

「脳を知る」
平成 8 年度採択研究代表者

藤澤 肇

(名古屋大学大学院理学研究科 教授)

「神経結合の形成、維持、再編成を制御する分子機構の解明」

1. 研究実施の概要

脳機能発現は神経結合の構造的な再編成をも伴う神経結合の可塑的变化に依存している。従って、脳機能の発現機構を理解するためには、神経結合の形成とその維持、精密化、強化、再編成を制御する分子機構の解明が重要である。このような観点にたって、神経線維のガイダンスや神経結合の形成に関与する因子、分子の検索とその機能解析を行った。

分子機能解析グループ(研究代表者:藤澤 肇、名古屋大学大学院理学研究科)では遺伝子機能解析グループと共同で神経系膜分子ニューロピリン-1の遺伝子をノックアウトしたマウス、ならびに、神経線維の伸張を抑制する反発因子として知られているセマフォリン3A(以前はセマフォリンⅢ/Dと呼ばれていた)遺伝子をノックアウトしたマウスの作出に成功し、ニューロピリン-1がセマフォリン3Aのレセプターとして機能していること、ニューロピリン-1を介したセマフォリン3Aの神経線維反発シグナルが秩序だった末梢神経回路の形成に不可欠であることを証明した。さらに、ニューロピリン-1が血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)と結合して補助レセプターとして機能し、胚での血管形成を制御することも明らかにした。また、ニューロピリン-1を介したセマフォリン3Aシグナルが交感神経系の形成に必須であることも明らかにした。一方、神経系膜分子プレキシンの解析も進行し、マウスで4種類のプレキシン遺伝子が存在すること、それぞれのプレキシンが発生時の特定の神経回路で選択的に発現することを明らかにし、プレキシンが神経回路の形成に関与する可能性を明らかにした。プレキシンの機能を明らかにするため、プレキシン遺伝子欠損マウスの作製、線虫を用いた分子遺伝学的解析を進めている。

嗅覚回路形成解析グループ(共同研究者:平田たつみ、国立遺伝学研究所)では、神経回路形成機構解析のためのモデル実験系を開発し、神経回路形成を制御する分子機構の解明を進めてきている。研究対象をマウス嗅覚神経回路に絞り、嗅覚神経回路を培養下で再構成する技術確立した。更に、モノクローナル抗体法を用いて、嗅覚神経回路形成に関与する分子を検索し、培養下で再現させたマウス嗅覚神経回

路を用いてその機能を検証した。

遺伝子機能解析グループ（共同研究者：八木 健、岡崎国立共同研究機構生理学研究所）ではFynキナーゼの機能をFynキナーゼの機能欠損マウスを用いて調べ、アルコール摂取時に海馬のシナプスでFynが活性化され、学習・記憶に重要な役割を持つNMDA受容体をリン酸化し、アルコールにより機能が低下したNMDA受容体の機能を回復させることを明らかにした。さらに、Fynチロシンリン酸化酵素をプローブとして、新規な神経回路の形成機能分子の単離を試みた。その結果、Fynに結合する新たなカドヘリンファミリーCNR（cadherin-related neural receptor）を得ることに成功し、その生化学的特性、発現様式、遺伝子構造の解析、ならびに遺伝子マッピングを行った。また、各種の遺伝子欠損マウスの作製、時限遺伝子欠損法の開発を行った。

2．研究実施内容

分子機能解析グループ

1) ニューロピリン - 1・セマフォリン3Aシグナルによる神経線維ガイダンスの機構の解析

セマフォリン（semaphorin）3Aは神経線維の伸張方向を制限する反発性のガイダンスシグナルである。しかしながら、生体内でセマフォリン3Aが神経線維の伸長をどのように制御しているか不明であり、また、神経細胞側のセマフォリン3Aレセプターも不明であった。我々は、ニューロピリン - 1 遺伝子ノックアウトマウス（分子機能解析グループが担当）、セマフォリン3A遺伝子ノックアウトマウス（遺伝子機能解析グループが担当）の作出と表現型の解析を行い、ニューロピリン - 1 がセマフォリン3Aのレセプターとして機能し、ニューロピリン - 1・セマフォリン3Aシグナルが神経回路の形成に不可欠であることを示す結果を得た。

ニューロピリンは眼神経、上顎神経、下顎神経、顔面神経、舌咽神経、迷走神経など特定の脳神経、ならびに、脊髄神経で発現する。ニューロピリン - 1 欠損マウスではこれら末梢神経の走行経路が無秩序となり、投射部位も異常となることが明らかとなった。また、ニューロピリン - 1 遺伝子ノックアウトマウスが示す末梢神経系の異常ときわめて酷似している異常がセマフォリン3A遺伝子ノックアウトマウスでも認められた。このような表現型の類似は、ニューロピリン - 1 とセマフォリン3Aが機能的に関連していることを示唆している。

このことをより直接的に検証するため、ニューロピリン - 1 欠損マウスニューロンの培養にセマフォリン3Aを加えた。その結果、過剰量のセマフォリン3Aを加えてもニューロピリン - 1 欠損マウスニューロンの成長円錐は全

く崩壊しないことが明らかになった。これら一連の解析結果から、ニューロピリン - 1 がセマフォリン 3 A のレセプター、ないしは、レセプター複合体の不可欠構成分子であると結論することができる。

末梢神経系はきわめて秩序立ったパターンを示すためニューロンネットワーク形成の機構を明らかにするための良い実験系で、数多くの研究がなされてきている。しかしながら、末梢神経ネットワークの形成を制御する分子機構は全く不明であった。我々の研究成果は、ニューロピリン - 1 がセマフォリン 3 A のレセプターとして機能し、ニューロピリン - 1 を介したセマフォリン 3 A の神経軸索反発シグナルが末梢神経線維の伸張方向を制限し、その結果、生体で見られる秩序だった分節的な末梢神経ネットワークが作り出されてくることを完璧に証明したもので、末梢神経ネットワーク形成を制御する分子機構の一端が初めて明らかにされたといえる。

一方、ニューロピリン - 1 は中枢神経系の一部のニューロンでも発現する。また、セマフォリン 3 A も脳の特定の領域で発現することが知られている。更に、培養した中枢神経ニューロンに対しセマフォリン 3 A が抑制的に作用することが示されている。しかしながら、ニューロピリン - 1 遺伝子ノックアウトマウス、ならびにセマフォリン 3 A 遺伝子ノックアウトマウスでは中枢神経系で明瞭な形成異常は認められなかった。

2) ニューロピリン - 1 ・ V E G F シグナルによる血管形成の制御

ニューロピリン - 1 遺伝子ノックアウトマウスの解析を行う中で、ニューロピリン - 1 が血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; V E G F) の補助レセプターであり、血管形成の制御に必須の分子であるという成果を得た。

ニューロピリン - 1 遺伝子ノックアウトマウスは胎生致死である。その原因を明らかにするため、ニューロピリン - 1 遺伝子欠損マウスの血管系の詳細な解析を行った。その結果、ニューロピリン - 1 遺伝子ノックアウトマウス胚では血管形成が低下し、神経組織への血管進入が極度に低下すること、また、心臓血管系の形成異常が見られ、全ての胚で肺動脈が欠損し、更に、70%以上の胚で動脈弓が体の右側へ転移することが明らかとなった。セマフォリン 3 A 遺伝子ノックアウトマウスではこのような血管形成異常は認められなかった。

生化学的な解析でニューロピリン - 1 が V E G F と結合し、補助レセプターとして機能する可能性が報告されており、ニューロピリン - 1 遺伝子ノックアウトマウスが示す心臓血管系の低形成は、生体内でもニューロピリン - 1 が V E G F の補助レセプターとして機能し、血管形成を制御していることを示していると考えられる。

3) ニューロピリン - 1・セマフォリン 3 A シグナルによる交感神経節細胞とその前駆細胞の細胞移動の制御

ニューロピリン - 1 は交感神経節ニューロンでも強く発現している。培養した交感神経節ニューロンにセマフォリン 3 A を作用させると成長円錐の退縮と崩壊が起こる。このことから、交感神経節ニューロンでもニューロピリン - 1 がセマフォリン 3 A のレセプターとして機能することが予測されていた。しかしながら、ニューロピリン - 1・セマフォリン 3 A シグナルが交感神経系形成にどのように関与しているか不明であった。

ニューロピリン - 1 遺伝子ノックアウトマウス、ならびにセマフォリン 3 A 遺伝子ノックアウトマウスの表現型の詳細な解析を行い、これら 2 つの変異マウスでは過半数の交感神経節ニューロンが四肢、肩甲部、頸部、腹壁、あるいは胚の正中部など正常な交感神経節の形成部位と異なる場所に分散していることが明らかになった。また、このような交感神経節ニューロンの位置異常のため、交感神経幹の形態がきわめて異常となっていた。このような結果は、神経堤由来の交感神経節ニューロン前駆細胞が適切なルートをたどって正しい標的領域に到達する過程をニューロピリン - 1・セマフォリン 3 A シグナルが制御していることを示している。

さらに、ニューロピリン - 1・セマフォリン 3 A シグナルが細胞移動を制御することを実証するため、交感神経節ニューロンの培養にセマフォリン 3 A を加える研究を行った。その結果、セマフォリン 3 A は交感神経節ニューロンの運動性と細胞移動を抑制することが明らかとなった。

以上の解析により、ニューロピリン - 1・セマフォリン 3 A シグナルが神経軸索の伸長を抑制的に制御するのみならず、交感神経系細胞の移動をも抑制的に制御していることを実証することが出来た。

4) ニューロピリン - 1 による細胞接着の制御

ニューロピリン - 1 は細胞接着能を持つ分子である。ニューロピリン - 1 の細胞外領域のどの部分が細胞接着を司るかを解析し、b 1 ドメイン、b 2 ドメインそれぞれの中間部に位置する 18 アミノ酸残基からなる配列が細胞接着ドメインであることを証明した。さらに、この 2 つの細胞接着ドメインはセマフォリン 3 A ならびに V E G F の結合ドメインとは異なることを明らかにした。また、この細胞接着ドメインに結合する細胞接着リガンドは蛋白質であることを明らかにした。

このような結果は、ニューロピリン - 1 がセマフォリン 3 A レセプター、V E G F レセプターとして機能するほかに、細胞接着レセプターとしても機能する多機能性分子であることを示している。

5) マウスプレキシンの解析

プレキシン (plexin) は、当初、アフリカツメガエルの神経系で見出された膜分子である。この分子の神経回路形成時で果たす役割を解明するため、神経回路の解剖学的知見が豊富で、かつ、遺伝子操作が可能なマウスでプレキシンホモログの分離を試みた。

すでに、アフリカツメガエルプレキシン cDNA をプローブとしてマウス胎児脳より調整した cDNA ライブラリーを検索し、3 種類のマウスプレキシンホモログ (プレキシン A1, プレキシン A2, プレキシン A3) を見出し、その一次構造を明らかにしていたが、本研究では、これら 3 種のマウスプレキシンファミリー分子で保存度の高い領域の cDNA の塩基配列を参考にしてプライマーを設計し、RT-PCR を行い、新たなマウスプレキシンファミリー分子 (プレキシン A4) を見出した。

いずれのマウスプレキシンもその細胞外領域に 3 個の C-rich domain を持つ。プレキシン A1 はアフリカツメガエルプレキシンと最も高い相同性 (アミノ酸配列で 84% の相同性) を示し、これがアフリカツメガエルプレキシンのマウスホモログであると考えられた。マウスプレキシンファミリー間では 59% ~ 66% の相同性があった。また、プレキシン分子の細胞内領域はマウスプレキシン間で、あるいは、マウスとアフリカツメガエル間で良く保存されている (アミノ酸配列でおよそ 80% の相同性)。また、プレキシン A1 とプレキシン A3, プレキシン A2 とプレキシン A4 とが相同性が高かった。以上の結果は、マウスではプレキシンは少なくとも 4 種の分子からなるファミリーを構成していることを示している。

マウス神経系でプレキシンファミリー分子の発現動態を明らかにするため、プレキシン分子にたいする特異抗体の作製、ならびにこれを用いた免疫組織化学的解析と in situ hybridization とによる解析を実施した。その結果、各々のマウスプレキシンが異なった神経回路に発現することが明らかになった。例えば、聴覚系では主としてプレキシン A1 が、一般体性感覚系では主としてプレキシン A2 が発現する。プレキシン A3 は神経系の比較的広い領域にわたって発現するが、特に、脳神経節、脊髄神経節で強く発現する。プレキシン A4 は一般体性感覚神経回路を構成する神経節と神経核に強く発現し、その発現領域はプレキシン A2 と部分的に重複していた。しかしながら、嗅覚系、網膜、聴覚平衡覚系での発現パターンはプレキシン A2 と明瞭に異なっていた。プレキシン A1 に特異的なモノクローン抗体を作製し、プレキシン A1 はニューロンに発現すること、プレキシン A1 蛋白質がニューロンの細胞体ならびに神経軸索の膜表面に分布することを明らかにした。

一方、Yale 大学との共同研究で、プレキシシン A 1 がニューロピリン - 1 とヘテロダイマーを形成し、セマフォリン 3 A のシグナルを細胞内に伝えることを明らかにした。

また、遺伝子機能解析グループと共同で、標的組み換えによりプレキシシンファミリー遺伝子を破壊したマウスを系統的に作出する試みを行っている。

6) 線虫におけるプレキシシン機能の解析

データベースの検索から線虫のゲノムには 2 種類のプレキシシン遺伝子が存在していることが明らかになっている。線虫ではマウスに比べ遺伝学的な解析が容易に行えるので、プレキシシン変異マウスの作製と平行して、線虫プレキシシンの分子遺伝学的な解析を実施した。これまでに、2 つの線虫プレキシシン遺伝子 Cep1 と Cep2 の遺伝子構造、c D N A の分離、特異抗体の作製を行った。現在、これら線虫プレキシシン遺伝子の破壊株の分離とその表現形の解析を行っている。

嗅覚回路形成解析グループ (国立遺伝学研究所)

1) 僧帽細胞の軸索をガイドする道標細胞 (lot細胞) の同定

発生途上のマウス胚の嗅皮質を抗原にしてラットを免疫し、多数のモノクローナル抗体を得た。これらのモノクローナル抗体を用いてマウス胚の嗅覚神経回路の免疫染色をしたところ、僧帽細胞の軸索の伸長経路 (嗅索 : lateral olfactory tract : L O T) に限局して存在する一群の神経細胞を選択的に染める抗体を見出した。この抗体で染まる細胞は L O T の形成時に限ってみられ、培養した嗅覚神経回路でこの神経細胞を取り除くと、僧帽細胞の軸索の伸長が停止することが明らかになった。これらの結果から、この神経細胞は僧帽細胞の軸索をガイドする機能を持つ道標細胞であると考えられ、"lot細胞"と命名した。

2) lot細胞の発生起源と細胞移動の解析

様々な培養技術を用いて、終脳における lot細胞の発生位置ならびに移動経路を検討した。更に、脳の形態に様々な異常を持つ突然変異マウスにおいて lot細胞の数や位置に異常がないか検討した。

胎生 10 日目胚のマウス終脳を新皮質と神経節隆起とに分け、それぞれの細胞を分散培養して、分化してくる lot細胞の数を計測した。終脳をさらに細かい領域に分割して培養し、lot細胞がどこから発生してくるかを詳細に検討した。神経の幹細胞である神経上皮細胞のクローン培養を行い、lot細胞が単一の神経上皮細胞から分化してくるかを解析した。また、東北大学大隅典子博士との共同研究で、マウス 10 日目胚の全胚培養を行い、マウス終脳における神経細胞の移動経路を解析した。更に、脳の形態に異常を持つ突然変異マウスとして Extra toes (Xt) , Small eye (Sey) , Reeler (rl) の 3 種類の終脳における lot細胞の分

布パターンを解析した。

lot細胞は、終脳新皮質の領域の細胞を培養したときにのみ発生し、神経節隆起からは発生してこなかった。lot細胞を生み出す能力に、終脳新皮質の中では領域差は認められなかった。新皮質の神経上皮細胞を単離してクローン培養してもlot細胞が発生してきたことから、lot細胞を生み出す能力は新皮質の神経上皮細胞に細胞自立的に備わっていると考えられた。

終脳新皮質は将来lot細胞が局在することになる予定LOT領域からは少し離れたところに位置する。したがって、もしlot細胞が生体内でも終脳新皮質で生まれているとすれば、これらの細胞は予定LOT領域までかなりの距離を移動しなければならない。全胚培養法を用いてこの時期の細胞移動のパターンを解析したところ、実際に新皮質から予定LOT領域への神経細胞の移動経路が存在することが確かめられた。

以上の結果を総合すると、lot細胞は終脳新皮質全体で生まれ、腹側方向へと移動し、LOT領域に局在すると考えられる。

Xt突然変異マウスにおいて、lot細胞は終脳背側の新皮質全域にわたって分布していた。Xtの終脳における細胞の移動様式を検討したところ、この突然変異マウスにおいては新皮質で生まれた細胞がほとんど移動していないことが示された。おそらくこの細胞移動の異常がlot細胞の分布異常の直接の原因であると考えられる。Sey突然変異とrl突然変異マウスにおいてはlot細胞の異常は認められなかった。

3) 僧帽細胞の突起伸長を阻害するモノクローナル抗体の発見

胎生16日目のマウス胚の嗅球および嗅皮質から調製した細胞膜画分を抗原としてハムスターを免疫し、計300クローンのハムスター・マウスキメラハイブリドーマを作成した。これらを僧帽細胞の培養系でアッセイし、神経突起伸長を阻害するモノクローナル抗体H1-1B4を見出した。この抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、マウス神経系における抗原の分布パターンを解析した。またこの抗体の僧帽細胞以外の神経細胞の突起伸長に対する影響を検討した。この抗体の認識する抗原を解析するために、免疫沈降を試みた。

H1 - 1B4は僧帽細胞の突起および成長円錐に結合し、培養シャーレ上での僧帽細胞の突起伸長を阻害した。H1 - 1B4は、嗅覚回路培養において僧帽細胞の軸索伸長も強く抑制し、LOT形成を阻害した。僧帽細胞の生存細胞数そのものはH1 - 1B4により影響を受けなかったため、この抗体は突起伸長の過程を特異的に阻害していると考えられた。H1 - 1B4は培養網膜からの神経突起伸長も強く阻害した。しかしこの抗体が結合しない背根神経節からの突起伸長には影響を与えなかった。ビオチンおよびS 35アミノ酸でタンパク質を標識して、H1

- 1B4を用いた免疫沈降を行ったところ、分子量約30 K dのタンパク質が特異的に沈降してくることが確かめられた。

遺伝子機能解析グループ（岡崎国立共同研究機構生理学研究所）

1) F y n 欠損マウスを用いた脳機能解析

神経回路形成での機能がシナプス及び成長円錐で想定されているF y n キナーゼの機能を遺伝子欠損マウスを用いて調べた結果、アルコール摂取時にマウス脳の海馬のシナプスでこのF y n が活性化され、学習・記憶に重要な役割を持つNMDA受容体をリン酸化し、アルコールにより機能が低下したNMDA受容体の機能を回復させていることが明らかとなった。この研究は、アルコールがどのように脳の機能を変化させるか、またアルコールによる依存症及び痴呆がどのような分子メカニズムでおこるかを解析する手がかりを与えるものとして重要な成果である。

F y n 欠損マウスでは嗅球のシナプスにおいて長期増強が抑制され、抑制性のGABA受容体の機能が異常になっていることが明らかとなった。F y n 欠損マウスでは床敷きの匂いによる哺乳行動の異常が明らかとなっており、F y n が匂いの識別に関連する神経回路形成でのシナプス領域で機能している結果として注目される。

F y n 欠損マウスの哺乳行動異常を引き起こす床敷き（オートクレーブした北米産樅材）をガスクロマトグラフィーで解析したところ、ヘキサナールが約10倍出ていることが明らかとなった。このヘキサナール存在下でF y n 欠損マウスをかけあわせした結果、100%の子供がミルクを飲めず死亡した。この異常はF y n 欠損マウスだけで認められ他のヘテロ欠損マウス、野生型マウスでは死亡が認められなかった。

また、フリームービング状態のマウス嗅球より神経活動を測定することに成功した。

2) 新規F y n 結合分子C N Rの分離と機能解析

神経回路の形成、再編成、維持に関わる分子機能が想定されるF y n チロシンリン酸化酵素をプローブとして、新規な神経回路の形成機能分子の単離を試みた。その結果、新たなカドヘリンファミリーC N R（cadherin-related neural receptor）を得ることに成功した。

a) F y n 結合分子C N Rの同定

F y n のN末端のS r cファミリー間で保存されていない領域、SH2、SH3をbait（餌）として、この領域と結合する分子を酵母two hybrid系を用いて単離した。その結果、154クローンを得ることに成功した。この内、膜蛋白質を探索する目的で、全c D N Aの塩基配列決定を行った。その結果、1クロー

ンに疎水性アミノ酸クラスターが存在しており、膜蛋白質であることが予想された。このクローンの全長の蛋白質構造を決定する目的で、cDNAのクローニングを行ったところ約5 KbpのcDNAが単離された。この塩基配列には予想細胞外領域にカドヘリンモチーフが6回繰り返されており、新たなカドヘリン分子であることが明らかとなった。Fynと結合するカドヘリン様分子であることよりCNR1 (cadherin-related neural receptor 1) とした。また、最初のカドヘリンモチーフは、カドヘリンの研究より細胞接着活性に重要な領域であることが示唆されているが、この領域にはインテグリンのファイブロネクチンとの結合配列であるRGD配列が存在していた。カドヘリンでは細胞内領域が細胞接着活性の獲得に必要であり、この領域でカテニンと結合しアクチンフィラメント系との相互作用が可能となることが知られている。CNR1は細胞内領域ではカドヘリンやプロトカドヘリンと全くアミノ酸配列上相同性が無いことより、分子機能が異なることが予想される。予想細胞内領域には規則的なシステイン残基が存在する。また、SH3領域と結合するPxxP配列が4カ所存在していた。

b) CNR1の発現様式の解析

CNR1の発現様式を解析する目的で、成体マウスの各組織よりmRNAを抽出し、ノーザンブロット法により各組織での発現様式を解析した。その結果、神経組織で発現量が多いことが明らかとなった。また、発生段階での発現様式を解析した結果、胎生15日には発現が認められ、生後10日目で発現量がピークとなり、成体になるに従い発現量がゆっくりと減少することが明らかとなった。

c) Fynとの結合能の解析

CNR1の細胞外領域でモノクローナル抗体を作製し、マウス脳のタンパク抽出液を用いてFynの抗体による免疫沈降を行った。その結果、FynとともにCNR1が共沈してくることが明らかとなった。この結果をより確かなものとするため、myc-tagを付けたFynの全長とCNR1の全長をHEK293細胞にcotransfectionして、myc抗体及びFyn抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、両者ともにCNR1と共沈してくることが明らかとなった。Fynは細胞膜直下に存在するので、CNR1の細胞内領域と結合していることが予想される。CNR1の細胞内領域を欠失させたcDNAを用いて同様の免疫沈降を行った結果、この細胞内欠失CNR1は共沈してこないことより、予想どおりCNR1はFynと細胞内領域で結合していることが明らかとなった。

d) C N Rファミリーの解析

C N R 1 が F y n と結合する新規な受容体型分子であることより、相同な分子がファミリーとして存在していることを予想し、ゲノミックDNAを用いてサザンブロット法にて相同遺伝子の解析を行った。その結果、5'側のプローブを用いて約20本のバンドが確認された。これらの相同遺伝子の単離を行った結果、新たに7種類のcDNAの単離に成功した。これらの分子のタンパク質の構造を解析したところ、興味深いことにC末端の153アミノ酸配列が完全に一致していた。このアミノ酸配列にはPXXP配列が4箇所存在していることよりF y n と結合する領域であることが想定される。

e) C N Rファミリーの発現様式の検討

C N R がファミリーとなっていることが明らかとなったことより、これらファミリーの発現様式の違いについて解析を行った。その結果、C N R ファミリーのそれぞれが、嗅球、海馬、小脳、大脳皮質で発現しており、大まかな脳領域での発現様式に差が認められなかった。また、F y n の分布とも一致していた。C N R ファミリーの発現が神経細胞レベルでも一致しているかどうかについて、ジゴケシゲニンを用いたin situ hybridization法で解析したところ、神経細胞レベルでは発現に差が認められた。しかし、同一の神経細胞中に2種類のプローブが確認されたことより、細胞1個に1種類のC N R ファミリーの発現があるのではなく、数種類のC N R ファミリーの組み合わせが異なることが考えられた。

f) C N Rファミリーのマウス及びヒトのゲノム構造

C N R ファミリーのマウス及びヒトのゲノム構造を解析した結果、マウスで16、ヒトで16の約2 K b p からなる大きな第1エクソンが同方向に縦列して存在していた。また、その3'側にはC N R ファミリーで共通な配列として知られていた遺伝子配列が3つのエクソンに分断されて存在していた。このゲノムの構造は免疫系での多様化分子として知られているイムノグロブリンT細胞受容体と類似したものであり、大きく「可変領域」と「不変領域」からなることが明らかとなった。また、ヒトとマウスのゲノムの構造を調べたところ、マウスとヒトの「可変領域」での並ぶ順序が保存されていた。しかし、偽遺伝子となっているものがマウスとヒトで異なっていた。また、塩基配列の比較を行ったところ、マウスはマウスの、ヒトはヒトの「可変領域」の配列の相同性が高く、これらのエクソンが分子進化的に協調進化していることが明らかとなった。また、新たに同一の「可変領域」エクソンが異なった「不変領域」を利用するイムノグロブリンで知られているクラススイッチ様の発現を行っていることも明らかとなった。

g) C N R とReelinとの相互作用

大脳皮質形成過程でC N Rは全てcortical plateで発現していた。F y n 欠損マウスでも部分的な大脳皮質形成異常が認められたことより、カハールーレチウス細胞で発現するReelinとC N Rファミリーとの関連性を解析した。その結果、C N Rのカドヘリンドメイン1 (EC1) でReelinと結合することが明らかとなった。C N RファミリーはこのEC1領域がよく保存されている。また、Reelinとの結合に関わる領域はC N R 1 から8まで完全にアミノ酸配列が一致していた。このアミノ酸配列に対するモノクローナル抗体を作製したところ、この抗体はReelinとの結合性を阻害するとともに、Reelin依存的なmDab1のチロシンリン酸化を阻害し、大脳皮質の浮遊培養において、正常なアグリゲーション形成を阻害することが明らかとなった。また、この保存されているC N RのReelin結合領域でZoo Blotを行うと、大脳皮質の層構造が両生類から哺乳類へと増加するにつれて、相同な遺伝子のバンドが増えてくることより、C N Rファミリーの大脳皮質の進化過程での機能についても興味を持たれた。

以上の研究により、チロシンリン酸化酵素F y nと結合する新たなカドヘリン様受容体を得ることができた。しかし、この分子は他のカドヘリンファミリーと異なり、培養細胞中での発現で細胞膜に局在せず、細胞内膜系で止まってしまうことより、細胞接着活性については今後の検討が必要である。また、生体内でC N R分子がシナプス膜に存在することより、今後は、シナプス膜への輸送系を明らかにする必要がある。現在、神経回路の形成、維持、再編成過程でのC N Rファミリーの生体内分子機能を明らかにして行く目的で、遺伝子欠損マウスの作製を行っている。

3) マウスにおける新たな遺伝子操作技術の開発

時限遺伝子欠損法の開発も平行して行っている。トランスジェニックマウスであることを確認したマウスをloxPの組み換えによりlacZ遺伝子qが発現するトランスジェニックマウスと交配し、両方のトランスジーンをもつF 1 マウスを得た。このマウスの脳におけるlacZの発現を確認したところ生後の終脳領域で発現する3系統を確認した。このlacZの発現により、マウス終脳領域でCreリコンビナーゼの発現するトランスジェニックマウスを3系統得ることに成功した。また、この3系統は海馬CA1で強い発現を示したが、各系統により大脳皮質の層、扁桃体での核などで発現の差が認められたことにより、これらマウスの系統を用い比較することにより、大脳皮質の層や扁桃体での核特異的に遺伝子欠損した効果を調べられる可能性がある。Creを発現しているマウス胚幹細胞を効率よく選別する新たな方法を開発し、セマフォリン3 Aについては3種類

の遺伝子欠損マウスを作製することに成功した。

CaMキナーゼ2プロモーター下にCreとIRES付きtetを導入したベクターを構築し、マイクロインジェクション法によりC57BL/6マウス卵よりトランスジェニックマウスを作製した。遺伝子導入を確認し、loxPの組み換えによりlacZが発現するマウスと交配し、Creの活性を測定した。Creリコンビナーゼとテトラサイクリントランスアクティベータ(tet)を生後の終脳領域で発現するトランスジェニックマウス、3ラインを得ることに成功した。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

- S. Nishina, S. Kohsaka, Y. Yamaguchi, H. Handa, A. Kawakami, H. Fujisawa and N. Azuma: PAX6 expression in the developing human eye. *British J. Ophthalmol.*, 89, 723-727 (1999)
- M. Fukata, S. Kuroda, M. Nakagawa, A. Kawajiri, N. Itho, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, H. Fujisawa, A. Kikuchi and K. Kaibuchi: Ced42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with β -catenin. *J. Biol. Chem.*, 274, 26004-26050 (1999)
- T. Takahashi, A. Fournier, F. Nakamura, L.-H. Wang, Y. Murakami, R. G. Kalb, H. Fujisawa and S. M. Strittmatter: Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell*, 99, 59-69 (1999)
- T. Kawasaki, T. Kitsukawa, Y. Bekku, Y. Matsuda, M. Sanbo, T. Yagi and H. Fujisawa: A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*, 126, 4885-4893 (1999)
- S. Takahashi, H. Ujihara, G-Z. Huang, M. Sanbo, K. Yagyu, H. Kaba and T. Yagi: Reduced hippocampal LTP in mice lacking a presynaptic protein: complexin II. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 2359-2366 (1999)
- Y. Yanagawa, T. Kobayashi, M. Ohnishi, T. Kobayashi, S. Tamura, T. Tsuzuki, M. Sanbo, T. Yagi, F., Tashiro and J. E. Miyazaki: An efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: the use of DT-A gene with the polyadenylation signal as a negative selection maker. *Transgenic Res.*, 8, 215-221 (1999)
- T. Yagi: Molecular mechanisms of Fyn-tyrosine kinase for regulating mammalian behaviors and an ethanol sensitivity. *Biochemical Pharmacology*, 57, 845-850 (1999)