

学位論文題名

大脳新皮質構築過程における新規 IgSF 分子 MDGA1 の役割

学位論文内容の要旨

脳には約二千億個のニューロンが存在し、特異的なシナプス結合を介して神経回路網を形成し、情報の伝達と処理を行っている。神経回路網は脳がその機能を果たす上での基本となる構造であり、その形成に関わる分子群と作用メカニズムの解明は、脳機能の維持・再生を目指す上で極めて重要な課題である。中枢神経系の発生過程において、神経細胞は誕生後その神経細胞固有の位置に移動・配列を行い、それと同時に特定の経路を辿る軸索を標的に向けて投射する。この細胞種ごとに異なる移動や投射はそれぞれ固有の誘導様式に従っており、その誘導の分子機構としてはガイダンス分子と呼ばれる一群の分子群が細胞に対し外界の情報を伝達することが基本となっている。現在ガイダンス分子群の実態は明らかにされつつあり、例えば網膜-視蓋投射系における Eph/ephrin システムに代表される分子群によって誘導機構の解明が進みつつある。しかしながら、現在知られているガイダンス分子群のみで、大脳皮質構築過程などに見られる多様なニューロンの動きを全ては説明できず、未知・未同定の分子の存在が示唆されている。

我々は、そのような未同定のガイダンス分子の探索を目的として、単一神経細胞由来の subtractive cDNA library を作製することにより、特定の機能をもつ神経群に選択的に発現する分子のスクリーニングを行い、MDGA1 (MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 1) を単離した。MDGA1 は IgSF に属する GPI-anchor 型の膜蛋白質であり、MDGA1 に見られる Ig ドメイン、FNIII ドメイン、MAM ドメインは、既知のガイダンス分子群によく見られる構造モチーフであり、MDGA1 はガイダンス因子として機能しているものと類推された。これらのことから私は MDGA1 の神経回路網構築過程における機能を探るべく、その解析をおこなった。

MDGA1 のマウス脳における発現を *in situ* hybridization (ISH) により解析したところ、嗅球、大脳新皮質、海馬、中脳上丘、橋、下オリブ核、および発生期の小脳外顆粒細胞層に顕著な発現が観察された。なかでも、大脳新皮質においては II/III 層および VI 層の神経群において選択的な発現が認められ、その構築過程において重要な役割を担っていることが推察された。

MDGA1 には一次構造の極めてよく類似した family protein である MDGA2 が存在する。同様に MDGA2 のマウス脳における発現を ISH により解析したところ、概して全般的に発現が認められ、嗅球、大脳新皮質、海馬、中脳、小脳プルキンエ細胞層等でやや強い発現が観察された。

それぞれ内在性の蛋白質を組織染色により確認できる特異抗体を調製し、これら分子群の分布を解析したところ、MDGA1 は ISH で発現が確認された神経群の投射軸索においてその存在が認められ、MDGA2 は同じく、主として細胞体内にその存在が認められた。しかしながら、全脳の膜画分をショ糖密度勾配遠心により分画すると、MDGA1, MDGA2 の両者とも Detergent resistant membrane fraction 画分に存在が認められることから、両者とも、既知の GPI-anchor 型ガイダンス分子と同様、lipid raft において機能していることが推定された。

さらに MDGA1 の機能を探るため、MDGA1 を発現させた 293T 細胞上での後根神経節 (DRG) 移植

片からの軸索伸長パターンを観察した。DRG 移植片を 293T 細胞上に播種すると軸索伸長が阻害されるため、たまたま伸長できた神経の軸索上を他の神経軸索群が走行することにより、少数の束化した軸索群が観察される。これに対して、MDGA1 を発現させた 293T 細胞上では、より多数の軸索が DRG 移植片から伸長する傾向が認められた。このことは、MDGA1 により DRG ニューロンの基質選択性が抑制され、293T 細胞上でも軸索伸長がおこなえるようになったものと推察される。これらのことから、MDGA1 は、ガイダンス分子として、大脳新皮質などの構築過程において、その機能を果たしているものと考えられた。

そこで、MDGA1 の神経回路網形成過程における機能を明らかにするために、MDGA1 発現細胞を LacZ 遺伝子の発現で追跡できるように、MDGA1 のシグナル配列をコードする第一エクソンを LacZ 遺伝子と入れ替えた MDGA1 の KI-KO マウスを作製した。挿入した LacZ レポーター遺伝子の発現を β -galactosidase の活性染色並びに ISH によって確認した結果、活性の認められた部位は MDGA1 の発現していた部位と一致しており、ホモ欠失個体では、MDGA1 蛋白質の発現は完全に失われていることを確認した。これらホモ欠失個体においては脳の巨視的な顕著な異常や、大脳新皮質 II/III 層細胞が投射する脳梁交連繊維全体の投射経路や正中線を越える時期などの軸索伸長速度に顕著な差は観察されなかった。そこで次に、大脳新皮質構築時における放射状神経細胞移動について検証を行った。

大脳新皮質は 6 層よりなる層構造をなしており、それぞれの層には特定の機能をもつ細胞が集積し、層ごとに異なった特定の投射先へ軸索を送っている。この構造は、あとに生まれた上層の神経群が、先に生まれた下層の神経群を追い越すようにして、放射状に上層へと移動していくことにより形成されている。そこで deeper layer のマーカーとして V 層細胞に発現する *ER81* を、upper layer のマーカーとして II/III 層細胞に発現する *Cux2* を用い、最終的に II/III 層に到達する MDGA1 陽性細胞の移動過程を WT マウス胚では MDGA1 を、KO マウス胚では挿入した遺伝子である LacZ を指標に、それぞれ ISH によって追跡した。

II/III 層細胞が移動を開始した直後の E16.5 から基本的な層構造の構築が完成する P7 まで解析した結果、E16.5 においては野生型マウス胚では MDGA1 陽性細胞は cortical plate に広く分布していたのに対し、KO マウス胚では大部分が ER81 陽性細胞層よりも深層に分布していた。E18.5 においては、野生型マウス胚では MDGA1 陽性細胞は Cux2 陽性細胞層の上方辺まで移動したが、KO マウス胚では LacZ 陽性細胞は Cux2 下方から ER81 陽性細胞層上方にかけての層と ER81 陽性細胞層よりも深層側の層の 2 つに分かれて分布した。なお、Cux2 陽性細胞群の移動には野生型マウス胚と KO マウス胚の間に顕著な差は認められなかった。

これらの結果から、MDGA1 は大脳新皮質の構築過程において、その放射状細胞移動に細胞自律的に寄与する分子であることが明らかになった。また、KO マウスにおいては、一部の細胞の移動が停滞してしまうなど、MDGA1 陽性細胞群の中でも MDGA1 欠失の影響が異なる細胞種が存在し、また、Cux2 陽性細胞群の放射状移動には異常が認められないことなどから、同じ層に移動・配置される神経細胞群であっても、その放射状移動は、それぞれ異なったメカニズムで制御されている可能性が考えられる。

続いて MDGA1 がガイダンス分子として機能する際の分子機構の実態を明らかにするために、MDGA1 と協働する相互作用分子の探索を試みた。まず今回表現型を観察したマウス脳においても結合分子がこれまでの報告同様に繊維性の組織に多く存在することを検証し、単離のための可溶化・解離条件を検討した。続いてリコンビナント MDGA1 蛋白質のアフィニティービーズを作製し、ニワトリ胚脊髄から結合分子の単離及び質量分析を用いた同定を試み、MDGA1 同士のホモフィリックな結合の可能性を示した。

これらのことから、新規 IgSF 分子である MDGA1 は新規ガイダンス分子として機能しており、大脳新皮質を構成する多種多様な神経群が正しく移動・配置されるにあたっては、今回明らかにした MDGA1 をはじめとする因子群により、精妙な制御がなされていることが推察された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 利 治
副 査 教 授 南 雅 文
副 査 准教授 山 本 融
副 査 准教授 上 原 孝

学位論文題名

大脳新皮質構築過程における新規 IgSF 分子 MDGA1 の役割

博士學位論文審査等の結果について (報告)

ほ乳類の大脳新皮質においては、投射先・機能の異なる神経群が層状に整然と配置されており、この層構造は、領野・カラムと共に大脳新皮質の基本的な構築原理のひとつとなっている。この6層よりなる層構造は、大脳新皮質形成期において、脳室帯より生まれた神経細胞群が、外側へ向けて放射状方向に移動し、後から生じた神経が先に生まれた神経群を乗り越えていくことにより形成されている。その基本的な分子メカニズムは現在明らかにされつつあり、移動制御に関わる Reelin などの細胞外因子や、秩序だった放射状細胞移動に必要な Cdk5・Doublecortin などの細胞骨格系制御因子群の同定・機能解析が進んでいる。しかしながら、大脳新皮質は多種多様な神経群の精緻な集合体であり、同一の層内においても、詳細に見れば、発現する遺伝子の異なる、すなわち機能に差違のある何種類もの神経群が存在しており、これら多種多様な神経群の移動と配列が、すべて同様のメカニズムで進むのかは不明である。本論文において、著者は、ニワトリ胚運動神経のサブタイプ特異的に発現する因子として単離された、免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) に属する GPI アンカー型の細胞外因子である MDGA1 に着目し、マウスホモログを単離して *in situ* hybridization 法によりその発現を解析したところ、マウス大脳新皮質において、層選択的に発現していることを新たに見いだした。既知の層選択的に発現する転写因子群と比較しながら、発生ステージを追って詳細に解析を進めることにより、MDGA1 は、大脳新皮質においては II/III 層に属する神経群と VI 層に属する神経群の一部において選択的に発現が認められること、発生期においては II/III 層の神経群の誕生時より発現が認められ、その後放射状に移動していくことを明らかにした。さらに、*in vitro* での解析から、この因子に軸索ガイド活性が認められたことより、MDGA1 は、II/III 層に属する神経群の放射状細胞移動および軸索伸長過程において重要な機能を担っていることが推察された。そこで、MDGA1 の大脳皮質形成過程における機能を明らかにするために、LacZ ノックイン-ノックアウトマウスを作製した。内在性の MDGA1 をウエスタンブロットおよび免疫組織化学で特異的に検出できる抗体を調製し、ノックアウトマウスにおいては MDGA1 の発現が完全に失われていることを確認後、遺伝背景をそろえるために congenic としてよいレベルまで C57BL6 マウスと 10 代以上バッククロスをすすめた後、ノックアウトマウスにおける MDGA1 発現細胞の挙動を、ノックインした LacZ 遺伝子の発現を指標に解析した。その結果、MDGA1 ノックアウトマウスにおいては、MDGA1 発現神経細胞の放射状移動に遅滞が認められ、その一部は VI 層付近に停滞していることが明らかとなった。この時、II/III 層選択的に発現する Cux2 陽性神経細胞群の移動には変化が認められなかった。これらの解析結果は、MDGA1 陽性神経細胞において、MDGA1 はこれらが正しく放射状細胞移動を行うために必須であるこ

とを示しているのみならず、同じ II/III 層を構成している細胞群でも、その放射状移動については異なった制御メカニズムが存在していることを示唆する初めての結果である。したがって、本論文は、精緻に構成された「知」の「座」である大脳新皮質がどのように構成されていくのかについて、新規な知見を付け加えたにとどまらず、その構成機構について新たな洞察を与えるものであり、医薬科学分野における生命科学の進展に大きく貢献するものである。

よって、北海道大学大学院生命科学院生命医薬科学コース博士後期課程を修了する著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格があるものと認める。