

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「Genetic dissectionによる神経回路網形成機構の解析」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名 (研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

岡本 仁 (理化学研究所脳科学総合研究センター グループディレクター)

主たる共同研究者

政井 一郎 (理化学研究所 政井独立主幹研究ユニット ユニットリーダー
(平成14年4月～))

東海林 互 (東北大学加齢医学研究所 助手(平成14年4月～))

豊田 敦 (理化学研究所横浜研究所ゲノム科学総合研究センター
上級研究員(平成16年4月～))

舟橋 淳一 (東北大学加齢医学研究所 助教授(平成16年4月～))

二階堂 昌孝 (埼玉大学理学部生体制御学科 助手(平成16年4月～))

川上 厚志 (東京工業大学大学院生命理工学研究科 助教授
(平成16年4月～))

佐藤 淳 (東京工科大学バイオニクス学部 助教授(平成16年4月～))

3. 研究内容及び成果

本研究では、脳を構成する神経細胞が分化し神経回路を形成する過程に関与する遺伝子を系統的に同定するために、ゼブラフィッシュを用いて神経回路網(特に運動神経)の形成に異常を持つ突然変異体の大規模スクリーニングを行い、そのスクリーニングの結果得られた突然変異の原因遺伝子をクローニングすることを第一の目的とした。

更にゼブラフィッシュ胚において、任意の遺伝子を任意の時期と組織で発現誘導できるケージド mRNA 法を用い、遺伝子の異所性発現を行うことによって、脳の形成に関わる遺伝子の機能解析を行うことを第二の目的とした。

I: 神経系突然変異系統の大規模スクリーニング

発生過程の後脳では、それぞれの運動神経細胞が誕生した後、それぞれの運動神経細胞ごとに特有な移動と軸索伸展様式を示す。顔面運動神経細胞は、第4菱脳節で誕生し、第6菱脳節間で後方移動する。迷走運動神経細胞は、第7～9菱脳節の腹側正中付近で誕生するが、背外側に移動し、運動神経核を形成する。後核の三叉運動神経細胞は、正中付近で誕生した後、側方に移動し、最終的には、腹外側の白質層内に移動する。これらの運動神経細胞の軸索は、後脳の外で、それぞれに特有な経路に沿って伸展し、分岐する。

このような振る舞いが比較的単純なことから、後脳運動神経細胞は、神経細胞の分化、移

動、標的認識の機構を調べる上で、最も単純なモデルシステムとなる。後脳の構造は脊椎動物の進化を通じて高度に保存されている。我々は、このことを利用し、脊椎動物の中でも最も単純な神経系を持ち、胚が透明で、胚操作や遺伝学的解析を容易に行えるゼブラフィッシュを用いて、それぞれの後脳運動神経細胞が、分化し移動し軸索伸展する過程の各ステップごとに特異的に影響を及ぼす突然変異系統を単離した。さらに、それらの原因遺伝子を究明することによって、神経細胞誕生から機能を開始するまでの過程に重要な役割を果たす遺伝子を、発生段階の順に系統的かつ網羅的に同定することを目指した。

そのために、我々は運動神経細胞特異的に GFP を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュを作製し、これに突然変異を誘発し、生きた胚を観察することによって、突然変異を同定するという、世界で最初のスクリーニング法を採用した。また、複数の研究グループと共同することによって、他の神経分化の局面にも着目し、突然変異系統を単離した。

合計で 1572F2 ファミリー、1817 ゲノムをスクリーニングし、
[1]後脳運動神経細胞の分化(誕生、細胞移動、軸索伸展)

[2]網膜の層形成

[3]側線神経の伸展

[4]耳胞と三半規管の分化

の過程に異常を示す突然変異を合計 109 系統確立することに成功した。これらのうちのポジショナルクローニングを進めた結果、現在までに以下のことが明らかになってきた。

運動神経細胞の移動の突然変異の解析から、

顔面運動神経細胞の移動異常の突然変異群は、細胞平面極性と上皮極性に関わる遺伝子群に欠損を持っていた。モザイク解析の結果、これらの遺伝子群は、神経上皮細胞で働き、移動中の顔面運動神経細胞が、基底膜側から逸脱するのを防いでいることが明らかになった。同じような分子メカニズムは、哺乳類の後脳で働いているだけでなく、大脳皮質の形成においても、神経前駆細胞の脳室帯から軟膜側への移動などにおいても共通して働いていることが期待され、細胞平面極性遺伝子群の新たな機能として注目されている。

迷走運動神経細胞の背外側への移動では、誕生から目的地に達するまでの全ての段階に特異的に影響を及ぼす突然変異系統を単離することに成功した。さらに、ポジショナルクローニングの結果、正しい目的地を通り過ぎて、背側まで運動神経細胞が移動してしまう突然変異では、タンパク質の糖鎖付加過程の異常が疑われ、細胞移動の停止において糖鎖の果たす役割の重要性が示唆された。

三叉運動神経細胞の腹外側への移動に異常を示す突然変異の解析から、細胞移動制御蛋白の遺伝子のエピジェネティックな修飾の重要性が示唆された。

運動神経細胞の軸索伸展の突然変異の解析から、

既知の軸索伸展制御因子が、経時的に正しい組合せで発現することの重要性が示唆された。運動神経細胞とは関係が知られていなかった転写因子が、成長因子の受容体発現を介して、軸索伸展を制御している可能性が示唆された。さらに、新規の因子が、軸索伸展に特異的に関わる事が明らかになった。

網膜の層形成の突然変異の解析から、

HDAC3 が、神経幹細胞の分裂と分化のスイッチングに関わることを明らかにした。さらに、N-Cadherin 突然変異体の解析から、細胞極性と、細胞接着と、細胞増殖の関係を明らかにした。

側線神経の伸展異常の突然変異系統群の中から、

神経系腹側正中構造の分化異常の突然変異(you)を同定し、ポジショナルクローニングの結果、背中側正中に発現するのに、腹側正中で発現するソニック・ヘッジホグの機能を阻害する細胞外マトリックスタンパクを同定することに成功した。

II: ケージド mRNA による時空間特異的遺伝子発現制御技術の開発

ゼブラフィッシュで単離された遺伝子の機能を詳細に解析するために、UCSD の Roger Tsien 教授の研究室で新規のケージド化合物 6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycoumarin (Bhc-diazo)の合成に成功した古田寿昭博士(東邦大)と共同研究を行い、試験管内で合成した mRNA のリン酸基に、新規に合成された光感受性ケージング用試剤 6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycoumarin (Bhc-diazo)をエステル結合し、mRNA の翻訳活性を可逆的に不活化し、長波長の紫外線照射によって Bhc を再解離させ、再び mRNA の活性を回復することができる技術を開発した(mRNA ケージング法)。

さらに、mRNA ケージング法による異所的遺伝子発現誘導と標的遺伝子発現阻害法の併用による形質救済効果を指標とした遺伝子機能間のエピスタシス解析により脊椎動物前脳発達の制御に関わる Six3 と Lhx2 の支配関係を明らかにした。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

ゼブラフィッシュを用いて脊椎動物神経系形成に関する多数の突然変異を生成単離し、その遺伝子を同定してクローニングすることにより、神経回路網形成の分子機構を明らかにしようとする大規模な計画であったが、多数の突然変異が分離されて、その一部に関する詳しい解析にまで到ったことは高く評価できる。突然変異体分離のために、脳神経の発生過程を継続的に半透明な生きた胚の中で可視化する技術を完成させたことが実験の効率向上に不可欠であった。当面は既知遺伝子の再発見という側面も大きいですが、それはこの実験系が順調に成果を生み出しつつあることの証拠と言うこともできる。この種の研究では突然変異体の分離

だけでは論文にならず、その遺伝子同定と機能解析にまで至る必要があるが、当初の心配を乗り越えて、Neuron, EMBO J., Development, Current Biology などのトップジャーナルに成果が次々と発表できる段階に達したことは高く評価できる。この規模の脊椎動物遺伝子のスクリーニングと機能解析は大学などの研究室規模では困難であるが、理化学研究所の環境とCRESTの支援があって初めて可能であったと考えられる。今後は、得られた多数の突然変異の詳細な解析から脳神経系の回路網形成に関する遺伝子基盤の解明を徹底的に進める必要があるが、その段階では大学や他の研究機関の研究者との共同研究がなお一層重要になるであろう。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

線虫やショウジョウバエのような無脊椎動物の神経系形成に関する網羅的な解析は既に成熟期に達しているが、脊椎動物実験系では神経系の構造の複雑さに加えて飼育交配に時間がかかるなどの困難を抱えている。一方でマウスやゼブラフィッシュのようにゲノムの全貌も明らかになる実験系が続々と生まれ、ゲノム全体を対象として神経系関連等の遺伝子の網羅的な同定が急務となっている。そのなかで本プロジェクトがとりあげたゼブラフィッシュは半透明な胚の中で神経系や軸索伸長を可視化して継時的に研究できるという大きな長所を持っている。海外はむろんのこと国内でもゼブラフィッシュの突然変異分離の試みはいくつかあるが、本研究はその規模の大きさと神経系可視化の技術の応用において大きな特徴があり、また得られた突然変異体を広く公開していこうという姿勢も高く評価できる。本プロジェクトで明らかにできた遺伝子機構の解析に加えて、今後の研究の発展に資する研究資源の蓄積ができたことは科学技術研究への大きな貢献である。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

特になし。