「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　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、そこにはいくつかの基本的な素過程が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。他方、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、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。

平成 18 年度は、以下のような研究成果が得られた。

１）　ショウジョウバエとマウスの神経幹細胞で、神経幹細胞の細胞極性と分裂軸の制御が神経発生にとって重要な役割を果たしていることを明らかにした（脳構築プログラム解析グループ）。

２）　細長い上皮形態をとる神経幹細胞のねじれ弾性が、分裂によって生じた娘細胞の移動などを通して脳構築に寄与すること、また、その性質に形成に働く細胞内骨格を同定した（脳細胞構築研究グループ）。

３）　*Pax6* 変異胚で認められた神経幹細胞の核の運動異常および中心体の挙動異常に関連する分子をマイクロアレイ法により探索し、細胞骨格・接着関連因子 FEZ および delta-catenin が神経上皮細胞の先端側に局在し、これらのプロセスに関与する可能性を示唆した（細胞移動研究グループ）。

４）　ADAM ファミリーに属する膜型プロテアーゼ、メルトリンβのノックアウトマウスの解析から、この分子が、神経冠細胞の遊走とりわけ、心室中隔・弁形成にかかわるが神経冠細胞の働きに必須であることを証明した（細胞間相互作用研究グループ）。

５）　転写因子発現で表される神経幹細胞の時間変化が、娘細胞の個性だけでなく、神経幹細胞の休眠やその後の成虫神経系の形成に関わる現象も制御していることを明らかにした（細胞系譜研究グループ）。

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分裂軸と細胞極性の制御

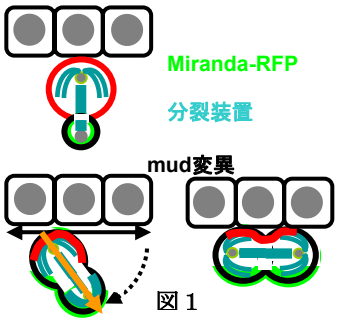


図１

上皮細胞がその細胞極性に分裂軸を直交させることで等分裂を行うのに対して、ショウジョウバエの神経幹細胞は、細胞極性に平行に分裂することによって非対称分裂を行う。このように、細胞の分裂軸の方位は極性を持つ細胞の分裂が対称性か非対称であるかを決定する。我々は、神経幹細胞と上皮細胞のどちらにおいても、受容体シグナルを必要としないGタンパク質シグナル（Gαi-Pins 複合体）が、分裂軸の方向の決定に必須であることを明らかにしてきた。その分子機構を知るため、突然変異のスクリーニングと、Pins に直接結合する因子の検索を行った。その結果、脳の構造に影響を与えることが知られていた Mushroom body defect (Mud)遺伝子が、分裂軸の方向の制御に働くことがわかった。分裂軸と細胞極性が一致しない mud 変異体では、正常に非対称分裂を行うものもあるが、分裂軸と細胞極性が直行してしまった結果、等分裂となるものがあることも判明した。この因子は上皮細胞と神経細胞の分裂軸の制御にも必須である。また、線虫から人まで種を超えて Mud と機能的に相同な因子が存在することから、Gαi-Pin-Mud という複合体は分裂軸の方位決定の一般的な機構を担っていると考えられる。

b. マウス神経幹細胞の細胞系譜と分裂軸のリアルタイム解析

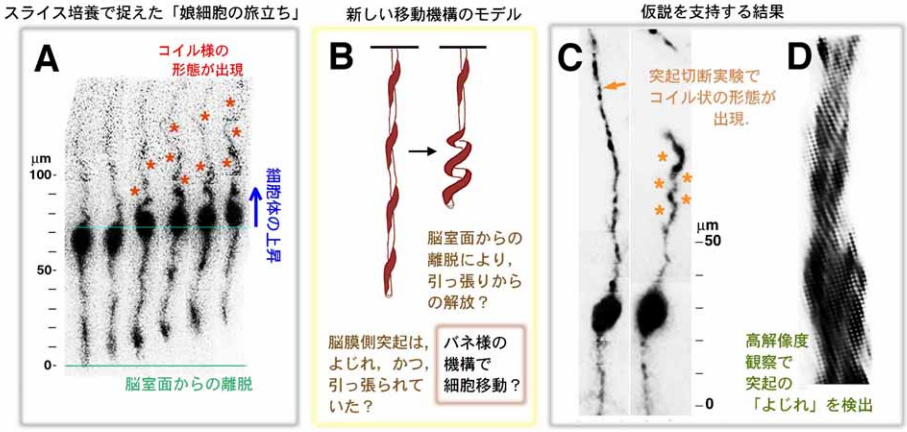
脊椎動物の神経系の発生では、神経上皮細胞が胚性神経幹細胞（apical progenitor）として働き、細胞核がダイナミックな運動（エレベーター運動）を繰り返しながら、脳室面で分裂することにより、それ自身と neuron や basal progenitor を生じる。他方、subventricular zone で分裂する basal progenitor は、ショウジョウバエの神経母細胞と同様、一度だけ分裂して２個の神経を生じる。マウス神経発生は、発現する遺伝子や前駆細胞の性質について、ショウジョウバエの神経発生に類似点が見られる一方で、大変ダイナミックであり、幹細胞から neuron が生じる仕組みについて、不明な点が多い。

ショウジョウバエの神経幹細胞では、G 蛋白シグナルに制御された分裂軸の方向が非対称分裂の制御に決定的な役割を果たすことが我々の研究から明らかになったが、マウス胚性神経幹細胞の場合、分裂軸の方向自体がいまだ議論の対象となっている。我々のグループでは、細胞極性に対する分裂軸の方向が神経幹細胞の分裂にいかなる役割を果たすかという視点から、マウス胚性神経幹細胞の分裂様式を解析してきた。方法論としては、胚性神経幹細胞が分裂する際の分裂軸方向を人為的に改変し、その効果をリアルタイムで追跡することを中心とする。そのため、分裂軸を制御するショウジョウバエ遺伝子の相同遺伝子のノックアウトや強制発現を行った。その結果、*in vivo* では神経幹細胞が脳室面に対して水平な分裂を行うことが胚性神経幹細胞の性質と機能の維持に重要な意味を持つことを示す結果が得られた。

2)脳細胞構築研究グループ(宮田卓樹)

細胞挙動の観察を続け，娘細胞の「旅立ち」に関する新知見を得た．観察の過程で注目

された「力・機械的作用が脳の形成に貢献するか否か，もしイエスならばいかにしてなのか」との問題に取り組み，娘細胞の保有する突起が「よじれ＋引っ張り」から解放されることで「バネ」のように働き，速やかな核・細胞質移動，すなわち効率的な脳の「建築」に貢献することを見いだした．各々の細胞骨格成分に対する個別の阻害実験を通じて，中間系フィラメントがよじれ形成に強く貢献していること，すなわち，双極型細胞の体内で中間系フィラメントが微小管，アクチンフィラメントという他の細胞骨格繊維と「建材」としての役割分担をしていることが分かった．



3)細胞移動研究グループ （大隅典子）

Pax6 変異胚で認められた INM の異常および中心体の挙動異常に関連する分子の候補を探索するために、マイクロアレイ法により *Pax6* 変異胚で発現が低下している因子の中で、細胞骨格や細胞接着に関連することが知られている FEZ および delta-catenin に着目した。免疫染色の結果、FEZ1 および delta-catenin ともに、神経上皮細胞の先端側に特異的な局在が認められ、*Pax6* 変異胚終脳ではその発現が著しく低下していた（図１）。一方、N-cadherin、Par3、Par6 など、上皮細胞の先端側に局在が報告されている他の因子については、*Pax6* 変異胚で発現変化が認められなかった。現在、FEZ1 および delta-catenin の発現量の低下について Western blot により検証するとともに、FEZ1 および delta-catenin の機能阻害を行うために、子宮内電気穿孔法による遺伝子導入を用いた RNA 干渉法の実験系を確立しつつある。

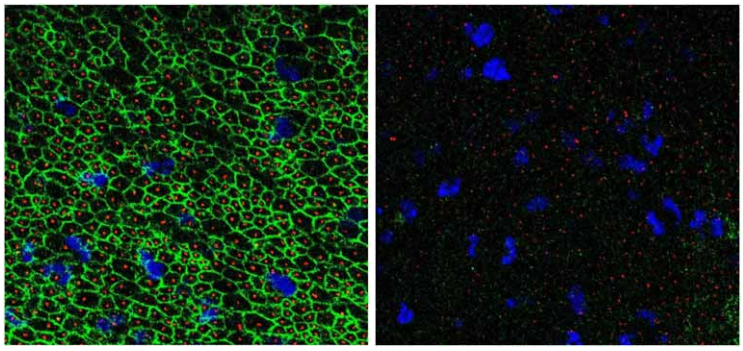


図１：野生型（左）および *Pax6* 変異（右）ラット胚終脳片 whole mount 免疫染色試料を脳室面から共焦点顕微鏡観察した像。*Pax6* 変異胚では delta-catenin（緑）の発現が著しく低下している。青：中心体を示す gamma-tubulin の染色

4）細胞間相互作用研究グループ （瀬原淳子）

これまでに、メルトリンβ遺伝子ノックアウトマウスの解析から、この遺伝子が心臓形成および末梢神経の束化に関与することなどを見い出した。しかし、培養細胞を用いた研究として、グリア増殖因子とメルトリンβを共発現させれば後者がプロテアーゼの活性を有することが観察できるものの、マウスの表現型からは、この分子がプロテアーゼとして働いているのかどうかはわからない。また、どの細胞系譜におけるメルトリンの発現が、心臓形成や末梢神経の束化に関与するのか、これは生理的な基質を同定する上で知っておかなければならない情報である。そこで、メルトリンβがどの細胞系譜で必要とされ、そしてプロテアーゼとして機能するのかどうかを、遺伝学的な検証を試みてきた。

まず、メルトリンβ欠損マウスの表現型が100％の個体で見られる心臓形成に着目し、次の研究を行った。胎生期の心臓では、メルトリンβは心内膜床と呼ばれる間葉組織で発現している。この組織は心内皮細胞から上皮間葉転換によって生じる間葉細胞および心臓へと移動してくる神経堤細胞によって構成される。まず心臓形成におけるそれらの細胞の挙動を観察するため各細胞系譜特異的に発現する遺伝子のプロモーターを利用した Cre マウス（Tie2-Cre マウス(内皮細胞系譜)、P0-Cre マウス(神経堤細胞系譜))を、Cre 依存的に LacZ を発現するトランスジェニックマウスとかけ合わせて、これらの細胞系譜の何らかの挙動にメルトリンβが必要かどうかを検討した。その結果、メルトリンβは内膜組織形成後期に行われる心内膜丘の癒合に必要であることがわかった。 次に、Cre 依存的にメルトリンβを発現するトランスジェニックマウスを作製し、各細胞系譜特異的なメルトリンβの発現による機能回復を試みたところ、神経堤細胞特異的にメルトリンβを発現させると心室中隔欠損および一部の弁形成不全が回復した。中隔欠損・弁形成不全が、神経堤細胞におけるメルトリンβの発現により特異的に回復することを示したことで、心室中隔・弁形成におけるメルトリンβ及び心臓神経堤細胞の関与を遺伝学的に証明することができた。この研究は、未だよくわかっていない心臓形成における神経堤細胞の役割を知る上で重要な知見をもたらしたと同時に、メルトリンβのプロテアーゼとしての機能を検証し、生理的基質を同定・証明する手法を得ることができた。現在、同様の手法で神経組織形成におけるメルトリンβの役割、そしてプロテアーゼとしての機能についての研究を行っている。

5）細胞系譜研究グループ （一色孝子）：非公開

3. 研究実施体制

（1）「脳構築プログラム研究」グループ（松崎　文雄）

①研究者名

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

(2)「脳細胞構築研究」グループ(宮田　卓樹)

①研究者名

宮田　卓樹(名古屋大学　大学院医学系研究科　細胞生物学分野　教授)

②研究項目

・大脳皮質，網膜など，層構造を有する中枢神経系組織の形成過程における細胞挙動を三次元培養法によって解析する.

・細胞挙動の原理探求のために，遺伝子導入，薬剤投与，細胞操作などの機能的実験を三次元培養下に行う.

(3)「細胞移動研究」グループ(大隅　典子)

①研究者名

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

(4)「細胞間相互作用研究」グループ(瀬原　淳子)

①研究者名

瀬原　淳子(京都大学　再生医科学研究所　教授)

②研究項目

・グリア細胞産生機構

・神経分化における ADAM の役割

・シナプス形成

(5)「細胞系譜研究」グループ(一色　孝子)

①研究者名

一色　孝子(情報・システム研究機構　国立遺伝学研究所　助教授)

②研究項目

・ショウジョウバエをモデルとした神経幹細胞の細胞系譜解析

4. 成果発表等

(1)論文発表(原著論文)

○Fujimura Y., Iwashita M., Matsuzaki F. and Yamamoto T.

MDGA1, an IgSF molecule containing a MAM domain, heterophilically associates with axon- and muscle-associated binding partners through distinct structural domains.

Brain Res. 1101,12-19. (2006).

○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. 8***, 586-593 (2006).

宮田　卓樹 （脳細胞構築研究グループ）

○ Miyata, T., Ogawa, M. Twisting of neocortical progenitor cells underlies a spring-like mechanism for daughter cell migration. ***Curr. Biol.*** 17, 146-151, 2007

○Ochiai, W., Minobe, S., Ogawa, M., Miyata, T. Transformation of pin-like ventricular zone cells into cortical neurons. Neurosci. Res. 57, 326-329, 2007

○Imai, F., Hirai, S., Akimoto, K., Koyama, H., Miyata, T., Ogawa, M., Noguchi, S., Sasaoka, T., Noda, T, and Ohno, S.: Inactivation of aPKCλ results in the loss of adherens junctions in neuroepithelial cells without affecting neurogenesis in mouse neocortex. ***Development*** 133, 1735-1744, 2006

○Muto, T.,, Miyata, T., Kashiwagi, S., Miyawaki, A., and Ogawa, M.: Dynamic behavior of individual cells in developing organotypic brain slices revealed by the photoconvertable protein Kaede. ***Exp. Neurol.*** 200, 430-437, 2006

○Naruse, M., Nakahira, E., Miyata, T., Hitoshi, S., Ikenaka, K., and Bansai, R: Induction of oligodendrocyte progenitors in dorsal forebrain by intraventricular microinjection of FGF-2. ***Dev. Biol.*** 297, 262-273, 2006

○Zou, P., Muramatsu, H., Miyata, T., and Muramatsu, T.: Midkine, a heparin-binding growth factor, is expressed in neural precursor cells and promotes their growth. ***J. Neurochem.*** 99, 1470-1479, 2006

大隅　典子 （細胞移動研究グループ）

○De Pietri Tonelli D, Calegari F, Fei JF, Nomura T, Osumi N, Heisenberg CP, Huttner WB. Single-cell detection of microRNAs in developing vertebrate embryos after acute administration of a dual-fluorescence reporter/sensor plasmid.. *Biotechniques* 41(6), 727-732, 2006

瀬原　淳子 （細胞間相互作用研究グループ）

○ Irie, N., Sehara-Fujisawa, A.. (2007) The vertebrate phylotypic stage and an early bilaterian-related stage in mouse embryogenesis defined by genomic information. *BMC Biology,* 5:1

○Yokozeki, T., Wakatsuki, S., Hatsuzawa, K., Black, R.A., Wada, I., Sehara-Fujisawa, A.. (2007) Meltrin β/ADAM19 Mediates Ectodomain Shedding of Neuregulin β1 in the Golgi Apparatus: Fluorescence Correlation Spectroscopic Observation of the Dynamics of Ectodomain Shedding in Living Cells. *Genes to Cells*, 12(3): 329-43

○Dyczynska E, Sun D, Yi H, Sehara-Fujisawa A, Blobel CP, Zolkiewska A.. (2007) Proteolytic processing of delta-like 1 by ADAM proteases. *J Biol Chem.*, 282(1): 436-44

○Tanabe, C., Hotoda, N., Sasagawa, N., Sehara-Fujisawa, A., Maruyama, K. & Ishiura, S.. (2007) ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP <alpha>-secretase in A172 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 352(1):111-7.

○Komatsu, K., Wakatsuki, S., Yamada, S., Yamamura, K., Miyazaki, J., Koni, P.A., Sehara-Fujisawa, A.. (2007) Meltrin β expressed in cardiac neural crest cells is required for ventricular septum formation of the heart, *Developmental Biology*, 303(1):82-92.

○Weskamp, G., Ford, J.W., Sturgill, J., Martin, S.,Docherty, A., Swendeman, S., Broadway, N., Hartmann,D., Saftig, P., Umland, S., Sehara-Fujisawa, A., Black, R.A., Ludwig, A., Becherer, J.D., Conrad, D.H. and Blobel, C.P.. (2006) ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *nature immunology*, 7(12):1293-1298.

○Peduto, L., Reuter, V.E., Sehara-Fujisawa, A., Shaffer, D.R., Scher, H.I., Blobel, C.P.. (2006) ADAM12 is highly expressed in carcinoma-associated stroma and is required for prostate tumor progression. *Oncogene*, 25(39):5462-6.