

「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 発生遺伝研究部門 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

器官構築は、様々な細胞運命を獲得した細胞を的確に「配置」することによって達成される。神経系では、細胞配置は神経回路形成、つまり、神経細胞の突起による標的探索と配線という形をとる。神経回路形成のための位置情報は、細胞外の分泌因子の分布で担われている、という考え方が一般的である。しかし、長い神経突起「内」の分子分布も神経系全体での位置情報を提供し、「長距離作用」や「領域への区画化」を行ない得る。われわれは、神経突起内の分子分布を「細胞内パターンニング」ととらえ、その機構や器官構築における意義を解析している。これまでに、ショウジョウバエの神経細胞は軸索を複数の「区画」に分割し、それぞれの区画に特異的膜タンパク質を配置する細胞自立的な能力を持っていることを見いだした。軸索ガイダンス受容体の細胞内局在の分子機構を解析するため、線虫を用いた遺伝的スクリーニングを行い、新規遺伝子を同定した。また、軸索投射の受け手側の樹状突起にも「突起内パターン」があり、それが軸索の層特異的投射を制御している可能性を検討している。数多くの細胞からなる器官の「一つの細胞内の分子分布」に着目した解析により、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. 神経突起の細胞自立的な区画化 (遺伝研グループ)

神経細胞は、軸索や樹状突起といった長い突起を伸ばす。これらの突起上には、神経活動に必要なチャネルや神経発生において重要な役割を果たす受容体などの分子が特定のパターンで分布する。しかし、突起上での分子の局在パターンがどのようにして形成されるのかはよく分かっていなかった。我々は、軸索ガイダンスに関わるさまざまな受容体が軸索上でセグメント状に分布することに着目し、その局在化のメカニズムを検討した。ショウジョウバエ神経細胞の低密度培養法を用いることにより次のことが明らかになった。1) 軸索上のセグメント状の局在パターンは細胞自立的に形成されうる。2) 異なる複数の分子が同じセグメント状の局在パターンを示す。3) 分子の局在するセグメントの境界には膜タンパク質の拡散を妨げる障壁が存在する。これらのことから、軸索の膜上には拡散障壁によって仕切られるセグメント状の膜区画が存在し、それぞれの区画内に分子が留まることによって分子の局在が維持されているのではないかと考えている。以上のような現象は、軸索内において区画の「位置」がどのようにして決まるのか、すなわち、細胞内における位置情報の形成機構、という新たな問題に取り組む手がかりとなる可能性がある。

## 2. 線虫 *C. elegans* における軸索ガイダンス分子の細胞内局在機構 (横浜市大グループ)

軸索ガイダンス受容体の細胞内局在は、その細胞の軸索ガイド機能や神経系内の位置情報提供などに重要な役割を果たす。しかし、細胞内局在の分子機構はほとんど知られていない。我々は線虫 *C. elegans* を用い、進化的に保存された軸索ガイダンス受容体である UNC-5 の細胞内局在に必要な遺伝子を検索した。その結果、*unc-51* 変異体と *unc-14* 変異体において UNC-5 タンパク質が神経細胞の細胞体に蓄積することを見いだした。*unc-51*, *unc-14* 変異体は、DD/VD 神経の軸索ガイダンスに関して、受容体をコードする *unc-5* やそのリガンド Netrin をコードする *unc-6* の変異体と遺伝的に相互作用した。また、UNC-5, UNC51, UNC-14 タンパク質は神経細胞の細胞質に共局在していた。*unc-51*, *unc-14* 変異体では UNC-5 以外の軸索ガイダンス受容体の細胞内分布には異常はなかった。これらの結果は、UNC-51 と UNC-14 が UNC-5 の細胞内局在を特異的に制御していることを示す。

UNC-51 は酵母のオートファジーに必要な APG1 に相同なセリン/スレオニンキナーゼであり、その結合分子である UNC-14 は Rab, Rap 等の GTPase のシグナリングに重要と考えられる RUN ドメインを有する分子である。しかしながら、軸索ガイダンスにおけるそれらの分子機能はほとんど知られていない。UNC-51, UNC-14 の機能をより詳細に解析する目的で、現在、*unc-51*, *unc-14* 変異体の表現型を抑制するサプレッサー変異体をスクリーニングしている。

## 3. 標的細胞の樹状突起における領域特異的な軸索投射機構 (遺伝研グループ, 名大・藤澤研との共同研究)

神経回路形成において軸索が標的細胞と適切に接続するためには、軸索を標的細胞へと導くだけでなく、標的細胞上においても特定の領域のみに投射させることが必要となる。標的細胞がどのようにして領域特異性の情報を提供するのかはほとんどわかっていない。我々はマウス海馬をモデルシステムとして用い、標的細胞上での軸索投射を制御する分子メカニズムの解明を試みている。

海馬 CA3 野の神経細胞は頂上および基底樹上突起を有し、歯状回由来の苔状線維が、頂上樹状突起の細胞体近位部と一部の神経細胞の基底樹状突起に特異的に投射する。我々は、plexin-A2 ノックアウトマウスでは苔状線維が頂上樹状突起に投射できず、基底樹状突起に投射することを見出した。plexin-A2 の機能は標的細胞側で必要とされており、plexin-A2 タンパク質は標的細胞の樹状突起に局在していた。一方、plexin-A2 のリガンドである Sema6A は苔状線維に反発因子として機能し、CA3 野の樹状突起領域に分布していた。これらの結果は、標的細胞の樹状突起において、plexin-A2 が Sema6A の軸索反発活性を中和することによって状態線維の投射を制御していることを示唆している。

## 3. 研究実施体制

### (1)「遺伝研」グループ(広海 健)

#### ①研究者名

広海 健 (国立遺伝学研究所 教授)

#### ②研究項目

- ・ 神経軸索の細胞自立的パターンニング
- ・ 軸索内パターンニングの神経発生における役割
- ・ 軸索側枝形成のプロテオーム解析

(2)「横浜市大」グループ(五嶋良郎)

①研究者名

五嶋 良郎 (横浜市立大学 教授)

②研究項目

- ・線虫 Netrin 経路の分子遺伝解析
- ・軸索ガイダンスシグナルによる軸索内輸送の制御
- ・新しいタンパク質機能破壊法の開発

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1)論文発表(原著論文)

- Gil, V., Nicolas, O., Mingorance, A., Urena, J.M., Tang, B.L., Hirata, T., Saez-Valero, J., Ferrer, I., Soriano, E., del Rio, J.A. (2006). Nogo-A and Nogo receptor expression in the human hippocampus in neuronal aging and Alzheimer's disease. **J. Neuropathol. Exp.Neurol.** 65, 433-444.
- Williams, D. W., Kondo, S., Krzyzanowska, A., Hiromi, Y. and Truman, J. W. (2006). Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. **Nature Neuroscience** 9,1234-1236.
- Kondo, S., Senoo-Matsuda, N., Hiromi, Y. and Miura, M. (2006). DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation. **Mol. Cell. Biol.** 26, 7258-7268.
- Suto, F., Tsuboi, M., Kamiya, H., Mizuno, H., Kiyama, Y., Komai, S., Shimizu, M., Sanbo, M., Yagi, T., Hiromi, Y., Chedotal, A., Mitchell, K.J., Manabe, T. and Fujisawa, H. (2007). Interactions between Plexin-A2, Plexin-A4, and Semaphorin 6A Control Lamina-Restricted Projection of Hippocampal Mossy Fibers. **Neuron** 53, 535-547
- Fouquet, C., Di Meglio, T., Ma, L., Kawasaki, T., Long, H., Hirata, T., Tessier-Lavigne, M., Chedotal, A., Nguyen-Ba-Charvet, K. T. (2007). Robo1 and robo2 control the development of the lateral olfactory tract. **J. Neurosci.** 27, 3037-3045
- Nakajima, O., Nakamura, F., Yamashita, N., Tomita, Y., Suto, F., Okada, T., Iwamatsu, A., Kondo, E., Fujisawa, H., Takei, K., and Goshima, Y. (2006). FKBP133: A novel mouse FK-506 binding protein homolog alters growth cone morphology. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 346, 140-149.
- Ogura, K., Goshima, Y. (2006). The autophagy-related kinase UNC-51 and its binding partner UNC-14 regulate the subcellular localization of the Netrin receptor UNC-5 in *Caenorhabditis elegans*. **Development** 133(17), 3441-50.
- Kaneko, S., Iwanami, A., Nakamura, M., Kishino, A., Kikuchi, K., Shibata, S., Okano, H.J., Ikegami, T., Moriya, A., Konishi, O., Nakayama, C., Kumagai, K., Kimura, T., Sato, Y., Goshima, Y., Taniguchi, M., Ito, M., He, Z., Toyama, Y., Okano, H. (2006) A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. **Nat Med** 12(12), 1380-9.
- Charrier E, Mosinger B, Meissirel C, Aguera M, Rogemond V, Reibel S, Salin P, Chounlamountri N,

Perrot V, Belin MF, Goshima Y, Honnorat J, Thomasset N, Kolattukudy P. (2006). Transient Alterations in granule cell proliferation, apoptosis and migration in post-natal developing cerebellum of CRMP1<sup>-/-</sup> mice. **Genes Cells** 11(12), 1337-52.

○ Yamashita, N., Uchida, Y., Morita, A., Ohshima, T., Hirai, S., Nakamura, F., Usui, H., Taniguchi, M., Mikoshiba, K., Honnorat, J., Kolattukudy, P., Thomasset, N., Takei, K., Takahashi, T., and Goshima, Y. (2006). CRMP1 mediates Reelin signaling in cortical neuronal migration. **J. Neuroscience** 26, 13357-13362.

○ Iizuka, A., Sengoku, K., Iketani, M., Nakamura, F., Sato, Y., Matsushita, M., Nairn, A.C., Takamatsu, K., Goshima, Y., and Takei, K. (2007). Calcium-induced synergistic inhibition of a translational factor eEF2 in nerve growth cones. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 353, 244-250.

## (2) 特許出願

平成 18年度特許出願: 1件 (CREST 研究期間累積件数: 1 件)