

神経軸索の伸長経路を決める道標細胞の発現分子の検索

- 道標細胞の本質を探る -

平田 たつみ

(国立遺伝学研究所)

1 . 研究のねらい

発生時、神経細胞の軸索は迷うことなく、特定の経路を正確に選んで伸長する。この時軸索が何を目印にしているのかは、神経生物学の長年の謎であった。私はマウスの嗅球-終脳神経回路を使って、このテーマに取り組んでいる。嗅球の神経細胞の軸索は、終脳の特定領域を選択的に伸長する。この軸索の道標となるのが、モノクローナル抗体 (mAb) lot1が認識する神経細胞である。この道標細胞は、軸索の伸長に先立って将来の経路に並び、軸索をこの経路へと導く。本研究では、この道標細胞の起源ならびに発生機構を解析した。また、道標細胞が特異的に発現する分子として、mAb lot1が認識する抗原分子を同定した。

2 . 研究結果及び自己評価

(1) 道標細胞の発生機構

道標細胞はどこで生まれ、どのようにして将来の軸索経路に配列するのだろうか？この疑問に答えるために、様々な培養法を用いて、道標細胞の起源を探索した。その結果、この細胞は終脳新皮質とよばれる領域から、広範囲にわたって分化してくることが示された。終脳新皮質は、将来道標細胞が並ぶ軸索経路に比較すると、はるかに背側に位置する。もし実際の生体内で、道標細胞が新皮質で発生してくるとすれば、これらの細胞はかなりの距離にわたって終脳半球を腹側方向に移動しなければならない。しかし、このような方向への細胞移動は、これまで報告されていなかった。

そこで、この時期の終脳における実際の細胞移動の様子を、マウス胚全体を子宮外で培養する方法を用いて解析した。その結果、終脳新皮質で生まれた細胞が確かに腹側方向へと選択的に移動し、将来の軸索経路に並ぶことが確かめられた。このようにして移動した細胞の少なくとも一部は、mAb lot1陽性の道標細胞へと分化することも示された。以上の結果を総合すると、生体内で、道標細胞は終脳新皮質全体で発生し、腹側方向に移動して、将来の軸索経路に並ぶという興味深い発生過程をたどると考えられる。

(2) mAb lot1の認識する抗原分子の同定

mAb lot1 の認識する抗原は、免疫染色のパターンから膜タンパク質であると予想されたが、western blottingでも免疫沈降でも、この抗原分子を検出することはできなかった。このことは、mAb lot1の抗原決定部位が、膜からの抽出や可溶化にともなって破壊されるためであると考えられた。そこで、タンパク質を本来の立体構造に近い形で発現することにより、抗原分子を同定しようと考えた。具体的には、mAb lot1 の抗原分子を豊富に発現する領域からmRNA を調製してcDNA を合成し、これを哺乳類細胞用発現ベクターに組み込んでライブラリーを作成した。このcDNAライブラリーを哺乳類培養株細胞 (COS細胞) に導入し、コードするタンパク質を強制発現させた。その後、細胞をmAb lot1で免疫染色する事により、抗体が認識する分子を発現する細胞を顕微鏡下で検索した。約200,000クローンを検索したところ、mAb lot1で強く染色される細胞を生じるcDNAクローン1種類を単離する事ができた。このクローンの塩基配列を決定したところ、代謝型グルタミン酸レセプター1 (mGluR1)をコードしていることが明らかとなった。mGluR1は7回膜貫通タンパク質であり、神経伝達物質グルタミン酸のレセプターとして機能していると考えられている。この分子が本当にmAb lot1の抗原分子であるのかを確かめるために、mGluR1遺伝子欠損マウスを入手して、mAb lot1で免疫染色した。その結果、ホモ欠損マウス胚の脳において、染色性が完全に欠失していることが示された。このノックアウトマウスにおける道標細胞の動態と、この細胞がガイドする嗅球軸索の走行について現在解析中である。

自己評価

モノクローナル抗体lot1の認識する抗原分子を同定できたということで、本研究の第一目標は達成できたのではないかと考えている。しかし、同定した抗原分子が研究開始当初に期待した道標機能をもつとは考え難く、ある意味で研究がふりだしにもどった感否めない。予想していたこととはいえ、分子の局在から機能を推測する事の難しさならびに危険性をあらためて認識する事になった。とはい

え、本研究から得られた結果は今後の研究活動につながる貴重な材料となっており、これらを最大限活用して、嗅球－終脳神経回路形成を素過程に分解する努力を今後も続けてゆきたいと考えている。また、本研究から副産物的に見つかった道標細胞のユニークな細胞移動は、脳における新しい神経細胞の移動様式として広く受け入れられ、新たな研究分野として発展しつつあることを嬉しく感じている。

3．領域総括の見解

本研究者は、神経軸索が的確に伸長すべきところへ向かって伸長する機構の解明を目的に、マウス胚終脳を器官培養する方法を考案し、嗅球 終脳神経回路の神経軸索の伸長を対象に研究を行っている。その結果、モノクローナル抗体 lot1 が認識する神経細胞が所定の位置へ移動して軸索を導き、その Lot1 抗体が認識するのは、代謝型グルタミン酸リセプター1 であることを見出している。しかし、今だ混沌の感が深い。

4．主な論文

- 1．Sato, Y., Hirata, T., Ogawa, M., and Fujisawa, H. (1998). Requirement for early-generated neurons recognized by monoclonal antibody lot1 in the formation of lateral olfactory tract. J. Neurosci. 18, 7800-7810.
- 2．Hirata, T., and Fujisawa, H. (1999). Environmental control of collateral branching and target invasion of mitral cell axons during development. J. Neurobiol. 38, 93-104.
- 3．Tomioka, N., Osumi, N., Sato, Y., Inoue, T., Nakamura, S., Fujisawa, H., and Hirata, T. (2000). Neocortical origin and tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. J. Neurosci. 20, 5802-5812.
- 4．Hirata, T., Fujisawa, H., Wu, J. Y., and Rao, Y. (2001). Short -range guidance of olfactory bulb axons is independent of repulsive factor slit. J. Neurosci. 21, 2373-2379.

5．その他

口頭発表2件（うち海外1件）、招待講演10件（うち海外1件）