

論文内容の要旨

論文題目

Essential role of Laminin γ 1 in neural tube morphogenesis: analysis with the medaka mutant, *tacobo*

神経組織構築におけるLaminin γ 1の機能: メダカ変異体*tacobo*を用いた解析

氏名 津田 佐知子

序

形態形成において、細胞は様々な細胞外シグナルに晒されている。その一つ、基底膜の主要構成成分である laminin により活性化されるシグナルは、細胞移動や細胞極性、また細胞形態などを制御し、組織の形態形成において重要な役割を持つことが知られている。

脊椎動物において、神経組織は広く共通な過程を経て構築される。神経発生初期の構造である神経管を構成する神経上皮細胞は分裂を繰り返し、分裂により生み出された神経細胞は、その誕生の場から移動して、複数の神経細胞層からなる複雑なネットワークを作る。この神経上皮細胞は、Interkinetic Nuclear Migration (INM) と呼ばれる特徴的な核移動を示す。この細胞は神経管の apical (脳室面)、basal (基底膜) 両側への接着を保つ一方、核は細胞周期依存的に神経管内でその位置を変化させており、apical-basal 方向に往復を繰り返す。神経上皮細胞の核は分裂期を apical 側で迎えた後、G1 期に神経管の basal 側へ移動し、S 期の後 G2 期に再び apical 側へ戻る。この核移動は、1930年代での発見以来、神経上皮細胞の主たる特徴として知られている。これにより核分裂は神経管の脳室面側 (apical 側) に偏って生じる。また、神経前駆細胞は増殖期において、水平分裂 (planar cell division) により互いに等価な娘細胞を生む。この INM と水平分裂は近年、神経細胞を産生する神経前駆細胞の数を維持するのに重要であることが示唆されている。しかし一方、これら核の挙動

を制御するメカニズムについては、細胞接着関連分子や細胞極性形成因子、細胞骨格などの関与が明らかにされているが、いずれも細胞内に局在する分子であり、前述のように細胞は細胞外からのシグナルを受けるにも関わらず、細胞外分子による神経管組織レベルでの制御、また細胞内と外の分子の相互作用については不明であった。

博士課程研究において私は、順遺伝学、胚操作や個体でのライブイメージングが容易なメダカを実験動物として選択し、メダカ突然変異体 *tacobo* (*tab*) を用いて、細胞外シグナルの INM と平面分裂における役割を解析した。

結果と考察

tab 変異体は、放射線医学研究所石川裕二博士と共同で行われた ENU 誘発突然変異体 screening により得られた、体軸伸長と神経発生に異常を示す劣性致死変異体である。本博士研究において私は、この *tab* 変異体の原因遺伝子を positional cloning により調べ、これが laminin γ 1 変異体であることを明らかにした。細胞外マトリクスタンパク質 laminin は α 、 β 、 γ 鎖からなるヘテロ三量体であり、C 末端側に存在する coiled-coil ドメインで互いに結合している。それぞれ複数種ある subunit の組み合わせで、哺乳類では 15 種類の laminin 三量体が確認されているが、その内最も多くの laminin 三量体に用いられているのが、laminin γ 1 である。*tab* 胚では、laminin γ 1 の splicing donor サイトに生じた一塩基置換により、coiled-coil ドメインの大半が欠損し、laminin 三量体が正常に形成されないことが示唆された。laminin γ 1 に対する Morpholino antisense oligonucleotide 注入による機能阻害実験により、*tab* 胚の表現型が再現されたことから、*tab* 変異体は laminin γ 1 変異体であると結論した。

次に私は、*tab* 変異体の示す神経管の形態形成異常に注目し、神経発生における細胞外シグナルの機能を調べた。まず、分裂 M 期の核を抗リン酸化ヒストン抗体で標識したところ、*tab* 神経管において分裂頻度や細胞周期は正常であるが、M 期細胞核は basal 側に異所的に分布することが分かった。このとき、*tab* 神経管の basal 側において、laminin1 (α 1, β 1, γ 1) の染色性はほとんど失われ、さらに透過型電子顕微鏡観察により基底膜が薄くまた複数箇所で見切れていることが分かった。次に、laminin に起因するシグナルの関与を調べるため、laminin の主たる receptor であり、神経組織形成への寄与も報告されている integrin を介するシグナルに注目した。laminin/integrin シグナルの下流の中心的標的分子である、focal adhesion kinase (FAK) の活性を抗リン酸化 FAK (pY397) 抗体により調べたところ、野生型 (*wt*) 胚において神経上皮細胞の apical, basal 両側に活性化が観察された。一方 *tab* 胚の神経管では、その活性化

は著しく低下していた。さらに、Morpholino antisense oligonucleotide (MO) 注入による FAK 機能阻害実験を行ったところ、*fak*-MO 注入胚は、体軸伸長異常、眼の形態異常といった *tab* 胚と同じ表現型を示し、神経管において異所分裂が観察された。これらの結果から、FAK を介した laminin シグナルが、分裂期細胞核の位置決定に関与することが示された。

では、*tab* 胚での異所的細胞分裂は、いかなる細胞内メカニズムにより生じたのだろうか。まず神経上皮細胞の主たる特徴である INM について調べた。EGFP mRNA 注入により標識した神経上皮細胞について、共焦点レーザー顕微鏡による time-lapse 観察により、その核移動を調べた。*wt* 胚神経管では、ほぼ全ての核が apical 側へ移動後分裂を迎えたのに対し、*tab* 胚では多数の核が異常な移動パターンを示し、この結果 basal 側で異所的な分裂が生じていた。*tab* 胚での分裂直前の核の移動速度は、核分裂の位置によらず、*wt* 胚に比べ有意に低下していた。これらの結果により、laminin γ 1 が神経上皮細胞の INM を制御することが示された。

一方これまでに、神経上皮細胞の apical-basal 極性が分裂の位置決定に重要であり、また、laminin は極性形成に重要である、とされてきた。従って、laminin 欠損による極性異常により、*tab* 神経管において分裂位置異常を生じた可能性があった。しかし、複数の apical marker (aPKC ζ , ZO1, γ tubulin)のいずれについても、*tab* 神経管で apical 側への正常な局在が確認され、細胞極性は正常に維持されていることが分かった。さらに、神経上皮細胞のもう 1 つの特徴である、神経管の apical と basal 両面に接着するという細胞形態についても調べた。膜と核をそれぞれ GFP, YFP で可視化し、モザイクにラベルした所、*wt*, *tab* 胚共に、観察したほぼ全ての細胞について、両面への接着が維持されていた。以上の結果から、laminin 欠損による異所分裂は、神経上皮細胞の極性や形態の異常の結果ではなく、INM の核の移動自体の異常によることが強く示唆された。

さらに、apical 側での細胞の分裂軸を調べたところ、*wt* 胚では多くが水平分裂を示すのに対し、*tab* 変異体では分裂の方向はランダム化していることが分かった。この細胞の分裂軸異常は、FAK 機能阻害胚においても同様に生じていた。

以上のように *tab* 胚において、神経前駆細胞の数の維持に重要であると考えられている INM と水平分裂双方に異常が観察された。このことから、*tab* 神経管において神経分化異常が生じていることが予想された。初期神経細胞マーカーである Hu 抗体を用いて解析したところ、*tab* 神経管において予想通り分化した神経細胞数は同じ時期の *wt* 胚神経管と比べて有意に増加していた。一方、同時に分裂頻度は *tab* 神経管において有意に減少していた。これは、*tab* 神経管において、神経前駆細胞が正常に維持されず、分化が早まっている可能性を示唆する。

さらに FAK 機能阻害胚を用いた細胞移植により、FAK 機能阻害のモザイク胚を解析したところ、この核の挙動異常と神経分化亢進が、FAK 機能阻害細胞選択的に観察されたことから、FAK が細胞自律的にこの過程を制御していることも明らかにした。

では FAK シグナルは、いかにして INM と水平分裂を制御しているのでしょうか。近年、dynactin が網膜での INM に機能することが示されている。Dynactin は複合体として、dynein とその cargo の相互作用や dynein の微小管への結合性を制御し、その motor 活性に重要な役割を持つ。ゼブラフィッシュの結果および *tab* 胚においてアクチンや微小管ネットワークには大きな異常は見られなかったことから、我々は dynein の活性調節に注目した。最初に dynactin の局在を抗体を用いて調べた。wt 神経管では、細胞質全体への分布と共に、apical, basal 端への局在が観察された。一方 FAK 機能阻害胚の神経管では、dynactin の局在が低下していた。Dynactin 量の減少は western blot 解析によっても確認された。Dynactin の INM への関与をより直接的に調べるため、dynactin 複合体の 1 つ dynamitin p50 の過剰発現により dynactin 複合体形成阻害を試みた。その結果、過剰発現胚において、神経管での異所分裂と共に、体軸伸長異常、目の形態異常といった *tab* の表現型が観察された。さらに、laminin/FAK と dynein-dynactin システムの genetic interaction の有無を検証した。*fak* MO 注入と *dynamitinp50* mRNA それぞれ単独では殆ど異所分裂や分裂軸異常生じない量の注入を行い、核の挙動に異常が生じるか調べた。その結果、共注入胚で有意に異所分裂の増加と水平分裂の減少が確認された。以上より、INM と水平分裂が laminin/FAK と dynein 複合体の相互作用により制御されることが示された。

本研究により、神経上皮細胞での INM と水平分裂、さらに神経分化制御における細胞外基質 laminin の役割が初めて明らかになった。さらに laminin は FAK を介して、dynein の活性調節に寄与していることが強く示唆された。これは、細胞外分子と細胞内分子の相互作用により、INM と水平分裂が組織レベルで制御されるメカニズムの一端を明らかにした初めての例である。また *tab* 神経管では、INM での細胞周期と核移動が de-couple していると考えられ、正常の INM における coupling において laminin が重要な役割を持つことが強く示唆された。FAK が dynein-dynactin システムといかなる相互作用をするのか、神経分化がいかに制御されているのか、また INM における coupling がいかに制御されるのか、これらは今後の課題である。以上、メダカ突然変異体の解析を通して、細胞外基質 laminin の神経組織形成における新たな役割を見いだすことができた。本研究により、INM と水平分裂を制御する細胞外シグナルの研究が進展するものと期待している。