

# 神経細胞移動の分子機構の解明

—Rho 類似 G 蛋白質の神経回路網形成に果たす役割—



星野 幹雄

京都大学大学院医学研究科 助手

## 1. 私が知りたかったこと

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数多くあるだろうと考え、それを一つずつ同定することによって、その分子機構を理解しようと考えた。そして、新しい発生工学的手法を用いる事によって、STEF/Tiam1-Rac-JNK-MAP1B-微小管という神経細胞移動に関わる新たなシグナル伝達経路とその果たす役割について提唱することができた。

## 2. 研究の狙い

これまでに、ヒトの病気やマウスの遺伝的変異体の解析などから、神経細胞移動に関与すると言われる候補分子がいくつか同定されてはいるが、それらの分子だけではその複雑な分子機構を説明するのに全く十分ではない。その理由の一つとして、神経細胞移動に重要な役割を果たしている分子の多くは、初期胚でも必須な役割を果たしているため、通常の遺伝学的解析では同定できないという可能性が挙げられる。なぜなら、そのような分子の単純なヌル突然変異動物を作製しても早い発生段階で致死となってしまう、その後に訪れるはずの神経発生における働きを個体レベルで調べるのが困難だからである。

この問題点を克服するために、我々は「子宮内エレクトロポレーション法」を用いて、マウス胎仔の脳皮質細胞で任意の発生段階で様々な分子の機能を抑制し、その分子の果たす役割を調べる方法を採用した(図1)。子宮内エレクトロポレーション法を用いれば、マウスの母体内の胎仔の脳室帯細胞に任意の外來遺伝子を簡便に効率よく導入できる。さらにその胚

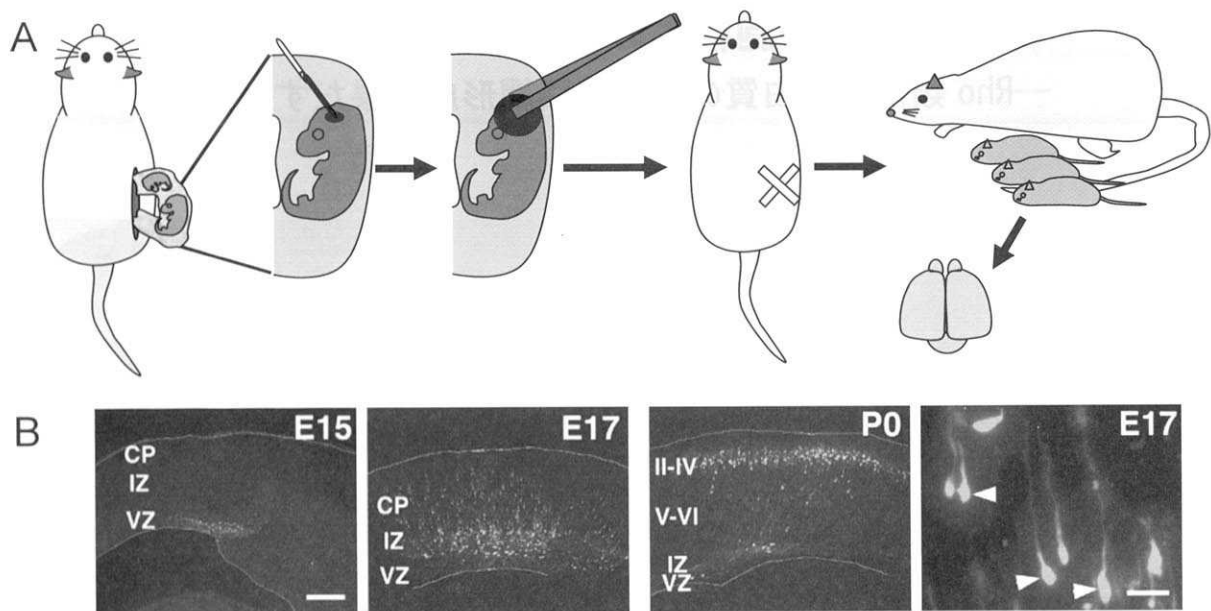


図1 子宮内エレクトロポレーション法

A 子宮内エレクトロポレーション法の概略図。妊娠マウスから子宮を取り出し子宮の上から DNA 溶液を胚の側脳室に注入し、エレクトロポレーションによって遺伝子導入を行う。その後胚を解析したいステージにまで発生させる。

B 胎生 14 日目 (E14) のマウス大脳皮質に EGFP 発現ベクターを導入し、その 1、3、5 日後に脳を取り出し、固定した切片を EGFP の蛍光で観察したもの。右端図は E17 (左下図) における中間帯の拡大図。軟膜側へと先端突起を伸ばし、極性をもって移動する神経細胞が観察できる。

操作自体が正常発生に影響を与えない上、GFP 発現ベクターを共導入すれば、遺伝子導入された神経細胞を同定できるだけでなく、その微細な細胞形態を長期に渡って GFP の蛍光で観察することが可能である。

我々は今までの研究から、Rho 類似 G 蛋白質の一つの Rac1 とその活性化因子である STEF および Tiam1 が、神経突起伸長に関与していることを示していたが、その発現様式から STEF/Tiam1-Rac1 シグナル伝達系が大脳皮質の神経細胞移動に関与しているのではないかと、推測した。Rac1 の単純なノックアウトマウスは発生初期で致死となるが、子宮内エレクトロポレーション法を用いれば、その働きを大脳皮質の移動神経細胞で調べる事が可能となる。そこで、子宮内エレクトロポレーション法を応用する事によって、Rac1 シグナル伝達系という切り口から神経細胞移動の分子機構に迫ることを試みた。

### 3. 結果／考察

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 (図 2A)。さらに、DN-STEF/Tiam1 を導入した脳皮質の表現型は、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 (data not shown)。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。

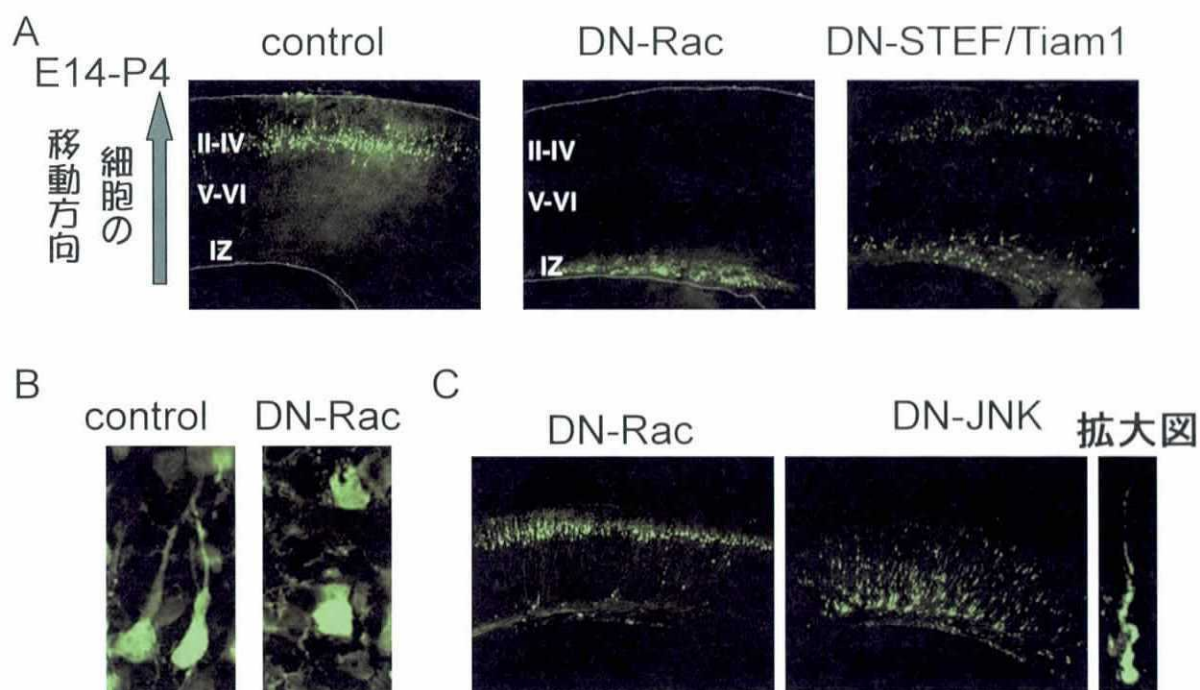


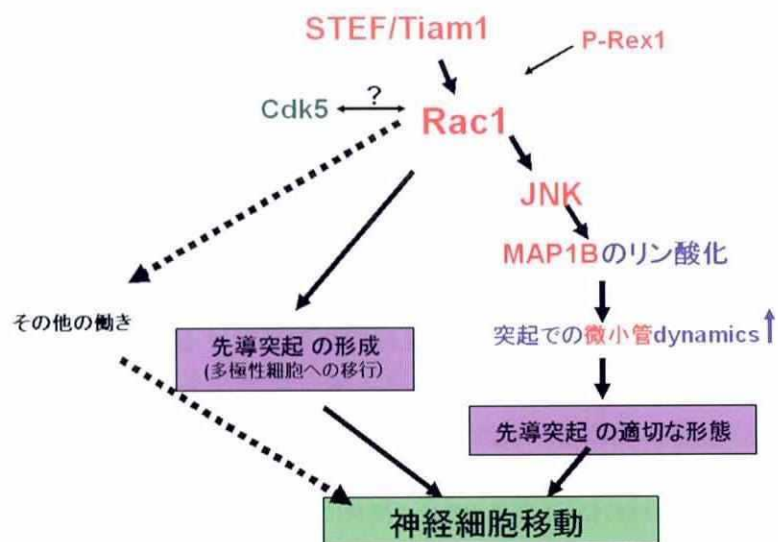
図 2 神経細胞移動における Rac1 シグナル伝達系

エレクトロポレーションはすべて E14 のマウス胚に対して行った。A ドミナントネガティブ (DN)-Rac1 もしくは DN-STEF/Tiam1 を導入し、その 5 日後 (P0) に固定し切片を作製した。コントロールの細胞が皮質板の表層まで移動しているのに対して、DN-Rac1 発現細胞や DN-STEF/Tiam1 発現細胞は中間帯に留まっている。B 中間帯における DN-Rac1 発現細胞の形態を、エレクトロポレーションの 3 日後 (E17) に観察した。コントロールの移動神経細胞は先導突起を形成しているが、DN-Rac1 発現細胞は突起を持たず、丸い形態をとっていた。C エレクトロポレーションの 5 日後 (P0)、DN-JNK 発現細胞は、コントロールと比較して、移動が遅れていた。また、DN-JNK 発現細胞の先導突起は異常な形態をしていた。

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(data not shown)。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 (図 2C)。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あきらかにし、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(data not shown)。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 (図 2C 最右小図) 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 (図 3)。さらに、今年 Reiner のグループによって JNK が別の微小管関連因子である DCX をリン酸化すること、このリン酸化が神経細胞移動や突起伸長に必要であることが報告された。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昨年としては非常に意外なものであったが、我々の報告 (Kawauchi et al., 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きている。DN-JNK 導入の場合と違って、DN-Rac1 発現細胞は脳室帯を出た直後に移動を停止し、際立った突起を持たない丸

い形態を示したことから (図 2B)、Rac1 が先導突起の形成だけではなく、移動を開始した神経細胞が多極性細胞へ移行する過程にも必要とされることが示唆された (図 3)。

子宮内エレクトロポレーション法を用いた我々の研究により、STEF/Tiam1・



神経細胞移動に関与する新しい分子カスケード

Rac1・JNKが微小管の動態の制御などを通して適切な先導突起の形成を行い、神経細胞移動を制御していることが示唆された。現在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。今後、子宮内エレクトロポレーション法のような新しい技術の開発、改良により、大脳皮質形成の分子機構が大きく進展していくことが期待される。

## 参考文献

T. Kawauchi, K. Chihama, Y. Nabeshima, \*M. Hoshino.

"The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration."

**EMBO J.** 22, 4190-4201 (2003).

N. Matsuo, M. Terao, Y. Nabeshima, \*M. Hoshino.

"Roles of STEF/Tiam1, guanine nucleotide exchange factors for Rac1, in regulation of growth cone morphology. "

**Mol. Cell. Neurosci.** 24, 69-81 (2003).

M. Yoshizawa, M. Sone, N. Matsuo, T. Nagase, O. Ohara, Y. Nabeshima, \*M. Hoshino.

"Dynamic and coordinated expression profiles of Dbl-family guanine nucleotide exchange factors in the developing mouse brain. "

**Gene Exp. Pat.** 3, 375-381 (2003).

N. Matsuo, \*M. Hoshino, M. Yoshizawa, Y. Nabeshima.

Characterization of STEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1, required for neurite growth.

**J. Biol. Chem.** 277, 2860-2868 (2002).

M. Hoshino, M. Sone, M. Fukata, S. Kuroda, K. Kaibuchi, Y. Nabeshima, C. Hama.

Identification of the *stef* gene that encodes a novel guanine-nucleotide exchange factor specific for Rac1.

**J. Biol. Chem.** 274, 17837-17844 (1999).