

「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

(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る。そこには3つの素過程、

1. 神経上皮の位置情報により、幹細胞が異なる個性を獲得する過程
2. 相異なる娘細胞を生じる非対称な細胞分裂によって多様性を増幅する過程
3. 幹細胞が順次異なる姉妹細胞を生じることにより多様性が増幅される過程

の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。

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、

1. 神経幹細胞が多様な神経細胞を生じる機構
2. 多様な神経細胞が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す。

### 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非対称分裂の解析。ショウジョウバエの神経幹細胞は、娘細胞の運命と大きさの異なる典型的な非対称分裂を行い、転写因子ProsperoやNotchシグナルの制御因子Numbを姉妹細胞の神経前駆細胞に不等分配する。これらの運命決定因子が正しく一方の娘細胞に不等分配されるために、分裂軸と運命決定因子の局在の方向が一致するように調節されている。本研究では、ショウジョウバエ神経幹細胞を実験系として、

このような非対称分裂のメカニズムとその背後にある細胞極性の分子実体を明らかにすることを目標としている。

昨年までに、突然変異の系統的な分離とその分子遺伝学的な解析から、神経幹細胞の娘細胞の大きさの違いが、細胞外シグナルに依存しない3量体G蛋白質の働きによって生じることを明らかにしてきた。他方、神経幹細胞では、リン酸化シグナルを伝達するaPKC-Par3複合体とGタンパクシグナルを担うG $\alpha$ i-Pins複合体という二つのシグナル伝達系がapical側に局在し、細胞極性を制御することが知られ、娘細胞のサイズの非対称についても、両者が平行して機能することが判明している。この2つのシグナルの役割を詳細に解析した結果、aPKC-Par3シグナル伝達系は主に運命決定因子の局在に、G $\alpha$ i-Pinsは分裂軸の方位の決定に関わることが明らかになり、2つのシグナル系は互いに協調しながら機能を分担していることが判明した。G $\alpha$ i-Pins複合体が分裂軸の方位の決定を担うことから、Pinsと相互作用する因子が分裂軸の制御を行うと想定し、Pins結合因子を探索した結果、あるPins結合因子の突然変異体で分裂軸の方位の異常が観察された。G $\alpha$ i-Pins複合体の下流で、この因子が星状体微小管と相互作用することにより分裂軸の方向を制御していると考えられる。b) マウス神経形成の解析。脳の発生過程では神経上皮細胞が神経前駆細胞として多数のニューロンを生み出すことが知られているが、最近、神経上皮細胞は、ニューロンだけでなく、subventricular (intermediate) zoneで1度だけ分裂する中間的な前駆細胞も生成することが判明した。この二つの神経前駆細胞がどのように異なるのか、それぞれから生成するニューロンにどのような違いがあるのかを知る目的で、それぞれの前駆細胞を単独に取り出し、遺伝子発現をシングルセルレベルで解析する方法を確立し、2種類の神経前駆細胞の遺伝子発現の相違を見出すことに成功した。

## 2) 脳細胞構築研究グループ (宮田卓樹)

長く謎とされてきた大脳皮質原基の「非脳室面分裂細胞」を対象としてその形態、移動様式、細胞産生能についてスライス培養等による解析を行なった。極めて重要なニューロン供給主であることを見い出すとともに分裂位置決定の分子メカニズムにも成果をあげた。

## 3) 細胞移動研究グループ (大隅典子)

### 1) 神経上皮細胞の挙動のイメージング解析

神経上皮細胞は細胞周期に伴い非常にダイナミックな動態を示す。すなわち、基底膜側と脳室側を結ぶ細長い細胞質を細胞核がエレベーターのように往復し、先端側すなわち神経管の内側に到達したときに分裂期に入り、そこで2つの娘細胞に分裂する。神経上皮細胞の核はこのエレベーター運動を繰り返しながら、幹細胞としての性質を保持すると同時に、より分化した神経前駆細胞や神経細胞を生じる。そこで細胞分裂と分化の様相をタイムラプス観察するためのシステムを、蛍光顕微鏡および2光子顕微鏡を用いて確立した。このシステムを用いて菱脳および脊髄神経上皮細胞の挙動を観察した結果、神経上皮細胞から微細な突起が出たり引っ込んだりしているという様相が初めて認められた。また、終脳神経上皮細胞を観察した結果、*Pax6*変異ラットではエレベーター運動の異常と中心体の挙動の異常が見られた。

## 2) 神経幹細胞の増殖と分化を統合する分子機構の網羅的解析

野生型脳と *Pax6* 遺伝子変異動物脳で発現する遺伝子のプロファイルをマイクロアレイ法を用いて比較し、定量RT-PCRおよび *in situ* ハイブリダイゼーション法により発現様式を確認することにより、*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。電気穿孔法による遺伝子導入を行い、RNA干渉法 (siRNA法) によるFABP7の機能阻害を行ったところ、神経上皮の形態が異常になり、細胞増殖の減少とニューロン分化の亢進が認められた。したがって、*Pax6* はFABP7を介し、神経上皮細胞の性質の維持に深く関与することが示された。

## 4) 細胞間相互作用研究グループ (瀬原淳子)

神経組織の形成において、神経は自らをサポートしてくれるグリア細胞を生み出す。そして分化したグリア細胞は、神経と接触して存在し、神経突起からの維持刺激がなければ死んでしまう。このような神経において合成され、グリアの分化と維持に必要なグリア増殖因子は、その多くが膜貫通型タンパク質として合成され、膜直上の位置で切断されて、可溶性分子として細胞外に放出される。私たちは、形態形成の研究のなかでADAMファミリーに属する膜型プロテアーゼメルトリン $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の遺伝子クローニングに成功し、その形態形成における役割と機能を探ってきた。そのうち、メルトリン $\beta$  (ADAM19) が、神経や心臓の形成に関与する膜型ErbBリガンドであるグリア増殖因子の切断活性化を担うこと、ノックアウトマウス作成によりメルトリン $\beta$  が心臓形成や神経の束索化にかかわり、protein kinase C依存的なグリア増殖因子の切断活性化にかかわることなどを明らかにしてきた。

大部分のメルトリン $\beta$  欠損マウスは、生後1週間以内に死んでしまうが、一部が成体まで生き延びる。そこで、メルトリン $\beta$  ノックアウトマウスを用いて、メルトリン $\beta$  が神経組織の再生に関わるかどうかを検討した。その結果、メルトリン $\beta$  が神経再生にともなって発現活性化されること、そしてノックアウトマウスでは神経再生が遅れることを見いだした。グリア増殖因子は、成体においても神経組織の維持にかかわっていることが報告されている。このことから、この表現型は、メルトリン $\beta$  プロテアーゼによるグリア増殖因子あるいは類似因子の切断制御の破綻によってもたらされるものと考えられる。

今後、それらの神経組織の電顕観察、グリアの分化などをさらに検討し、末梢神経再生におけるメルトリン $\beta$  の役割・機能解明を進める。さらに、発生過程での神経組織形成におけるこの遺伝子の役割についても、運動神経組織のシュワン細胞の分化・ミエリン鞘の形成、神経筋接合部形成を中心に、メルトリン $\beta$  の役割と機能を明らかにしていく。

## 5) 細胞系譜研究グループ (一色孝子)

発生過程において、神経幹細胞の個性は常に一定ではなく時間とともに変化していく。このため、一つの幹細胞は多様な子孫神経細胞を一定の順番で作ることができる。ショウジョウバエの神経系形成の前半過程において、ほぼ全ての幹細胞が、Hunchback、Krüppel、Pdm、Castorという4種の転写因子を順次発現し、これらの転写因子の発現を自律的に切り替える。しかし、Castor発現開始以降も神経幹細胞は胚発生期だけでも10

回程度分裂するにもかかわらず、発生後期における神経幹細胞の時間変化についてはほとんど謎であった。本研究では、まず、転写因子の発現パターンにもとづいて時期特異的に発現される遺伝子を検索する過程で、Castor発現開始以降に神経幹細胞において一過的に発現される一群の転写因子を同定した。次にCastor発現以降8回程度の分裂について、それらの転写因子の正確な発現順序を明らかにした。この結果にもとづき、現在、胚発生後期における時間変化の分子メカニズムの探求を進めている。

胚発生が終了すると、腹部の神経幹細胞は死滅するのに対して、脳と胸部の神経幹細胞の多くは、長い休止期に一旦入った後、幼虫期に分裂を再開し、一幹細胞あたり平均100個にも及ぶ神経細胞を産生する。本研究では、幼虫型神経幹細胞の時間変化についても解析を開始した。幼虫型神経幹細胞においても胚性型と同様な後期特異的転写因子の発現推移が認められた。すなわち、分裂の時期や回数が全く異なるのにもかかわらず、これら2種の神経幹細胞は非常に類似した内在性のメカニズムに従って時間変化していくことがわかった。さらに、胚性型から幼虫型への変換と時期特異的転写因子の発現切り替えとの間に強い連携があることを示唆するデータも得ている。

### 3. 研究実施体制

#### 脳構築プログラム解析グループ

- ① 研究分担グループ長：松崎文雄（理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 非対称細胞分裂研究グループ・グループディレクター）
- ② 研究実施項目：脳の発生の遺伝的プログラムの解析

#### 脳細胞構築研究グループ

- ① 研究分担グループ長：宮田卓樹（名古屋大学大学院医学系研究科 機能形態学講座・細胞生物学分野 教授）
- ② 研究実施項目：脳神経幹細胞とその子孫ニューロンの挙動の網羅的観察・記録

#### 細胞移動研究グループ

- ① 研究分担グループ長：大隅典子（東北大学大学院医学系研究科・附属創生応用医学研究センター 形態形成解析分野・教授）
- ② 実施項目：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

#### 細胞間相互作用研究グループ

- ① 研究分担グループ長：瀬原淳子（京都大学再生医科学研究所・再生統御学部門 再生増殖制御学分野・教授）
- ② 研究実施項目：細胞間相互作用の研究

#### 細胞系譜研究グループ

- ① 研究分担グループ長： 一色孝子（国立遺伝学研究所・新分野創造研究室・助教授）
- ② 研究実施項目：神経幹細胞系譜形成の分子機構の解析

#### 4. 主な研究成果の発表

##### (1) 論文（原著論文）発表

研究代表者 松崎 文雄（脳構築プログラム研究グループ）

- Kawaguchi, A., Ogawa, M., Saito, K., Matsuzaki, F., Okano, H., Miyata, T.  
Differential Expression of Pax6 and Ngn2 Between Pair-Generated Cortical Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 78(6), 784-795(2004)
- Izumi, Y., Ohta, N., Itoh-Furuya, A., Fuse, N. and Matsuzaki, F.  
Differential functions of G protein and Baz/aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division. *J. Cell Biol.* 164(5), 729-738 (2004)

##### 共同研究者

宮田 卓樹（脳細胞構築研究グループ）

- Kawaguchi, A., Ogawa, M., Saito, K., Matsuzaki, F., Okano, H., and Miyata, T.: Differential expression of Pax6 and Ngn2 between pair-generated cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 78, 784-795 (2004)
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., and Ogawa, M.: Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131, 3133-3145 (2004)

大隅 典子（細胞移動研究グループ）

- Kasai, K., Takahashi, M., Osumi, N., Sinnarajah, S., Takeo, T., Ikeda, H., Kehrl, J. H., Itoh, G., and Arnheiter, H. (2004). The G12 family of heterotrimeric G proteins and Rho GTPase mediate Sonic hedgehog signalling. *Genes Cells* 9, 49-58.
- Wakamatsu, Y., Endo, Y., Osumi, N., and Weston, J. A. (2004). Multiple roles of Sox2, an HMG-box transcription factor in avian neural crest development. *Dev Dyn* 229, 74-86.
- Nomura, T., and Osumi, N. (2004). Misrouting of mitral cell progenitors in the Pax6/small eye rat telencephalon. *Development* 131, 787-796.
- Wakamatsu, Y., Osumi, N., and Weston, J. A. (2004). Expression of a novel secreted factor, Seraf indicates an early segregation of Schwann cell precursors from neural crest during avian development. *Dev Biol* 268, 162-173.

- Kobayashi, K., Takahashi, M., Matsushita, N., Miyazaki, J., Koike, M., Yaginuma, H., Osumi, N., and Kaibuchi, K. (2004). Survival of developing motor neurons mediated by Rho GTPase signaling pathway through Rho-kinase. *J Neurosci* 24, 3480–3488.
- Takahashi, M., and Osumi, N. (2005). Identification of a novel type II classical cadherin: rat cadherin19 is expressed in the cranial ganglia and Schwann cell precursors during development. *Dev Dyn* 232, 200–208.
- Nagase, T., Nagase, M., Osumi, N., Fukuda, S., Nakamura, S., Ohsaki, K., Harii, K., Asato, H., and Yoshimura, K. (2005). Craniofacial anomalies of the cultured mouse embryo induced by inhibition of sonic hedgehog signaling: an animal model of holoprosencephaly. *J Craniofac Surg* 16, 80–88.
- Yokoo, T., Ohashi, T., Shen, J. S., Sakurai, K., Miyazaki, Y., Utsunomiya, Y., Takahashi, M., Terada, Y., Eto, Y., Kawamura, T., et al. (2005). Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 3296–3300.

瀬原 淳子 (細胞間相互作用研究グループ)

- Masaki, M., Kurisaki, T., Shirakawa, K., Sehara-Fujisawa, A.  
Role of Meltrin  $\alpha$  (ADAM12) in obesity induced by high-fat diet. *Endocrinology*, 2005; 146(4): 1752–63
- Watabe-Uchida, M., Masuda, A., Shimada, N., Endo, M., Shimamura, K., Yasuda, K., and Sehara-Fujisawa A.  
Novel Metalloprotease–Disintegrin, Meltrin $\gamma$  (ADAM35), Expressed in Epithelial Tissues during Chick Embryogenesis. *Dev. Dynamics*, 2004; 230: 557–568
- Wakatsuki, S., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A.  
Lipid rafts identified as locations of ectodomain shedding mediated Meltrin $\beta$ /ADAM19  
*J. Neurochemistry*, 2004; 89(1): 119–23
- Kurohara, K., Komatsu, K., Kurisaki, T., Masuda, A., Irie, N., Asano, M., Sudo, K., Nabeshima, Y., Iwakura, Y., and Sehara-Fujisawa, A.  
Essential Roles of Meltrin $\beta$ /ADAM19 in Heart Development. *Developmental Biol.* 2004; 267: 14–28