「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

(理化学研究所 発生再生科学総合研究センター 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かだろうか。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) 少数の幹細胞から多数の分化細胞をつくりだす非対称分裂は、自律的なメカニズムと非自律的なメカニズムに大別される。ショウジョウバエの生殖幹細胞のように、隣接するニッチ細胞が幹細胞の維持に必要とされる場合、娘細胞の一方だけがニッチ細胞と相互作用するよう細胞分裂の方向が制御され、その結果、幹細胞と分化した細胞が生じる。他方、ショウジョウバエの神経幹細胞のように自律的に非対称分裂を行う場合、細胞運命の決定因子が娘細胞の一方に不等分配される。この場合も、分裂軸

の方向は運命決定因子の局在と一致するよう厳密に制御される。このように分裂の非対称性が自律的な仕組によるか否かにかかわらず、非対称分裂には細胞の分裂軸の定位が重要な役割を果たす。

ショウジョウバエ神経幹細胞では、リン酸化シグナルを伝達する aPKC-Par3 複合体とGタンパクシグナルを担う Gαi-Pins 複合体(受容体非依存的)という二つのシグナル伝達系が細胞表層の一部に局在し、非対称分裂を制御することが知られている。この2つのシグナルの役割を詳細に解析した結果、2つの細胞内シグナル系は互いに協調しながら機能を分担していること、aPKC-Par3 シグナルは主に運命決定因子の局在に、Gαi-Pins は分裂軸の方位の決定に関わることが判明した。そして、Pins と相互作用する因子が分裂軸の制御を行うと想定し、Pins 結合因子を探索した結果、脳の形態異常変異の原因遺伝子である mushroom body defect (mud)が同定された。mud 変異体では上皮細胞と神経幹細胞の両方で分裂軸の方位に異常が観察されることなどから、Mud は星状体微小管と相互作用することにより Gαi-Pins 複合体の下流で分裂軸の方位を制御していることが明らかになった。

b) 哺乳類の神経発生では、神経上皮細胞が神経前駆細胞として働き、繰り返し分裂することによって、神経上皮細胞自身や中間的な前駆細胞、神経細胞などが様々な組み合わせで生じてくる。本研究グループでは、神経上皮細胞から神経細胞が生じる過程でいかなる細胞の多様性が生じるのかという問題を単一細胞レベルで追及している。平成17年度には、胎生期マウス大脳由来の多数の神経前駆細胞から、mRNAの存在比を正確に反映したcDNAを作成することに成功し、単一細胞由来のcDNAを多数得た。位置情報遺伝子や細胞周期マーカー遺伝子の発現を定量的PCRで調べることによってこれらの細胞をまず大まかに分類した。その分類群の代表的な単一細胞由来cDNAについてマイクロアレイ解析を行い、網羅的に発現量を比較することにより、それぞれの分類群の関係を推測することができた(リンケージ解析)。さらに、それぞれの分類群の細胞種に高い発現特異性を示す遺伝子の解析に着手した。in situ hybridization による脳内発現パターンと単一細胞の定量的PCRの解析から、いくつかの神経前駆細胞種に特異性の高い発現を示す遺伝子が同定されている。

2) 脳細胞構築研究グループ(宮田卓樹)

哺乳類の神経前駆細胞は、細長い形態をとり、脳室面において周囲の前駆細胞とアドヘレンスジャンクションを形成し合うことで、集団として神経上皮シートを維持している。この神経上皮の成り立ちの原理を知ることが、その後に重層化が進むことで形成されることになる脳全体の構築の仕組みを解明する上で非常に重要である。神経前駆細胞の「細長い」構造および周囲との連結には、個々の前駆細胞にとっての「脳室側(apical 側)か脳膜側(basal 側)か」という極性決定が必須である。横浜市立大大野茂男研究室が作成した atypical PKCλを胎生中期に脱落させたコンディショナルノックアウトマウス大脳原基における前駆細胞の挙動をスライス培養によって解析する機会を得て(共同研究)、本来脳室面を構成すべき突起が抜けて脳膜側に虚脱するという異常現象をライブでとらえることができた(in press).

この「脳室側突起の抜去」という現象は、実は、正常な発生現象としても観察される。脳室面で誕生したニューロンあるいは「ニューロン作りに専門化した前駆細胞」が、脳膜方向へ細胞体を移動させる際に、この現象はおこる。これらの娘細胞のうち誕生時に親細胞から脳膜面にまで達する突起を相続するものは、当初は親と同様の双極型をしているが、脳室側突起抜去により単極型に変わる。この「双極 → 単極」変化の間、脳膜側突起の長さが不変であるにもかかわらず細胞体の挙上(脳膜方向への移

動)が果たされる.この移動様式は,既存の原理(「先端突起の中へ核を潜り込ませる」)では説明しがたい(核の挿入により先端突起は短縮するはずなので).じつは,この「双極→単極」変化中の脳膜側突起が S 字あるいは L 字の形態をとることが頻見され,脳膜側突起に秘められた物理的性状の理解がこの新規移動様式を説明するために必須であると判断された.そこで,突起の切断,細胞骨格阻害剤投与を大脳皮質原基スライス培養下に行ない,突起のよじれと引っ張りの存在が示唆された.

また、網膜の前駆細胞から産生される娘細胞の挙動を観察した結果、姉妹細胞同士で密に寄り添う場合と、周囲の細胞たちと位置を入れ替え合い姉妹が離れる場合の二通りがあると分かった。さらにこれらのパターンの出現頻度が網膜原基の未分化度およびWntシグナル強度と関係していることも示唆された。

3)細胞移動研究グループ (大隅典子)

Pax6 遺伝子は転写因子をコードしており、中枢神経系の初期発生に重要な役割を果たしている。Pax6 は、発生初期の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固定標本を用いた免疫染色により示され、INM に異常が生じている可能性が示唆されていた。そこで本研究では、Pax6 変異胚で見られるであろう INM の異常をタイムラプス観察することを出発点として、INM を制御するメカニズムの解明を目指した。まず、脂溶性色素 Dil を用いた大脳皮質原基スライス培養法により、野生型ラット胚と Pax6 変異ラット胚の神経上皮細胞の核の挙動をタイムラプス観察し、Pax6 変異胚神経上皮細胞で観察された異常がINM の異常に起因することを確認した。

次に、Pax6 変異ラット胚で観察された異常な INM の原因を究明するにあたり、脳室面側に存在する細胞内機構に着目し解析を行った。まず、脳室面側の突起先端部に存在する細胞間接着装置 (adherens junction) について免疫染色および電子顕微鏡により観察したところ、野生型と Pax6 変異胚の間で明らかな差は認められなかった。また、免疫染色ならびに電子顕微鏡により神経上皮細胞の中心体の局在を調べたところ、Pax6 変異ラット胚において中心体の局在や中心体に付随する一次線毛 (primary cilia) の形成が乱れていることが観察された。さらに、大脳皮質原基スライス培養法ならびに子宮内胎児操作を併用した電気穿孔法により、神経上皮細胞の INM と中心体の挙動を同時にタイムラプス観察したところ、野生型胚では S-G2 期に中心体は脳室面側にじっと止まっているのに対し、Pax6 変異胚では S-G2 期にかけて中心体が頻繁にその位置を変えており、その結果、異常な INM が起きることが強く疑われた。

4)細胞間相互作用研究グループ (瀬原淳子)

骨格筋のアセチルコリンレセプターAChR は、五量体イオンチャネルで、発生過程において $\alpha2\beta\gamma\delta$ の胎児型から $\alpha2\beta\delta\epsilon$ の成体型に置換される。その重要性は、ヒトにおいては・サブユニットの変異が重症筋無力症の原因の一つである事などからも分かるが、この置換機構は不明である。そもそも成体型は、筋繊維上で胎児型と同じ場所に集まり置き換わるのか、それとも空間的に異なる場所に新たなシナプスを形成するのか? そこで、神経筋接合部(neuro-muscular junction:NMJ)形成機構の解明の一端として、 γ,ϵ サブユニットの変換が個体の発達期に、どのように達成されるのかを調べた。まず、

 γ 、 ϵ サブユニットに対する特異抗体を作成し、 α サブユニットに特異的に結合する α ブンガロトキシンで全神経終板(シナプス後膜)を標識して、その変換が生後のどの時期に起こるのかを詳細に調べた。生後 4 日まではほぼ全ての神経終板が γ 陽性、 ϵ 陰性であるのに対し、生後 5 日(P5)には ϵ 陽性の神経終板の割合が増え始め、P7 には γ , ϵ 陽性のそれぞれの神経終板の割合が逆転した。従来の報告に比べ、変換は生後初期に、短期間のうちに起こる事がわかった。次に、P5-7日に生じるサブユニットの変換は個々の神経終板内で起こる現象か否かを調べた。これは、抗 ϵ 抗体を直接蛍光標識し、抗 γ 抗体と α ブンガロトキシンとの三重染色を成功させ、初めて見る事が出来た。P5 の横隔膜では、 γ サブユニットに比べ、 ϵ サブユニットの染色強度が弱く、P7 ではそれが逆転した。最も注目すべき事は、これら γ , ϵ サブユニットは P5,P7 のいずれにおいても、同一の神経終板内で発現していた事である。これまで漠然と捉えられていたサブユニットの変換現象は、成体型が新たな神経終板を形成するのではなく、生後短期間に同一シナプスで起こる、まさに「置換」現象である事を明らかにした。P5-P7 の時期は、新生マウスの筋線維で軸索の退縮 (axon elimination)が活発に起きている時期とほぼ一致し、AChR のサブユニットの置換は神経との相互作用の何らかの変化に依存する現象であることが考えられる。

5)細胞系譜研究グループ (一色孝子)

神経幹細胞の個性は常に一定ではなく時間とともに変化していく。このため、一つの幹細胞は多様な子 孫神経細胞を一定の順番で作り出すことができる。ショウジョウバエ神経幹細胞では、時間特異性を決 定する一連の転写因子群が順次発現される。この発現制御のメカニズムはしだいに明らかになってきて いるものの、未知の点が非常に多く残されている。 昨年度までに、これまで明らかにされていなかった 時間変化の後半過程を特定の転写因子群の発現変化というかたちでとらえる系を確立した。本年度は、 この系を用いて、後期特異的転写因子群の機能の解析を行った。その結果、Castor(Cas)という Zn フィ ンガーと AT-hook を合わせもつタンパクが、全ての後期特異的な転写因子群の発現に必須であり、な おかつ Castor の発現終了が後半の系譜形成の進行のキューとなっていることを明らかにした。これと似 通った機能を時間変化の前半過程においては Hunchback という別の Zn フィンガータンパク質が担って いることが知られている。しかしながら、時間変化の前半と後半とでは発現される遺伝子群が全く異なり、 結果として違う性質を持つ神経細胞が生成される。また、マウスの spinal cord では、AT-hook を持つ Sox9 が神経幹細胞の neurogenic から gliogenic への時間的変化を制御していることが報告されている。 以上のことをふまえ、Castor の分子作用機序をより深く理解する目的で、Castor と結合するタンパク質の 同定を進めており、現在までに4つの有力候補を得ている。胚発生期の時間変化を終えた神経幹細胞 は、一旦休眠状態に入った後に幼虫期にその性質を非常に変化させて分裂を再開する。当グループで は時期特異的転写因子の発現とこの休眠のタイミングの関係についても、ほぼ明らかにしつつある。

3. 研究実施体制

脳構築プログラム研究グループ

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、グループディレクター)

②研究項目: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(名古屋大学大学院医学系研究科・細胞生物、教授)
- ②研究項目: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

- ①研究分担グループ長:大隅 典子(東北大学大学院医学系研究科形態形成解析分野、教授)
- ②研究項目: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、教授)
- ②研究項目: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、助教授)
- ②研究項目:研究項目 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

(1) 論文(原著論文)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)

O Izumi, Y., Ohta, N., Hisata K., Raabe, T. and Matsuzaki, F. Drosophila Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. Nat. Cell Biol., in press

共同研究者

宮田 卓樹 (脳細胞構築研究グループ)

- O Ueno, S., Kondo, M., Miyata, K., Hirai, T, Miyata, T., Usukura, J., Nishizawa, Y., Miyake, Y.: Physiological function of S-cone system is not enhanced in rd7 mice Experimental Eye Research 81: 751-758 (2005)
- Miyata, T., Saito, K., Nishizawa, Y., Murayama, A., Masaoka, M., and Ogawa, M.: Modern slice culture for direct observation of production and migration of brain neurons. Nagoya J. of Med. Sci. 67: 65-70 (2005)
- O Uematsu, J., Nishizawa, Y., Hirako, Y., Kitamura, K., Usukura, J., Miyata, T., Owaribe, K.: Both type-I hemidesmosomes and adherens-type junctions contribute to the cell-substratum adhesion system in myoepithelial cells. European Journal of Cell Biology 84: 407-415 (2005)

大隅 典子 (細胞移動研究グループ)

- O Tomita, Y., Matsumura, K., Wakamatsu, Y., Matsuzaki, Y., Shibuya, I., Kawaguchi, H., Ieda, M., Kanakubo, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., Osumi, N., Okano, H. and Fukuda, K. Cardiac neural crest cells as dormant multipotential stem cells in the mammalian heart. *J Cell Biol.* 2005;170(7), 1135–1146.
- Arai, Y., Funatsu, N., Numayama-Tsuruta, K., Nomura, T., Nakamura, S.and Osumi, N. Role of Fabp7, a downstream gene of Pax6, in maintenance of neuroepithelialcells during early embryonic development of the rat cortex. *J. Neurosci.* 2005;25(42), 9752-9761.
- Ogawa, Y., Takebayashi, H., Takahashi, M., Osumi, N., Iwasaki, Y. and Ikenaka, K. Gliogenic radial glial cells show heterogeneity in the developing mouse spinal cord. *Dev Neurosci*. 2005;27(6), 364-377.
- Nomura, T., Holmberg, J., Frisen, J. and Osumi, N. Pax6-dependent boundary defines alignment of migrating olfactory cortex neurons via the repulsive activity of ephrin-A5. Development 2006;133, 1335-1345.

瀬原 淳子 (細胞間相互作用研究グループ)

- O Peduto, L., Reuter, V.E., Sehara-Fujisawa, A., Shaffer, D.R., Scher, H.I., Blobel, C.P.. ADAM12 is highly expressed in carcinoma-associated stroma and is required for prostate tumor progression. Oncogene, in press
- Yumoto, N., Wakatsuki, S., Sehara-Fujisawa, A.. The acetylcholine receptor γ-to-ε switch occurs in individual endplates. Biochem. Biophys. Res. Commun, 331, 1522-1527 (2005)