

行動制御研究部門

竹 市 雅 俊
(客員研究部門)

神経ネットワークは個々のニューロンが特定の道筋に沿って軸索を伸ばし、適切な標的細胞とシナプス結合することにより形成される。複雑な神経間結合が間違いなく発生過程において形成されるために、どのような分子メカニズムが働いているのか。平成4年度より開始した本研究部門では比較的構成が単純なショウジョウバエの神経-筋結合をモデル系として、この問題にアプローチしている。ショウジョウバエの神経-筋結合系は半体節あたり、約40個の運動ニューロンが、30本の筋肉繊維を支配することにより成立している。発生過程において、個々の運動ニューロンは特定のパターンに従って軸索を伸ばし、決まった筋肉とシナプス結合をすることが知られている(図1;口絵7参照)。この際、運動神経は筋肉表面に存在する特定の分子を認識することによって標的筋肉を識別していると考えられている。このような筋肉上の特異分子を探索するため、本研究部門の能瀬聡直助手はカリフォルニア大学バークレー校(Corey S. Goodman 研究室)において、特定の筋肉繊維において特異的に発現しているエンハンサー・トラップ株をいくつか単離した。さらに、その一つの解析から神経-筋結合に関連した接着分子 Connectin を同定することに成功していた(文献1)。本研究部門ではこの研究を継続、発展させる形で、平成5年1月より能瀬助手が研究室のセットアップを開始し、その後助手として立井一明、非常勤講師として富永知子、宍戸恵美子、博士研究員として一色孝子、大学院生として梅田達夫、谷口弘樹、梅宮猛らがメンバーとして加わり、これまでに以下のような研究成果をあげている。

研究成果

1. 神経-筋結合形成過程における Connectin の機能解析

Connectin はロイシン・リッチ・リピート(LRR)をもつ細胞表面蛋白質で、*in vitro*において homophilic な接着分子として機能する。神経-筋結合形成時に Connectin は一部の運動神経(特に SNa)と、その標的筋肉において特異的に発現することから、神経-筋標的認識分子として働くことが期待された(文献1)。Connectin の生体における機能を解析するため、この分子を本来発現していない筋肉において異所発現させその影響を調べた。その結果筋肉上の Connectin が、この分子を発現する運動神経 SNa に対し誘引的な働きをすること(図2;口絵8参照、文献4)、他の運動神経 SNb (Connectin を発現しない)に対し阻害的な働きかけをすること(文献2)、を示した。以上の結果から Connectin は特定の運動神経 SNa とその標的筋肉において発現し、両者間の結合を促進するとともに、近傍の他の筋肉を支配する運動神経 SNb に対し阻害的に働きかけ、その神経が Connectin 発

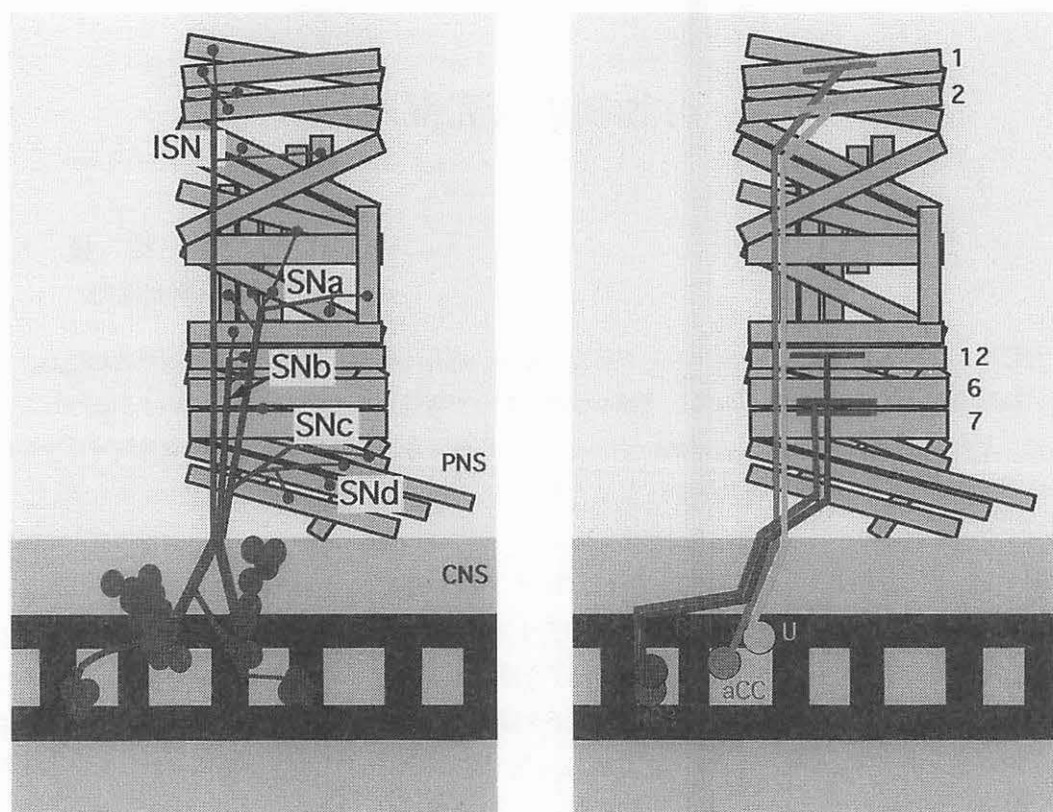


図1 ショウジョウバエ神経-筋結合系

ショウジョウバエ神経-筋結合系は中枢神経系 (CNS) 内の約40個の運動神経細胞が、5本の主要な神経経路 (ISN および SNa-d) に沿って軸索を伸長し、30本の筋肉を支配することにより成立している (左図)。この際、個々の運動神経細胞は決まった道筋に沿って伸長し特定の筋肉を支配することが知られている (右図)。

現領域に不適切に侵入するのを防ぐ機能をもっていることを示唆した。

2. 新たな神経-筋認識分子 P750 の同定

さらに多くの神経-筋結合関連分子を同定するため、他のいくつかのエンハンサー・トラップ株について、分子遺伝学的解析を進めた。その1つの解析から、少数の筋肉、神経細胞で発現し、Connectin 同様、LRR を持つ膜貫通型のタンパク質をコードする P750 を同定した。P750 遺伝子の欠損体や筋肉全体における異所発現体における運動神経投射パターンを調べたところ、特定の運動神経の伸長パターンやシナプス形成に顕著な異常が見いだされた。このことから P750 は神経-筋結合形成過程における神経認識に直接関与することが示された。現在その作用機構についてより詳細な解析を進めている。

3. M-spondin, G-spondin : 新規の分泌蛋白質ファミリー

エンハンサー・トラップ株 AN34 の解析から、ラットの F-spondin に強い相同性を示し、筋肉において発現する分泌蛋白質 M-spondin を同定した。F-spondin は、floor plate において特異的に発現し、

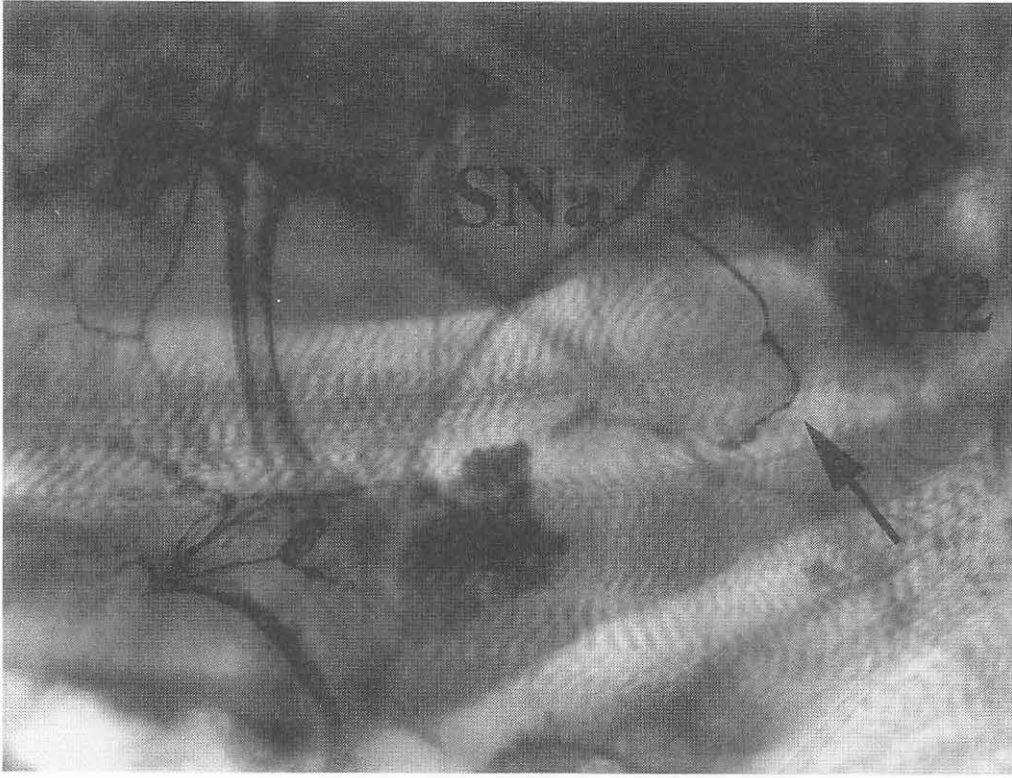


図2 Connectin の異所発現によるシナプス結合特異性の変化

正常胚では運動神経 SNa は筋肉 12 番とは結合しない。しかし細胞接着分子 Connectin を、この筋肉において異所発現すると、シナプスを形成するようになる (矢印)。このことから Connectin は標的認識分子として機能することが示された。

in vitro において神経繊維伸長を促すことが示されている。さらに両者間の相同領域に対するプライマーを用い PCR を行うことにより、このファミリーに属する新たな遺伝子、G-spondin、H-spondin をクローニングした。このうち G-spondin は中枢神経系のニューロバイルに沿って存在する特定のグリア細胞において特異的に発現していた。このような発現の特異性、F-spondin について示されている *in vitro* における機能などから、この新規の遺伝子ファミリーが神経軸索の誘導や細胞の接着に関与することを示唆した。

4. 特定の神経細胞、筋肉の分化に関与する転写因子 Msh 値

エンハンサー・トラップ株 rH96 を解析した結果、既知の遺伝子 *muscle segment homeobox (msh)* 遺伝子への P 因子挿入株であることが分かった。*msh* はホメオボックス転写因子をコードする遺伝子で、その転写産物は一部の筋肉、神経細胞等で強く発現する。*msh* 欠損変異体、異所発現体の解析から、Msh が筋肉及び神経系の特定の細胞の分化あるいはパターン形成に必須な分子であることを明らかにした。特に中枢神経系の初期発生過程において、Msh は背側領域において特異的に発現し、その

領域特異性の決定に関与することを示唆した。

今後の展望

神経結合の特異性がどのような分子機構によって決定されるのかを明らかにすることは、神経生物学の中心的なテーマの一つである。これまでの研究により、Connectin, P750 などショウジョウバエ神経-筋結合に関与する神経認識分子をいくつか同定することに成功した。他の研究グループによっても、最近この系において機能する神経認識分子がいくつか見つけられており、この比較的シンプルな神経結合系が形成される仕組みについてかなりのことが分かってきた。しかしながら、これまでに見つかっている機能分子の数はまだ少なく各論的知見の域を出ていないのが現状である。今後さらに新たな機能分子を組織的に検索し、その作用機構を明らかにして行くことにより、神経ネットワーク形成メカニズムのより総括的な理解をめざしたい。

参考文献

1. A. Nose, V. B. Mahajan and C. S. Goodman (1992). Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell* 70, 553-567.
2. A. Nose, M. Takeichi and C. S. Goodman (1994). Ectopic expression of Connectin reveals a repulsive function during growth cone guidance and synapse formation. *Neuron* 13, 535-539.
3. M. Takeichi (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current Opinion in Cell Biol.* 7, 619-627.
4. A. Nose, T. Umeda and M. Takeichi (1997). Neuromuscular target recognition by a homophilic interaction of Connection cell adhesion molecules in *Drosophila*, submitted.

