

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19370092
 研究課題名(和文) 神経細胞が形成されるメカニズムを明らかにする新たなモデルの提唱
 研究課題名(英文) Novel mechanisms underlying neural formation

研究代表者

多羽田 哲也(Tabata Tetsuya)
 東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
 研究者番号：10183865

研究成果の概要：

脳には様々な種類の多くの神経細胞がある。それらは神経前駆細胞から形成されるが、その数を調節するメカニズムは良く理解されていない。その理由の一つは前駆細胞の形成がランダムに起こるように見えるからであり規則性を見出すことに困難がある。ショウジョウバエの視覚を司る脳神経が規則正しく形成されることを発見した。本研究では、この系を用いて、神経前駆細胞が形成される機構の一端を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生遺伝

1. 研究開始当初の背景

脳は様々な種類の数多くの神経細胞から成り立ち、非常に複雑でありながら高度に制御された器官である。これを作る仕組み、すな

わち非常に多岐にわたる種類の神経細胞が生成される仕組みは発生生物学の主要課題を解くモデルである。上皮細胞から神経幹細胞、さらには神経芽細胞が形成され、不等分

裂によりそれ自身と神経細胞を産み出す一連のメカニズムはショウジョウバエ胚の中樞あるいは感覚器の分化をモデルとして、盛んに研究され、大きな成果を挙げている。これらの研究は哺乳類を含む他の生物における神経形成研究の基盤としてクラシックであると同時に、現在も日々深化した研究が展開されている。しかし、神経発生の最初のステップである神経を産み出す細胞が上皮細胞群から選出される仕組みは良く理解されていない。上皮の中から神経芽細胞になるコンピーテンスを持った細胞集団が生じ、その中の細胞間で確率論的に生じるゆらぎを増幅することで、神経発身に運命づけられた細胞がNotchシグナルによる側方抑制メカニズムにより形成されると説明されてきた。これでは神経前駆細胞は決まったルールではなく、ランダムに形成されることになり、細胞数がどのようにして制御されているかわからない。

私たちは、ショウジョウバエ脳の視覚系の一つであるメダラ神経節の形成を調べている過程で、上記とは異なる様式で神経前駆細胞（神経芽細胞）が規則正しく形成されることを見出した。この系ではまず視葉とよばれる領域で対称分裂により皮質に一層の神経上皮細胞が増殖する。その過程で、上皮の最も近位の細胞から一細胞ずつ順にメダラ神経を生み出す神経芽細胞に分化していく（ちなみに神経上皮細胞シートの反対側である、最も遠位の細胞は視神経の投射を受けて、第1の視覚中枢であるラミナ神経に分化する）(図)。すなわち、神経芽細胞の形成は確率論的ではなく、決定論的に起こることである。この系を用いることにより神経形成の最初のステップ、すなわち神経前駆細胞が形成される過程を精度高く解析することが可能となった。

2．研究の目的

上記のように、ショウジョウバエ脳の視覚中枢では、神経幹細胞が上皮組織から時空間的に規則正しく同調して生じることを見出し

た。上皮から神経芽細胞にいたる発生の時間的進行が発生進度の異なる細胞の連続した配列として空間的に配置されており、この系を研究することにより、上皮細胞から神経芽細胞が形成される個々のステップを詳細に研究することが可能になる。上皮細胞が神経芽細胞となる過程で proneural 遺伝子を一過性に発現することを見出した。proneural 遺伝子の発現が発生に伴って移動していくことから、これを proneural wave と名付けた。本研究では proneural wave が進行するメカニズムを明らかにし、従来考えられていた確率論的な機構を検証し直し、神経幹細胞が生まれる諸過程を明らかにする。

3．研究の方法

ショウジョウバエは分子遺伝学的な遺伝子操作の手法が充実している。この手法を用いて、遺伝子の機能喪失変異や機能獲得変異の表現型を調べる。また変異体細胞クローンを作製し、細胞レベルでの表現型を解析する。

4．研究成果

(1) Proneural wave の発見

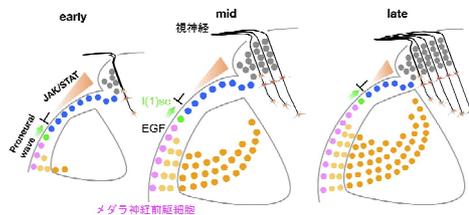
神経芽細胞の発生過程を詳細に観察すると、上皮細胞が神経芽細胞に分化することに先立って一過性に proneural 遺伝子 lethal of scute (l(1)sc) を発現することを見出した。この遺伝子の発現は神経上皮細胞を近位から遠位に向けて波のように伝播していくので、Proneural wave と名付けた。本研究では Proneural wave すなわち l(1)sc の発現をマーカーとして神経芽細胞を形成するメカニズムを明らかにする。

(2) Proneural wave 進行を負に制御する JAK/STAT シグナル

Proneural wave の進行の機構を明らかにする目的で、視葉に発現する遺伝子の探索を行い、神経上皮の最も遠位で発現する遺伝子 Unpaired (Upd) を見出した。Upd は JAK/STAT シグナルのリガンドである。JAK/STAT シグナルは様々な系で、細胞の分

化、増殖を制御するシグナルとして知られている。STAT 結合領域をタンデムにつないだリポーター遺伝子の発現を指標にすると、JAK/STAT 活性は遠位側で強く近位側（メダラ神経芽細胞形成が開始する部位）では弱いことが示唆された。

JAK/STAT シグナルの変異を観察すると、メダラ神経芽細胞とラミナ神経がほとんどなく、少数のメダラ神経が観察されるのみであった。神経上皮細胞が十分に増殖しなかったためと思われる。この表現型をさらに詳細に観察するために JAK/STAT シグナルの機能喪失変異クローンを作成すると proneural wave の進行が速くなることが観察された。逆に機能獲得変異クローンでは proneural wave の進行が遅くなることを見出した。リガンドである Upd を異所的に発現することによっても proneural wave の進行の遅滞が観察された。これらの変異の表現型と活性の勾配から、JAK/STAT シグナルは proneural wave の進行を負に制御しており、神経上皮の増殖と相まって勾配に従って徐々に proneural wave が遠位側に動いていき、神経上皮を神経芽細胞にリクルートしていくと考えられる(図)。



(3) Proneural wave を正に制御する EGF シグナル

JAK/STAT シグナルによる負の制御だけで proneural wave の進行は説明できるであろうか。私たちは正のシグナルの存在の可能性を探るうちに EGF シグナルが有力な候補であることを見出した。EGF シグナルの直接のターゲットである Pointed が proneural wave で特異的に発現していることから、そこで EGF シグナルが活性化されることが示された。このシグナルの主たるリガンドと思われる Spitz は神経上皮全体で発現している。Spitz

は不活性な前駆体として発現し、Rhomboid による切断を受けて初めて活性のあるリガンドとなるため、Rhomboid の発現制御が重要である。抗体染色の結果、Rhomboid は proneural wave で発現していること、この Rhomboid の発現は EGF シグナルに依存していることがわかった。そこで、以下の仮説が考えられた。Proneural wave では Rhomboid が発現し、そこで Spitz を活性化する。活性型 Spitz は分泌され隣の上皮細胞にシグナルを送るとそれは l(1)sc を発現し、神経芽細胞となる。同時に、Rhomboid の発現も誘導するので、EGF シグナルの連鎖が起こり proneural wave が進行していく。この仮説を証明するために EGF 受容体の変異クローンを作成したところ、細胞自律的に l(1)sc も神経芽細胞のマーカーの発現もみられなかった。また異所的に活性型受容体や活性型 Spitz を発現させたところ、その場に神経芽細胞の分化が誘導された。また、RNA 干渉法により、Spitz や Rhomboid の発現をロックダウンすると神経芽細胞の形成が阻害された。以上のことから EGF シグナルが proneural wave 進行の正のシグナルであると考えられる。Spitz や Rhomboid の機能喪失型変異クローンによる実験でも同様のことが観察された。

(4) シグナル間の相互作用

相反する JAK/STAT シグナルと EGF シグナルはお互いにどのように作用するであろうか。両シグナルの構成的活性型変異因子を異所的に同じ細胞で発現させると proneural wave の遅滞が起こり JAK/STAT シグナルが下流にあることが示された。EGF シグナルは JAK/STAT シグナルを抑えることによって proneural wave を進行させるようであるが、JAK/STAT シグナルの下流因子を同定しないと結論は出せない。

Notch シグナルのリガンドである Delta は EGF シグナルに誘導されて proneural wave 領域を含む細胞で発現している。また Notch シグナル活性を計測すると proneural wave の直

前で高くなっている。変異クローンの解析から、Notch シグナルは EGF シグナルと共役して proneural wave のアイデンティティーを決定している。一過性の Notch シグナルが不活性化することによって細胞は proneural wave を脱して神経芽細胞へと分化する。Notch シグナルが活性化されたままだと細胞は次のステージに進む事ができない。

本系では細胞の発生ステージを正確に追跡することができるため、このような詳細な解析が可能である。

(5) 正確な視覚系神経回路の形成

私たちが正確に外界を認識するためには眼の光受容細胞の2次元の配列が、視神経の脳への投射およびそこでのシナプスの形成の際に正確にその相対位置を保っている必要がある。これは retinotopic map とよばれ、神経回路形成の良いモデルとして研究されてきた。ショウジョウバエの視覚中枢には最も外側のラミナ神経節とその内側にメダラ神経節があり、それぞれに視神が直接投射することから、光受容細胞とそれぞれの神経節の神経の数と位置は正確に対応づけるメカニズムがあるはずである。ラミナ神経の分化は投射してくる視神経(光受容細胞の軸索)によってもたらされるヘッジホッグシグナルによって誘導される。ショウジョウバエの光受容細胞の分化は後部から前部に向かって時間とともに規則正しく進行する。先に成熟した後部の光受容細胞からの軸索がラミナ領域に到達すると、そこにラミナ神経の分化を誘導する。この場合、視神経はシナプスを形成する相手の分化をその場で自ら誘導することになり、効率のよい正確な神経回路形成が可能であると思われる。一方メダラ神経の形成には視神経の入力は不要であり、どのようにして正確な回路を形成するか不明である。

STAT の大きな変異クローンができると、メダラ神経が過剰に形成され、本来ラミナができるはずの場所にまで浸食していく。ラミナとメダラは一続きの共通の神経上皮から分化するので、両者の形成は共通のリソース

を取り合うことになり、そのためにメダラ神経の形成はラミナ神経の形成とバランスが取れており、ひいては視神経との対応がとれ、retinotopic map 形成に寄与しているのではないか。JAK/STAT シグナルのリガンドである Upd がラミナ領域に隣接した上皮で発現していることがこの調節に意味を持っているかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Yasugi, T., Umetsu, D., Murakami, S., Sato, M. and Tabata, T. *Drosophila* optic lobe neuroblasts triggered by a wave of proneural gene expression that is negatively regulated by JAK/STAT, *Development*, 135(8), 1471-80, 2008. 査読有

[学会発表](計 16 件)

1. Tetsuya Tabata, Cellular and molecular mechanisms underlying neural formation in *Drosophila* visual system development. International Symposium on *Drosophila* Bio-Resource: Pioneering life science research with *Drosophila* Genetic Resources, 3/17-18, 2010, Kyoto.
2. Tetsuo Yasugi, Umetsu Daiki, Tetsuya Tabata. EGFR and Notch Signaling Regulates the Progression of the Proneural Wave in the *Drosophila* Optic Lobe Development. 第32回日本分子生物学会 12/9-12, 2009, 横浜
3. Tetsuya Tabata. Spatio-temporal regulation of DER and Notch signaling pathways organizes the proneural wave progression in medulla neuroblast development. Neurobiology of *Drosophila*, Cold Spring Harbor Laboratory. 9/29-10/3, 2009, Cold Spring Harbor, U. S. A.

4. Tetsuo Yasugi, Umetsu Daiki, Satoshi Murakami, Makoto Sato, and Tetsuya Tabata. Role for the EGFR and JAK/STAT Signaling Pathway in the *Drosophila* Optic Lobe Development. 16th International Society of Developmental Biologists Congress 2009, 9/6-10, 2009, Edinburgh, Scotland, UK.

5. Tetsuo Yasugi, Daiki Umetsu, Satoshi Murakami, Makoto Sato, and Tetsuya Tabata, EGFR and JAK/STAT Regulate Progression of Proneural Wave in the *Drosophila* Optic Lobe Development, CDB Symposium 2009 Shape and Polarity, 3/23-25, 2009, Kobe.

6. Tetsuya Tabata. Cellular and molecular mechanisms underlying neural circuit formation in *Drosophila* visual system, OIST Workshop "Gradients and Signalling: from chemotaxis to development" 11/17-21, 2008, Okinawa.

7. Tetsuya Tabata. Visual system development of *Drosophila*, Frontiers in Developmental Biology, 9/13-17, 2008, Giens, France.

8. Tetsuo Yasugi, Daiki Umetsu, Satoshi Murakami, Makoto Sato, and Tetsuya Tabata. Neuroblast Formation in the Optic Lobe Development Neurofly 2008 12th European *Drosophila* Neurobiology Conference, 9/6-10, 2008, Würzburg, Germany.

9. Tetsuya Tabata. The life of medulla neurons in the *Drosophila* visual center, Gordon Research Conference, Visual system development, 8/10-15, 2008, New Port, U.S.A.

10. Tetsuo Yasugi, Daiki Umetsu, Satoshi Murakami, Makoto Sato, and Tetsuya Tabata. *Drosophila* optic lobe neuroblasts triggered by a wave of proneural gene expression that is negatively regulated by JAK/STAT. 第41回日本発生物学会, 5/28-30, 2008, 徳島.

11. Tetsuo Yasugi, Daiki Umetsu, Satoshi Murakami, Makoto Sato, and Tetsuya Tabata. JAK/STAT signal regulates proneural wave progression in the optic lobe development 49th Annual *Drosophila* Research Conference, 4/2-6, 2008, San Diego, U. S. A.

12. Tetsuo Yasugi, Daiki Umetsu, Satoshi Murakami, Makoto Sato, and Tetsuya Tabata. JAK/STAT Signal Negatively Regulates Progression of Proneural Wave that Induces Neural Stem Cells. CDB Symposium 2008 turning neurons into a nervous system. 3/24-26, 2008, Hyogo.

13. Tetsuya Tabata. Neurogenesis in the *Drosophila* visual center. Progress in Developmental Biology, Swiss-Japanese seminar, 1/6-9, 2008, Arosa, Swiss.

14. 多羽田哲也、八杉徹雄、梅津大輝、村上智史、吉田章子、佐藤純. 神経幹細胞を形成するProneural waveの進行はJAK/STATにより負に制御されている. シンポジウム 神経発生過程の生体制御 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会大会合同大会、12/11-15, 2007, 横浜.

15. Tetsuo Yasugi, Daiki Umetsu, Satoshi Murakami, Shoko Yoshida, Makoto Sato, Tetsuya Tabata. JAK/STAT Signal Regulates the Proneural Wave Progression in the Optic Lobe Development. 第8回日本ショウジョウバエ研究集会, 7/12, 2007, 淡路.

16. Tetsuya Tabata. Molecular mechanisms that underlie neuroblast formation in the optic lobe Visual Processing in insects: From Anatomy to Behavior. 2007 Janelia conference number 6. 4/29-5/2, 2007, HHMI Janelia Farm, Chevy Chase, U. S. A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多羽田 哲也

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

1 0 1 8 3 8 6 5

(2) 研究分担者

佐藤 純

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・

特任准教授

3 0 3 4 5 2 3 5

吉田 章子

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

7 0 3 7 2 4 3 0