

## 研究課題別事後評価結果

### 1. 研究課題名： 脳構築の遺伝的プログラム

### 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

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)

#### 主たる共同研究者

宮田 卓樹 (名古屋大学大学院医学系研究科 教授)

大隅 典子 (東北大学大学院医学系研究科 教授)

瀬原 淳子 (京都大学再生医科学研究所 教授)

一色 孝子 (情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 准教授)

### 3. 研究内容及び成果

#### 研究の構想

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。神経幹細胞の形成から始まり、決定論的な神経発生を行うショウジョウバエに対し、極めて複雑でダイナミックな脊椎動物の脳発生は理解が進んでいない。本研究では、ショウジョウバエとマウスを実験系として、神経幹細胞が多様な神経細胞を生じ、脳の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した。

#### 脳構築の遺伝的プログラムの解析 (理研CDB 松崎グループ)

##### 1) ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂と細胞極性制御

ショウジョウバエ神経幹細胞は、一定の方向に生じる小さな神経母細胞に、運命決定因子を不等分配する。この非対称分裂の分子遺伝学的解析にから、神経幹細胞の非対称分裂とそれを制御する極性シグナルの普遍的側面を探ることをめざした。

##### 1) 娘細胞のサイズの非対称性を制御

ショウジョウバエの神経幹細胞の分裂が形態的非対称性を失う二つの突然変異の解析から、3量体G蛋白シグナリングが分裂装置の非対称化に働くことを明らかにした (Fuse et al. Curr. Biol. 2003)。

##### 2) 自己複製と分化の制御

形態的にも運命決定因子の分配に関しても対称な分裂を行う神経幹細胞を遺伝学的に作製し、等価な娘細胞が分化するか増殖に向かうかは、発生の段階に依存することを明らかにした。(北島、布施ら、投稿準備中)

##### 3) 神経幹細胞の細胞極性シグナル系の役割分担

神経幹細胞の極性制御シグナルのうち、aPKC-Par3-Par6 複合体は運命決定因子の局在を制御し、他方、Gαi-Pins は分裂軸の方位の決定に必須であり、機能分担を行っていることを明らかにした (Izumi et al. JCB 2004)。

##### 4) 分裂軸を定位する因子の同定

神経幹細胞と上皮細胞の分裂において、分裂軸の方向を制御する Gαi-Pins の下流因子 Mud を Pins の結合因子として同定した。Gαi-Mud-Pins (Goloco 蛋白質)の複合体は種を超え

て保存されていることから、分裂軸の方位を制御する一般的な仕組みであることを提唱した (Izumi et al. Nat Cell Biol. 2006)。

## II) 哺乳類神経発生の解析

### 1) 神経幹細胞が神経細胞を産むメカニズム: 分裂軸の果たす役割

極端に伸張した上皮構造を持つ脊椎動物神経幹細胞は上皮極性に平行に分裂することにより、非対称分裂を行い幹細胞と神経細胞を生じるとされてきた。しかし、その分裂方向には異論も多く、その仕組みについては混沌としていた。このプロジェクトでは、まず、野生型で、神経上皮(幹細胞)の分裂が上皮面に平行であることを確定し、その際、apical 面は娘細胞の両方に引き継がれることを明らかにした。次に、Pins のホモログ LGN 遺伝子をノックアウトすると、分裂軸の方位がランダム化すること、その結果、apical 面を失い、神経上皮細胞が、basal 側で細胞分裂を行う異常な前駆細胞へと変換されることを明らかにした。さらに、マウス *Inscuteable* 遺伝子の強制発現により apic-basal 方向の分裂を引き起こし、娘細胞の運命をリアルタイムで追跡した結果から、幹細胞の細胞質の basal 側に分裂能を与える能力が局在していると推測された。これらの結果から、マウス胚性神経幹細胞は上皮面に水平な分裂により上皮性を保つことで、自己複製を行うこと、また、apical-basal 極性と分裂軸と方位を制御することで娘細胞の運命を決定しているのではないことが判明した (Konno et al. Nat. Cell Biol. 100, 93-101(2008))。

### 2) 神経幹細胞の単一細胞解析: ショウジョウバエの知見に依存しないアプローチ

神経前駆細胞の単一細胞 cDNA を多数作成し、遺伝子発現をゲノムワイドに分析し、さらに発現パターンの知見をあわせ、(1) 神経幹細胞 (apical progenitor) と中間前駆細胞 (basal progenitor) はグローバルに遺伝子発現が異なること、(2) 神経幹細胞 (apical progenitor) は常に Notch シグナルの活性化を必要とすること、(3) この中間前駆細胞は Notch 基質である Delta の一過的な発信源であることを明らかにした。この結果から、「分化細胞が未分化な幹細胞を維持する」という feedback システムが機能していることが判明した。この方法論は、この他にいくつかの細胞間シグナルの関与を示唆しており、この解析法の有効性が実証された。(Kawaguchi *et al.* 投稿中)。

## 脳構築研究グループ(名古屋大学医学研究科 宮田卓樹)

発生中の脳の生切片をライブ観察することから、大脳皮質原基では、分裂位置の異なる深部分裂型前駆細胞 (basal progenitor) の存在を同定した (Mityata et al., Development 131, 3133, 2004)。さらに神経上皮前駆細胞の細長いプロセスが弾性要素として働き、核・細胞質移動に貢献することを見いだした (Miyata and Ogawa, Curr. Biol. 17, 146, 2007)。

## 細胞移動研究グループ(東北大学 大隅典子)

神経幹細胞の細胞周期と核の移動の制御機構を *Pax6* 遺伝子変異体を用いて解析し、細胞周期と核のエレベーター運動に関して知見を得た (Tamai *et al.* Genes Cells. 2007)。また、*Pax6* の下流遺伝子として脂肪酸結合タンパク質をコードする *Fabp7* を見いだした (Arai, Y. et al. *J. Neurosci.* 2005)。

## 細胞間相互作用研究グループ(京都大学 瀬原淳子)

グリア増殖因子 (neuregulin) 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膜分子 ADAM プロテアーゼ、メルトリン  $\beta$  のノックアウトマウスの解析から、副腎の節前神経繊維の束

化過程と (Kurohara *et al.*, Developmental Biol. 2004)、心臓形成の際に、神経堤細胞でこの分子が必要とされることが明らかになった (Komatsu *et al.* Developmental Biol. 2007)。

#### 神経幹細胞の時間的変遷研究グループ (国立遺伝学研究所 一色孝子)

ショウジョウバエ中枢神経系をモデル系として、神経幹細胞の時間変化を解析した。その重要なステップとして、神経幹細胞が休眠に入る際に働く因子を同定し、その仕組みの大筋を明らかにした。

#### 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

論文発表は十分にレベルの高い雑誌に適切に行われている。ショウジョウバエの神経幹細胞の細胞極性制御と非対称分裂の分子機構の研究は研究代表者が従来から世界的にもリードしてきた分野であり、その分子機構の解明の発展が順調に進展し、Curr. Biol., Nature Cell Biol., J. Cell Biol. などに報告された。これらは期待通りの大きな成果である。本研究計画では、ショウジョウバエで詳細に明らかにされた神経幹細胞の増殖と分化の機構が哺乳類脳の神経幹細胞の発生分化にどこまで応用できるか、哺乳類固有の機構があるのかを明らかにすることも主たる目標であるが、その成果についてはまだ投稿中あるいは印刷中の論文が多い。ショウジョウバエに比べてマウスの神経上皮の幹細胞発生はさらに複雑であり、空間的な規則性が明確でなかったり、部域差が著しいなど研究の難しさを考えるとやむを得ないと考えられる。しかし、投稿中であった主要論文のひとつが年末に Nature Cell Biol. に発表され、これまでの定説を修正するその内容が注目されている。今後これに続く他の論文が発表されることにより、十分に高い評価が定まることが期待できる。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

ショウジョウバエの神経幹細胞に関する研究はいわば従来からの研究の継続であり、順調に進展した。特に新たに Mud の関与を明らかにして、娘細胞の非対称性の分子機序、apical/basal 極性の制御機構、分裂軸の位置決定の機構など一連の重要な過程を明らかにすることに成功している。さらに、その進展が哺乳類の神経幹細胞の発生分化にどこまで応用できるかを示す成果が出始めていることは、重要な貢献である。

従来からの哺乳類神経系の研究者を共同研究者として協力体制を整備したこと、それを通してショウジョウバエ研究の厳密な方法論や考え方を哺乳類脳研究に導入したことは、科学技術開発の進展に新しい視点を導入したとも言え、今後の脳神経系の研究への貢献度は十分に高い。マウスの神経幹細胞の発生分化の過程には、ショウジョウバエとのアナロジーで進められる部分もあるが、異なる面も多いことが明らかにされたことも重要である。特にマウス大脳皮質スライス培養系での特定の幹細胞の持続的な観察による細胞分裂の継時的追跡、神経幹細胞への siRNA の導入や遺伝子強制発現、単一細胞由来の遺伝子発現プロファイルの決定など、ショウジョウバエで培ってきた分子遺伝技術の応用に成功したことはめざましい功績である。それらの結果として、脊椎動物神経細胞の分裂軸と非対称分裂の神経分化に関する教科書的な知識が必ずしも正しくないことを示す成果も得られている。神経幹細胞の科学を将来応用に結び付けていくための重要な基礎的知見の精密化に貢献するとともに、技術革新にも成功しつつあり、本計画の戦略目標に合致した十分な成果が得られたものと評価できる。今後は、哺乳類神経幹細胞のより詳しい同定や分類の確立、個々の細胞で見るときの遺伝子発現のばらつきなど、ショウジョウバエではあまり問題にならなかった困難をどのようにして克服していくのかなど、課題も多い。マウスの利用は分子遺伝技術の応用という意味では不可欠であるが、細胞分裂軸や単一細胞の遺伝子発現などの研究にマウスが最適であるという保証は必ずしもない。そのような研究戦略上の工夫もいま一つ必要な段階が近づいているのではないだろうか。

4－3. その他の特記事項（受賞歴など）

特記事項なし