



細胞間シグナル分子の中樞神経系発生における役割

1. 細胞間情報伝達による中樞神経系形態形成の制御

中樞神経系の形態形成における大いなる疑問は、如何にして形と大きさが、器官としての整合性をもって作られるかということにある。非常に多くの細胞がシグナル分子を介してコミュニケーションしなければならない。神経幹細胞は、始めは同じような多分化能を維持したまま分裂増殖するが、ある時点から局所のシグナリングセンターからの位置情報によって、増殖能や分化運命が異なってくる。脊椎動物の中樞神経系は始めは比較的単純な上皮組織である神経板として発生する。神経板の両側端が隆起して正中線で癒合し、神経管となる。この段階で既に神経管の前方は後方よりも膨らんでおり、脳胞と呼ばれる。脳胞を構成する神経上皮においては、神経幹細胞が分裂増殖している。マウス胎生10.5日胚の終脳胞では、一部の細胞がニューロンへと分化し始めている。分裂を停止し、分化し始めた細胞は神経上皮層から出て外側の層=外套層(mantle layer)を作り始める。内側の分裂を続けている神経上皮細胞の層は脳室周囲層(ventricular zone=VZ)と呼ばれる。Notchは膜タンパク質であり、Delta等リガンドの受容体である。NotchはVZにある神経幹細胞に発現している¹⁾。リガンドの一つであるDelta-like1はVZにおいて分化し始めた細胞に発現しており、周囲のNotch陽性細胞にシグナルを送っている。このシグナルは神経幹細胞の分化を抑制していると考えられる²⁾。このNotchシグナルによる分化抑制は幹細胞プールの維持に役立っていると考えられる。

Notchシグナルを受けた細胞の中では、basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写制御因子 HES1 (HESはショウジョウバエのHairyおよびEnhancer of splitのホモログ) および HES5が発現上昇する。この発現上昇はNotch細胞内ド

メインとRBP-Jk (recombinase binding proteinで免疫グロブリン遺伝子のJ kappa signal配列に結合するタンパク質)複合体がHes1, Hes5遺伝子のエンハンサー領域に直接結合することによる³⁾。Hes1を強制発現させると神経分化は抑制される。またHes1ノックアウトマウスでは神経分化が通常よりも早く起こる。以上のことから、我々はNotchシグナルによる神経分化抑制はHESを介したものであるのではないかと考えた。そこで、Hes1/5のダブルノックアウトマウスの神経前駆細胞に活性化型Notchを発現させたところ、神経分化抑制は起こらず、ニューロンが分化した。従って上記の仮定は正しかったことになる⁴⁾。

繊維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor:FGF)の一つ、FGF8は脳の形成過程において主として二つのシグナリングセンターに発現している。一つはanterior neural ridge (ANR)という神経板の前端部である。この部位で産生されたFGF8は終脳原基に拡散し、転写因子Foxg1(以前はBflと呼ばれていた)を誘導する⁵⁾。また、濃度勾配を形成することにより、終脳の前後軸決定に関与している。FGF8を異所性に発現させると前後軸に沿った領域化に異常が生じる⁶⁾。二つ目の産生部位は峡部(中脳と後脳の境界)である。ここで産生され、前方へ拡散するFGF8は中脳の前後軸形成に関与する。後方では予定小脳領域を決定する⁷⁾。

Wnt1(ショウジョウバエwinglessのホモログ。哺乳類ではがん遺伝子int-1と呼ばれていた)は早期胚(体節のできる前)における予定中脳領域に発現している。後にこの発現は峡部前端と背側正中部に局限していく。峡部前端のWNT1はFgf8発現を誘導する。また背側正中部の発現はWNT3aと共に神経前駆細胞の増殖を促進している⁸⁾。

このように様々なシグナル分子によって脳原基の大きさや領域が決定され、脳の「形」が定まってくる。

2. Sonic hedgehog ノックアウトマウス胚における脳の背側部の異常

Sonic hedgehog (SHH)は分泌性の糖タンパク質であり、発生の様々な場面で重要な役割を果たしている。まず、SHHは脊索に発現しており、隣接する神経板正中部に床板を誘導する⁹⁾。床板が更にSHHを発現するようになり、神経管腹側部から背側方へと拡散する。このときに生じる濃度勾配によって神経管腹側部半分ニューロンの種類が決まる。Shh遺伝子をノックアウトすると、神経管の腹側半分が欠損するが、背側部はほとんどの領域において中期胚(胎生9日)まで正常に形成される¹⁰⁾。ところが、間脳と

中脳前部においては、背側部も低形成となっていることが明らかとなった。これらの領域では神経前駆細胞の増殖が低下し、細胞死が増加していた。この異常は、SHH 標的遺伝子の発現解析等（後述）から、中間部における二次的シグナルを介したものであると示唆された¹¹⁾。

3. 脳背側部における SHH, FGF, Wnt, BMP シグナルの相互作用

Shh ノックアウトの間脳および中脳前部における低形成は 13 体節期（胎生 8 日）までは観察されず、21 体節期（胎生 9 日）になって明らかとなる。この時期に SHH シグナル標的遺伝子である *Patched 1* および *Gli 1* の発現は腹側部に限局している。従って、ノックアウトマウス胚における背側部の異常は SHH シグナルに誘導される二次的シグナルの欠損によるものと予測された¹¹⁾。

二次的シグナルの候補としては、肢芽や肺芽の解析から FGF ではないかと予想した。*Fgf 1~23* の発現解析を行ったところ、*Shh* ノックアウトで低形成が観察され始める時期において *Fgf 15* が野生型胚の間脳・中脳前部に発現していた。またこの発現はノックアウトでは消失していた。従って、*Fgf 15* は二次的シグナルの候補として有力であると考えられた。

T cell factor 4 (TCF4) は転写因子であり、WNT シグナルを受けた細胞の中でサイクリン D1 の転写を促進することが知られており、間脳背側部に発現している。この発現は 14 体節期に始まる。このとき、*Wnt 1/3a* が背側正中部（蓋板）に発現しており、TCF4 陽性細胞はこのシグナルを受けて増殖が促進されると考えられる。*Shh* ノックアウトマウスにおいては、14 体節期以降になっても、間脳背側部に TCF4 が発現しない。このことが間脳背側部における低形成の一因と考えられる。野生型マウスでは、SHH →FGF15→TCF4 (WNT シグナル) カスケードが間脳における腹側部と背側部の整合性を制御していることが示唆された¹¹⁾。

細胞死については、野生型においても蓋板に *Bmp 4* が少量ながら発現している。*Bmp 4* は発生中の脳において細胞死を促進することが知られている。*Shh* ノックアウトでは間脳・中脳蓋板における *Bmp 4* の発現が増加していた。このことが、ノックアウトにおける細胞死の増加に関与していると示唆されるが、どのようにして蓋板における *Bmp 4* 発現上昇が起こるのか不明である。

4. *Fgf 15* の発現は SHH シグナルによって直接制御されている

SHH →FGF15 →TCF4 (WNT シグナル) カスケードが間脳における細胞増殖を促進していることが示唆されたが、*Fgf 15* 発現は SHH によってどのように制御されているのかを調べてみた。SHH の直接の標的遺伝子においては、そのエンハンサー部位に Gli 結合配列が存在する。Gli はショウジョウバエにおける転写因子 *cubitus interruptus* のホモログである。*Fgf 15* 遺伝子のエンハンサー領域と推測される部位の塩基配列を調べたところ、上流約 1 kb のところに Gli 結合配列が存在した。この配列を含む約 3.6 kb の DNAI を lacZ につないでトランスジェニックマウスを作成したところ、lacZ の発現は、*Fgf 15* の発現パターンとよく一致した。次いで、このエンハンサー領域の Gli 結合配列に変異を導入した DNA と lacZ をつないでトランスジェニックマウスを作成したところ、間脳・中脳における lacZ の発現は消失していた。このこととルシフェラーゼアッセイの結果から、間脳・中脳における *Fgf 15* の発現は SHH によって直接制御されていることが示された¹²⁾。

5. 大脳新皮質形成における SHH の役割

大脳新皮質は終脳背側部から形成されるが、その過程において、少量ながら *Shh* が発現していることが報告されていた¹³⁾。この報告では、終脳背側部から抽出した RNA をもとに RT-PCR で *Shh* を確認しているのみで、その空間的分布は不明であった。我々は、免疫染色によって発生中の大脳新皮質における SHH タンパク質の局在を明らかにした（図 1）¹⁴⁾。SHH タンパク質は新皮質原基のでき始める胎生 11 日頃には、神経上皮細胞全体に薄く分布している。新皮質原基はその後、内側から脳室周囲層 (VZ)、中間層、皮質板、辺縁層に分かれるが、胎生 13 日以降、中間層に SHH タンパク質はより多く検出されるようになる（胎生 15 日では更に増加する）。

この SHH の役割を明らかにするために、*Emx 1-Cre* マウスを用いてコンディショナルノックアウトマウスを作成した。このマウスにおいては終脳背側部特異的にコンディショナル遺伝子を除去することができる。*Shh* コンディショナルと *Emx 1-Cre* マウスを交配した場合、胎生 13 日において野生型よりも増殖が低下していたが、胎生 15 日では、野生型と増殖に差が無かった（図 2）。この胎生 15 日のコンディショナルノックアウト胚では、中間層の SHH 陽性細胞が野生型と同様に検出された（図 1）。これ

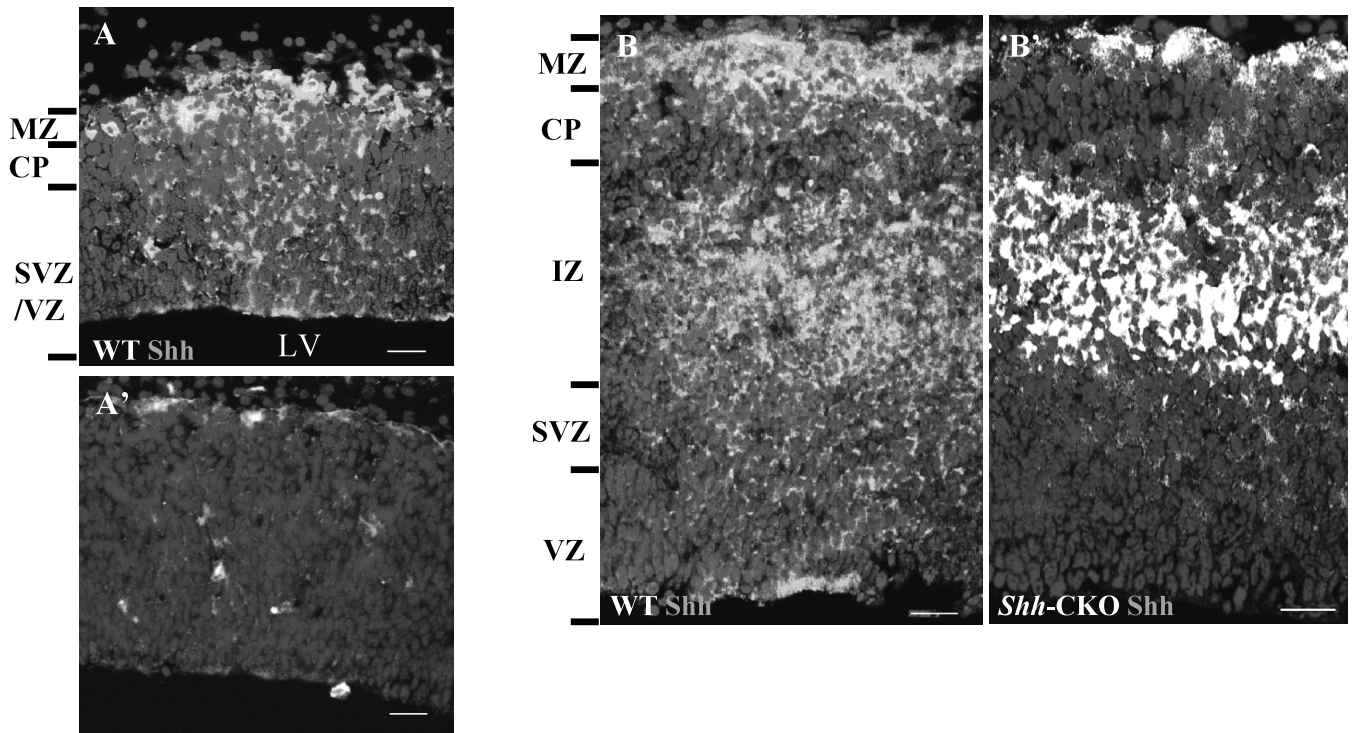


図1 SHH タンパク質の分布

大脳皮質原基切片を抗 SHH 抗体で免疫染色した。(A, A') 胎生 11 日。(B, B') 胎生 13 日。(A, B) 野生型大脳皮質原基では全層に SHH タンパク質の分布 (白) が観察される。(A') *Shh* コンディショナルノックアウトマウス胎生 11 日では、辺縁帯 (MZ) 以外の層 (*Emx1* 陽性) における SHH タンパク質の染色がほとんど見られない。(B') *Shh* コンディショナルノックアウトマウス胎生 13 日では、辺縁帯と中間帯 (IZ) は SHH タンパク質陽性であるが、その他の層は陰性となっている。辺縁帯と中間帯に存在する細胞は *Emx1* 陰性細胞由来であることに注意。CP, 皮質板; SVZ, 脳室下帯; VZ, 脳室帯; WT, 野生型; *Shh*-CKO, *Shh* コンディショナルノックアウトマウス

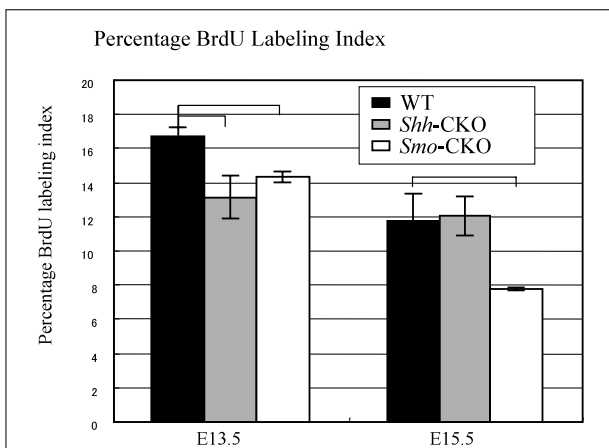


図2 コンディショナルノックアウトマウス大脳皮質原基における細胞増殖

胎生 13.5 日 (E13.5) では, *Smo*, *Shh* コンディショナルノックアウト (*Shh*-CKO, *Smo*-CKO) 共に増殖が野生型に比べ, 有意に減少している (左). 胎生 15.5 日 (右, E15.5) では, *Smo*-CKO のみが増殖減少を示し, *Shh*-CKO は野生型 (WT) と有意差が認められない (本文参照).

は, 中間層の SHH 陽性細胞が, *Emx1* 陰性である腹側由来の介在ニューロンであることを示している. 更に *Smo* コンディショナルマウス (*Smo* は SHH シグナルを細胞内に伝える膜タンパクをコードする) と *Emx1*-*Cre* マウスを交配したところ, 胎生 13 日においても 15 日においても野生型に比して増殖が低下していた. 以上の所見から, 新皮質原基における SHH シグナルの役割は主として細胞増殖の促進にあり, SHH タンパク質の供給源は中期以降, 腹側部由来の介在ニューロンが主であることが示された¹⁴⁾. ここでもまた腹側部と背側部の成長の整合性が SHH シグナルによって制御されていることになる. また, birthdate analysis により, 分化したニューロンの分布にも異常がみられた. これは増殖の乱れが分化のタイミングの乱れにつながったものと考えられる.

Foxg1 ノックアウトマウスでは主に終脳腹側部が形成異常となるが, 終脳背側部もサイズが小さくなる¹⁵⁾. 我々の結果によると, 背側部における SHH の主な供給源は (特

に胎生15日以降)腹側部 medial ganglionic eminence 由来の介在ニューロンである。この欠落が背側部低形成の一因であると推測される。

以上のことから、SHHが前脳の形態形成において、増殖能の制御等を通じて「大きさ」「形」の決定に重要な役割を果たしていることが示された。しかしながら、*Shh*, *Smo* コンディショナルノックアウトマウスにおいて、増殖は完全に停止したわけではなく、FGF, WNT等、他のシグナルとの統合、タイミング等が重要であると考えられる。今後は複数のシグナルを受け取った細胞がどのように振る舞うのかを詳細に検討することが大切であろう。

- 1) Del Amo, F.F., Smith, D.E., Swiatek, P.J., Gendron-Maguire, M., Greenspan, R.J., McMahon, A.P., & Gridley, T. (1992) *Development*, 115, 737-744.
- 2) Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, I., Pourquié, O., Ish-Horowicz, D., & Lewis, J. (1997) *Curr. Biol.*, 7, 661-670.
- 3) Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., & Israel, A. (1995) *Science*, 377, 355-358.
- 4) Otsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., & Kageyama, R. (1999) *EMBO J.*, 18, 2196-2207.
- 5) Shimamura, K. & Rubenstein, J.L. (1997) *Development*, 124, 2709-2718.
- 6) Fukuchi-Shimogori, T. & Grove, E.A. (2001) *Science*, 294, 1071-1074.
- 7) Joyner, A.L., Liu, A., & Millet, S. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12, 736-741.
- 8) Ikeya, M., Lee, S.M., Johnson, J.E., McMahon, A.P., & Takada, S. (1997) *Nature*, 389, 966-970.
- 9) Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., & Jessell, T.M. (1991) *Cell*, 64, 635-647.
- 10) Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., & Beachy, P.A. (1996) *Nature*, 383, 407-413.
- 11) Ishibashi, M. & McMahon, A.P. (2002) *Development*, 129, 4807-4819.
- 12) Saitsu, H., Komada, M., Suzuki, M., Nakayama, R., Motoyama, J., Shiota, K., & Ishibashi, M. (2005) *Dev. Dyn.*, 232, 282-292.
- 13) Dahmane, N., Sánchez, P., Gitton, Y., Palma, V., Sun, T., Beyna, M., Weiner, H., & Ruiz-i-Altaba, A. (2001) *Development*, 128, 5201-5212.
- 14) Komada, M., Saitsu, H., Kinboshi, M., Miura, T., Shiota, K., & Ishibashi, M. (2008) *Development*, 135, 2717-2727.
- 15) Xuan, S., Baptista, C.A., Balas, G., Tao, W., Soares, V.C., & Lai, E. (1995) *Neuron*, 14, 1141-1152.

石橋 誠

(京都大学大学院医学研究科人間健康科学専攻
リハビリテーション科学コース)

Roles of signaling molecules for cell-to-cell communication during development of the central nervous system

Makoto Ishibashi (Department of Physical Therapy, Human Health Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, 53 Syogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto City, Kyoto 606-8507, Japan)

シアノバクテリアの概日時計の出力系

はじめに

多くの生物は、約24時間で振動する「時計」を体内、もしくは細胞内に持っている。これは概日時計(サーカディアンクロック)と呼ばれており、昼夜の環境変動や一年の季節変化に応じた生命活動の基軸となっている。この基本振動を生み出すのが概日時計システムの「振動体」であり、一定の環境下においても自律的に振動することが可能である。しかし、その周期長は地球の自転周期と同じではない。季節・生息地によって昼夜の長さが変わるため、昼夜に伴う光や温度などの変化を利用して、周期的環境変動と概日時計の振動を日々同期させる必要がある。このような外界の刺激を振動体に伝えるための信号伝達経路を、概日時計システムの「入力系」という。一方、振動体はただ振動しているだけでは意味が無く、それによって生み出された時間情報を遺伝子発現などの生理現象に変換するためのシステムが必要である。これを概日時計システムの「出力系」と呼ぶ。概日時計システムを構成するこれら三つのサブシステムのメカニズムの研究は、原核生物から哺乳類を含めた複数のモデル生物を用いて、それぞれ精力的に進められている。本総説では、酸素発生型の光合成を行う原核生物であるシアノバクテリアの一種、*Synechococcus elongatus* PCC 7942の概日時計の出力系に焦点を絞り、最近の筆者らの知見を含めて紹介する。

1. シアノバクテリアの概日時計の振動体

出力系の話をする前に、シアノバクテリアの概日時計の振動体について、この節で簡単に説明しておく。シアノバ