

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700286

研究課題名（和文）脊椎動物神経発生機構における Notch シグナルの新たな役割

研究課題名（英文）Study for role of Notch signaling in neural development of vertebrates

研究代表者

尾身 実（OMI MINORU）

東北大学・大学院生命科学研究所・助教

研究者番号：00400416

研究成果の概要：本研究は、最も複雑且つ極めて高度な機能を有する動物特有の組織である脳・神経組織の分化・形成に焦点を当てた。新規の Notch シグナル関連遺伝子 *sno* が中枢神経系において神経細胞の分化／未分化を制御していることが示唆された。また、視神経が脳に投射する際の新たな経路が発見された。これは脳での視覚情報処理機構に関して新たな知見を与えるものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：脳、神経、発生、Notch、分化、網膜視蓋投射

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は極めて高度に特殊化した組織・器官であり、思考、判断、情動という動物特有の機能を司る。中枢神経系は多くの種類の神経細胞とそれを支持するグリア細胞から成り、またそれらは高度に組織化されている。このような複雑且つ精緻な形態は脳・中枢神経の機能発現において必須なものであるが、そもそも中枢神経系は胚発生の過程で一本の管状構造から形成されていく。単純な管状構造であった神経管から如何にして複雑且つ緻密な構造である脳・中枢神経系が形成されていくのかという問題は、神経発生

の最大の問題である。神経形成においては、(1) 神経細胞の分化と神経幹細胞の維持がどのように制御されているか、(2) 分化した神経細胞が整然と配置される機構は如何なるものか、という点が重要な問題である。この2点に関して、これまで次のような知見が得られている。

## (1) 神経分化の機構

中枢神経系には、多分化能を持ち自己複製を行う神経幹細胞と、神経幹細胞に由来し、細胞増殖能を消失して分化・成熟したさまざまな種類の神経細胞が存在する。神経幹細胞

の増殖と神経細胞への分化は神経発生過程において厳密に制御されている。このような増殖と分化のバランスを統制する機構を解明することは、神経発生を理解する上で避けて通ることの出来ない課題である。

Notch シグナルは神経幹細胞がその未分化状態を維持するために必要であることが、これまでの研究から明らかにされている。Notch シグナル系に関与する因子はさまざまなものが知られているが、そのひとつに strawberry notch (sno) がある。sno は無脊椎動物であるショウジョウバエにおいては複眼の光受容細胞の分化に必須の遺伝子であることが明らかとなっている。この遺伝子は進化上極めて高度に保存されており、脊椎動物であるヒトやマウスにも存在していることが分かっているが、複眼を持たない脊椎動物におけるその機能は不明のままである。マウス胚やニワトリ胚の中枢神経系において、神経管の脳室帯には神経幹細胞が存在し、そこには Notch が発現している。神経幹細胞の娘細胞は外側の中間帯および辺縁帯に移動し神経細胞に分化するが、sno はこの領域で発現している。また、機能欠損型の sno タンパクをニワトリ胚神経管に導入すると、神経幹細胞のマーカーである Notch を発現する細胞が異所的に出現する。したがって、これらのことから sno は Notch シグナルと関連しながら神経細胞の分化の維持に深く関与していることが考えられる。

## (2) 神経細胞の配置

脳・中枢神経系ではさまざまな種類の神経細胞が存在するが、それらは整然と配置されている。中枢神経系が正常に機能するためにはこのような正確な配置が不可欠である。とりわけ脳では神経細胞が層構造を形成しており、この層構造が正常に構築されないと行動などの面に異常が認められることが分かっている。しかし、この層構造がどのように形成されてくるかということについてはほとんど何も分かっておらず、古くて新しい問題である。さらに、大脳・中脳・小脳それぞれが層構造を持つが、その発生様式は各々異なり、各脳特有の機構を有すると考えられる。このような脳の層構造構築の機構を明らかにすることは脳の機能発現機構を理解する上で欠かせない。

ニワトリ胚中脳では、さまざまな因子が層特異的な発現パターンを示すことが知られているが、そのうちのひとつに Groucho がある。Notch シグナル関連因子である Groucho も層特異的に発現しており、Groucho の異所的発現により層構造の形成異常が起こることが知られている。これは Notch シグナルが中脳の層形成に関与していることを示唆しており、Notch シグナルが中脳特異的な発生

様式を制御している主な因子のひとつである可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、Notch シグナルに関連した因子を手がかりに、中枢神経系の複雑な発生様式とそれに関連した細胞の分化および挙動を明らかにすることを目的とする。

### (1) strawberry notch に着目した神経分化制御機構の解析

strawberry notch (sno) は進化上高度に保存されていることから、その機能の重要性がうかがえる。sno はマウスの中枢神経系において辺縁帯領域で発現しているが、辺縁帯は分化した神経細胞の存在する領域である。一方、辺縁帯よりも内部にある脳室帯には神経幹細胞が存在し、神経細胞の供給源となっているが、ここには sno は発現していない。すなわち、このような発現パターンから sno は神経の分化制御に関与していること、特に分化を促進する機能を有することが示唆される。あるいは分化した神経の維持に関与している可能性も考えられる。神経幹細胞のマーカーである Notch は脳室帯にのみ発現し、その発現パターンは sno のそれと相補的であることもこの考え方を支持する。sno は無脊椎動物であるショウジョウバエの複眼にある光重要細胞の分化促進に関わっていることが明らかとなっており、脊椎動物においても神経細胞分化を正に制御している可能性が考えられる。神経分化における sno の機能を明らかにすることで、神経幹細胞と神経分化の制御機構が明らかになると期待される。

### (2) 中脳層構造形成機構の解析

脳の神経細胞は、それぞれ誕生した時期と分化形態・機能が密接にリンクしており、さらに脳内における位置にも関連している。種類の異なる神経細胞は異なる位置に存在し、その結果、脳では神経細胞による層構造が形成される。しかしこの層構造がどのような機構によって厳密に形成されるのかということについてはほとんど分かっていない。層形成において細胞の移動や細胞どうしの認識機構が重要であることはこれまでの知見より明らかであるので、本研究では接着因子等の細胞表面分子に焦点を当て、どのような分子群が層形成にとって不可欠であるのかを明らかにしていきたい。

ニワトリ胚中脳においては Notch 関連因子である Groucho が層特異的に発現している。Groucho の機能獲得や機能欠損により層構造が乱れることから、Notch-Groucho シグナルが層形成に重要な役割を果たしていると考えられる。Notch は細胞表面に存在する

受容体分子であり、細胞どうしの認識や分化方向の決定に重要であることが知られている。本研究では、Notch-Groucho シグナルがどのように中脳神経細胞の分化に関わっているか、特に他の認識分子の制御に如何に関与しているかに焦点を当てる。

中脳の背側は視蓋と呼ばれ、眼の網膜に存在する網膜神経節細胞が伸ばす視神経軸索が投射する視覚中枢である。中脳に侵入した視神経軸索は中脳視蓋の特定の層に投射することが知られており、このことから層構造と脳機能発現が不可分であることが分かる。この視神経軸索の層特異的投射に関しても Groucho が関わっていることが知られているものの、やはりその詳細は不明である。そこで Notch-Groucho シグナルが視神経軸索投射を、特に軸索伸長をどのように制御しているかについての知見を得る。これらの研究は、脳における視覚機能の発現を担う構造が如何に形成されるかを理解することに多大に寄与すると期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) sno の機能解析

ゼブラフィッシュを用いた sno1 のノックダウン実験は次のように行った。ゼブラフィッシュの sno1 に対するモルフォリノオリゴヌクレオチドを設計し、1細胞期のゼブラフィッシュ胚に顕微注入した。その後、発生を継続し、適切な発生段階に達した時点で回収、固定液で固定し、解析を行った。神経分化を調べるために用いた HuC:GFP トランスジェニックゼブラフィッシュは、ナショナルバイオリソースプロジェクトの援助を受けて、岡本仁博士（理化学研究所脳科学総合研究センター）からご提供いただいた。遺伝子発現解析は in situ hybridization 法により行った。

マウスは、ショウジョウバエ sno のオーソログをふたつ持つ (sno1, sno2)。神経管の辺縁帯に発現が限局しているのは sno1 であるので、sno1 のノックアウトマウスを作成した。このマウスでは、ゲノムにおける sno1 遺伝子は loxP で挟まれているので、ストレートノックアウトマウスは  $\beta$ -actin-Cre マウスとの交配により作成した。コンディショナルノックアウトマウスの作成は、Nestin-Cre マウスとの交配により作成した。Nestin は神経管脳室帯に発現するため、Cre リコンビナーゼによって sno1 が神経組織特異的にノックアウトされる。

#### (2) 中脳層形成と網膜視蓋投射の解析

層構造の形成に関与する遺伝子のスクリーニングは、in situ hybridization 法を用いて行った。視神経軸索の長期間の可視化は、トランスポゾンを用いてマーカー遺伝子を

網膜神経節細胞のゲノム中に組み込む方法に依った。トランスポザーゼの発現ベクターおよびマーカー遺伝子の発現ベクターは、電気穿孔法によりニワトリ胚の網膜神経節細胞内に導入した。視神経軸索の観察は蛍光実体顕微鏡を用いて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 脊椎動物の発生における sno1 の役割

ゼブラフィッシュ胚における sno1 の発現を in situ hybridization 法により調べたところ、発生初期は胚全体に発現しており、後期には脳・神経組織に限局していた。ゼブラフィッシュ sno1 に対するモルフォリノオリゴヌクレオチドを設計し、1細胞期のゼブラフィッシュ胚に注入して sno1 ノックダウン胚 (モルファント) を作成した。その結果、眼の形成不全および脳室の狭窄が認められた。HuC:GFP トランスジェニックゼブラフィッシュは、神経に分化した細胞にのみ HuC プロモーターによって GFP が発現する系統である。この系統の胚に sno1 モルフォリノを導入したところ、GFP 陽性細胞の減少が顕著であった。これは、sno1 の機能低下により神経分化が著しく阻害されたことを表している。

sno1 モルファントにおける遺伝子発現を in situ hybridization により調べたところ、Notch 関連因子のひとつである deltaD の発現が頭部において低下していた。deltaD 変異体でも脳室狭窄の起こることが知られているが、sno1 モルファントが示す脳室狭窄と deltaD 変異体のそれとの類似性を考え合わせると、sno1 は神経系において deltaD の発現を制御して神経分化に関与していると考えられる。

Notch シグナルは体節形成にも重要な役割を果たしていることが知られている。sno1 モルファントでは体節形成にも異常が認められ、個々の体節の形態に不全が認められた。体制形成時は Notch シグナル因子である Her7 や deltaC・deltaD が体節領域で発現しているが、sno1 モルファントにおけるこれらの遺伝子発現を in situ hybridization により調べたところ、すべてに発現の低下が観察された。

これらの結果を考え合わせると、ゼブラフィッシュにおいて sno1 は Notch シグナルの比較的上流でシグナル因子のひとつとして機能していること、神経分化と体節形成を正に制御していることが強く示唆された。

ゼブラフィッシュの他に、マウスを用いて sno1 の機能の解析を試みた。sno1 のストレートノックアウトマウスを作成し、その表現型を調べた。発生開始から 3.5 日では胚盤胞の段階にあるノックアウトマウス胚が母マウス子宮内に存在することを確認したが、

7.5 日ではその存在は確認されなかった。この結果はマウス発生において神経形成のみならず胚発生の極めて初期においても sno1 が重要な役割を果たしていることを示唆しており、進化上高度に保存されてきたことと考え合わせると大変興味深い。神経組織など胚の一部ではなく胚そのものが認められないということは、この表現型は神経異常が原因ということよりも、むしろその前段階における異常に依ると考えられる。sno1 は神経組織以外にもその発現が認められることも、この考えを支持する。ストレートノックアウトマウスでは神経組織異常の解析は不可能であることが判明したので、神経組織特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Nestin-Cre マウスとの交配により、神経組織のみにおいて sno1 を欠損するマウス系統を作成した。今後、このマウス胚を用いた解析を進める必要がある。

#### (2) ニワトリ中脳視蓋層形成と網膜視蓋投射パターンに関する解析

ニワトリ胚中脳の背側は成熟すると 16 もの層構造を有する。この層構造は、神経上皮でつくられる神経細胞が発生時期に因る差異を持ち、同時期に出現した神経細胞は集合し、誕生時期の異なる神経細胞は混合しないことで層が形成されると考えられる。この差異は細胞表面の認識分子の差異として現れると考えられるので、反発性シグナルを担う ephrin-Eph シグナルに関わる分子の発現を in situ hybridization により調べた。その結果、EphB ファミリーおよびそのリガンドである ephrinB ファミリーに属する因子が層特異的な発現をすることが分かった。今後は、これらの分子の過剰発現および機能欠損実験を行い、ephrinB-EphB シグナルがどのように層形成を制御しているのかを明らかにする。

ニワトリ胚中脳は視蓋と呼ばれ視覚中枢として機能しており、網膜からの視神経は中脳に侵入し、特定の層に投射する。鳥類では、視神経軸索は視蓋の表層に投射する一方、深層には投射しないと考えられてきた。このことを確かめるため、トランスポゾンを利用した細胞標識システムを用いて網膜神経節細胞をラベルし、中脳視蓋における視神経軸索の分布を調べた。今回用いたシステムは、これまで用いられてきた方法に比べて大規模且つ安定的に網膜神経節細胞をラベルすることが出来る。この方法を用いて視神経の視蓋における投射パターンを調べたところ、これまで報告されていない、中脳視蓋の深層への投射があることを発見した。この新しく発見した投射は、発生 10 日目から 16 日目まで認められる。胚発生が進むにしたがい、退縮が起こっているように見えるため、一過的な構造であると考えられる。これまでは、視神

経軸索は標的となる特定の層に初めから正確に投射すると考えられていたが、今回の研究によって、実際には標的層だけでなく標的層を越えてさまざまな層に到達し、その後、適切な標的に到達できなかった軸索分枝が刈り込まれることによって最終的な投射パターンを示すという仕組みを持つ可能性が示唆された。視蓋における視神経軸索の頭尾軸および背腹軸に沿った投射パターンも厳密に制御されるのだが、初期段階では標的以外の領域にも伸長しており、その後の刈り込みによって修正されることが知られている。視神経軸索が標的層に到達し、分枝する機構についてはほとんどが不明のままであるが、これまで考えられていたような、初めから正確に投射する仕組みではなく、頭尾軸・背腹軸に沿ったパターン形成と同様に、初めは不正確で大雑把な分布をしながら標的を探索し、続いて正しい標的に到達できなかった軸索が刈り込まれ修正されるという機構が存在すると考えられる。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 尾身実、Novel paths of retinotectal projection in chick embryos、Tohoku University-Fudan University Neuroscience Workshop for Young Scientists、2008 年 10 月 15~18 日、上海

② 尾身実、Functions of strawberry notch 1, a gene functionally related to Notch signaling, in early development of zebrafish embryos、第 20 回国際生化学・分子生物学会議、2006 年 6 月 18~23 日、京都

③ 尾身実、ゼブラフィッシュ胚発生における Notch 関連因子 strawberry notch 1 の機能解析、日本発生生物学会 39 回大会、2006 年 6 月 1~3 日、広島

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

尾身 実 (OMI MINORU)  
東北大学・大学院生命科学研究所・助教  
研究者番号：00400416

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者