

研究課題別評価

1 研究課題名: Rho 類似 G 蛋白質の神経回路網形成に果たす役割

2 研究者氏名: 星野 幹雄

研究員: 松尾 直毅 (研究期間; H14.4.1 ~ H15.3.31)

川内 健史 (研究期間; H16.4.1 ~ H16.6.15)

3 研究の狙い:

神経細胞移動は、その異常によっててんかん、精神遅滞などがもたらされることから、重要な発生過程であると考えられるが、様々な研究がなされてきたにも関わらずその個体レベルでの分子機構については未だに良くわかっていない。我々は、神経細胞移動に関わる未同定の重要な分子、あるいは分子カスケードがまだ数多くあるだろうと推測した。特に、神経細胞移動過程では細胞形態のダイナミックな変化があることが知られており、それ故、細胞骨格系を制御する Rho 類似 G 蛋白質が、神経細胞移動時の振る舞いを決定する分子スイッチとして中心的な働きをしているのではないかと考えた。Rho 類似 G 蛋白質の単純なノックアウト動物は早い発生過程で致死となることから、我々は子宮内エレクトロポレーション法を応用することによって、Rho 類似 G 蛋白質が神経回路網形成に果たす役割について個体レベルで明らかにしていくことを目指した。

4 研究成果:

(1) 神経細胞移動の分子機構の理解

子宮内エレクトロポレーション法を用いて STEF/Tiam1 および Rac1 に対するドミナントネガティブ体 (DN-STEF/Tiam1・DN-Rac1) を発生期の大脳皮質 (胎生 14 日) に導入する実験を行ったところ、DN-STEF/Tiam1 もしくは DN-Rac1 を発現させた細胞は皮質板まで移動することができず、中間帯にとどまることが観察された。さらに、DN-STEF/Tiam1 を導入した大脳皮質の表現型は、DN-Rac1 を導入した場合と比較して神経細胞移動の異常がマイルドであったことから、この過程に関わる Rac1 活性化因子は STEF および Tiam1 以外にも存在することが示唆された。実際、我々は別の Rac1 特異的 GEF である P-Rex1 も神経細胞移動に関与するという結果を得た。P-Rex1 は EGF や NGF に応答して活性化する GEF であることを我々は見いだしており、また EGFR は神経細胞移動に関与しているという過去の知見を考え合わせると、EGF などの外部シグナルによって移動神経細胞で P-Rex1 が活性化し、さらに Rac1 経路が活性化しているのかもしれない (J. Neurosci, in revision)。

DN-Rac1 導入細胞では、特異的に JNK の活性化が阻害されていたことから、大脳皮質の移動神経細胞において Rac1 の下流で JNK が活性化していることが示された。さらには、大脳皮質への DN-JNK の導入実験や大脳皮質スライス培養系に JNK 阻害剤を添加する実験などで、やはり神経細胞移動が阻害されたことから、JNK も大脳皮質の放射状神経細胞移動に関与していることが示された。我々はさらに大脳皮質の初代培養系に対して JNK 活性阻害剤を加えると、神経突起での微小管の安定性が低下することを明らかにし、その際には MAP1B のリン酸化が大きく阻害されることを見いだした。大脳皮質における DN-JNK 発現細胞の先導突起が異常な形態を示すことを考え合わせると、Rac1 は JNK-MAP1B 経路を介して微小管動態を制御し、先導突起の形態・動態を適切に調節することにより神経細胞移動に関与していると考えられた (EMBO J. 2003)。核へのシグナルを伝えると考えられてきた JNK が微小管の安定性を制御し、神経細胞移動に関与しているというこれらの結果は我々が報告した当時としては非常に意外なものであったが、我々の報告 (EMBO J., 2003) と全く同時期に Huang らによって JNK がケラトサイトなどのいくつかの培養細胞の移動にも関与していることが報告され、その後、いくつかのグループの研究により JNK が広範囲の細胞種において移動を制御していることが最近では明らかとなって来ている。

(2)小脳無形成マウス *cerebelless* の解析

我々はあるトランスジェニックマウス作製の過程で、成体において、小脳皮質の全ての領域を欠失し、よるめく、頻繁に転倒するなどの小脳失調性症状を示す、新たな突然変異マウス *cerebelless* (*cbll*)を得た。このマウスの小脳原基では全ての発生過程を通じて、プルキンエ細胞、ゴルジ細胞、籠細胞、星状細胞、小型小脳核細胞などの GABA 作動性の抑制性神経細胞が全く誕生してこないが、大型小脳核細胞や顆粒細胞などのグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞は誕生してくることがわかった。発生が進むにつれて、顆粒細胞は二次的に消失していくが小脳核細胞は成体まで残る。また、少なくとも胚発生の段階では、小脳原基以外の中枢神経系においては異常が認められていない。以上から、この *cbll* ミュータントでは小脳原基脳室帯からの GABA 作動性神経細胞の発生に関与する遺伝子に異常があると考えられたため、連鎖解析によりその原因遺伝子 *Ptf1a* をクローニングした。*Ptf1a* は、膵臓の発生に必須な bHLH 転写因子をコードしている遺伝子であった。*in situ* ハイブリダイゼーションにより、*Ptf1a* 遺伝子が小脳原基の脳室帯でのみ発現していることが明らかになった。*Ptf1a* locus に Cre リコンビナーゼをノックインしたマウスを手に入れたので、*ROSA26-loxP-lacZ* マウスとの交配によって、*Ptf1a* 遺伝子が発現していた細胞の lineage trace が可能となった。これをノックインのヘテロ接合体バックグラウンド(正常な表現型を示す)で解析を行ったところ、小脳における全ての GABA 作動性細胞では陽性であったが、グルタミン酸作動性である大型小脳核細胞では陰性であった。すなわち *Ptf1a* 遺伝子は、小脳の脳室帯の神経前駆体細胞の中でも、将来 GABA 作動性神経細胞を生み出す細胞でのみ発現しているということが明らかになった。さらに、子宮内エレクトロポレーション法により、胎生 14 日目のマウスの大脳皮質の脳室帯に *Ptf1a* 発現ベクターを導入し、数日後に遺伝子導入された細胞について調べた。マウスでは大脳皮質脳室帯からはグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞しか生まれないとされており、実際にコントロール実験においてはそれが再確認されたが、*Ptf1a* を導入された細胞は GABA 陽性となっていた。コントロールのグルタミン酸作動性細胞が放射状細胞移動をするのに対して、それらの GABA 陽性細胞は接線方向の移動様式を示すことも明らかになった。これは、グルタミン酸作動性神経細胞のみを生み出す神経前駆細胞でこの遺伝子を発現させると、そこから生み出される神経細胞に GABA 作動性細胞の様々な形質を付与させることができることを示している。以上の結果から、*Ptf1a* が小脳の脳室帯の GABA 作動性神経細胞を生み出す神経前駆細胞で発現し、そこから生み出される細胞が GABA 作動性神経細胞の形質を獲得するのに必要な働きをしていることを示しているということが明らかになった (Neuron, in revision)。

5 自己評価:

当初は、子宮内エレクトロポレーション法の他に、コンディショナルターゲティングも併用して、Rho 類似 G 蛋白質の役割を調べる予定であった。しかし、そのマウスを作製している途中で、国内外で Rac のコンディショナルノックアウトマウスが作製されたという情報を得た事と、我々のドミナントネガティブ体の子宮内エレクトロポレーション実験が予想以上にうまく働いたことから、研究期間後半からは子宮内エレクトロポレーション法による解析に集中した。結果として、コンディショナルノックアウトマウスの作製に時間を取られなかったために、Rac1 の働きだけでなく、その上流因子(神経栄養因子-P-Rex1/STEF/Tiam1)および下流因子(JNK-MAP1B-微小管)の果たす役割にも切り込んで、神経細胞移動に関わる新たなシグナル伝達カスケードを提唱できたことは良かったと考えている。また、これまで神経細胞移動に関与すると考えられてきた分子は核の移動に関与するものが多かったが、先導突起の形成に関わる分子はほとんど明らかになってはいなかった。これはおそらくは先導突起の形成に関与する分子が Rac1 や JNK のように神経系以外の細胞において様々な細胞現象で重要な役割を果たしているために、神経細胞移動における機能については従来の遺伝学的な手法では解析できなかったためであろうと考えられる。その部分に貢献できたことも成果の一つであると考えている。

しかし、未だに神経細胞移動の分子機構の全貌は明らかになってはいない。今後も個体レベルでの研究にこだわって、その全体像を明らかにしていくことを目指す。

6 研究総括の見解:

試行錯誤的な状況が続いていたが、漸く独自の優れた実験系を立ち上げることに成功し、注目すべき成果が上がり始めた。こうした成長経過は、PRESTOによる若手育成の一つのモデルであって参考になり、注目してよい。今後の成果を見守りたい。それを十分に期待し得るだけの素質が現れてきている。

7 主な論文等:

(1) 論文・総説

1. Masato Yoshizawa, Mikio Hoshino, Masaki Sone and Yo-ichi Nabeshima
Expression of stef, an activator of Rac1, correlates with the stages of neuronal morphological development in the mouse brain.
Mech. Dev., 113, 65-68 (2002).
2. Naoki Matsuo, Mikio Hoshino, Masato Yoshizawa, and Yo-ichi Nabeshima
Characterization of STEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1, required for neurite growth.
J. Biol. Chem. 277, 2860-2868 (2002)
3. Masato Yoshizawa, Masaki Sone, Naoki Matsuo, Takahiro Nagase, Osamu Ohara, Yo-ichi Nabeshima, and Mikio Hoshino
Dynamic and coordinated expression profiles of Dbl-family guanine nucleotide exchange factors in the developing mouse brain.
Gene Expression Patterns, 3, 375-381 (2003)
4. Naoki Matsuo, Mami Terao, Yo-ichi Nabeshima, and Mikio Hoshino
Roles of STEF/Tiam1, guanine nucleotide exchange factors for Rac1, in regulation of growth cone morphology.
Mol. Cell. Neurosci., 24, 69-81 (2003)
5. Takeshi Kawauchi, Kaori Chihama, Yo-ichi Nabeshima, and Mikio Hoshino
The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration.
EMBO Journal, 22, 4190-4201 (2003)
6. Mari Dezawa, Hiroshi Kanno, Mikio Hoshino, Hirotomi Cho, Naoya Matsumoto, Yutaka Itokazu, Nobuyoshi Tajima, Hitoshi Yamada, Hajime Sawada, Hiroto Ishikawa, Toshiro Mimura, Masaaki Kitada, Yoshihisa Suzuki and Chizuka Ide
Specific induction of neuronal cells from bone-marrow stromal cells and application for autologous transplantation.
J. Clin. Invest., 113, 1701-1710 (2004)
7. Takashi Nishimura, Tomoya Yamaguchi, Katsuhiko Kato, Masato Yoshizawa, Yo-ichi Nabeshima, Shigeo Ohno, Mikio Hoshino, and Kozo Kaibuchi
PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42 signaling to Rac activation through STEF/Tiam1, RacGEFs.
Nature Cell Biol. in press
8. Mari Dezawa, Mikio Hoshino and Chizuka Ide
Treatment of neurodegenerative diseases using adult bone marrow stromal cell-derived neurons. Expert Opinion on Biological Therapy, in press
9. Masato Yoshizawa, Takeshi Kawauchi, Masaki Sone, Yoshiaki V. Nishimura, Mami Terao, Kaori Chihama, Yo-ichi Nabeshima and Mikio Hoshino

Involvement of a Rac activator, P-Rex1, in neurotrophin-derived signaling and neuronal migration.

J. Neuroscience, in revision

10. Mikio Hoshino, Shoko Nakamura, Kiyoshi Mori, Takeshi Kawauchi, Mami Terao, Yoshiaki V. Nishimura, Akihisa Fukuda, Naoki Matsuo, Masaki Sone, Toshio Terashima, Christopher V.E. Wright, Yoshiya Kawaguchi, Kazuwa Nakao, Yo-ichi Nabeshima
Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum, Neuron, in revision

11. 川内健史, 星野幹雄
大脳皮質形成における神経細胞移動の分子機構
神経研究の進歩 第49巻・第1号(2005年)

(2) 招待講演(英語)

1. Mikio Hoshino
Molecular Mechanisms underlying neuronal migration *in vivo*.
Special Seminar, Imperial College School of Medicine, ロンドン 2004年8月2日
2. Mikio Hoshino, Shoko Nakamura, and Yoichi Nabeshima
Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum
JBS International Symposium in 2005 "New Frontier of Transcription Research" 群馬県草津
2005年1月11日

(3) 学会発表 17件(うち海外発表 8件)