

「生物の発生・分化・再生」

平成 14 年度採択研究代表者

広海 健

(国立遺伝学研究所 教授)

「細胞内パターンニングによる組織構築」

1. 研究実施の概要

軸索や樹状突起のような長い突起をもつ神経細胞は、一つの細胞自体が発生の「場」である。突起を器官内の広い領域に伸ばして細胞「間」のコミュニケーションをするだけでなく、細胞「内」においてもシグナル伝達・輸送・細胞骨格編成などによって、「長距離作用」や「領域への区画化」といったパターンニングを行うからである。長い神経突起は、核や細胞体とは独立に伸長・誘導・退縮などの行動を行うことができる自立的ユニットでもある。これまでも突起内には成長円錐、イニシャルセグメント、シナプス領域などの特殊構造があることは知られていたものの、突起の大部分は質的に一様な「ケーブル」であると考えられてきた。しかし生体内では突起の一部の領域に分子が局在している例が多数あるから、軸索や樹状突起のような構造も、その中に巨視的な「パターン」を含有していると考えべきだろう。われわれはこのような「細胞内パターンニング」現象に着目し、その形成機構と器官構築における意義を解析することにより、器官構築の新しい原理発見を目指している。

2. 研究実施内容

(1) 軸索膜タンパク質の領域特異的局在と軸索膜のコンパートメント化 (遺伝研グループ)

「細胞内パターンニング」の最も顕著な例として、われわれは軸索内の分子局在に着目している。これまでに、ショウジョウバエの初代培養細胞系において複数の軸索膜タンパク質が細胞自立的に軸索の遠位部あるいは近位部領域に局在することを見いだしている

(2004 年度報告書)。軸索内領域への分子の配置機構としては、遺伝子発現調節、タンパク質の軸索内輸送、mRNA の局在あるいは局所的タンパク質合成等、さまざまな可能性がある。われわれは ROBO ファミリータンパク質と GFP の融合タンパク質を用い、軸索内局在の経時観察を行った。ROBO2 や ROBO3 の軸索遠位領域への局在は、転写制御や軸索伸長とは独立に起こった。また、軸索内には GFP でラベルされた小胞が移動しているのが観察された。細胞体付近で作られた膜タンパク質は小胞輸送を介して標的領域に配置されるのだろう。

別々の領域に配置される膜タンパク質の局在には、それぞれ異なる輸送経路がある可能性が高い。

軸索内パターンニングは、タンパク質の遠位部あるいは近位部領域への「配置」のメカニズムだけでは説明できない。細胞膜は流動的であると考えられているから、膜タンパク質の局在パターンを維持するには特定領域に配置されたタンパク質が隣の領域へ移動するのを防ぐ機構が必要である。FRAP 法を用いて分子の動態を解析したところ、膜タンパク質は遠位部あるいは近位部の領域「内」では細胞膜内で移動できるが、領域の境界で分子の動きが制限されていることが明らかになった。軸索膜に一樣に分布する人工的な 1 回膜貫通タンパク質 (CD8-GFP) もこの境界で移動制限を受けた。これらの結果は、軸索の近位部、遠位部の細胞膜がそれぞれ独自の膜区画 (membrane compartment) であることを示唆している。

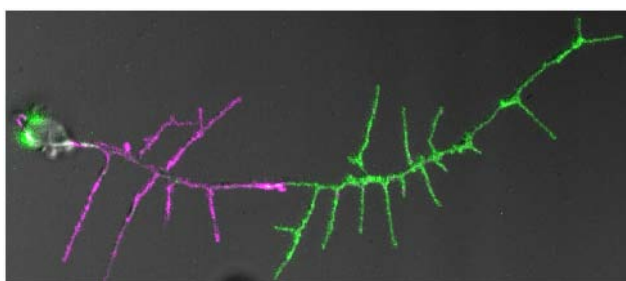


図1 培養下で単離されたショウジョウバエの神経細胞における軸索内分子局在。緑は ROB03-GFP 融合タンパク質の分布、マジェンタはモノクローン抗体 BP102 による染色。ROB03-GFP と BP102 抗原はそれぞれ軸索の遠位部、近位部に細胞自立的に局在する。左端が細胞体。

(2) 軸索内パターンニングに基づく軸索ガイダンス (遺伝研グループ)

神経細胞が標的に向かって突起を伸ばす現象 (軸索ガイダンス) は、「誘因あるいは反撥分子の『濃度勾配』に従って軸索を伸ばす」という化学走性仮説で説明されてきた。軸索走行に影響を及ぼす分泌タンパク質もいくつか同定されている。しかし、これらのタンパク質の濃度勾配が観察された例はない。数年前われわれは、誘因性の軸索ガイド分子として考えられている分泌タンパク質 Netrin が「受容体の軸索内局在」という軸索内パターンニングに基づくメカニズムによって、濃度勾配とは異なるパターンに再配置されることを発見した (Hiramoto et. al, 2000)。そこで、反撥シグナルと考えられている Slit に関してその作用機構を再検討した。Slit の受容体 ROB0 の変異体では、本来前後方向に伸びる縦走軸索が正中線に向かって間違った道筋をたどる。ショウジョウバエ胚で Slit の異所的発現実験を行った結果、この ROB0 の作用には Slit が濃度勾配を形成することは不必要であることが明らかになった。これは、長距離作用を呈す反撥因子 Slit についても、化学走性仮説に基づく考えが間違っていることを示している。ROB0 は、縦走軸索が体節モジュールの境界に近づいたときに軸索先端の成長円錐で発現し、軸索を正中線へと誘導する Netrin 信号を無効化していることも明らかになった (Hiramoto and Hiromi, 2006)。

(3) 細胞移動と突起伸長のスイッチング (遺伝研グループ)

神経組織構築において神経細胞が行う重要な素過程に「細胞移動」と「突起伸長」があ

る。これらの細胞行動は、「細胞体」と「神経突起」という二つの細胞内区画が行う行動が、「共役して起こる」か「独立している」かで区別されるが、そのスイッチング機構については不明である（図2）。われわれは、細胞移動における細胞体とそこから伸びる突起との連携を調べることにより、複数の細胞内区画の間の「協調」の機構を解析している。

誕生後に長距離の細胞移動を行う神経細胞の代表例として終脳のlot細胞が挙げられる。lot細胞は終脳新皮質で生まれた後、腹側に向かって接線方向に移動する。この行動は器官培養で再現でき、lot細胞が移動方向に先端突起を伸ばしつつ動くことが観察できる。われわれは、この器官培養系にprotein kinase 阻害剤であるK252aを投与すると細胞体の動きが抑えられる一方で、先端突起の伸長は抑えられないという事を発見した。伸長を続ける突起の一部は、目的地である予定嗅索領域に到達すると正常に90度回転できるので、細胞体の移動が阻害されても神経突起のガイダンスは正常に機能しうることがわかった。今回発見した現象は、細胞が移動から突起伸長への切り替えをする際の細胞内機構を探る重要な手がかりとなるだろう。

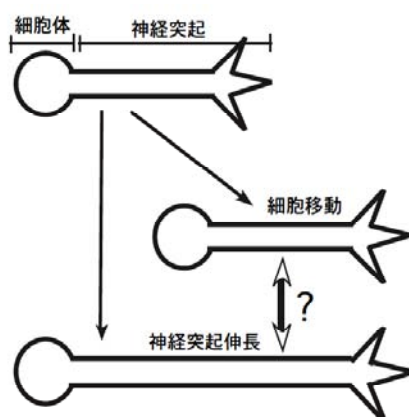


図2 細胞移動と突起伸長のスイッチング。
細胞移動と突起伸長の本質的な違いは、細胞体と神経突起の運動行動の共役の有無にある。多くの神経細胞では細胞移動に引き続いて突起伸長が起こるが、その切り替え機構は知られていない。

（4）神経成長円錐における局所的蛋白質合成の役割（横浜市大グループ）

神経突起先端の成長円錐部には多くの種類の mRNA が存在する。しかし、成長円錐部での局所的タンパク質合成の生理的意義やその調節機構については不明な点が多い。われわれは、ニワトリ後根神経節培養細胞の NGF 刺激による突起伸長の系を利用して、神経突起伸長における局所的蛋白質合成の機構と意義を解析した。タンパク質翻訳伸長因子 eEF2

(eukaryotic elongation factor 2) をレーザー分子不活性化法 (CALI 法) を用いて成長円錐局所で急性的に機能阻害したところ、NGF 刺激によって誘導された神経突起伸長は一過性に阻害された。成長円錐の糸状仮足や葉状仮足の形態や運動性には影響が認められなかったため、成長円錐部における局所タンパク質合成系は、突起伸長に直接的に寄与する微小管重合に関連するタンパク質を新生することが示唆された。

eEF2 はリン酸化によって活性調節を受けることが知られている。NGF 刺激を与えると、成長円錐部では、タンパク質合成を促進する非リン酸化型 eEF2 が豊富に分布していた。eEF2

の脱リン酸化酵素 PP2A を薬理的に阻害すると、成長円錐部で脱リン酸化型 eEF2 が減少し、神経突起伸長は抑制された。また、ATP 刺激や高 KCl 刺激による細胞内カルシウム濃度上昇によって eEF2 の特異的リン酸化酵素 EF2K を活性化することでも同様に神経突起伸長が抑制された。このことは、カルシウム依存的に EF2K を活性化して局所的タンパク質合成を「抑制する」シグナル伝達経路の存在を示唆している。一方、NGF による細胞内カルシウム濃度の上昇作用と EF2K の活性化の関連性が認められないことから、NGF の下流には PP2A を介して eEF2 の脱リン酸化を促進し、局所的タンパク質合成を「活性化する」経路もあると考えられる。神経突起伸長は、これらの経路による局所的蛋白質合成の調節によって制御される可能性が高い。

3. 研究実施体制

遺伝研グループ

- ①研究分担グループ長：広海 健（遺伝研・発生遺伝、教授）
- ②研究項目：
 - (1) 神経軸索の細胞自立的パターンニング
 - (2) 軸索内パターンニングの神経発生における役割
 - (3) 軸索側枝形成のプロテオーム解析

横浜市大グループ

- ①研究分担グループ長：五嶋 良郎（横浜市大・分子薬理、教授）
- ②研究項目：
 - (1) 線虫 Netrin 経路の分子遺伝解析
 - (2) 軸索ガイダンスシグナルによる軸索内輸送の制御
 - (3) 新しいタンパク質機能破壊法の開発

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文(原著論文)発表

- Hiramoto, M. and Hiromi, Y. (2006). ROBO directs axon crossing of segmental boundaries by suppressing responsiveness to relocalized Netrin. **Nat Neurosci.** *9*, 58-66.
- Iwanami, M., Hiromi, Y. and Okabe, M. (2005). Cell-type specific utilization of multiple negative feedback loops generates developmental constancy. **Genes Cells.** *10*, 743-752.
- Kawasaki, T., Ito, K. and Hirata, T. (2006). Netrin 1 regulates ventral tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. **Development** *133*, 845-853.

- Koma, Y., Ito, .A, Watabe, K., Hirata, T., Mizuki, M., Kitamura, T., Kanakura, Y. and ,Kitamura, Y. (2005). Distinct role for c-kit receptor tyrosine kinase and SgIGSF adhesion molecule in attachment of mast cells to fibroblasts. **Lab. Invest.** *85*, 426-435.
- Morita A., Yamashita N., Sasaki Y., Uchida Y., Nakajima O., Nakamura F., Yagi T., Taniguchi M., Usui H., Katoh-Semba R., Takei K., Goshima Y. (2006): Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin3A-Fyn signaling. **J Neurosci.** *26*, 2971-80.
- Arimura N., Menager C., Kawano Y., Yoshimura T., Kawabata S., Hattori A., Fukata Y., Amano M., Goshima Y., Inagaki M., Morone N., Usukura J., Kaibuchi K. (2005): Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. **Mol Cell Biol.** *22*, 9973-84.
- Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., Nakamura, F., Takei, K., Ihara, Y., Mikoshiba, K., Kolattukudy, P., Honnorat, J. and Goshima, Y. (2005). Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3 β phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer' s disease. **Genes Cells.** *10*, 165-179.