により遺伝子導入することにより回復できることを見出した。各種遺伝子発現様式を検索した結果、*Pax6*変異ラット終脳ではFGF受容体遺伝子の発現が異なっていることから、終脳における神経細胞移動にFGFシグナルが関わる可能性が示唆された (Nomura & Osumi **Development**, 2004)。

4) 細胞間相互作用研究グループ (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。これまでに、ADAMファミリープロテアーゼメルトリンβが、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ARIA (acetylcholine receptor Inducing activity, またはニューレギュリン) を膜貫通領域直上部で切断し可溶型に変換する活性をもつこと、メルトリンβ欠損マウスを作成し、神経の束化に異常のあること、などを報告した (Kurohara et al., *Developmental Biol.*, 2004)。

本年度は、メルトリンβの神経筋接合部における役割を検討した。メルトリンβプロテアーゼ欠損マウスではの胎児では、横隔膜に投射する運動神経の束化が不全であること、アセチルコリンレセプターの神経下への集積が悪く、まばらであることがわかってきた。

現在、メルトリン β の関わる神経筋接合部形成の分子機構を検討中である。

一方、ARIAの活性化機構を知る手がかりとして、メルトリン β によるARIAの認識機構を研究してきた。メルトリン β とARIAは、形態形成過程において、ともにコレステロールリッチなmicrodomain、いわゆる膜ラフト画分に存在することを見出した。メルトリン β の膜ラフトへの局在には膜貫通領域が必須である。メルトリン β が膜ラフトに局在することは基質の切断を正に制御しており、膜ラフトに存在できないようなフォーム、たとえば、メルトリン β の膜貫通領域を、膜ラフトの外に局在するLDLレセプターの膜貫通領域に置換したキメラ分子は、基質の切断活性をもたない。そのことは、これらのプロテアーゼと基質をそこに運ぶことが切断に必要であることを示唆している (Wakatsuki et al., J. Neurochem., 2004)。今後、そのような観点からの研究も進めていきたいと考えている。

5) 細胞系譜研究グループ (一色孝子)

本研究は、ショウジョウバエ胚中枢神経系をモデル系として、神経細胞系譜が刻々と形成される分子メカニズムの解明を目的としている。ショウジョウバエ神経幹細胞においてはHunchback、Krüppel、Seven up、Pdm、Castor、Grainyheadという転写因子のセットが、順次発現され、分裂とカップルしてその発現が切り替わる。一方で、姉妹分化細胞では生まれた時に幹細胞から受け継いだ転写因子発現パターンが維持される。本研究では、これらの転写因子の発現を調節する機構や転写因子自身の機能の解析を行っている。

平成15年度は、この系譜形成メカニズムに含まれる新規因子の同定を目的として、データベースに登録されている遺伝子発現パターンに基づいて、神経系において時期特異的に発現される遺伝子を探索した。その結果、複数の線虫heterochronic遺伝子ショウジョウバエホモログをそのような遺伝子として見いだした。heterochronic遺伝子は線虫の幼虫発生において、細胞に時間的特性を与える遺伝子群として知られている。このことから、当グループが研究対象としているショウジョウバエ神経幹細胞系譜形成機構は、進化的に保存された時間的発生プログラムであることが確認できた。

3. 研究実施体制

脳構築プログラム解析グループ

- ① 研究分担グループ長：松崎文雄 (理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 非対称細胞分裂研究グループ・グループディレクター)
- ② 研究実施項目：脳の発生の遺伝的プログラムの解析

脳細胞構築研究グループ

- ① 研究分担グループ長：宮田卓樹 (理化学研究所 脳科学総合研究センター 細胞培養技術開発チーム・研究員)
- ② 研究実施項目：脳神経幹細胞とその子孫ニューロンの挙動の網羅的観察・記録

細胞移動研究グループグループ

- ① 研究分担グループ長：大隅典子（大学院医学系研究科・器官構築学分野・教授）
- ② 実施項目：神経前駆細胞と神経細胞の移動による脳構築プロセスの解析

細胞間相互作用研究グループ

- ① 研究分担グループ長：瀬原淳子（京都大学再生医科学研究所・再生増殖制御学分野・教授）
- ② 研究実施項目：細胞間相互作用の研究

細胞系譜研究グループ

- ① 研究分担グループ長：一色孝子（国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教授）
- ② 研究実施項目：神経幹細胞系譜形成の分子機構の解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文発表

研究代表者 松崎 文雄（脳構築プログラム研究グループ）

- Izumi, Y., Ohta, N., Itoh-Furuya, A., Fuse, N., and Matsuzaki, F., Differential functions of G protein and Baz/aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division. *J. Cell Biol.*, **164**, 729-738 (2004).
- Shirai T, Maehara A, Kiritooshi N, Matsuzaki F, Handa H, Nakagoshi H., Differential requirement of EGFR signaling for the expression of defective proventriculus gene in the *Drosophila* endoderm and ectoderm. *Biochem Biophys Res Commun.*, **311**, 473-477 (2003).
- Fuse, N., Hisata, K., Katzen, L.A., and Matsuzaki, F., Heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size asymmetry in *Drosophila* neuroblast divisions. *Curr. Biol.*, **13**, 947-954 (2003).

共同研究者

宮田 卓樹（脳細胞構築研究グループ）

- Saito, K., Kawaguchi, A., Kashiwagi, S., Yasugi, S., Ogawa, M., and Miyata, T.: Morphological asymmetry in dividing retinal progenitor cells. *Development Growth & Differentiation* **45**, 219-229 (2003)

大隅 典子（細胞移動研究グループ）

- Horie, M., Sango, K., Takeuchi, K., Honma, S., Osumi, N., Kawamura, K., and

- Kawano, K.: Subpial neuronal migration in the medulla oblongata of Pax-6-deficient Rats. **Eur. J. Neurosci.** **17**, 49-57, 2003
- Yamada R, Mizutani-Koseki Y, Hasegawa T, Osumi N, Koseki H, Takahashi N.: Cell-autonomous involvement of Mab2111 is essential for lens placode development. **Development** **130**, 1759-1770, 2003.
 - Fujino M, Osumi N, Ninomiya Y, Iseki S, Shibasaki Y, Eto K.: Disappearance of epidermal growth factor receptor is essential in the fusion of the nasal epithelium. **Anat Sci Int.** **78**, 25-35, 2003.
 - Endo, Y., Osumi, N, Wakamatsu, Y.: Deltex/Dtx mediates NOTCH signaling in regulating Bmp4 expression for cranial neural crest formation during avian development. **Devel. Growth Differ.** **45(3)**, 241-248, 2003
 - Nagase, T., Sanai, Y., Nakamura, S., Asato, H., Harii, K., and Osumi, N.: Roles of HNK-1 carbohydrate epitope and its symthetic glucuronyltransferase genes on migration of rat neural crest cells. **J. Anat.** **203**, 77-88. 2003
 - Kasai, K., Takahashi, M., Osumi, N., Sinnarajah, S., Takeo, T., Ikeda, H., Kehrl, J.H., Itoh, G., Arnheiter, H.: The G12 family of heterotrimeric G proteins and Rho GTPase mediate Sonic hedgehog signaling. **Genes Cells** **9(1)**, 49-58, 2004
 - Wakamatsu, Y., Endo, Y., Osumi, N., Weston, J. A.: Multiple roles of SOX2, a HMG-box transcription factor in avian neural crest development. **Dev. Dyn.** **229**, 74-86, 2004.
 - Nomura, T., and Osumi, N.: Misrouting of mitral cells in *Pax6/Small eye* rat telencephalon. **Development** **131**, 787-796, 2004

瀬原 淳子 (細胞間相互作用研究グループ)

- Wakatsuki S., Kurisaki T., Sehara-Fujisawa A. Lipid rafts identified as locations of ectodomain shedding mediated Meltrin β /ADAM19. *J. Neurochem.* **89**, 119-123 (2004)
- Kurohara K., Kurisaki T., Masuda A., Asano M., Katsuko Sudo, K., Nabeshima Y., Iwakura Y., and Sehara-Fujisawa A. Essential Roles of Meltrin β / ADAM19 in Heart Development. *Developmental Biol.*, **267**, 14-28 (2004).

一色 孝子 (細胞系譜研究グループ)

- Isshiki T, Doe CQ. Maintaining Youth in Drosophila Neural Progenitors. *Cell Cycle.* 2004 Mar;3(3):296-299.

(2) 特許出願

なし