

「脳を知る」
平成9年度採択研究代表者

松崎 文雄

(東北大学加齢医学研究所 教授)

「神経系の遺伝的プログラムと可塑的メカニズム」

1. 研究実施の概要

複雑な神経ネットワークは、素子として働く神経細胞が独自の個性をもつことによって成り立ち、また、それは外界の刺激に応じて柔軟に変化する。このプロジェクトでは、ショウジョウバエと脊椎動物をモデル系として、神経系の多様性を生む遺伝的プログラムと構造的可塑性の分子メカニズムを明らかにすることを目標にしている。神経細胞の個性は、少数の神経幹細胞が非対称な分裂をくり返し、莫大な数の神経を生じる過程で形成されてゆく。本プロジェクトでは、ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂に伴って、姉妹細胞に非対称に分配される神経運命決定因子Mirandaを同定し、その解析から、神経幹細胞の非対称分裂が神経の運命決定に直接的な役割を果たすことを世界に先駆けて明らかにしてきた。その知見に基づき、神経幹細胞の非対称性を形成する分子機構をはじめとする、神経系の多様性の根本にある発生原理を解き明かそうとしている。また、行動学的手法と遺伝学を用いた神経回路形成の解析から、GTPaseカスケードに働く因子SIFとTrioを同定し、それらが神経回路形成の制御を行うことを明らかにしてきた。さらに、これらの因子の解析に基づいて、シナプスの構造的可塑性を担う新しいメカニズムを提唱し、神経回路形成における可塑性と機能的可塑性の両者を支える分子機構を明らかにしようとしている。

2. 研究実施内容

1. 非対称分裂グループ

(1) 神経幹細胞の非対称分裂を制御する遺伝子の同定

神経幹細胞の非対称分裂は神経細胞の運命決定に必須なプロセスである。その非対称性を制御する細胞極性の分子メカニズムを明らかにすることを目標に、ショウジョウバエ神経幹細胞の分裂に際して、姉妹細胞に不等分配されるProspero結合因子Mirandaの局在を指標として、神経幹細胞の非対称性を制御する因子を系統的に検索することを開始した。その結果、Mirandaが神経幹細胞とその姉妹細胞に等しく分配される突然変異をいくつか同定した。symmetric cell division (scd) 変異と名づけた突然変異では、神経幹細胞の非対称分裂に際し、

Mirandaはもとより、同様に非対称に分配されるNotchの抑制因子Numbも等分配される。従って、突然変異の原因遺伝子は、不等分配されることが知られている全ての神経運命決定因子の局在を制御する重要な因子である。この遺伝子は、突然変異によってショウジョウバエに脳腫瘍を引き起こす癌抑制遺伝子であること、さらに、他の癌抑制遺伝子を検索したところ、さらにもう一つの癌抑制遺伝子が神経運命決定因子の非対称分配に必須であることが判明した。

(1) 神経幹細胞の形成位置を決定する仕組みについての研究

神経発生の遺伝的プログラムのなかで、神経幹細胞の個性の確立、神経幹細胞の分裂による多様な神経細胞の形成が起こる前に、幹細胞の形成位置を決定する必要がある。一般に、これは、位置情報と呼ばれるものに基づいているが、ショウジョウバエの羽の片縁に並ぶ感覚器は、成虫原基の中央に並ぶ幹細胞に由来し、Winglessという分泌性シグナル因子がその位置を規定する。このWingless発現細胞のパターンを決定する仕組みに、Defective proventriculus(Dve) という転写因子が必須であることを明らかにした。Dve遺伝子はWinglessによって活性化さるが、一旦発現したDve因子は逆に、Wingless遺伝子の転写を抑え、それによって、極めて限局された領域内の細胞がWinglessを発現するようになる。すなわち、感覚器幹細胞の位置はDve転写因子を介したWinglessシグナルのフィードバック機構によって決定されていることが明らかになった。

2 . 細胞間相互作用グループ

細胞間相互作用は、神経細胞の多様性の獲得にきわめて重要な役割を演じている。膜型プロテアーゼをコードするメルトリンが神経発生の過程で細胞間シグナルの制御を行っている可能性を検討し、以下のことを明らかにした。

(1) 胎生期のマウスで、メルトリン が脊髄・後根神経節・筋節などで発現すること、特に後根神経節においては、ニューロフィラメント陽性の神経細胞でメルトリン タンパク質が発現している。

(1) メルトリン と同様な発現パターンを示し筋形成や神経分化に関与することが知られる細胞膜貫通型増殖因子ニューレギュリンが、メルトリン の基質となっており、メルトリン が、ニューレギュリンのプロセッシング、すなわち蛋白分解による膜型から可溶化型への変換に直接的に関わっている。

3 . 脊椎動物神経発生グループ

哺乳類胚を材料とし、全胚培養下での脳組織に対し細胞標識法や電気穿孔法による遺伝子導入法を駆使して、領域特異的な神経分化機構を明らかにすることを目的とする。本年度は以下のような研究成果が得られた。

1) マウス胚予定前脳領域の神経上皮細胞を全胚培養下で標識・追跡することにより、昨年度作成した前脳予定運命地図をさらに詳細なものとし、前脳区画成

立に関わる因子として、領域特異的転写因子Pax6と細胞接着因子cadherin6が重要な働きをしている可能性を示した。

- 2) Pax6 mutant胚菱脳に電気穿孔法によりPax6遺伝子を導入することにより、Pax6遺伝子の下流の因子としてWnt7bが存在することを明らかにした。

4. 培養細胞グループ

哺乳動物神経幹細胞において、ニューロン・グリアへの分化と、自己増殖との選択を制御する機構を明らかにすることめざしている。遺伝子欠損マウス、多能性神経幹細胞の培養系を用いた解析から、転写因子であるMash1およびProx1が神経幹細胞の自己複製から分化へのコミットメントの初期過程を正に制御する因子であることを明らかにした。さらに、細胞膜受容体分子Notchを介したシグナルが、Mash1の機能を抑制することにより幹細胞の分化を負に制御すること、そのシグナルはdeltex遺伝子の哺乳動物相同遺伝子として単離されたDeltex1 (Dtx1) が担い、Mash1の転写促進に必須なcoactivatorであるp300と直接に相互作用しその機能を阻害することを明らかにした。以上の結果から、脳神経系の発生の初期過程において、神経幹細胞の増殖・分化の運命選択は、Mash1およびProx1による正の制御ならびにNotchシグナル伝達系による負の制御が働いており、両者のバランスによって巧妙にコントロールされていることが明らかとなった。

5. シナプス形成グループ

シナプスの構造的可塑性を制御する分子機構を解明することを目的として、細胞の形態変化を制御するRhoファミリー GTPaseカスケードに着目し、神経細胞で活性化する2種類のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF)、SIFとTrioを同定してきた。本年度は、それぞれの分子のシナプス形成あるいは軸索伸長における機能を明らかにできた。

- (1) シナプス形成を制御するSIFタンパク質とペリアクティブゾーン。

SIFタンパク質の突然変異では、神経筋接合部におけるシナプス上のbouton構造が野生型に比べて有意に減少することがわかった。さらに、boutonの数を減少させるFasciclin II (Fas II) の変異との二重変異では、bouton数が野生型レベルに復帰する。このことはSIF経路とFas II 経路とが互いに抑制的に作用しながらシナプス形成を制御することを遺伝学的に示している。SIFタンパク質は、シナプス形成に関与するFas II やインテグリン、Dlgと共に、bouton構造においてアクティブゾーンの周縁部に同心円状に局在することから、この領域でシナプス形成が制御されると考えられる。われわれは神経伝達の間であるアクティブゾーンの周囲にシナプス形成を制御する膜ドメインとしてペリアクティブゾーンの存在を提唱し、この2つのゾーンが対を成してシナプス末端の基本構造を構築していると考えている。

(2) 軸索伸長を制御するTrio

Rhoファミリー GTPaseを活性化する2つのDHドメインを持ち、異なるシグナル経路を共役的に調節すると考えられる因子Trioを同定した。この分子の突然変異の分離とその表現型を解析から、胚および幼虫の中樞神経系の軸索走行に著しい乱れが生じていること、幼虫から成虫にかけて、学習・記憶の中樞であるキノコ体の形成が異常となることが判明した。キノコ体でクローン解析を行うことにより、trio 変異による異常は変異細胞集団の神経繊維の自律的な機能欠損による結果であることが明かとなった。従って、Trioは軸索伸長を制御することにより神経回路形成において不可欠な役割を持つ。成虫脳では、Trioは神経繊維の細胞質中で輸送され少なくともその一部はシナプス後部を形成する樹状突起末端に局在することから、Trioが発生後の脳においてシナプスの維持ないし動的変化を制御していることが示唆される。

6 . シナプス構造グループ

シナプス形成の初期過程であるシナプス標的の認識機構を明らかにすることを目的にしたイリノイ大学千葉晶博士との共同研究から、運動ニューロンが標的筋細胞に近づく時期に筋細胞から伸びる多数の糸状仮足 (myopodiaと命名) の存在を明らかにしたが、本年度はmyopodiaの形成機構と機能を解析した。まず、運動ニューロンを機械的に除去しても、myopodiaは本来形成される時期に形成されることから、myopodiaの形成が軸索成長円錐の誘導によらない筋細胞に自律的な過程であることがわかった。次にGFP標識を利用した生細胞の蛍光観察と電子顕微鏡観察を行うことにより、myopodiaと軸索成長円錐との相互作用を解析した。Myopodiaは、はじめに筋細胞表面からランダムな方向に伸縮を繰り返しているが、ニューロンの接近によって、成長円錐から伸びる糸状仮足と接触しているmyopodiaを残して、消失した。さらに、成長円錐の糸状仮足とmyopodia とが、密接に接触しながら葉状仮足様に形態変化することがわかった。このような変化は、標的特異的であり、また成熟シナプスの位置とは必ずしも一致しないところで起こることから、シナプスのパートナーをシナプス形成部位に誘う過程の第一段階として重要な過程と考えられた。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Torii, M., Matsuzaki, F., Osumi, N., Kaibuchi, K., Nakamura, S., Casarosa, S., Guillemot, F. and Nakafuku, M.: Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development*, 126, 443-456 (1999)

Matsuzaki, F. : Asymmetric division of *Drosophila* neural stem cells: a basis for neural diversity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10, 38-44 (2000)

Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., and Ishiura, S.: Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an α -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem. J.*, 343, 371-375 (1999)

Kawano, H., Fukuda, T., Kubo, K., Horie, M., Takeuchi, K., Osumi, N., Eto, K., and Kawamura, K.: Pax6 is required for the thalamocortical pathway formation in fetal rats. *J. Comp. Neurol.*, 408, 147-60 (1999)

Kamitori, S., Machide, M., Osumi, N. and Kohsaka, S.: Expression of receptor tyrosine kinase RYK in developing rat central nervous system. *Dev. Brain Res.*, 114, 149-160 (1999)

Shimoda, Y., Tajima, Y., Nagase, T., Harii K., Osumi, N., and Sanai, Y.: Cloning and expression of a novel galactoside b1, 3--glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of HNK-1 epitope. *J. Biol. Chem.*, 274, 17115-17122 (1999)

Akamatsu, W., Okano, H.J., Osumi, N., Inoue, T., Nakamura, S., Sakakibara, S., Miura, M., Matsuo, N., Darnell, R.B. and Okano, H.: Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96, 9885-90 (1999)

Ishii, Y., Nakamura, S. and Osumi, N.: Demarcation of early mammalian cortical development by differential expression of fringe genes. *Dev. Brain Res.*, 119, 307-320 (2000)

Inoue, T., Nakamura, S. and Osumi, N.: Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate. *Dev. Biol.*, 219, 373-383 (2000)

Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S. Sonic hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.*, 274, 8143-8152 (1999)

Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C-C, Nakafuku M, Kondoh H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development*, 126, 3915-3924 (1999)

Ding Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H, Dlugosz A, Nakafuku M, Hui C-C. Mouse Suppressor of fused is a negative regulator of Shh signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr. Biol.*, 9, 1119-1122 (1999)

E. Suzuki, D.Rose, A. Chiba. The Ultrastructural interactions of identified pre- and postsynaptic cells during synaptic target recognition in *Drosophila* embryos. *J. Neurobiol.*, 43, 448-459 (2000)