

「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」

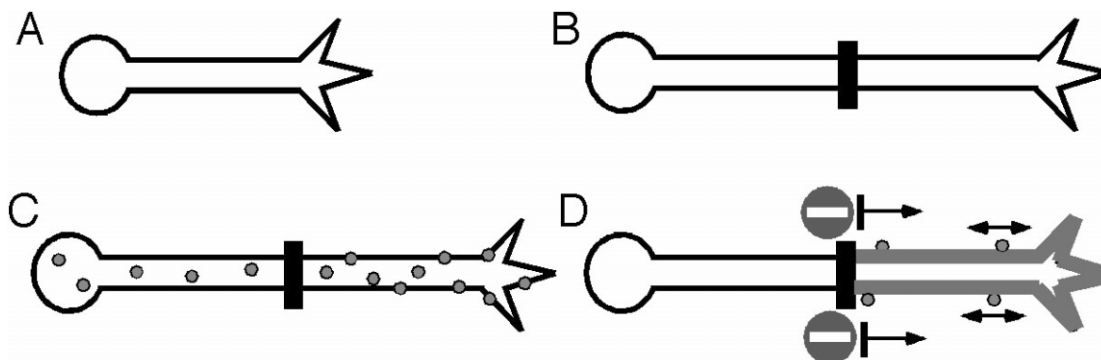
1. 研究実施の概要

神経細胞の特徴の一つはその長い突起 – 軸索と樹状突起 – である。これらの突起は神経系の広い領域をカバーしているので、神経活動情報を伝達するだけでなく、発生過程でも、突起の一領域に分子を運び局在させることによって組織全体に指令を送りうる。たとえばショウジョウバエ胚中枢神経系において、軸索ガイド分子Netrinの受容体であるFrazzledは、横行軸索の中で局在することによってNetrinを神経系側方に集積し、縦走神経のための軸索ガイドシグナルを形成する (Nature 406, 886-9, 2000)。つまり、神経系の回路構築に係わる基本的情報が神経細胞内の分子局在能力によって担われているのである。このような軸索内での分子の発現制御は、ショウジョウバエから哺乳類にいたるまで広く認められる現象であるが、その機構と意義についてはほとんどわかっていない。われわれは単一の神経細胞内の分子局在現象に着目し、そのメカニズムと組織全体の構築に対する役割を解析している。

2. 研究実施内容

(1) 細胞自律的な軸索内のコンパートメント化と分子の軸索内局在 (遺伝研グループ)
分子が神経軸索内の一部の領域に局在する機構を解析するために、軸索ガイダンス分子であるRobo受容体 (Robo, Robo2, Robo3) を取り上げた。1回膜貫通型タンパク質であるこれらのRobo受容体はすべて軸索の遠位端側に局在し、軸索の投射に必須の役割を果たしている。我々はショウジョウバエの神経細胞の低密度培養系を用い、(1) 神経細胞は自律的にRobo受容体の軸索内パターンを形成する能力を持っているか、(2) Robo受容体を軸索の特定の領域にとどめておくメカニズムは何なのか、の二つの点を検討した。単離された神経細胞において、Roboは軸索内に一様に分布した。このことは、Roboの局在には細胞外からのシグナルが必要であることを示唆する。一方、Robo2とRobo3は培養条件下でも軸索の遠位端に局在した。この結果は、神経細胞が自律的に軸索内に分子のパターンを形成しうることを示している。我々はまた、Robo3と相補的なパターンで軸索の近位端側に局在する分子があることを見出した。軸索内には複数の区画 (コンパートメント) が形成され、それぞれの区画に分子を特異的に輸送する仕組みが存在し、さらに区画内に分子を留

めることで分子の局在を維持しているのかも知れない。実際、FRAP法を用いて分子の動態を解析したところ、区画の境界で分子の動きが制限されていることが明らかになった。



膜タンパク質の軸索遠位部への局在機構の想像図

A, B: 軸索伸長と区画境界形成. C: 遠位部への選択的輸送. D: 区画境界によるパターンの維持. 左が細胞体, 右が成長円錐.

(2) Unc5によるNetrinの脱局在作用と反発性軸索ガイダンス (遺伝研グループ)

軸索内の分子の局在の意義として最も理解が進んでいるのは軸索ガイド分子Netrinのショウジョウバエ胚中枢神経系における局在である。Netrinは正中線で強く発現するが、その受容体Frazzledは横行神経で軸索内に局在している。Netrinは横行神経のための求心性シグナルとして作用した後、Frazzledと結合する事によってその分布を変え、引き続いて起こる縦走神経形成のために新しいガイド情報を作る (Hiramoto et al., 2000)。今回、Netrinのもう一つの受容体であるUnc5の作用機構を解析した。Frazzledとは異なり、Unc5にはNetrinを提示する性質は見いだされなかった。一方、Unc5はFrazzledによってNetrinが軸索束上に提示される事を抑制した。この作用はUnc5の細胞外ドメインが必要であった。

(3) 海馬軸索投射制御におけるPlexin-A2とPlexin-A4の役割 (遺伝研グループ)

軸索内の分子局在が神経組織内のグローバルな位置情報を提供できるのと同様、樹状突起の一区画に分子が局在できれば軸索投射のための位置情報となりうる。海馬では、軸索が標的細胞のごく一部の限定された領域に投射するという現象が知られているので、樹状突起内パターンの神経回路網形成における役割を解析するのに適した系である。海馬において、歯状回顆粒細胞はその軸索である苔状線維をCA3錐体細胞頂上樹状突起の基部に限定して投射する。Semaphorin受容体Plexin-A2とPlexin-A4はそれぞれ苔状線維の軸索投射が異常になるが、このうちPlexin-A2はCA3錐体細胞、つまり投射を受ける側の細胞が必要である。このことは、Plexin-A2が錐体細胞の樹状突起でそのリガンドの分布または活性を制御している可能性を示唆している。現在、Plexin-A2の局在とそのリガンドの分布を解析している。

(4) 軸索側枝形成期前後の嗅球軸索におけるタンパク質発現の比較 (遺伝研グループ)
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、発生過程の特定の時期にのみ側枝を伸ばす性質のあるマウス嗅球投射ニューロンを用い、側枝形成期に軸索内でおこる劇的な構造の再構成に関与する分子を網羅的に同定する試みを行っている。二次元電気泳動を用いて側枝形成前後の嗅球軸索におけるタンパク質発現の比較を行ったところ、側枝形成が起こる前と開始後のステージで発現量に差があるタンパク質のスポットが得られた。これらのタンパク質が軸索側枝形成に関わっている可能性が考えられる。

(5) *C. elegans*の軸索ガイダンス分子Netrinとその受容体の細胞内輸送機構 (横浜市大グループ)

ショウジョウバエで軸索内局在をする分泌性の軸索ガイダンス分子Netrinは、ショウジョウバエだけでなく、線虫から哺乳類まで種を超えて保存されている。Netrin受容体の構造も保存性が高く、線虫のUNC-40, UNC-5の2種のNetrin受容体はそれぞれショウジョウバエのFrazzled, Unc-5のホモログである。我々は線虫*C. elegans*を用いてNetrinとその受容体の分布の機構を解析している。UNC-6/Netrin, UNC-5/Netrin受容体ともに、軸索内を小胞状に輸送されることを見出した。また、*C. elegans*の軸索ガイダンスに関与している遺伝子の内、unc-51, unc-14変異体では、UNC-6/NetrinとUNC-5/Netrin受容体がともに神経細胞体に蓄積し、軸索上にはほとんど存在しないことを発見した。UNC-51はセリン/スレオニンキナーゼであり、*S. cerevisiae*のオートファジー (代謝的小膜輸送) に必要なApg1pの相同分子である。UNC-14は、小胞輸送に重要なRab, Rap等の低分子Gタンパク質の情報伝達に関わると考えられているRUNドメインを有している。これらの結果はUNC-51, UNC-14が、NetrinおよびNetrin受容体の細胞内小胞輸送を介して、軸索ガイダンスに重要な役割を演じている可能性を示唆している。

(6) 樹状突起およびスパイン形成におけるSema3Aの役割 (横浜市大グループ)

神経軸索先端の成長円錐に与えられた情報は、軸索のガイダンスだけでなく、細胞の運動や形態変化といった細胞全体の反応を引き起こしうる。たとえば神経軸索ガイド分子Sema3Aは、その受容体であるNeuropilin-1/Plexin-A複合体を介してチロシンリン酸化酵素Fynを活性化し、細胞内にシグナルを伝達する。Sema3Aシグナルの細胞内パターンニングへの寄与を調べるため、胎生16日の野生型マウスの大脳皮質初代分散培養系を作製してSema3A刺激による樹状突起およびspine形成における影響を検討した。Sema3Aは樹状突起の分枝形成を促進し、この促進効果はsrc型チロシンキナーゼの阻害剤によって遮断された。また、Sema3A刺激によってpost-synapseのマーカ分子の陽性spot数とpre-synapseのマーカ分子陽性spot数がともに増加した。一方、Sema3A遺伝子欠損マウスおよびFyn遺伝子欠損マウスでは、大脳皮質第V層錐体細胞の樹状突起の一定長当たりのspine密度が野生型に比ベ有意に低かった。これらの結果から、Sema3Aによって活性化される細胞内シグナルが、樹状突起の分枝形成、spine形成、presynapse形成といったグローバルな細胞反応を促進することが明らかになった。

(7) 時空間分解能を有する簡便な選択的分子不活化法の開発と適用 (横浜市大グループ)

興味ある分子の機能を簡便に不活化できれば、目的分子の機能解析の強力な方法となる。そこで我々は、抗原抗体反応とFITC蛍光色素によって選択的に分子不活性化を行うFluorophore-assisted light inactivation (FALI)法を適用して細胞培養系や器官培養系における簡便な分子不活化法の確立を試みた。まず簡便さを求め、通常の内熱球光を利用するFALI法の有効性を検討した。Semaphorin-3F (Sema3F)の受容体であるNeuropilin-2 (Nrp2)に対するFALI実験を行った結果、内熱球光の照射によりNrp2とSema3Fの結合が阻害された。次に、神経細胞の初代培養系において培養中に継続してFALI法を適用する条件を検討し、Nrp2に対するFALIでSema3F刺激による培養交感神経節細胞の成長円錐の崩壊応答を阻害することに成功した。また、長期間の培養を必要とする終脳の器官培養系においてもFALI法が適用可能であることが分かった。照射した任意の空間と時間で目的分子を簡便に不活化できる技術は、発生などの比較的長い時間の間、目的分子を継続的に不活性化できる強力な実験ツールになると考えられる。

(8) 新規蛍光プローブを用いた生体内におけるCaspase活性のモニタリング (東大グループ)

細胞の運命決定、形態変化、分裂といった細胞現象の過程では、様々なタンパク質修飾反応や切断反応が細胞内の限られた場所で起こり、局所的な生理変化を制御している。このような分子反応を可視化する技術は細胞内パターンニングの理解に不可欠である。我々は生体内でのモニタリングを試みる細胞内の分子反応の一例として、カスパーゼによるタンパク質切断反応を取り上げた。カスパーゼはアポトーシスの際に活性化されるプロテアーゼであるが、アポトーシス以外の様々な細胞現象にも関与されていることが示唆されており、組織構築に重要な働きをしている。我々はカスパーゼの活性を検出する新しい蛍光プローブを作成した。このプローブはYFPとRFPをカスパーゼ切断配列を含むリンカーで接続し、両末端に別々の細胞内局在シグナルを付加した融合タンパク質で、切断前はYFPとRFPは共局在するが、カスパーゼによって融合タンパクが切断されると、YFPとRFPが個別の細胞内局在を示すようになる。このプローブを導入したショウジョウバエ培養細胞及びトランスジェニックフライを用い、アポトーシスの際に活性化される内在性カスパーゼ活性の検出に成功した。

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) 軸索内パターンニングの神経発生における役割
 - (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

東大グループ

① 研究分担グループ長：三浦正幸（東京大学，教授）

② 研究項目

- (1) caspase活性可視化技術の開発
- (2) ショウジョウバエcaspaseの遺伝解析

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- Kanai, M. I., Okabe, M. and Hiromi, Y. (2005). Seven-up controls switching of transcription factors that specify temporal identities of *Drosophila* neuroblasts. **Dev. Cell** *8*, 203-213.
- Jindra, M., Gaziova, I., Uhlirova, M., Okabe, M., Hiromi, Y. and Hirose, S. (2004). Coactivator MBF1 preserves the redox-dependent AP-1 activity during oxidative stress in *Drosophila*. **EMBO J.** *23*, 3538-3547.
- Niwa, N., Hiromi, Y. and Okabe, M. (2004). A conserved developmental program for sensory organ formation in *Drosophila melanogaster*. **Nature Genet.** *36*, 293-297.
- Li, C., Sasaki, Y., Takei, K., Yamamoto, H., Shouji, M., Sugiyama, Y., Kawakami, T., Nakamura, F., Yagi, T., Ohshima, T. and Goshima, Y. (2004). Correlation between semaphorin3A-induced facilitation of axonal transport and local activation of a translation initiation factor eukaryotic translation initiation factor 4E. **J. Neurosci.** *24*, 6161-6170.
- Yamatani, H., Sato, Y., Fujisawa, H. and Hirata, T. (2004). Chronotopic organization of olfactory bulb axons in the lateral olfactory tract. **J. Comp. Neurol.** *475*, 247-260.
- Tozaki, H., Tanaka, S. and Hirata, T. (2004). Theoretical consideration of olfactory axon projection with an activity-dependent neural network model. **Mol. Cell. Neurosci.** *26*, 503-517.
- Kawasaki, T., Takagi, Y., Yamatani, H. and Hirata, T. (2004). Systematic screening and identification of the antigens recognized by monoclonal

antibodies raised against the developing lateral olfactory tract. **J. Neurobiol.** *62*, 330-340.

- Aizawa, H., Sato, Y., Maekawa, M., Fujisawa, H., Hirata, T. and Yuasa S. (2004). Development of the amygdalohypothalamic projection in the mouse embryonic forebrain. **Anat. Embryol.** *208*, 249-264.
- Ohsawa, S., Hamada, S., Kakinuma, Y., Yagi, T. and Miura, M. (2005). A novel function of neuronal PAS domain protein 1 (NPAS1) in erythropoietin expression in neuronal cells. **J. Neurosci. Res.** *79*, 451-458.
- Arai, H., Furuya, T., Yasuda, T., Miura, M., Mizuno, Y. and Mochizuki, H. (2004). Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1 β and expression of caspase-11 in mice. **J. Biol. Chem.** *279*, 51647-51653.
- Kakinuma, Y., Saitoh, F., Osawa, S. and Miura, M. (2004). A mechanism of impaired mobility of oligodendrocyte progenitor cells by tenascin C through modification of Wnt signaling. **FEBS Lett.** *568*, 60-64.
- Kakinuma, Y., Saitoh, F., Ohsawa, S., Furuichi, T. and Miura, M. (2004). A sulfatase regulating the migratory potency of oligodendrocyte progenitor cells through tyrosine phosphorylation of β -catenin. **J. Neurosci. Res.** *77*, 653-661.