

論文の内容の要旨

論文題目 脳発生における Fyn チロシンキナーゼの機能解析

指導教員 山本 雅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月 入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 後藤 純

Src 型チロシンキナーゼは動物種に渡って広く保存されており、細胞の増殖、分化および移動など様々な生命活動の制御に関与している。哺乳類には 8 つの Src 型キナーゼが存在する。そのうち Src、Fyn、Yes、Lyn および Lck は脳および脊髄での発現が高く、Trk、Eph、ErbB ファミリーなど他のチロシンキナーゼファミリーと同様に中枢神経系の発生および高次脳機能に関与することが示されている。これまでに Src 型キナーゼの各遺伝子欠損マウスが作製され、神経系の顕著な表現型は *fyn* 欠損マウスに見出された。このことは脳神経系において Fyn が特に重要な役割を持つことを示している。

fyn 欠損マウスはミエリン形成の低下や海馬 CA3 領域の細胞層構造の異常および大脳皮質第 V 層の錐体細胞の形態異常といった脳発生過程における表現型に加えて、空間学習能の低下、海馬 LTP の減弱および情動行動の異常といった高次脳機能における表現型も示す。しかし、いずれの現象においても Fyn が関わる分子レベルでの作用機序は不明な点が多い。その理由はこれまでに報告された Fyn の結合分子や基質だけでは *fyn* 欠損マウスの全ての表現型を説明できないことや、Fyn の転写標的遺伝子が殆ど明らかにさ

れていないことにある。

そこで本研究ではまず神経系における *Fyn* の転写標的遺伝子を探索する目的で、*fyn* 欠損海馬と野生型海馬の網羅的遺伝子発現解析を行った。マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析によって野生型海馬と *fyn* 欠損海馬における遺伝子発現の差異を調べた。その結果、比較した約 12,000 個の遺伝子のうち、554 個の転写産物の発現量に変動が見られることが分かった。このうち 34 個の発現量は *fyn* 欠損海馬において野生型の半分以上に減少し、別の 2 個は 2 倍以上に上昇していた。興味深いことに、*fyn* 欠損海馬で発現量の低下していた遺伝子は多くがミエリン形成もしくはオリゴデンドロサイトの細胞分化に関与しているものであった。このうち 5 つのミエリン関連遺伝子 (*MOG*、*MAL*、*MOBP*、*CGT* および *PLP*) についてノザンプロットを行ったところ、これらの発現量が *fyn* 欠損脳で有意に低下していることが確かめられた。

マイクロアレイ解析では *zic1* など神経細胞に発現する遺伝子も *fyn* 欠損海馬で発現が低下する遺伝子群に含まれていた。したがって、マイクロアレイ解析の結果は *fyn* 欠損海馬における LTP の減弱や海馬 CA3 領域における細胞層構造の異常など、ミエリン形成の低下以外の表現型も反映している可能性が十分に考えられた。今後、これらの遺伝子の機能解析によって海馬機能の分子レベルでの理解を深めたいと考える。

上記実験の過程で C57BL/6 に高度に戻し交配の進んだ *fyn* ヘテロ欠損マウス同士の掛け合わせを行ったところ、C57BL/6 を遺伝的背景として持つ *fyn* 欠損マウスの約 20% が重篤な水頭症をするという表現型を発見した。この遺伝的背景を持つ *fyn* 欠損マウスはほぼメンデルの法則に従って生まれ、生後 4 週齢までは発育したものの、生後約 4 週を過ぎると一部は重篤な水頭症により死亡した。

矢状断と冠状断の亜連続切片を作製し HE 染色切片の観察を行ったところ、水頭症を発症した *fyn* 欠損マウスでは側脳室、第三脳室および嗅球内脳室が顕著に拡大していることが分かった。

未分化神経細胞に発現する *Musashi-1* の遺伝子欠損マウスは上皮細胞の分化に異常を来し、中脳水道の狭窄を伴った水頭症、非交通性水頭症を発症する。そこで、まず水

頭症を発症した *fyn* 欠損マウスの後頭部の薄切連続を作製し、水道の観察を行った。しかし、*fyn* 欠損マウスに中脳水道の狭窄は認められず、この水頭症が交通性水頭症であることが示された。また、交通性水頭症モデルマウスの一つである TGF- β 1 のトランスジェニックマウスでは脳静脈からの髄液吸収が低下している。そこで、静脈洞の形態および髄液循環に関連した器官における Fyn の発現の有無について検討した。しかし、*fyn* 欠損マウスでは水頭症を発症した個体においても静脈洞は正常な範囲の形態を保っていた。また脳髄液産生器官である脈絡叢と吸収器官である脳静脈に Fyn の発現は認められなかった。したがって、このマウスの水頭症の原因は脳髄液の循環不全ではなく、大脳形成の異常であることが示唆された。

大脳形成の異常の原因を知る目的で、種々の神経系マーカーの抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、水頭症を発症した *fyn* 欠損脳において各種神経細胞のマーカータンパク質は野生型脳と同程度発現しているものの、ミエリンタンパク質の減少とアストロサイトのマーカータンパク質である GFAP の増加が見られた。

Fyn はオリゴデンドロサイトの分化に寄与しており、またオリゴデンドロサイトに発現する CNP を欠損させたマウスは神経変性を伴った水頭症を発症することが報告されている。これらのことから *fyn* 欠損マウスの水頭症はオリゴデンドロサイトの機能障害がその一因である可能性が考えられた。また GFAP の発現量の増加と *fyn* 欠損マウスの水頭症の症状との間には相関が見られ、アストロサイトの増加と水頭症の進行の関連が示唆された。初代培養系において *fyn* 欠損アストロサイトに増殖能の亢進は見られなかったことから、*fyn* 欠損脳では神経変性あるいは脳圧亢進後の応答としてアストロサイトの増殖が亢進していることが示唆された。

一方で、*Pafah1b1* ヘテロ欠損マウスでは発生段階における神経細胞の移動遅延が原因で、また *hyh* マウスでは神経幹細胞の増殖低下が原因で、大脳の形成異常に因る水頭症を発症することが報告されている。そこで、胎生期 *fyn* 欠損マウスにおける神経細胞の増殖および移動について検討した。胎生後期の *fyn* 欠損および *fyn* ヘテロ欠損マウス脳細胞に BrdU を取り込ませ、抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色によって生後脳の BrdU 陽性細胞の数及び位置を比較した。その結果、*fyn* 欠損マウス大脳皮質では BrdU 陽性細胞の数

に異常は見出せないものの、大脳皮質層における存在位置に違いが見られることが分かった。したがって、*fyn* 欠損マウスの水頭症は大脳層構造を構成する神経細胞群の移動障害がその一因である可能性も示された。

続いて *fyn* 欠損マウスに見られる水頭症の分子基盤を明らかにする目的で、ヒト家族性水頭症の原因遺伝子として知られる細胞接着分子 L1 に注目した。Fyn は G タンパク質共役受容体、受容体型チロシンキナーゼ、接着分子などの膜受容体の下流でシグナルを伝達する。また L1 欠損マウスと *fyn* 欠損マウスは共に C57BL/6 の遺伝的背景において側脳室拡大を伴う水頭症を発症するという点で似た表現型を持つ。そこで L1 と Fyn の機能相関を検討した。その結果、HEK293T 細胞に過剰発現させた Fyn が L1 の機能に重要な 1176 番目のチロシン残基と 1229 番目のチロシン残基をリン酸化することを見出した。さらに、L1 は胎生後期マウス脳においてチロシンリン酸化されていることが分かった。これらの結果は大脳皮質形成時に Fyn と L1 が直接的に機能することを示唆していた。

Fyn はオリゴデンドロサイトおよび神経細胞の両者において重要な役割を持つことから、*fyn* 欠損マウスにおける水頭症の発症・進行にはオリゴデンドロサイトの機能低下および神経細胞移動の異常の両方が関与していると考えている。今後オリゴデンドロサイトの分化および神経細胞の移動の局面において、どのような Fyn を介するシグナル伝達経路が寄与しているのかを、L1 と Fyn の機能相関を含め検討することが重要である。