「脳を知る」
平成８年度採択研究代表者

野田　昌晴

（岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所　教授）

「神経ネットワーク形成の遺伝子プログラム」

１．研究実施の概要

脳形成機構の分子レベルでの解明は、それが多くの異なる過程を経て形成されることからも、困難な課題があることが推測される。我々は特に、神経系における領域特異性獲得の分子機構の解明に向けた研究を、網膜における領域特異性の形成をモデルとして行っている。これは脳における領域特異的神経結合形成の基盤を明らかにする研究でもある。具体的には、まず網膜において領域特異的発現を示す分子群を網羅的に単離・同定し、その機能と分子間の相互関係を明らかにすることを通じて、普遍的なメカニズムの解明を目指している。これまでに多くの新規分子を含むトポグラフィック分子群を同定し、引き続いて、各分子の構造、機能、分子間の相互関係を明らかにする研究を展開している。また、脳における特異領域の形成並びに、特異機能の発現という関点から、プロテインチロシンホスファターゼβ/ζおよび機能未知のNaチャンネルの役割解明に向けた研究も併せて行っている。

2. 研究実施内容

網膜視蓋投射グループ：

脳における特異的神経結合形成の分子基盤は、脳の発生過程における領域特異性を生み出す遺伝子発現パターンの違いとしてとらえることができる。従って、発生の過程を追って領域特異的（トポグラフィック）な発現を示す遺伝子をシステマティックに検出、単離することができれば、その領域の構造的、機能的特異性を決定づけている分子的基盤が明らかになると考えられる。本グループは、このような観点から、ニワトリの網膜視蓋投射系をモデルシステムとして研究している。

網膜の前後軸あるいは背腹軸方向においてトポグラフィックな発現を示す分子を網羅的に単離・同定することを目指して、平成９年度においてRestriction Landmark cDNA Scanning (RLCS)法を用いた大規模スクリーニングを行った。本法はサブトラクション法の欠点を補うとともに網羅的単離に適する。網膜の両軸方向についてスクリーニングを行い、前後軸に関して約20個、背腹軸に関しては約30個のトポグラフィックな発現を示す分子のcDNAスポット（重複を含む）を見い出した。引き続き、このおのおのの分子に関して全長cDNAの単離と構造解析を行った。その結果、

網膜においてトポグラフィックな発現を示す分子群は、転写因子、接着因子、細胞内シグナル伝達分子など、多様な分子で構成されていることが判明した。また同定された分子の中には、新規分子とともに、既知のトポグラフィック分子も含まれており、本法の信頼性と有用性が示された。

これらの分子の網膜及び中枢神経系における発現パターンを解析したところ、いくつかのトポグラフィック分子については網膜だけでなく、視神経の投射標的領域である視蓋においても発現していることが判明した。一方、網膜内での発現パターンが、発生が進むにつれて動的に変化するものが存在した。例えば、前後軸方向から得られたものの中には、８日目胚では網膜の後側に片寄った発現を示すが、10日目になると前後差のない均一な発現を示す分子が存在した。さらに網膜内での発現部位に関しては、神経節細胞層のみに発現する分子、神経節細胞層と内顆粒層に発現する分子、また内顆粒層のみ発現する分子などさまざまなタイプに分類することができた。

さらに、平成11年度に導入したコンピュータ画像処理システムによって、発現量は少ないながらトポグラフィックな分子を示すcDNAスポットが更に多数存在することが明らかになった（前後軸方向で約30個、背腹軸方向で80個）。現在、これらのcDNAクローンについても、全長cDNAの単離とその構造解析並びに発現パターンの解析を行っている。

得られた各トポグラフィック分子の機能を解明すべく、現在レトロウイルスベクターや、*in ovo*エレクトロポレーション法を用いて異所的強制発現を行うとともに、リボザイム、アンチセンスRNAやドミナントネガティブ型分子の強制発現によって発現阻害や機能阻害実験を試みている。これらの遺伝子導入胚において、網膜視蓋投射の領域特異的な発現パターンおよび網膜自体の発生にどのような異常が起こるかに焦点を当てて解析を進めている。更に、重要と思われるものについては、遺伝子変換マウスの作製も計画している。以下に、現在解析中の主な分子について簡単に報告する。

ａ．前後軸方向に関するスクリーニングにより得られた分子

１）T/BglII #2

本分子は神経特異的カルシウム結合タンパク質ファミリーに属する分子であり、E8ニワトリ胚網膜では耳側神経節細胞に多く発現している。神経系に特異的に発現しているEFハンド型カルシウム結合タンパク質が多数同定され、情報伝達、イオンチャネル活性、転写制御、受容体の機能及び酵素活性などに関与すると考えられている。他のメンバーと同様に、本分子もカルシウムやcAMPを介した情報伝達に関与していると考えられ、シグナル伝達という観点から網膜視蓋投射形成における機能を解析中である。

２）T/BsiWI #2 （bHLH型転写因子）

E8ニワトリ胚網膜の耳側に発現するbHLH型転写因子のファミリーに属する新規分子であることが判明した。また*in situ*ハイブリダイゼーションの結果、網膜を構成する６種類の神経細胞のうち、２種類の細胞でのみ特異的に発現が認められた。これまでのbHLH型転写因子群に関する報告と考え合わせると、本分子は網膜において、特定の神経細胞の分化、あるいは維持に関与しているものと推測され、現在、機能を解析中である。

３）T/NcoI #1 (CRMP-3)

E8ニワトリ胚網膜の耳側に多く勾配状に発現している分子として同定されたものであり、構造解析の結果、CRMP (collapsin response mediator protein) 3であることが判明した。CRMPは軸索とその先端部の成長円錐に局在する細胞内タンパク質であり、発生過程において神経回路形成が最も盛んな時期をピークとする発現を示すこと、また線虫Unc-33変異体は重篤な行動異常を示し、神経回路にも広範囲な異常が認められること等から、軸索ガイダンスにおいて重要な役割を果たしていることが予想されてきた。しかしながら、その具体的な機能に関してはほとんど不明のままである。我々は、CRMP1-4の他にさらに新規のメンバーが存在することを見出すとともに、網膜及び神経系全般における発現パターンの解析を終えた。

ｂ．背腹軸方向に関するスクリーニングにより得られた分子

１）D/Bsp120I #1

構造解析の結果、N末端にシグナルペプチド配列を有し、分泌性タンパク質と推測される。*in situ*ハイブリダイゼーションでは、E8ニワトリ胚網膜の神経節細胞層に背側に強い発現が認められた。また、視神経の標的器官である視蓋の背腹軸に沿って、勾配状の発現が観察された。このような分子は神経系では見つかっておらず、その機能の同定を目指している。

２）D/MroI #1 (COUP-TFII)

転写因子Chicken Ovalbumin Upstream Promotor-transcription factor II (COUP-TFII)と同定された。本分子は網膜の背側の層全体、特に網膜神経節層で強く発現している。E3から弱いながらも発現が始まり、E10までには消失する。また、Steroid-Thyroid hormone receptor superfamilyに属し、リガンドの不明なorphan receptorである。Vitamin D, thyroid, retinoic acid receptorのresponse elementに結合し、これらの標的遺伝子の誘導を抑制することが知られている。さらに、COUP-TFIIは、motor neuronの発生に関わっていることが既に示唆されているが、網膜での機能は現在のところ不明である。

３）V/BamHI #1

E8のニワトリ胚網膜の腹側に特異的に発現する新規分子である。この分子はシステインリッチな繰り返し配列を３つ有する。また、インテグリンとの結合に関与するRGDモチーフを１つ持っている。そのほかの部分に有意な相同性を示す分子はこれまで知られていない。発現領域は､網膜の腹側の他に､前脳、間脳、肢芽である。少なくともE3では肢芽での発現は確認できるが、その他の部位ではっきりとした発現が確認できるのはE4以降である。また網膜での発現はE14までに完全に消失する。

４）V/BlnI #1

配列データからヒトチトクロームP450 1B1のニワトリホモログであると考えられる。網膜の内顆粒層に発現しており、眼杯裂に隣接した部位でもっとも発現量が高く、周辺部に行くに従って減少する。E4から発現が始まり、最初は網膜の広い範囲に発現が見られるが、以後、発現領域が縮小し、E14では眼杯裂周辺のごく限られた部位でのみ発現が見られる。また網膜より遅れてレンズの前側にも発現が認められる。V/BlnI #1はチトクロームP450の１種であることから、何らかの分子を基質として生合成もしくは分解を行っていると予想されるが､現在までのところニワトリ網膜内での基質は不明である。最近、遺伝性緑内症の原因遺伝子であることが報告された。

５）V/Alw44I #1

構造解析の結果、N末端にシグナルペプチド配列を有するタンパク質であることが明らかとなっている。さらに細胞膜貫通領域と推測される疎水性の高い領域が１カ所あるが、その他特徴的なモチーフはない。*in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、E3の網膜、及び体節において強く発現していた。E6及びE8では、網膜腹側の内顆粒層（Mueller細胞）に強い発現が認められ、また視神経の一部にも発現していた。一方、視蓋においては、E6で背側、E8以降では、腹側の領域で発現が認められた。

６）V/BglII #1 (aldehyde dehydrogenase)

網膜の腹側でレチノイン酸を合成する酵素aldehyde dehydrogenaseと判明した。その発現は網膜の腹側に特異的であり、発生初期（ステージ９以降）から始まる。これまでに、目の背腹軸形成には、発生初期のレチノイン酸の濃度勾配（腹側に多く、背側では少ない）が重要であることが知られていたが、その合成酵素が同定されたのはこれが初めてである。

チロシンホスファターゼグループ

本グループは、脳神経系に多量に発現する受容体型チロシンホスファターゼであるPTPζ（RPTPβ）の機能、および情報伝達機構の解明を目的として、研

究を進めている。

我々はこれまでに、ヘパリン結合性成長因子プレイオトロフィン（PTN）がPTPζの特異的リガンドであることを明らかにしている。最近さらに、PTPζが、PTNと高い相同性を示す、ミッドカイン（MK）分子とも結合することを見い出した。その結合性は、PTN-PTPζ間のそれとよく一致すること、さらにMK-PTPζ間の結合はPTNにより拮抗的に阻害されることが明らかになった。すなわちPTPζは、PTNとMKの共通の受容体であると考えられる。さらに、PTPζとMKの高親和性結合には、MKのヘパリン結合部位とされる二つの塩基性アミノ酸クラスター（クラスターⅠ、Ⅱ）の内、クラスターⅠが必須であることが明らかになった。特に、クラスターⅠのR78Qの変異は、PTPζとの結合および神経細胞移動誘導活性を著しく抑制し、MKの機能発現におけるクラスターⅠの重要性が確認された。さらに、詳細な解析の結果、クラスターIがPTPζのコンドロイチン硫酸部分と相互作用することによって、PTPζ-MK間の高親和性結合が成立することが明らかになった。

次に、PTPζの細胞内情報伝達機構を明らかにする目的で、本分子のチロシンホスファターゼ領域をbaitとして、酵母two-hybrid systemにより、ラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、シナプス蛋白質であるPSD-95/SAP90、SAP97/hdlg、SAP102がPTPζのC末端領域に結合することが明らかになった。これらの蛋白質は三つのPDZ領域を有するが、PTPζがこの内、PDZ2に結合すること、さらにPTPζのC末端の-ESLVという配列がこの結合に必須であることを明らかにした。また、免疫組織化学的な解析により、成体ラット海馬においてPTPζとPSD95が錐体細胞の樹状突起に局在することを示した。これらのことは、PTPζが海馬シナプス機能の調節に関与している可能性を示唆している。

名古屋大学の門松らは、MKの細胞遊走促進活性を骨芽細胞、血管平滑筋細胞、マクロファージについて見い出した。骨芽細胞遊走について、PTPζに加えてMAPキナーゼ系がMK特異的に動くことを明らかにした。MKノックアウトマウスでは、血管再狭窄モデルでの新生内膜形成が強く抑制されている。新生内膜形成は、血管壁へのマクロファージの侵入と血管内皮下への血管平滑筋細胞の移動によるが、この際にMKとPTPζの発現が似通ったプロフィールで誘導されることを見い出した。また、胎仔脳神経細胞、骨芽細胞、血管平滑筋細胞ついて、MK結合蛋白質であるp400+の発現が観察された。これらのことより、神経細胞のみならず、骨芽細胞、血管平滑筋細胞等の細胞移動にも、PTPζ、P400+、MKの三者間の相互作用が関与している可能性が考えられる。

遺伝子ノックアウトマウスグループ

遺伝子ノックアウトマウスグループは、タンパク質チロシンフォスファターゼζ（PTPζ）、及びNaGチャネル遺伝子の遺伝子ノックアウトマウスの表現型解析を中心に進めている。また、本年度はこれに加えて、中枢神経系の神経回路網の遺伝子工学的可視化も試みた。

１）PTPζ遺伝子欠損マウス

昨年度までの研究において、β-galactosidase geneをPTPζ遺伝子座に導入したノックインマウスによってPTPζ遺伝子の発現パターンを明らかにした。その結果、成獣においては、陽性細胞が幾つかの領域に限局して認められ、特に、海馬、小脳、嗅球等で強く発現していた。X-Gal染色と特異抗体により２重染色することで、PTPζがastrocyteだけでなくneuronにも発現していることを初めて明らかにした。現在、PTPζ遺伝子欠損マウスについては、PTPζグループと共同で解剖学、生化学、生理学及び行動薬理学的な方面からの統合的な研究アプローチを行っている。特に本年度は生理学的及び行動薬理学的解析を中心に進めた。

PTPζが最もよく発現している領域の一つに海馬が挙げられる。海馬は、空間学習や記憶を司る領域とされており、チロシンリン酸化レベルの制御機構は、学習行動に大きく関与すると考えられている。PTPζ欠損マウスの電気生理学的な解析から、CA1 領域においてage dependent な長期増強(LTPの亢進)を示す知見が得られた。これに関連して、最近、我々は、酵母のtwo hybrid screeningによってPTPζの細胞内ドメインと結合する分子の一つとして、後シナプス裏打ちタンパクであるPSD95を同定している。この電気生理学的な知見が、実際に欠損マウスの学習・記憶能力に相関しているのかどうかは、現在、モリス式水迷路迷路試験による解析・評価を行っている。

行動薬理学的な解析からは、既に、PTPζ欠損マウスの行動表現型として、１）新奇フィールドに対する慣れの遅延、２）マウス活動時間帯であるサーカディアン暗期における自発運動量の低下、３）ストレス刺激に対する反応性の増大（強制遊泳試験）を同定している。その後の解析では、これら行動に深く関係しているモノアミン(MA)性神経系に機能的な障害が生じていることが明らかになってきた。methamphetamine (METH) 投与後に側坐核(nucleus accumbens, NAC)の細胞外DA変化を、自由運動下でmicrodialysisを行って解析したところ、欠損型マウスではMETHの自発運動応答の低下と相関して、NACの細胞外DA応答が低下していることが判明した。成熟脳（ヘテロ型マウス）において、PTPζの発現の指標となるX-gal 陽性細胞は、黒質、腹側被蓋（DA神経核)、青斑核（NE神経核）及び縫線核（5HT神経核）

に数多く認められる。しかし、DA神経の主要な投射先である線条体や側坐核でほとんど検出されない。加えて、最近、我々は、単一の細胞からのmRNAを検出する手法であるSingle-Cell RT-PCRを用いて解析を行い、成熟脳のDA神経細胞に100%の確率でPTPζが発現していることを明らかにした。免疫組織学的な解析からは、MA神経系は正常と判断されることから、PTPζがDA神経伝達やMA代謝で何らかの役割を持つ可能性が示唆された。

2）NaG遺伝子欠損マウス

昨年度までの研究から、NaG チャネルは、これまでに報告されていたシュワン細胞、脊髄後根神経節の感覚神経細胞、顔面神経節の感覚神経細胞の他に、中枢神経系の特定の領域（下垂体神経葉、正中隆起、脳弓下器官、終板脈管器官、視索前野、視床下部前部、内側手綱核、背側脚間核）に特異的な発現を発見した。本年度は、NaG遺伝子欠損マウスについては、特にこれらの中枢神経系での発現部位の生理機能との関連から表現型解析を進めた。

大阪大学の山本らのグループと共同で、下垂体神経葉、正中隆起、脳弓下器官、終板脈管器官といった脳周囲器官での発現に着目して、体内水分塩分バランスの中枢制御について研究を進めた。脳周囲器官は中枢神経系の脳室に沿って分布する小器官で、脳脊髄液や血中成分中の浸透圧、塩分、内分泌ホルモンを検出する器官として知られ、渇水時や脱塩時の行動制御に重要な役割を持つ。そこで遺伝子欠損マウスを用いて行動解析を行った結果、遺伝子欠損マウスは、塩分や水分が充足した状態では各種塩分濃度への嗜好性は野生型マウスと同じであったが、24時間水分を剥奪すると高浸透圧塩溶液の異常な摂取が観察された。また、急性的に動物を塩分欠乏状態にしたときの塩欲求性が野生型マウスと比較して遺伝子欠損マウスのほうがより強いことが明らかになった。電気生理学的手法によって味覚異常の可能性を検討した結果、鼓索神経の塩刺激への応答は正常であった。このように、NaGチャネルは、塩分摂取行動の中枢制御において重要な役割を果たしていることが判明した。

また、京都工芸繊維大学の清原らのグループと共同で、視索前野、視床下部前部の体温調節機能に焦点をあて、NaG遺伝子欠損マウスの体温測定を中心に研究を進めた。視索前野、視床下部前部は自律神経系を制御する視床下部の機能の中でも体温制御に密接に関与していることが知られる。そこで温度プローブを遺伝子ノックアウトマウスの腹腔内に埋め込み、フリームービング状態（外気温25℃）で動物の体温を計測した結果、遺伝子ノックアウトマウスは野生型マウスに比較して0.5℃から1℃高く体温が推移していることが判明した。すなわち、NaGチャネルは体温の中枢制御においても重要な役

割を果たしていると考えられる。

3）中枢神経投射の遺伝子工学的可視化マウス

網膜視蓋投射で働くトポグラフィック分子の生体内での機能を明らかにする目的で、神経細胞特異的プロモーターで駆動する軸索可視化リポーター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製を行った。その結果、視神経細胞に発現した軸索可視化リポーター遺伝子は、軸索の起始部からシナプス形成部位に至るまで分布し、神経回路網を有効に可視化できることがわかった。また、このリポーター遺伝子は、胎生期から成獣に至るまで中枢神経系、末梢神経系を問わず使用できることも判明した。

3．主な研究成果の発表（論文発表）

○Revest, J.-M., Faivre-Sarrailh, C., Maeda, N., Noda, M., Schachner, M. & Rougon, G.: The interaction between F3 immunoglobulin domains and protein tyrosine phosphatase ζ/β triggers bidirectional signalling between neurons and glial cells. Eur. J. Neurosci., 11, 1134-1147 (1999)

○Kawachi, H., Tamura, H., Watakabe, I., Shintani, T., Maeda, N. & Noda, M. : Protein tyrosine phosphatase ζ/RPTPβ interacts with PSD-95/SAP90 family. Mol. Brain Res., 72, 47-54 (1999)

○Yamakawa, T., Kurosawa, N., Kadomatsu, K., Matsui, T., Itoh, K., Maeda, N., Noda, M. & Muramatsu, T. : Levels of expression of pleiotrophin and protein tyrosine phosphatase ζ are decreased in human colorectal cancers. Cancer Lett. 135, 91-96 (1999)

○Meng, K., Rodriguez-Pena, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yami, M., Noda, M. & Deuel, T.F. : Pleiotrophin signals increased tyrosine phophorylation of β-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase β/ζ. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 2603-2608 (2000)