

分野紹介

脳神経系の発生・分化のメカニズムの解明をめざして



脳神経発生・分化分野
教授 御子柴 克彦

神経系はニューロンとグリアに大別される全く性質の異なる細胞集団より構成されており、これらの細胞の緊密な相互作用のもとに神経系に特異的な高次機能が成り立っている。この洗練された細胞社会である神経系、特に高等動物の中枢神経系の形態形成がどのようにして行われるのか、またいったん完成した神経回路網がどのようにして記憶、学習の基礎となる可塑性という性質を保持しているのかを明らかにすることを目標としている。

中枢神経系の解析の為に、発想を豊かにするため出身大学や研究領域をこえた様々な研究者の集団が必要であり、現在のグループは多種多様な人達があつまり、にぎやかに研究を展開している。現在、私達の研究室では分子生物学的な手法は、誰もが出来るようにトレーニングしながら神経組織や神経細胞の培養、モノクローナル抗体の作製、アデノウイルスベクターや gene gun による細胞特異的遺伝子発現技術の開発、各種神経特異的な遺伝子のプロモーターの解析、in situ hybridization 法、免疫組織化学、電気生理学的手法として、パッチクランプ、Ca²⁺イメージング、エバネセント光線を利用した一分子イメージング、人工脂質二重膜によるチャネルの解析法等の技術を利用しながら、研究を進めている。特に当研究室の特徴は、正常機能の解析の為にミュータントマウスを導入したことであり、これまでにIP₃レセプターの発見やニューロンの位置を決める分子メカニズムの解明などを進めてきた。現在の研究の主な内容について紹介する。

(1) IP₃レセプターの機能の解明

小脳ミュータントマウスで欠損していた小脳プルキンエ細胞に豊富なリン酸化をうける糖タンパク質であるP400タンパク質がIP₃レセプターであることを発見し、その全構造を決定した (Nature 342, 32-38, 1989)。またIP₃レセプターが細胞内のCa²⁺振動を発振する装置であることを明らかにしてきた (Science 257, 251-255, 1992)。

・IP₃レセプターの発生・分化及び神経可塑性における役割

IP₃レセプターは授精 (Science 257, 251-255, 1992)、卵の活性化 (Cell 73, 555-570, 1993) に必須であることを明らかにした。初期発生では背腹軸形成はボディパターン形成に重要である。背側化は特に神経形成に重要である。最近、IP₃/Ca²⁺シグナルが、腹側化因子として重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた (Science 278, 1940-1943, 1997)。更に、IP₃レセプターの下流の因子の探索をおこなった結果、NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cell) が重要な下流因子であることを明らかにした。NF-ATのドミナントネガティブフォームを受精後4割球の時期に注入することにより腹側を背側に変換し、二次軸が形成された。しかもこれは、GSK3βの過剰発現により回復した (Nature 417, 295-299, 2002)。

またIP₃レセプターがニューロンの突起伸展 (Science 282, 1705-1708, 1998) に重要であること、欠損動物は、癲癇をおこすこと (Nature 379, 168-171, 1996)、IP₃レセプターが脳のシナプス可塑性に関わることを明らかにしてきた (Nature 408, 584-588, 2000)。

従来教科書的にはIP₃レセプターは細胞質の中央に固定されて描かれているが、細胞内をダイナミックに移動し、細胞表面膜のチャネルともカップリングしていることを明らかにした (Science stke 1-4, 2000)。

(2) 神経細胞の脳内での位置決定機構の解明

a) リーラーミュータントマウスを利用したリーラー遺伝子産物に対する抗体作製

我々は、脳のしわ形成がなく、ニューロンの位置異常を示すリーラーミュータントマウスには、正常なリーラー遺伝子産物がないと仮定した。そして、リーラーマウスへ正常マウス胎仔脳を免疫して世界で最初にミュータントを用いてリーラー遺伝子産物に対する抗体の作製に成功した (Neuron 14, 899-912, 1995)。この抗体 (CR50と命名した) は、Cajal-Retzius (CR) ニューロンを染色した。CRニューロンの機能はこれ迄不明であったが、CR50抗体を用いてCRニューロンからは、リーリンが分泌され、CR50抗体を加えることによりリーリンの機能を阻害し、胎児期のニューロンの位置異常を引き起こすことが明らかとなった。CR50抗体は、リーリンのN末端と反応する。またCR50抗体



は海馬の特定のニューロンの連絡も阻害する (Nature 385, 70-74, 1997) ことからリーリンはニューロンの位置決定のみならず線維連絡にも関わる可能性も考えられた。

b) リーリン下流の *disabled-1* の変異をおこした脳のしわのない新規な *Yotari* ミュータントマウスの発見

Disabled-1 は、Fyn, Src, Abl チロシンキナーゼのアダプター蛋白質である。東大医科で飼育していた IP_3 レセプター欠損マウスのコロニーの中から発見した脳のしわがなくニューロンの位置異常のあるマウスはヨタヨタと転げ回るので、ヨタリ (*yotari*) と命名した。この *yotari* マウスは *disabled-1* (*Dab1*) 変異マウスであった (Nature 389, 730-733, 1997)。Cdk5 の欠損マウスもリーラーと同じ脳のしわ欠損を示す。我々の研究室でヨタリ、リーラー、Cdk5 欠損マウスを用いて Cdk5/p35 とリーリン・シグナル (リーリン/*Dab1*) は共働的に皮質神経細胞の位置決定に機能していることも明らかにした (PNAS 98, 2764-2769, 2001, J. Neurosci. 22, 4036-4044, 2002)。脳内で Cdk5/p35 が *Dab1* をリン酸化している事も明らかにした。

(3) 神経外胚葉および神経堤の形成

Zic ファミリーはマウスの小脳顆粒細胞系譜に強く局限して発現する Zn フィンガー型転写因子をコードする遺伝子群として見だし、*Zic*: (*zinc finger protein enriched in cerebellum*) と命名した。我々は、これまでに *Zic* ファミリーが *Zic* と独立に発表されたショウジョウバエのペアルール遺伝子 *odd-paired* (*wingless* と *engrailed* を支配する) の脊椎動物ホモログであること (J. Biol. Chem. 271, 1043-1047, 1996)、*Zic* の Zn フィンガードメインは *Sonic hedgehog* の下流因子 *Gli* と高い相同性を示し、*Gli* の標的配列に結合し得ることなどを明らかにした。遺伝子ターゲティングにより、*Zic1* ないし *Zic2* は小脳を含めた背側の神経組織の増殖分化に不可欠の役割を持つことを明らかにした。また、ヒト *ZIC2* は前脳の葉構造が失われる全前脳症の原因遺伝子の一つであること (PNAS 97, 1618-1623) を明らかにした。ヒト *ZIC3* は左右軸に沿ったボディパターン形成に障害を持った遺伝病の原因遺伝子であること、そしてアフリカツメガエルを用いて心臓と内臓の位置を逆転することに成功した。*Zic3* は、*activin* 直下の遺伝子であった (Development 127, 4787-4795, 2000)。*Zic* 蛋白質の zinc フィンガードメインは *Gli* ファミリーの zinc フィンガードメインに直接結合し、*Zic* 蛋白質には共存する *Gli* 蛋白質の細胞内局在を変える性質があることを明らかにした。また両蛋白質は転写制御においても協調的に働くことを示した。

(4) 匂い及びフェロモン受容体の認識機構に関する研究

匂い物質を認識するためにはそのレセプターが必要であるが、これまでは鼻粘膜より得られた7回膜貫通タンパク質が、仮想的なレセプターと考えられていたに過ぎなかった。仮想的なレセプターをアデノウィルスベクターに組み込み、これを発現させた。またこれまでは、アフリカツメガエル卵を用いてレセプターの検出がなされていたが、この方法では解析できない為、直接、鼻粘膜へアデノウィルス粒子を噴霧して、鼻粘膜にレセプターを発現させはじめて、仮想的なものが本物であることを世界最初に証明した (Science 279, 237-242, 1998)。匂い分子は70種のうち厳密に一つのみ認識して、しかも構造特異的であった。現在フェロモン受容体についても同様の方法の試みを展開中である。

(5) イノシトールポリリン酸結合タンパク質・シナプトタグミンの機能の解明

細胞を刺激するとイノシトールポリリン酸 (IP_4 , IP_5 , IP_6) が細胞内で増加する。そこでイノシトールポリリン酸の機能を知るために IP_4 結合タンパク質を精製してアミノ酸配列を決定し、 IP_4 結合タンパク質としてシナプトタグミンを同定した (J. Biol. Chem. 269, 29206-29211, 1994)。シナプトタグミンの IP_4 結合部位を同定したところ、その部位はシナプトタグミンが細胞膜への融合部位であり、 IP_4 により、融合が阻害されることをイカの巨大シナプスで証明した (PNAS 91, 12990-12993, 1994)。これにより、イノシトールポリリン酸 (IP_4 , IP_5 , IP_6) がシナプトタグミンを介してシナプス伝達に関してネガティブな調節因子であることを世界に先駆けて示したことになる。また最近イノシトールポリリン酸結合部位 (C2B) が膜のリサイクリングにも関わることを明らかにしている。