

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「生物の発生・分化・再生」  
研究課題  
「脳構築の遺伝的プログラム」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者：松崎文雄

(理化学研究所 発生・再生科学総合  
研究センター グループディレクター)

# 1 研究実施の概要

## 研究の構想

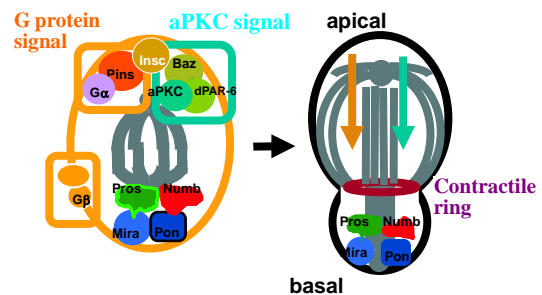
脳の発生に際立った特徴である神経細胞の多様性はいかなる遺伝的プログラムによって形成され、いかにして機能的な脳構築に組み込まれるのであろうか。神経発生は、一層の神経上皮という2次元的情報が、多様な細胞からなる3次元の脳構築に変換される過程と捉えることができる。ショウジョウバエの研究から、そこには3つの素過程、(1)幹細胞が異なる個性を獲得する過程、(2)非対称な細胞分裂によって多様性が増幅する過程、(3)幹細胞の個性の時間的編成により神経の多様性が増幅される過程が存在することが知られている。脊椎動物の脳発生の場合、神経幹細胞は極めて複雑でダイナミックな運動を伴って分裂する。その非対称分裂は神経の運命決定にいかに関与しているのか。また、脊椎動物に固有な構築である階層構造やカラム構造などの機能的な構築は神経幹細胞システムからどのように発生するのだろうか。このような問題は未知の領域である。

本研究では、遺伝的解析の容易なショウジョウバエとマウスを実験系として、神経幹細胞が多様な神経細胞を生じる機構、および、多様な神経細胞が秩序構造を形成する仕組みを追求し、脳発生に共通の論理を導き出すと同時に、脊椎動物に固有な仕組みを発見することをめざす。

## 脳構築の遺伝的プログラムの解析(理研 CDB 松崎グループ)

### 1) ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂と細胞極性制御

ショウジョウバエ神経幹細胞は、細胞分裂によって、それ自身と、より小さな神経母細胞を一定の方向に繰り返し生じる。その際、運命決定因子を非対称に分配する。非対称分裂に異常をきたす変異を系統的に分離することにより、神経幹細胞の非対称分裂とそれを制御する極性シグナルのメカニズムを明らかにし、それにより、非対称分裂に基づく細胞の分化と自己複製の普遍的なメカニズムを探ることを目指した。



### 1) 娘細胞のサイズの非対称性を制御するメカニズムの解析

ショウジョウバエの神経幹細胞が分裂する際、紡錘体自身が形態的に非対称性となり、さらに紡錘体が細胞の中心からずれることにより、収縮環が細胞の対称面からずれ、小さな神経母細胞を生じることが知られている。我々が分離した娘細胞のサイズが等しくなる二つの突然変異の原因遺伝子はそれぞれ3量体G蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットをコードするG $\beta$ 13F 遺伝子とG $\gamma$ 1 遺伝子であることが判明した。これらの結果から形態的非対称分裂すなわち、分裂装置の非対称性の獲得には、G 蛋白シグナリングが働くことを明らかになった(Fuse *et al.* Curr. Biol. 2003)。

## 2) 娘細胞の自己複製と分化を制御する機構

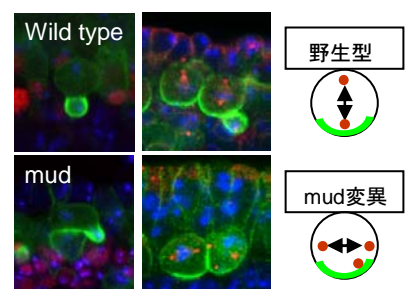
神経幹細胞が形態的な等分裂を行う変異の解析から、神経幹細胞の性質(自己複製と分化細胞の形成)の維持には、小さな神経前駆細胞を生じることで体積の減少を最小限にとどめることが必要であると示唆された。そこで、遺伝学的に、形態的にも運命決定因子の分配に関しても対称な等分裂を誘導し、生じた等価な娘細胞がどのような性質を持つかを検討した。その結果、こうして生じた娘細胞は、胚発生期には、神経母細胞として最終的に神経に分化し、幼虫期には、神経幹細胞様の性質を獲得し、自己複製を続けることが判明した。すなわち、幹細胞の等分裂によって生じる娘細胞が自己複製するか分化するかは発生の段階に依存することが明らかになった。(北島、布施ら、投稿準備中)

## 3) ショウジョウバエ神経幹細胞の細胞極性を制御するシグナル伝達系の役割分担

神経幹細胞では、二つの細胞内シグナル伝達系 - aPKC-Par3-Par6 複合体および受容体非依存的 Gαi-Pins シグナル系が apical 側に局在し、細胞極性を制御していることが知られている。娘細胞のサイズの非対称についても、両者が平行して機能することが最近明らかにされた。この二つの apical シグナル伝達系と Gβγ シグナルの関係を分析したところ、aPKC-Par3-Par6 複合体が運命決定因子の局在を制御する主要なシグナル系であり、他方、Gαi-Pins は分裂軸の方位の決定に必須であることが明らかになった。すなわち、aPKC-Par3-Par6 と Gαi-Pins という二つの apical シグナル系は互いに協調しながらも機能を分担していることが示された (Izumi *et al.* JCB 2004)。

## 4) 分裂軸を定位する因子の同定

上皮細胞がその細胞極性に分裂軸を直交させることで等分裂を行うのに対して、ショウジョウバエの神経幹細胞は、細胞極性に平行に分裂することによって非対称分裂を行う。このように、細胞の分裂軸の方位は極性を持つ細胞の分裂が対称性か非対称であるかを決定する。分裂軸の制御する Gαi-Pins の下流因子 Mushroom body defect (Mud) を Pins の結合因子として同定した。それは、突然変異スクリーニングで同定した変異 - 分裂軸の方位が細胞極性とカップルしない - の原因遺伝子であった。Gαi-Mud-Pins (Goloco 蛋白質)の複合体は種を超えて保存されており、これが、紡錘体微小管と細胞表層の相互作用を制御することで分裂軸の方位を制御する一般的なメカニズムを担うことを提唱した (Izumi *et al.* Nat Cell Biol. 2006)。

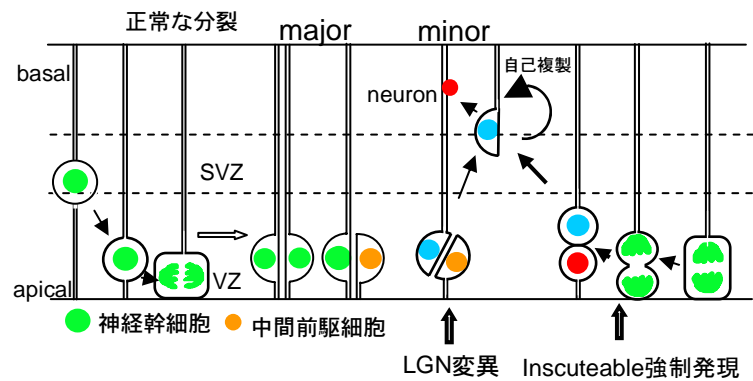


## II) 哺乳類神経発生の解析

### 1) 哺乳類神経幹細胞が神経細胞を産むメカニズム: 分裂軸の果たす役割

マウス胚発生において、神経幹細胞は極端に伸張した上皮構造を持つ。このような細胞が自己複

製と神経細胞の産生の両方を行う場合、細胞極性と分裂軸の一致による非対称分裂が想定されてきた。ショウジョウバエ幹細胞の分裂で分裂軸の制御にかかわる Pins と Inscuteable を遺伝的に操作することにより、前脳の神経幹細胞の分裂様式を解析した。



まず、野生型の神経上皮(幹細胞)の分裂が上皮面に平行であることを脳切片のライブレコーディングを含む複数の方法で確認した。その際、ほとんどの分裂で、apical 面は娘細胞の両方に引き継がれる。Pins のホモログ LGN のノックアウトマウスを作成したところ、神経幹細胞は脳室面で分裂するにもかかわらず(神経上皮細胞のエレベーター運動は正常)、分裂軸の方位は予想通りランダムとなり、apical 面を失った娘細胞が頻繁に生じる。そのような細胞は、マントル層を含む basal 側で細胞分裂を行う前駆細胞へと変換されることが判明した。つまり、apical 面の喪失は必ずしも分化細胞を生じない。そのため、このノックアウトマウスでは、神経上皮細胞の形態をとる幹細胞の数はすばやく減少して行くが、神経細胞の産生速度に大きな異常はなく、層構造にも大きな乱れは生じない。さらに、ショウジョウバエ同様、Inscuteable 遺伝子の強制発現により分裂軸を上皮面に垂直にすることを試みたところ、娘細胞は分裂軸の方向をランダムにした場合とほぼ同様な運命をたどった。生切片の time-lapse 観察により、娘細胞を長時間追う系を確立し、この条件化で娘細胞の運命を観測した。apical 側の娘細胞のほとんどが神経細胞となり、basal 側の娘細胞は分裂能を持つことが多いことが判明した(分散した前駆細胞になる)。このことから、apical-basal 軸に沿って、幹細胞の細胞質のより basal 側に分裂能を与える能力が局在していると推測される。以上の結果から、マウス胚性神経幹細胞は上皮性を保つことが自己複製にとって大事であること、そのためには、神経幹細胞の分裂が上皮面に水平であることが要求されることが明らかになった。また、神経幹細胞は、apical-basal 極性と分裂軸と方位を制御することによって娘細胞の運命を決定しているのではないことも判明した(Konnno, Shioi *et al.* 投稿中)。

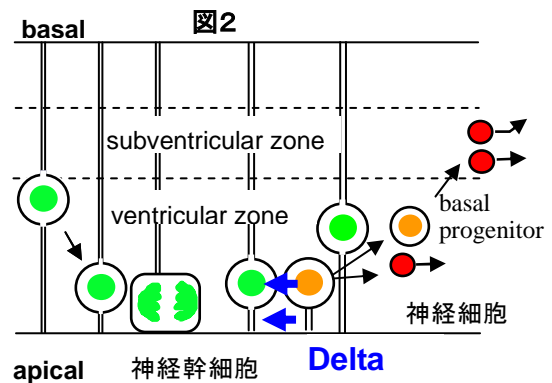
## 2) 神経幹細胞の単一細胞解析

神経幹細胞や前駆細胞の多様性と関係性を知るアプローチとして、神経幹細胞をはじめとする前駆細胞の単一細胞 cDNA を多数作成し、遺伝子発現をゲノムワイドに分析した(ショウジョウバエの知見に依存しないアプローチ)。この解析から出発して、以下の事実が判明した(図2)。

- 1) 神経幹細胞 (apical progenitor)と中間前駆細胞(basal progenitor)はグローバルに遺伝子発現が異なる。
- 2) 神経幹細胞 (apical progenitor)は常に Notch シグナルの活性化を必要とする。

- 3) Notch 活性が低下すると、中間前駆細胞や神経細胞への変換が細胞周期の狭い time window で起こる。
- 4) この中間前駆細胞(と神経細胞)は Notch 基質である Delta-like1 (Dll1)の一過的な発信源である。

すなわち、幹細胞(上皮細胞)から生じた娘細胞が、親細胞である幹細胞の維持に働く。この「分化細胞が未分化細胞を維持する」という feedback システムは、ショウジョウバエ neuroblast が神経上皮から生じる際、周りの細胞を上皮細胞へ運命づける場合に非常に良く似ており、側方抑制のメカニズムとして作用している可能性がある。単一細胞解析は、この他のいくつかの細胞間シグナルが幹細胞の維持と分化に関与することを示唆しており、この解析法の有効性が実証された。(Kawaguchi *et al.* 投稿中)。



### 脳神経幹細胞とその子孫ニューロンの挙動の網羅的観察・記録(名古屋大学医学研究科 宮田グループ)

脳皮質形成の過程および網膜形成の過程に焦点をあて、神経前駆細胞の形態、細胞産生挙動、娘ニューロンの移動および配置の様子をライブ観察し、さらに、外科的、薬理的、あるいは遺伝子強制操作的手法による各種実験を行うことで、細胞の振る舞いを分子の言葉で説明することを目指してきた。

発生過程のマウス大脳では、神経前駆細胞(progenitor:P)が、「 $P \rightarrow P + P$ 」という分裂様式で、分裂能を持つ二つの前駆細胞を生じることが知られている。マウス網膜原基の前駆細胞がこのパターンで分裂する際、二つの娘前駆細胞は、細胞周期長、細胞周期依存的運動(「エレベーター運動」)の軌跡、細胞産生能に関して異なることを見出した(Saito *et al.*, *Dev. Growth Differ.* 45, 219, 2003)。

大脳皮質原基では、それらに加えて、神経上皮前駆細胞とは異なる分裂位置を示す深部分裂型前駆細胞(basal progenitor)の存在を同定し、bHLH 型転写因子 Neurogenin2 がこの basal progenitor の挙動に重要な役割を果たしていることを突き止めた((Miyata *et al.*, *Development* 131, 3133, 2004)。

さらに神経上皮前駆細胞の細長いプロセスが弾性要素として働き、その「よじれ+引っ張り」が速やかな核・細胞質移動に貢献することを見いだした。中間系フィラメントがこのよじれ形成に強く貢献していることも明らかにした(Miyata and Ogawa, *Curr. Biol.* 17, 146, 2007)。

## 神経前駆細胞と神経細胞の移動による脳構築プロセスの解析(東北大学 大隅典子グループ)

### 1) 神経幹細胞の細胞周期と核の移動の制御機構の解析

神経幹細胞から適切な前駆細胞や神経細胞を生じるために重要な役割を果たしていると予想される、細胞周期と核のエレベーター運動(interkinetic nuclear movement: INM)の制御機構の解明に取り組んだ。大脳皮質原基の神経上皮細胞に強く発現する転写因子 Pax6 の変異で、INM の異常を見出した。INM と中心体の挙動を同時にタイムラプス観察したところ、野生型胚では S-G2 期に中心体は脳室面側に留まるのに対し、Pax6 変異胚では S-G2 期にかけて中心体が頻繁にその位置を変えることを発見した。この中心体位置の異常により、Pax6 の変異では INM に異常が生じるものと結論した (Tamai *et al.* Genes Cells. 2007)。

Pax6 変異胚で認められた INM の異常および中心体の挙動異常に関連する分子の候補を探索するために、マイクロアレイ法により Pax6 変異胚で発現が低下している因子の中で、細胞骨格や細胞接着に関連することが知られている FEZ および delta-catenin に着目し、免疫染色を行った結果、FEZ1 および delta-catenin とともに、神経上皮細胞の先端側に特異的な局在が認められ、Pax6 変異胚終脳ではその発現が著しく低下することを発見した。

### 2) Pax6 変異ラットの嗅球形成位置の異常の解析

Pax6 変異ラットで、本来嗅球が形成されるべき終脳吻側ではなく側面に嗅球形成が生じることを手がかりとして、嗅球の初期形成機構について解析を行った。その結果、僧帽細胞という最初に嗅球構築に関わるニューロンの移動が異常であること、この異常は細胞非自律的に制御されることを明らかにした。また、野生型で嗅上皮からの神経投射を除外した場合にも嗅球の形成位置は正常であることから、嗅球形成の位置に関しては終脳内在的な機構が働いており、そこに Pax6 が機能していることが明らかになった (Nomura & Osumi, Development 2004)。さらに、嗅皮質形成に、Pax6 およびその下流の Eph/ephrin シグナルが関わることを見出した (Nomura *et al.* Development 2006)。

### 3) 神経幹細胞の増殖と分化を統合する分子機構の網羅的解析

野生型脳と Pax6 遺伝子変異動物脳で発現する遺伝子のプロファイルについてマイクロアレイ法を用いて比較することから出発し、Pax6 の下流遺伝子として脂肪酸結合タンパク質をコードする Fabp7 を見いだした。FABP7 の機能阻害実験から、Pax6 は FABP7 を介し、神経上皮細胞の性質の維持に深く関わることを示された (Arai, Y. *et al.* J. Neurosci. 2005)。

## 神経・支持細胞間シグナリングの時間的・空間的制御機構の解明(京都大学 瀬原グループ)

神経系の構築においては、まず神経細胞が分化し、この神経細胞が自分を支えるグリア細胞の分化・移動・生存に関わるシグナルを出すことが知られている。神経がそれらのシグナルを支持細胞に送る時間的・空間的な制御機構を、プロテアーゼ制御を中心に解明することを目標とした。

### 1) 形態形成におけるメルトリン $\beta$ の役割

膜分子 ADAM プロテアーゼ、メルトリン  $\beta$  はグリア増殖因子(neuregulin)を膜貫通領域直上部で切断し可溶型に変換する活性をもつ。メルトリン  $\beta$  プロテアーゼ欠損マウスの解析から、心臓心室中隔・弁などの内膜組織形成に加えて、副腎の節前神経繊維の束化にこの分子が必要とされることを見出した(Kurohara *et al.*, Developmental Biol. 2004)。さらに詳細な遺伝学的解析から、メルトリン  $\beta$  は神経堤細胞で必要とされることが明らかになった(Komatsu *et al.* Developmental Biol. 2007)。

## 2) 神経再生におけるメルトリン $\beta$ の役割

坐骨神経損傷後の神経再生におけるメルトリン  $\beta$  の役割をノックアウトマウスを用いて解析し、神経再生においてメルトリン  $\beta$  は、PI3K-AKT 経路の活性化制御を介して、Schwann 細胞の分化を制御することが明らかした(投稿準備中)。

## 3) メルトリン $\beta$ によるグリア増殖因子の認識・切断制御機構

グリア増殖因子切断能を持つプロテアーゼは、メルトリン  $\beta$  以外に、同じプロテアーゼファミリーに属する TACE(ADAM17)など知られる。メルトリン  $\beta$  の場合、グリア増殖因子の切断には膜ラフトに局在することが必須であり、逆に、膜ラフトをこわすと ectodomain shedding を活性化する他の ADAM、TACE や Kuzbanian とは性質が異なることを明らかにした(Wakatsuki *et al.* J Neurochem. 2004)。

## 神経幹細胞の時間的変遷の研究 (国立遺伝学研究所 一色グループ)

一つの幹細胞は非対称的分裂を繰り返しながら多様な子孫神経細胞を特定の順番で作り出してゆく。一色グループは幹細胞系譜の再現的な観察が比較的容易に行えるショウジョウバエ中枢神経系をモデル系として、この神経幹細胞の時間変化を司る分子メカニズムを解明することを目指している。以前、ほぼ全てのショウジョウバエ神経幹細胞が、胚発生期前半において Hunchback、Krüppel、Pdm、Castor という4種の転写因子を順次発現し、これらの転写因子の発現を自律的に切り替えることを報告した。しかしながら、Castor 発現開始以降の神経幹細胞の時間変化についてはほとんど謎であった。

### 1) 幹細胞系譜後期過程の記載的解析とモデル幹細胞系譜の確立

公開データベースに登録されている転写産物の発現様式を指標にして、神経系で広範囲に時期特異的に発現される遺伝子を探索した。その結果、線虫 *heterochronic* 遺伝子 *lin-29* のホモログ (*dmlin-29*)をはじめとして、後期特異的分子マーカーをいくつか同定した。その結果、特定の神経幹細胞の系譜形成を、これまで観察が難しかった休眠期も含めて胚発生期から幼虫期まで、一分裂単位の精度で再現的に追跡できる系を確立した。その結果、ショウジョウバエの神経幹細胞系譜形成では、Hunchback/Castor (Castor は Hunchback と同じ DNA 結合特性を有する)タイプと Krüppel/dmLin-29 タイプの Zn フィンガーがペアになった発現が、(I)Hunchback/Krüppel→(II)Castor/ /Squeeze(Lin-29 ホモログの一つ)/Krüppel→(III)Castor/dmLin-29→(終了)の順番で、3回繰り返されることが明らかになった。

## 2) 神経幹細胞の休眠

胸部神経幹細胞は胚発生後期に分裂を停止し休眠に入る。その際、時期特異的因子の発現変化も停止することが判明した。その後、休眠していた神経幹細胞は幼虫期に入って再活性化されると、発胚生終期に示すのと同様の転写因子発現切り替えを示すことが観察された。

## 3) 神経幹細胞の休眠への移行を制御する機構

時期特異的転写因子群が幹細胞の休眠に果たす役割を解析した。Castor 変異では休眠が起こらず、胚発生終了まで神経幹細胞が分裂し続け、一方、Pdm 変異体では休眠が通常より早く起こることなどから、時期特異的転写因子群が休眠のタイミングを制御していることがわかった。さらに、*castor* 遺伝子の変異体と野生型での遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで比較し、Castor の制御下において休眠の制御を行う未知の因子として、NAB という転写コファクターを見出した。NAB の機能が欠損すると、胸部神経幹細胞は休眠せず、休眠する直前あたりで生成される神経細胞を生成しつづける。このことから、NAB は休眠、後期特異的神経細胞形成の相方において重要な役割を果たす分子であることがわかった。

# 2 研究構想及び実施体制

## (1) 研究構想

### 1. 背景

神経ネットワークを構成する各々の神経細胞は、回路網の中で固有の役割を果たしており、独自の個性を持つ。従って、神経が個性を獲得する仕組み、すなわち、神経細胞の運命決定は、神経発生の遺伝的プログラムの根幹をなすと言ってよい。1995年、ショウジョウバエ神経幹細胞の分裂に伴って、神経の運命決定に必須な転写因子prosperoが神経前駆細胞に不等分配されることを松崎グループは発見し、非対称な細胞分裂が、少数の神経幹細胞から多様な個性を持つ神経細胞を生む重要なプロセスとして浮かび上がった(平田ら、Nature 377, 627-630,1995)。その後、この研究成果を出発点に、神経幹細胞の非対称分裂のメカニズムと役割を主にショウジョウバエをモデル実験系として追求してきた。(図1参照)。

本研究提案では、遺伝的な解析が容易なショウジョウバエを実験系として、神経細胞の多様性形成の遺伝的プログラムを構成する素過程を明らかにし、その知見を基盤に、脊椎動物の脳構築の遺伝的プログラムを追

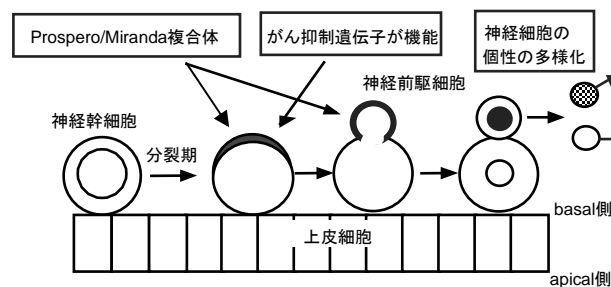


図1. ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂



求する。

## 脳構築プログラム解析グループ(松崎文雄)

### 1. 神経細胞の多様性を生む素過程：ショウジョウバエをモデルとした解析

一般に、細胞が非対称に分裂する場合、娘細胞間に(1)遺伝子発現(2)分裂回数、(3)細胞の大きさという3つの側面に関する非対称性が考えられる。ショウジョウバエ神経幹細胞の細胞分裂は、この全てに関して非対称である。遺伝子発現の非対称性は、神経幹細胞から神経前駆細胞に、娘細胞の形質を決める分化因子が不均等に分配されることによる。転写因子 Prospero と Notch シグナルの抑制因子 Numb がその代表的な因子であり、それぞれに特異的なアダプター分子、例えば Prospero に対する Miranda、が存在し、運命決定因子の細胞内局在を定める。この運命決定因子-アダプター複合体の局在が分裂軸と一致するために一方の娘細胞にだけ分配される(図1)。

このような運命決定因子の細胞内局在と細胞の分裂軸の方向を制御するのは、細胞の非対称性、即ち細胞極性であり、ショウジョウバエの場合、Inscuteable, Bazooka, Par6, atypical protein kinase (aPKC) などの因子によって担われることが明らかにされてきた。これらは進化的に保存された極性形成メカニズムに基づいている。しかしながら、

- 1) 極性制御因子が運命決定因子の局在や分裂軸の方位をいかにして決めるのか
- 2) 娘細胞の大きさの違いはなぜ生じ、どのような意味があるのか
- 3) 神経幹細胞の非対称分裂に細胞間相互作用が関与するか
- 4) 細胞極性を制御するこれらの因子群はなぜ細胞内の一方に局在するのか

という問題は、ショウジョウバエの神経幹細胞に限らず、非対称分裂に本質的な問題であるにもかかわらず、未だ明らかではない。

松崎グループでは、これらの問題を追求する目的で、ゲノムワイドの遺伝的スクリーニングを行ってきた。神経幹細胞の極性をよく反映する Miranda の局在を指標として、非対称分裂に異常をきたす突然変異を多数同定している。なかでも、

- 1) 運命決定因子の局在と分裂軸の方位がカップルしない変異体群
- 2) 姉妹細胞間の大きさが等しくなる変異体群
- 3) 隣接細胞との細胞間相互作用により分裂の方位が規定されていることを示唆する変異群

という、これまでにない表現型を示す突然変異グループを分離している。これらの突然変異を解析してゆくことで、上に述べた非対称分裂とそれを制御する極性の基本的なプロセスを明らかにしたい。

### 2. 脊椎動物神経幹細胞系譜のリアルタイム解析

脊椎動物の神経発生は、外胚葉が陥入し神経管が形成されることから始まる。神経管の上皮層すなわち神経上皮は肥厚し、やがて細胞分裂を始める。この神経上皮細胞が神経細胞やグリア細胞を生じる神経幹細胞として機能する。その細胞周期は非常にダイナミックなプロセスであり、基底膜

側(subventricular zone)と先端側(ventricular surface)を結ぶ細長い細胞質を細胞核がエレベーターのように往復し、先端側すなわち神経管の内側に到達したときに分裂期に入り、そこで二つの姉妹細胞に分裂する(図2)。神経上皮細胞の核はこのエレベーター運動を繰り返しながら、幹細胞としての性質を保持すると同時に、より分化した神経前駆細胞や神経細胞を生じる(図2)。しかし、in vitro の初代培養系で神経幹細胞の分裂パターンを解析した報告はあるものの、時間的空間的な情報を含めた in vivo の分裂パターンはよく判っておらず、エレベーター運動を繰り返す幹細胞からどのように神経細胞の系譜が形成されるのかを知るには、これを明らかにする必要があります。

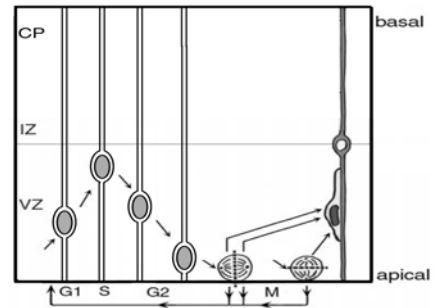


図2. 脊椎動物神経幹細胞の分裂

幹細胞と前駆細胞を区別する一般的な遺伝子マーカーが見出されていないため、リアルタイムで神経上皮細胞の分裂を追跡することが、分裂能をもつ神経前駆細胞と神経幹細胞を区別する確実な方法である。そこで、histone と EGFP の融合遺伝子の導入によって細胞の核をラベルしたマウス胎児の脳スライスを用い、この複雑な運動を伴う細胞分裂を考慮に入れた細胞系譜をリアルタイムで解析する。これらの解析法と、最終分化細胞を特定する抗体染色法を組み合わせることにより、神経幹細胞がどのような分裂パターンによって神経前駆細胞や神経細胞を生じるのかを追求し、神経細胞の種類と分裂パターンの中に存在する特定の関係を明らかにする。

### 3. 神経幹細胞および前駆細胞の分裂の非対称性の解析

神経幹細胞は、細胞分裂によって分裂能を保持した前駆細胞を生じる場合と、分裂能を失った未分化な神経細胞(あるいはグリア細胞)を生じる場合がある。いずれの場合も、基底膜面から先端側まで伸びた線維状の細胞質(radial fiber)が姉妹細胞のどちらか一方に受け継がれる(宮田ら、Neuron,31, 727-747,2001)。従って、神経幹細胞とその姉妹細胞の間には、分裂した時点で、細胞構築に関して明らかな非対称性が存在する。これらの非対称性はいかなる分子機構によって生じるのだろうか。以下の二つの方法によって追求する。

#### 1) ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂に関与する因子の脊椎動物ホモログの検討

ショウジョウバエ神経幹細胞で不均等分配される運命決定因子ProsperoとNumbは、共に脊椎動物の神経上皮層でも発現している。ProsperoのマウスホモログProx-1は、主に、spinal cordの神経上皮層のsubventricular zoneの細胞核に局在し、その大半はpost-mitoticな未分化神経細胞であると思われる。他方、Numbは神経上皮細胞の大半で発現し、事実、ニワトリの神経上皮細胞の分裂では、細胞の基底膜側に非対称に局在し、一方の細胞に不等分配されることが報告されている(若松ら、Neuron,23, 71-81,1999)。しかしながら、マウスについては、その局在に関して一致した見解はなく、論争的となっている。従って、ショウジョウバエで不等分配される運命決定因子がそのまま脊椎動

物でも同じような振る舞いをするとは限らないが、細胞分裂に非対称性を与えるメカニズムには同じ分子モジュールが使われている可能性がある。そのような観点から、松崎グループのショウジョウバエプロジェクトから、系統的に同定されてくる神経幹細胞の非対称分裂に関与する因子、また、神経上皮層に平行な方向の非対称性planer polarityを制御する因子のマウスホモログも解析の対象とする。GFP融合タンパク質による局在解析、あるいは、antisense RNA法や遺伝子ノックアウトなどを用いた機能阻害実験等により、脊椎動物の神経幹細胞における動的な細胞内局在とその役割を解析する。

## 2) 脊椎動物神経幹細胞の神経産生を制御する遺伝子の同定

脊椎動物の神経幹細胞の分裂はショウジョウバエと較べて格段に複雑であり、ショウジョウバエでは機能していない因子の関与が十分予想される。そこで、ショウジョウバエとの類似性に依存しないアプローチを用いて解析を行う必要がある。

まず、幹細胞の分裂の盛んな時期のマウス胎児脳から神経上皮層だけをマイクロディセクションで取り出し、そこで発現する mRNA を単離する。そこから cDNA を作成し、上皮細胞をコントロールとして、マイクロアレイ技術やゲノム情報を利用して比較することで、神経上皮に強く発現する遺伝子を選択する。In situ hybridization 法により局在を調べ、ventricular zone にとりわけ強く発現する遺伝子群を選抜する。それらの全長 cDNA を理研全長 cDNA バンク等から取り寄せ、GFP 遺伝子との融合遺伝子ベクターのセットを作成する。それらを electroporation 法によりマウス胎児脳の神経上皮層で発現させ、神経幹細胞内で GFP 融合タンパクが局在するものを同定する。このアプローチにより、分裂中の幹細胞や前駆細胞で非対称に局在する因子が同定できれば、機能阻害法や過剰発現による機能亢進法を用いて機能解析を進める。

## 4. 神経構築の秩序構造の探索—階層性の分子的基盤の探求

1) ひとつの神経幹細胞から生じた神経細胞とグリア細胞は神経上皮層に垂直な方向に移動し、上皮層の外側に、重層構造を持つマントル層を形成する。一つの幹細胞から生じた神経細胞は、複数の階層へ、また、一つの層に複数の神経細胞が到達することが知られている。なかには、到達後、水平方向に移動し広がった分布を示すこともある。また、離れた部位で生成した神経細胞も遊走して神経構築に加わる。このようにして形成される神経構築は、層構造を貫いた何らかの構築単位を構成すると考えるのが自然である。実際、ネコやサルの見視野のカラム構造のような、より大きな機能単位は知られている。しかし、神経幹細胞の系譜をもとにした神経構築があるのかどうか、それが機能的に何らかの役割をはたすのかについてはわかっていない。その解析の端緒として、単一あるいは隣接した少数の神経幹細胞から生まれた子孫細胞のレパトリーがつくる分布を解析し、そこに存在する構築ルールを抽出したい。

2) 脊椎動物の脳に見られる明らかな規則的構築は、マントル層の階層性である。脳の発生過程で、後に生じた神経は、以前に形成された神経より表面近くまで移動し、新しい階層を形成する。これまで層特異性を決める因子の探求が世界的に行われてきたが、分子的な理解にはまだほど遠い。私た

ちは次のようなアプローチでこの問題を追求したい。まず、神経幹細胞から分裂して神経細胞や前駆細胞が生じる際、幹細胞が階層特異的なidentityを姉妹細胞に与えると想定し、そして、幹細胞が与えるこの階層特異性が時間と共に切り替わるために、異なる階層が生じると考える。そこで、異なる発生段階の神経上皮からcDNAを作成し、発生ステージ特異的に発現する遺伝子群を濃縮する。もし、その遺伝子が層特異性を与えるとする、その発現は特定のマントル層に見られることが期待される。そのような性質を示す遺伝子のなかから、機能阻害法や機能亢進法を用いて、層特異性の規定にかかわる幹細胞遺伝子を同定する。

### 脳細胞構築研究グループ(宮田卓樹)

#### 脳神経幹細胞とその子孫ニューロンの挙動の網羅的観察・記録

脳構築の原理を遺伝子レベルで解明するための基盤とすべく、脳の基本素子であるニューロンの誕生の瞬間から移動・配置に至る全過程を、細胞レベルで把握する。固定標本における観察に基づいて描かれた古典的な概念図・模式図にとらわれず、スライス培養法を用いてライブの情報を蓄積し、「細胞系譜」、「細胞移動」、「細胞間相互作用」の各研究グループに対してリアルタイムで最新情報を提供する。細胞形態・細胞挙動に関するバイオインフォマティクスの発動源たることを目指す。具体的な研究対象としては、組織構築上、ニューロンの多層にわたる配置により高次の神経機能を担うことが知られている大脳新皮質および小脳皮質を選び、その秩序構造のなりたちを探る。方法として、現在は赤色あるいは緑色の蛍光色素またはタンパクを単独で用いて単一細胞の標識・観察を行なっているが、複数細胞に対して多色ラベルを施したスライスを観察することで複合的な情報獲得を目指す。また、現在保有する3次元培養技術そのものの改良によって培養可能期間の延長をはかるとともに、新たな培養法の開発を行ない、従来は研究の対象となり得なかった胎生早期における組織構築機構の解明を目指す。加えて、網膜の幹細胞およびニューロンの3次元的挙動についても解析を進める。

### 細胞移動研究グループ(大隅典子)

#### 神経前駆細胞と神経細胞の移動による脳構築プロセスの解析

##### 1) 神経幹細胞の細胞周期と核の移動の制御機構の解析

神経幹細胞として機能する神経上皮細胞の細胞周期と核のエレベーター運動は巧妙にcoordinateされており、幹細胞から適切な前駆細胞や神経細胞を生じるために重要な役割を果たしていると予想されるが、その制御機構はほとんどわかっていない。大隅グループが解析を続けてきたPax6突然変異では、神経上皮細胞の分裂周期に異常を生じ、非対称な分裂が野生型よりも増加する。また、細胞核のエレベーター運動と細胞周期のcoordinationに異常をきたすことも見いだしている。そこで、Pax6突然変異ラットなどの神経上皮の培養系において、分裂の様相やエレベーター

運動の様子をリアルタイムで解析することにより、細胞周期の制御と核の位置の移動の制御をコーディネートする分子機構を追求する。

## 2) 神経細胞の移動を制御する分子機構の解析

神経細胞は最終分裂した位置からかなり遠いところまで移動するものも多く、その様な神経細胞が基本的な神経構築に果たす役割は小さくない。大隅はこれまでに Pax6 変異ラットにおける嗅球形形成異常に、細胞非自律的な神経細胞移動の異常が関わることを見いだしている。また、すでに報告したように Pax6 変異ラット小脳顆粒細胞では細胞自律的な移動が阻害されている。そこで、Pax6 の下流因子を網羅的に探索することにより、このような細胞自律的・非自律的移動に関わる因子を同定し、その機能を確かめる。

## 細胞間相互作用研究グループ（瀬原淳子）

### 細胞間相互作用の研究

脳は神経とその機能を支える細胞集団、オリゴデンドロサイト・アストロサイトなどから成り立つ。神経発生の過程でも、生まれた神経の生存を支え、その遊走や軸索伸長の方向性を支配するのは、それら支持細胞集団のはたらきによる。脊椎動物の中枢神経系のような複雑な神経系では、その役割は特に重要であると考えられる。神経系の構築においては、まず神経細胞が分化し、この神経細胞が自分を支えるグリア細胞の生存・分化・遊走に関わるシグナルを出すことが知られている。当グループでは、ADAM ファミリーに属する膜型プロテアーゼ、メルトリン  $\beta$  遺伝子を単離し、このプロテアーゼが glial growth factor (別名 neuregulin) を切断し、膜型から可溶性分子に変換する活性を有することを明らかにしてきた。さらにメルトリン  $\beta$  遺伝子ノックアウトマウスの解析から、この遺伝子が、神経冠細胞の遊走や、神経の軸索伸長・束索化に関与することなどをこれまでに見出ししている。このプロテアーゼ制御系がシグナル分子の活性化を時間的・空間的制御に関わる可能性と、それによって神経細胞の極性あるいは遊走方向の決定・変換などへの関与を検討する。当グループでは、これら神経・グリア細胞間、非対称分裂によって生ずる神経系細胞間のシグナリング制御機構の解明を通じて、神経細胞の極性形成や tangential migration、組織形成の機構を追求してゆく。

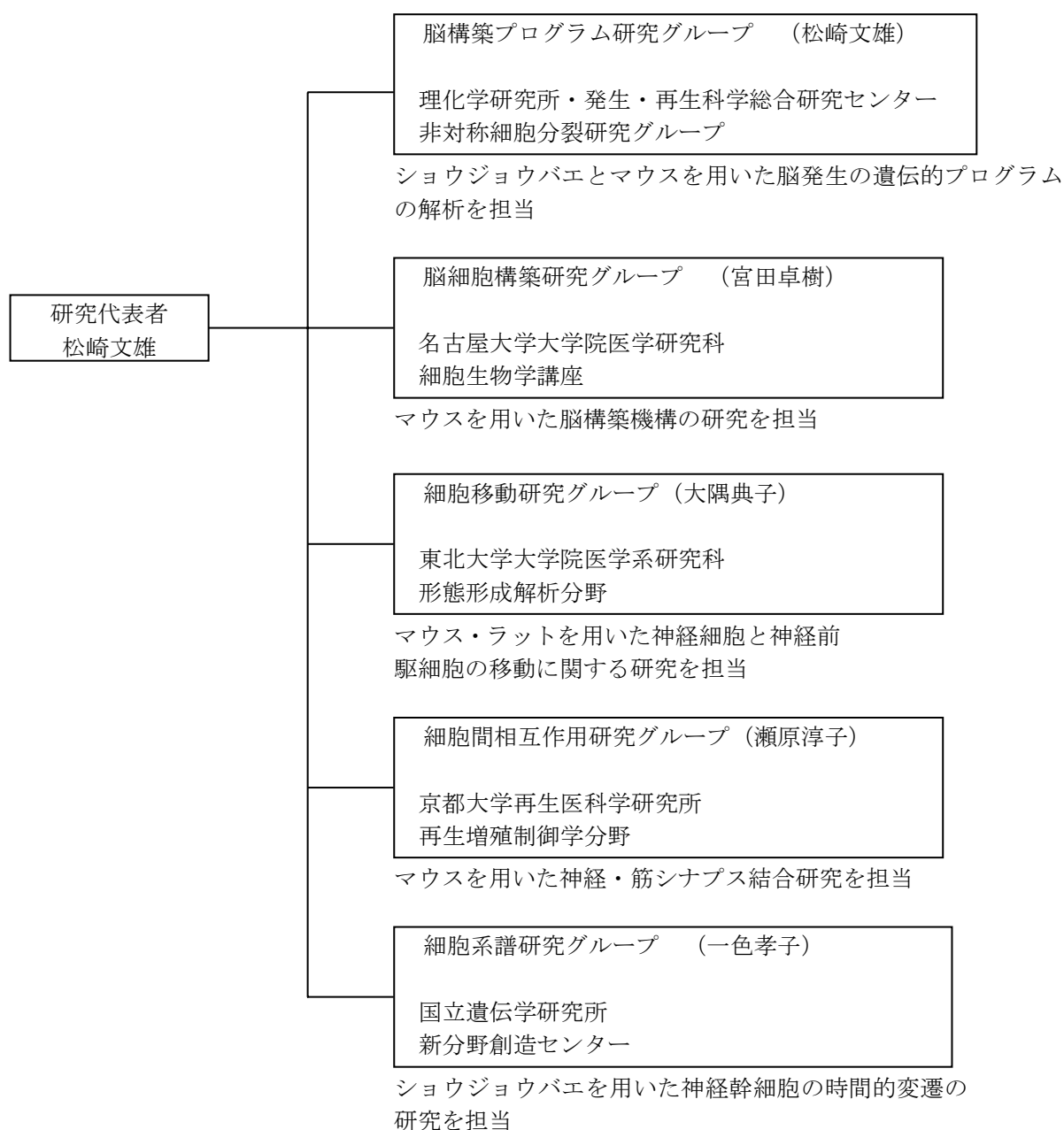
## 細胞系譜研究グループ（一色孝子）

### 神経幹細胞系譜形成の分子機構の解析

神経幹細胞の特性は、刻々と変化していく。このため、一個の神経幹細胞から順次異なる個性を持つ姉妹細胞が生じる。当グループは、ショウジョウバエ中枢神経系を実験系として、この神経幹細胞の時間的な変化によって細胞多様性が増幅される過程を探究する。ほぼ全てのショウジョウバエ神経幹細胞は、Hunchback、Krüppel、Pdm、Castor、Grainyhead という5種の転写因子のセットを順次発現し、その発現を分裂とカップルして自律的に切り替えていく。一方、姉妹前駆細胞は、幹細

胞から分裂する時にこれら転写因子の発現を受け継ぎ、そのまま維持する。こうして、姉妹前駆細胞は順次異なる個性を獲得する。この転写因子セットの発見によって、ショウジョウバエの系では、幹細胞系譜の形成がどのように刻々と進んでいくかという問題について、遺伝子レベルで取り組むことが可能となっている。しかしながら、転写因子セットの発現パターンを制御する分子機構はまだほとんどわかっていない。そこで、当グループは、各転写因子の発現を調節する遺伝子を、データベースの活用と遺伝学的スクリーニングの2つのゲノムワイドな方法を用いて探索し、それらの機能解析を行うことによって、この分子機構の解明を目指す。

## (2) 実施体制



### 3 研究実施内容及び成果

#### 3.1 脳構築の遺伝的プログラムの解析(理研 CDB 松崎グループ)

##### I) ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂と細胞極性制御

###### (1) 研究実施内容及び成果

正常な神経幹細胞は、ずっと小さな神経母細胞を細胞分裂によって一定の方向に放出し、その際、運命決定因子を非対称に分配する。ショウジョウバエの主要な染色体3本のうち、X染色体と第二染色体について、2002年までにはほぼ飽和する程度まで致死突然変異をスクリーニングした結果、非対称分裂に異常をきたす変異が多数の分離できた。そのなかで、

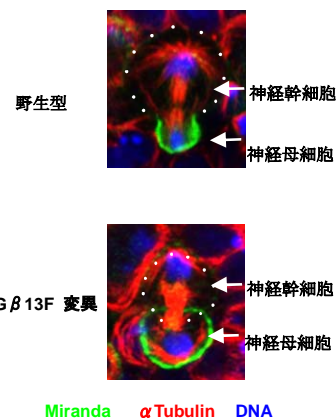
- 1) 運命決定因子の不等分配は正常であるが、娘細胞のサイズが等しい形態的等分裂を行う突然変異。
- 2) 神経幹細胞は正常な極性をもつが、分裂軸の方位がその極性と一致しない変異体。
- 3) 神経幹細胞は正常な非対称分裂を行うが、その方向がランダムになる変異
- 4) 運命決定因子の細胞内非対称局在に異常をきたす突然変異。

という4つの突然変異グループに注目して研究を進めた。

###### I-1) ショウジョウバエ神経幹細胞の形態的に非対称な細胞分裂のしくみ

一般に、細胞質分裂の際、収縮環の位置が分裂軸上で中央からずれることによって、娘細胞の大きさは非対称になる。収縮環の位置は、紡錘体の両極から伸びる微小管がオーバーラップする「midzone」によって規定される。ショウジョウバエの神経幹細胞が分裂する際、紡錘体自身が形態的に非対称性となり、さらに紡錘体が細胞の中心からずれることにより、収縮環が細胞の対称面からずれ、小さな神経母細胞を生じることが知られている。我々が分離した娘細胞のサイズが等しくなる二つの突然変異の原因遺伝子はそれぞれ3量体G蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットをコードするG $\beta$ 13F遺伝子とG $\gamma$ 1遺伝子であることが判明した。これらの遺伝子変異の解析から、G $\beta\gamma$ の関与するG蛋白質シグナルが紡錘体の大きさ、非対称性を制御し、その結果、娘細胞にサイズの非対称性が生じることが明らかになった(Fuse *et al.* Curr. Biol. 2003, Izumi *et al.* JCB 2004)。

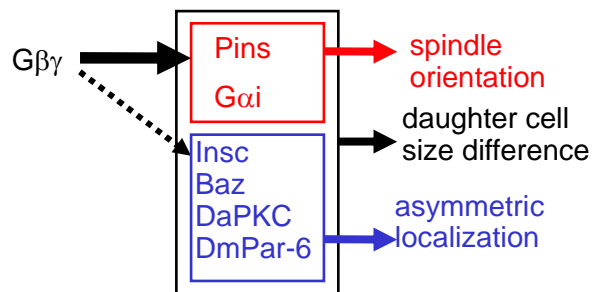
これらの突然変異の解析から、神経幹細胞の性質を維持するためには、連続した分裂による神経幹細胞の体積の減少を小さな神経前駆細胞を生じることで最小限にとどめることが重要であることが



示唆された (Fuse *et al.* Curr. Biol. 2003)。

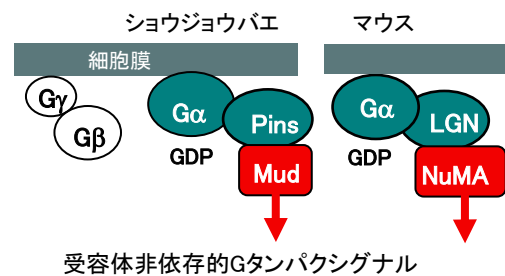
### I-2) ショウジョウバエ神経幹細胞の細胞極性を制御するシグナル伝達系の役割

神経幹細胞では、二つの細胞内シグナル伝達系—aPKC-Par3-Par6 複合体および受容体非依存的 G $\alpha$ i-Pins 複合体—が apical 側に局在し、細胞極性を制御していることが知られている。娘細胞のサイズの非対称性についても、両者が平行して機能することが最近明らかにされた。この二つの apical シグナル伝達系と G $\beta\gamma$  シグナルの関係性を分析したところ、G $\beta\gamma$  変異体では、G $\alpha$ i-Pins の局在は完全に非対称性を失い、aPKC-Par3-Par6 複合体も細胞表層のかなり広範囲に分布するようになることが判明した。このことから、G $\beta\gamma$  は二つの極性シグナルの上位に位置すると推定される。これらの変異体の詳細な解析から、aPKC-Par3-Par6 複合体が運命決定因子の局在を制御する主要なシグナル系であり、他方、G $\alpha$ i-Pins が分裂軸の方位の決定に必須であることが明らかになった。すなわち、aPKC-Par3-Par6 と G $\alpha$ i-Pins という二つの apical シグナル系は互いに協調しながらも機能を分担していることが示された (Izumi *et al.* JCB 2004)。



### I-3) 対称分裂と非対称分裂において分裂軸を定位する因子の同定

極性細胞が非対称分裂するには、単に運命決定因子が非対称局在するだけでは不十分である。分裂方向がその局在と一致して初めて一方の姉妹細胞に分配され、2つの異なる細胞が生み出される。そこで、紡錘体方位を制御する G $\alpha$ i-Pins の作用機序を解明するため、G $\alpha$ i-Pins 複合体に相互作用する因子の探索を行った。その結果、Mushroom body defect (Mud) 遺伝子にコードされ、coiled-coil 構造を持つ Mud 蛋白質を同定した。突然変異スクリーニングで「分裂軸の方位が細胞極性と一致しない突然変異」が同定されていたが、Mud 遺伝子変異を取り寄せ、相補性テストを行ったところ、その変異も mud 遺伝子の変異であることが判明した。mud 遺伝子の変異は、脳構造の異常を引き起こす事が知られていたが、その分子機能については不明であった。Mushroom body defect (Mud) という遺伝子の変異 Mud は神経幹細胞で G $\alpha$ i-Pins 依存的な apical 側細胞膜表層への局在を示すと同時に、中心体周囲への局在も示した。mud 変異体の神経幹細胞では、運命決定因子の局在に対する分裂方向が異常になることなどから、G $\alpha$ i-Pins は Mud を介して紡錘体に作用し、分裂方向を規定している事が示された (Izumi *et al.* Nat Cell Biol. 2006)。一方、神経幹細胞とは異なり均等 (対称) に分





裂する胚上皮細胞でも、Mud がその分裂方向の制御に関与する事より、Gai-Pins そして Mud による分裂方向の規定は細胞種を問わない普遍的なシステムである事が示唆された。この Gai-Pins-Mud シグナルは、現在のところ細胞膜上の受容体の刺激に依存しない考えられている。脊椎動物では Gai と Pins の相同蛋白質 LGN が、Mud の相同蛋白質と考えられている NuMA と協調して、紡錘体の動きを制御している事が示されており、このシステムが進化的に保存された機構である事を提唱した (Izumi *et al.* Nat Cell Biol. 2006)。

#### I-4) 神経幹細胞の自己複製機構の解析

##### <目的>

神経幹細胞の非対称分裂には二つの側面があり、発生運命決定因子の分配の非対称性と娘細胞のサイズの非対称性である。分裂中の神経幹細胞の basal 側には発生運命決定因子、Prospero とそのアダプタープロテイン、Miranda が局在し、それらは神経前駆細胞に分配されるが、神経幹細胞には分配されない。また、神経前駆細胞のサイズは神経前駆細胞に比べて小さい(第一分裂の後の直径比は 30-40%)。神経幹細胞の非対称性に関わる遺伝子の中で、discs large は発生運命決定因子の局在化に、G  $\beta$  13F は娘細胞の大きさの非対称性に関わる遺伝子である。我々はこれらの遺伝子の二重変異体を作成し、神経幹細胞の非対称性がどのように分化と自己複製に寄与しているかを調べた。*dlg G $\beta$*  変異体においては、神経幹細胞は等分裂を行い、細胞の大きさと発生運命決定因子の分配に関して等価な二つの娘細胞を生じた。この娘細胞が幹細胞性を保ち分裂を続けるのか、神経前駆細胞のように分化してしまうのか、また、その選択は発生過程に依存するのかわかを調べた。

##### <研究成果>

ショウジョウバエ神経幹細胞は非対称分裂を繰り返し、basal 側に神経前駆細胞とニューロンが形成されるため、胚生期中枢神経は層構造を示す。apical 側に発生過程を通して神経幹細胞が存在し、それより basal 側にニューロンが蓄積される。*dlg G $\beta$*  変異体では、このような層構造は見られなかった。胚発生初期において多くの細胞が神経幹細胞のマーカである Miranda を発現していた。その後、神経前駆細胞のマーカである Prospero を共に発現している細胞が増加し、後期においては、Miranda を発現している細胞は著しく減少し、ニューロンのマーカである Elav を発現している細胞が多数を占めた。野生型と *dlg G $\beta$*  変異体においても、Miranda を発現している細胞は、分裂中の細胞のマーカである CycE を発現していた。これらの結果から、等分裂する神経幹細胞は、分裂直後は神経幹細胞と神経前駆細胞の両方の性格を有し分裂を続けるが、徐々に幹細胞性を失い、最終的にニューロンに分化するものと推測される。

この推測が事実であるとすれば、*dlg G $\beta$*  変異体において、等分裂の結果生じた一つの神経幹細胞由来の細胞群は同時期にニューロンに分化し、均一であることが予想される。神経幹細胞は、複

数の転写因子(Hunchback, Krüppel, Pdm, Caster, Grainy head)を連続して発現することが知られている。神経前駆細胞とニューロンはその親である神経幹細胞が発現していた転写因子を発現するので、これらの転写因子はニューロンが形成された順序の目印として使うことができる。例えば、初期に形成されたニューロンはHunchbackを発現するが、後期に形成されたニューロンはCasterを発現する。野生型神経幹細胞 3-3 は、転写因子を Krüppel-Pdm/Caster-Caster-Caster-Grainy head-?-Caster-Caster-?の順序で発現し、その結果形成される EL ニューロンの 10-9 個中、5 個のニューロンのみが Caster を発現している。*dlg Gβ* 変異体においては、神経幹細胞 3-3 由来の全てのニューロンが Caster を発現していた。この結果より、一つの神経幹細胞由来の神経細胞は転写因子の発現パターンにおいて、均一であることがわかった。

次に幼虫期における *dlg Gβ* 変異体神経幹細胞の表現型を調べた。*Gβ*、*dlg Gβ* 変異体は胚生致死であるので、孵化直後にクローンを作り、その表現型を観察した。野生型クローンにおいて、一つの Miranda を発現している大きな細胞、神経幹細胞と、Miranda と Prospero を発現している複数の小さな細胞、神経前駆細胞と、Prospero と Elav を発現している多数の細胞、ニューロンが存在した。*dlg* 変異クローンは野生型のそれと著しい違いはなかった。*Gβ* 変異クローンは、クローンサイズが減少し、Miranda を発現している小さな細胞と 10 個程度のニューロンが存在した。この結果は、神経幹細胞が二つの娘細胞のサイズが等しくなるような分裂を繰り返した結果、神経幹細胞のサイズが急激に減少したため、細胞周期が伸び、増殖が低下したことを示す。一方、*dlg Gβ* 変異クローンでは、クローンサイズが増加し、ほとんど全ての細胞が Miranda を発現していた。この結果から、幼虫において等分裂する神経幹細胞は分化することなく、過増殖することが分かった。

*dlg Gβ* 変異クローンにおいて、Prospero を過剰発現させると過増殖は抑制され、全ての細胞はニューロンに分化し、クローンサイズも減少した。しかし、野生型クローンにおいて同様に Prospero を過剰発現させたが、変化はみられず、神経幹細胞では、核に局在する Prospero を検出することはできなかった。一方、野生型胚で Prospero を過剰発現させると神経幹細胞において Prospero の核局在が容易に観察された。これらの結果から、幼虫期の神経幹細胞では、Prospero の核移行を阻害する機構の働きが胚発生期の神経幹細胞に比べて高く、神経幹細胞の増殖活性に大きく寄与しているという可能性が浮かび上がった。幼虫期では、胚発生期と異なり、*dlg Gβ* 変異クローンにおいてもその活性は高く、Prospero の核移行を抑制することで過増殖が引き起こされるものと考えられる(以上、北島と布施ら、投稿準備中)。

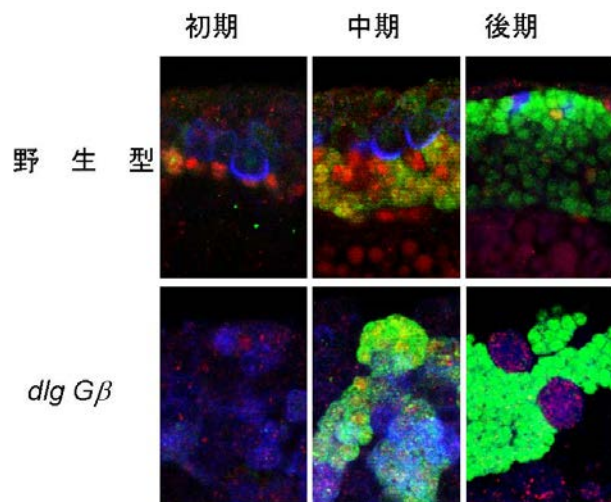


図1. 野生型と変異体における胚生期中枢神経系の発生過程

*dlG Gβ* 変異体において、神経幹細胞は等分裂の結果、神経幹細胞と神経前駆細胞の両方の性格をもつが、徐々に幹細胞性を失い、最終的にニューロンに分化した。

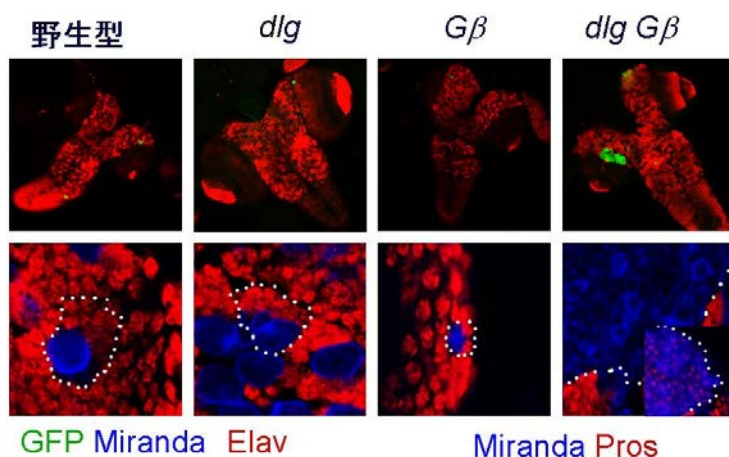


図2. 幼虫期におけるクローンの表現系

クローンは GFP でラベルされている。点線はクローンを示す。*Gβ* 変異クローンはサイズが減少した。*dlG Gβ* 変異クローンはサイズが増加し、ほとんどすべての細胞が Miranda を発現しており、ニューロンに分化した細胞はわずかだった。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

### 神経幹細胞の細胞極性と分裂軸の共役

細胞極性は、細胞内で局所的な変化を生み出す事により個々の細胞の多様性を生み出すが、幹細胞の多くもこのシステムを利用し分化細胞を生み出すと考えられている。近年になって、細胞極性の基本的な機構が共通の分子群によって制御されている事が明らかになり、その知見の中心となったショウジョウバエ神経幹細胞、線虫初期胚のシステムがそのモデルシステムとして、重要な位置を占めるに至った。PAR3-aPKC 複合体は、ショウジョウバエ神経幹細胞において細胞運命決定因子の局在に関わっており、細胞膜表層の極性を制御する中心的な因子である事が解明された。また、三量体 G 蛋白質は以前より、細胞膜レセプターにより活性化し様々な細胞内シグナル伝達機構に関わっている事が示されていたが、神経幹細胞を用いた解析により、 $G\beta\gamma$  は姉妹細胞のサイズの非対称性を制御すること、 $G\alpha i$  およびその GDP 解離抑制因子(GDI)である Pins は、Mud と活性複合体

を構成し、紡錘体の方向を制御することが我々の研究によって明らかになった。Gai-Pins-Mud 複合体による細胞極性軸に対する紡錘体方位の制御は、細胞運命決定因子の選択的分配に必須の過程であり、非対称分裂の典型的なモデルとなるに至った。細胞が移動や分裂する際、微小管のプラス端が細胞膜側のタンパク質と結合してその方向性を決めるメカニズムをサーチ&キャプチャーシステムと呼ぶが、Gai-Pins-Mud 複合体による紡錘体の方位制御は、細胞分裂時におけるサーチ&キャプチャーの中心的なメカニズムであると考えられる。

この様に、ショウジョウバエの神経幹細胞を用いた分子遺伝学的解析は、細胞極性及び非対称分裂の普遍的メカニズムの解明に大きく貢献してきたが、今後も、aPKC シグナルによる極性メカニズム、三量体 G 蛋白質シグナルによる紡錘体方位の制御機構の理解に貢献することが期待され、非対称分裂の標準モデルとみなされるショウジョウバエ神経幹細胞は、生物種を問わない普遍的な分子機構モデルの構築に貢献すると期待される。

### 神経幹細胞の自己複製機構

本研究から、等分裂する神経幹細胞は、発生段階に依存して異なる運命をたどることが判明した。つまり、幹細胞を増殖期にみられるような状態に変異させても、過増殖の表現型を示すか否かは、その幹細胞が置かれた環境に依存することが分かった。増殖を制御する機構には、癌抑制遺伝子として働く Prospero の活性調節が重要であると考えられる。Prospero を過剰発現させた結果からは、その制御が胚生期と幼虫期とで異なることが推察された。今後は、Prospero の活性制御を担う機構の解析が研究を進める上での一つの焦点となると考えられる。

## II) マウス神経発生における神経幹細胞から神経細胞の産生されるしくみ

### (1) 研究実施内容及び成果

#### II-1) 神経幹細胞から神経細胞の形成過程における細胞分裂軸制御の役割

##### <目的>

異なる二つの娘細胞を生じる非対称分裂は、細胞分裂を繰り返しながら多様な細胞を生じる個体発生にとって基本的なプロセスである。非対称な分裂では、分裂する細胞内あるいは細胞外の非対称性に基づいて娘細胞に違いが生じるが、いずれの場合も分裂軸の方向はその非対称性に一致するよう厳密に制御される。哺乳類大脳皮質においても神経上皮細胞が神経幹細胞として働き、神経細胞を生じるが、それが非対称分裂によるのかどうか、もしそうであるとすると、極性細胞の非対称分裂の一般的な様式に基づいているのか、いまだ不明である。本研究では、ショウジョウバエ神経幹細胞の研究から明らかにされた三量体 G 蛋白質経路(GaiとPins)による細胞分裂軸制御の知見を基礎に、哺乳類神経幹細胞の分裂軸制御と細胞分化の関係を明らかにすることを目的としている。

##### <研究成果>

#### a) 哺乳類大脳神経前駆細胞における細胞分裂軸制御と神経分化の関連性

1995年に Stanford 大学の Susan McConnell らのグループから、フェット大脳神経前駆細胞における細胞分裂軸制御と神経分化の関連性を示唆する研究が報告された。このモデルでは、神経前駆細胞の分裂軸が脳室面に対して水平方向から垂直方向に変化する事により、その運命決定様式が対称から非対称へと変化するというものである。このモデルはショウジョウバエ神経幹細胞における非対称分裂制御機構と良く一致する。しかしながらこの報告の後、様々なグループからこのモデルと合致もしくは矛盾するデータが多数報告され、哺乳類神経前駆細胞における分裂軸制御と神経分化の関連性の真相は依然謎のままであった。そこで、野生型マウス胎児脳における神経前駆細胞の細胞分裂軸を、固定組織切片に対する免疫染色及び HistoneH2B-EGFP を発現させた脳スライスを用いたタイムラプス観察により詳細に検討した。その結果、どちらの方法を用いた場合も 90% 以上の神経前駆細胞においてその分裂軸は脳室面に対して水平方向であった(図 II-1.1)。また、この水平方向分裂は発生の時期に関係なく、神経細胞が盛んに生み出される時期においても同様であった。これらの結果は、分裂軸を水平方向に維持することが正常な神経分化に重要であり、さらに分裂軸を制御する何らかの分子機構が存在することを強く示唆していた。

#### b) 細胞分裂軸制御における LGN の役割

細胞分裂軸を制御する分子機構はショウジョウバエ中枢神経系幹細胞での解析が進んでおり、細胞外シグナルに依存しない3量体 G 蛋白質 Gai/Pins 複合体が細胞の分裂軸の方向を制御することが知られている。哺乳類では現在までに LGN と AGS3 という二つの Pins ホモログ分子が報告されている。そこで胎生期マウス脳における LGN 及び AGS3 遺伝子の発現を検討したところ、神経上皮細胞層において LGN 遺伝子の強い発現が認められた。そこで LGN に対する siRNA をマウス胎児脳に導入してその発現をノックダウンすることにより、マウス神経前駆細胞における LGN 遺伝子の分裂軸制御に対する役割を検討した。その結果、コントロール siRNA を用いた対照群では、80% 以上の神経前駆細胞が神経上皮層の apical 面に対して水平に分裂していたのに対して、LGN 遺伝子をノックダウンした神経前駆細胞では、その分裂方向がランダム化していた(図 II-1.2)。以上の結果から、LGN が哺乳類神経前駆細胞における分裂軸の制御に重要な役割を担っていることが示された。

#### c) 強制的分裂軸改変を利用した細胞極性と神経分化の関連性の検討

水平方向に保たれている神経前駆細胞の分裂軸を Inscuteable と呼ばれる分子の機能を利用して強制的に改変させた場合の細胞運命を追跡することで、apico-basal 極性の神経分化における役割を検討した。Inscuteable はショウジョウバエ中枢神経系幹細胞において細胞分裂軸を apico-basal 方向に維持するために必須の分子である。そこでマウス Inscuteable をクローニングし、子宮内電気穿孔法によりマウス胎児脳へ発現させてその効果を検討した。その結果、Inscuteable を発現させたマウス神経上皮細胞の 60% 以上が垂直方向分裂へと変化した(図 II-1.3)。この縦分裂により生み出された二つの娘細胞のうち、basal 側に位置する細胞(basal 娘細胞)は basal process を含む basal 画分のみを、apical 側に位置する娘細胞(apical 娘細胞)は apical junction を含む apical 画分のみを

引き継ぐ。そこでこれら娘細胞の細胞運命をタイムラプス観察することにより、apico-basal 極性の神経分化における役割を検討した。その結果、80%以上の basal 娘細胞は basal progenitor もしくは神経細胞へと分化し、神経上皮細胞になるものの割合は低く10%強であった。一方、apical 娘細胞に関しては80%以上の細胞が神経細胞へと分化し、basal 娘細胞の場合と同様に神経上皮細胞になるものの割合は非常に低く3%程度であった。これらの結果は、娘細胞が分裂能を獲得するために必要な何らかの機構が、神経上皮細胞の basal 画分に存在していることを示唆している。また、分裂により生み出された娘細胞が神経上皮細胞層にとどまり再び神経上皮細胞になるためには、分裂時に apical 画分を引き継ぐことが必要不可欠であると考えられた。以上の結果から、神経上皮細胞がその性質を維持するためには、apical 画分と basal 画分の両方を引き継ぐことが必須であることが示された。以上の成果は、Konno, Shioi, Shitamukai, *et al.*として投稿中である。

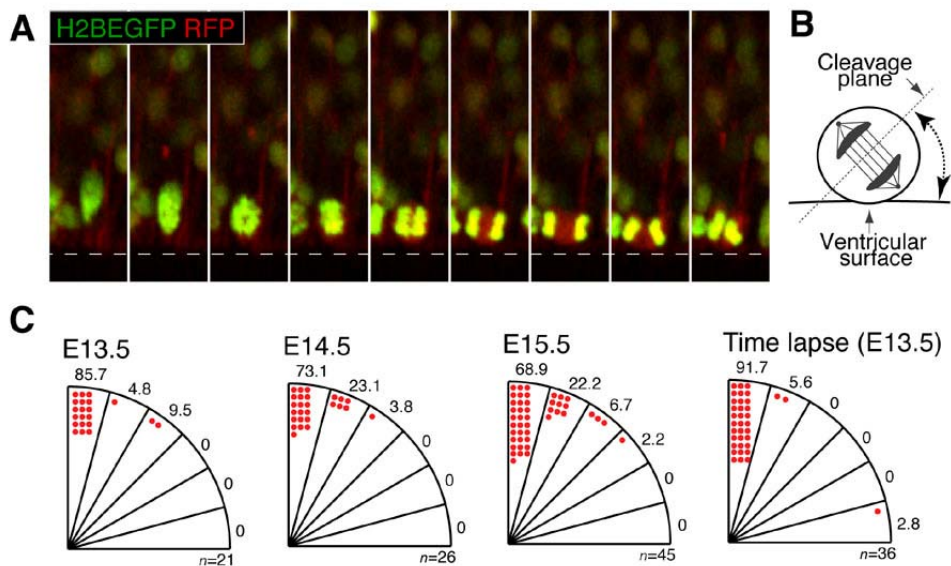


図 11-1.1

(A) 胎児脳スライス培養を用いた分裂神経上皮細胞のタイムラプス観察。HistoneH2B-EGFP (緑) 及び mRFP (赤) を発現させることにより分裂細胞の分裂軸を可視化している。(B) 分裂細胞における分裂溝と脳室面との角度の測定。(C) 各発生時期における分裂軸の変化。異なった発生時期においても分裂軸に大きな変化は認められない。

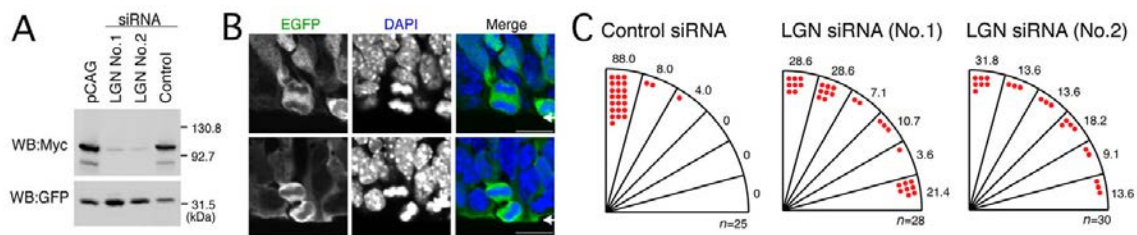


図 11-1.2

(A) COS7 細胞に発現させた LGN に対する siRNA による発現抑制。(B) 子宮内穿孔法により LGN-siRNA 及び EGFP 発現ベクターを導入した神経前駆細胞の分裂像。EGFP が発現している細胞において、野生型では認められない斜め方向及び縦方向の分裂が認められる。(C) LGN-siRNA 導入による分裂軸に対する影響を示すグラフ。異なった二つの siRNA において同様の効果が認められる。

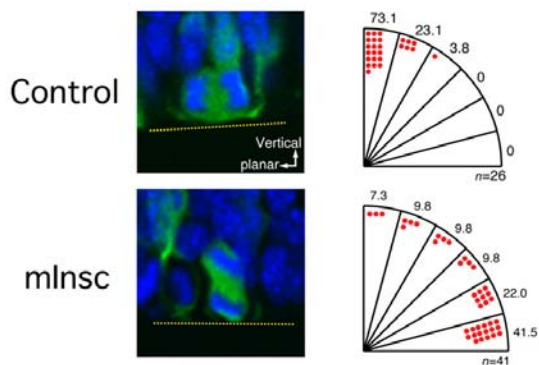


図 11-1.3

子宮内穿孔法により EGFP のみ (Control) もしくは EGFP とマウス *Inscuteable* (mInsc) を発現させた神経前駆細胞の分裂像。EGFP が発現している細胞において、野生型では認められない縦方向の分裂が認められる。

## II-2) Pins ホモログ LGN ノックアウトマウスの作製とその解析

### <目的>

マウス前脳の胚発生期には、2種類の神経前駆細胞が存在することが知られている。一方は apical neural progenitor cell であり、もう一方は basal neural progenitor cell である。apical neural progenitor は ventricular zone に存在し、幾度か分裂してそれ自身以外に、neuron や basal neural progenitor を生じる。一方、basal neural progenitor は subventricular zone で1回だけ分裂し2個の神経細胞を生じる。そういう点で、basal neural progenitor はショウジョウバエに存在する神経母細胞に似ている。従って、マウス神経発生とショウジョウバエ神経は、発現遺伝子だけではなく、前駆細胞の性質についても類似点が見られる。マウス神経前駆細胞からこれらの分化細胞が生じるメカニズムを明らかにするアプローチのひとつとして、我々は、ショウジョウバエの神経前駆細胞の非対称分裂で分裂軸の制御に重要な役割を果たしている GoLoco 蛋白 Pins の相同遺伝子 LGN に注目した。本研究では、LGN 蛋白質の発現様式を明らかにするとともに、ノックアウトマウスを作成し表現型の解析を行った。

## <研究成果>

発現様式の解析は mRNA と蛋白質の両方で行った。*in situ* ハイブリダイゼーションにより、LGN mRNA が神経前駆細胞で形成される ventricular zone に強く発現していることが明らかになった。LGN に対する抗体を作成、染色を行ったところ、分裂期の神経前駆細胞に強いシグナルが確認された。特に、lateral cell cortex に強く局在しているのが認められた。この局在は、LGN が神経前駆細胞の分裂軸を制御していることを想像させるものであった。

我々は LGN が機能するのに重要なドメインである GoLoco motif を欠損させたノックアウトマウス (LGN-KO) を作成した。変異の様式から、LGN-KO はシビアな hypomorph か null であることが予想された。我々は LGN-KO の胎仔を対象にして、神経発生に対してどのような異常を示すか解析を行った。野生型では、ほとんどの apical progenitor は ventricular surface に対して平行に分裂する。しかし LGN-KO ではその分裂方向がランダムになっていた(図 II-2.1)。野生型では滅多に観察されない分裂角度を示す progenitor cell が数多く観察された。また、LGN-KO では ventricular zone の厚みが早いステージから薄くなり、apical progenitor を正常に維持できなくなっていた。それに対応するように、progenitor cell が intermediate zone などに異所的に散在するのが観察されたりした(図 II-2.2)。これらの異所的に散在した progenitor cell は basal progenitor のマーカーである Tbr2 を発現する細胞を含むものの、ほとんどの細胞が apical progenitor のマーカーである Pax6 を強く発現しており、basal progenitor とは異なる性質を保持していた。これらのことから、異所的に散在した progenitor cell は、apical progenitor の分裂軸がランダムになったため、apical 面を保持できなくなった娘細胞が apical progenitor になれずに、basal 側に異所的に位置するようになった細胞であることが推測された。上記のように progenitor cell に異常が観察されたので、それから生じてくる神経細胞に異常がないか解析を行った。胎仔期に24時間以内に生じる神経細胞の産生頻度や、神経細胞で形成される cortical plate の形態を生後の時期に調べたが、いずれにも大きな異常は認められなかった。このことは、LGN-KO では progenitor cell に生じた異常が神経細胞の産生には大きな影響を与えていないことを示唆している。おそらく、分裂方向が異常になった progenitor cell や異所的に散在するようになった progenitor cell からも神経細胞が正常に産生されていると考えられる。

上記の表現型より、LGN は apical progenitor の分裂軸制御に必須であること、apical progenitor を維持するのに必要であることから、正常な発生に重要な役割を担っていることが明らかになった。神経細胞の産生頻度には異常は認められなかったが、生じた神経細胞の性質や機能に異常があるかどうかはノックアウトマウスの行動解析などさらに詳細に解析することで明らかになるだろう。以上の成果は、理研 CDB 変異マウスチーム、名古屋大学宮田卓樹氏との共同研究であり、Konno, Shioi, Shitamukai et al. (最初の二人は co-first authors) として論文投稿中である。



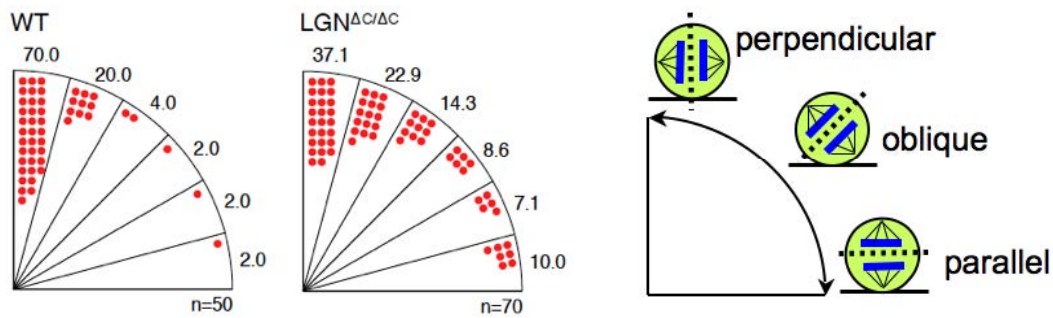


図 11-2.1 apical progenitor の分裂方向を示した図。LGN-KO では WT ではめったに観察されない分裂角度が高頻度で観察されることがわかる。

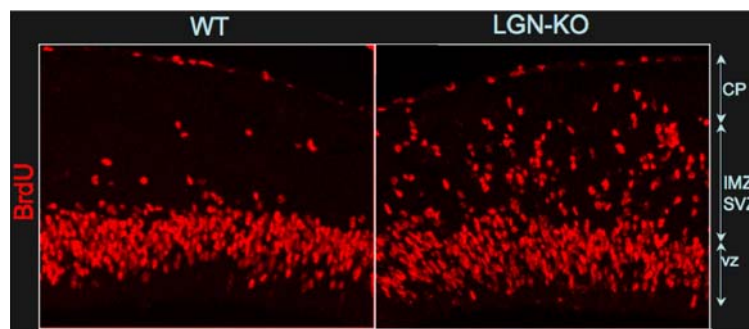


図 11-2.2 固定 30 分前に BrdU を取り込ませて S 期の細胞をラベルした。LGN-KO では BrdU でラベルされた progenitor cell の一部が散在していることがわかる。

### II-3) 分裂時におけるマウス神経上皮細胞の細胞構造のダイナミクスの解析

#### <目的>

ほ乳類の脳神経発生は apico-basal の極性をもった神経上皮細胞にて行われる。これら神経上皮細胞は、細胞分裂により、自己複製を行いながら、神経やより分化した前駆細胞といった異なる細胞を生み出す。これまで、ショウジョウバエと同様に、ほ乳動物でも apico-basal の極性に沿って運命決定因子が局在し、その非対称な分配によって娘細胞が異なる運命を獲得すると考えられてきた。しかし、ショウジョウバエホモログ分子がほ乳類脳細胞の運命決定に果たす役割は不明確であり、コンセンサスは得られていない。なによりも、神経上皮細胞の分裂時に、細胞因子の局在に必要とされる apico-basal の極性に基ついた細胞構造がどのように分配されるのか、未だ正確な知見がなく、apico-basal の極性が細胞運命の決定にどのように関与するかは不明である。

本研究では、細胞運命を決定する構造的基盤として、apical process および basal process をはじめとした神経上皮細胞の細胞構造が運命の決定に果たす役割を明らかにしようと試みた。

#### <研究成果>

まず、上皮構造を保ったままライブ観察が可能な脳スライス培養を用いて、apical junction と中心体を蛍光タンパクでラベルし、脳室の表面から観察ことにより神経上皮細胞の分裂時に apical 面を

どのように引き継ぐかを観察する系を確立した。

この観察により、神経発生が盛んに起きている胎生14日目の脳においても、apical 面の分配は分裂の方向に依存しているが、基本的に両方の細胞に分配されることが分かった。また、娘細胞間で分裂時の apical 面の面積の分配比率も極端に差は無かった。これらのことは神経の分化、未分化は apical 領域に運命を決定するような因子が存在し、それを受け継ぐ、受け継がないで決定されているという従来考えられていたモデルの一つを強く否定する証拠と考えられる。また、apical 面を失った細胞は速やかに VZ から排出されることから、apical 面の受け継ぐことは apical progenitor を VZ 内に維持するのに重要であることが示唆される。

更に apical junction の形成に重要な aPKC/PAR complex の構成因子である aPKC キナーゼの恒常的活性型に膜移行シグナルを付加した分子を in utero エレクトロポレーションを用いて発生中の脳に導入することにより、全体の apico-basal の極性を保ったまま、一部の細胞の apical junction を破壊することに成功した。これを tool として用いて、神経上皮の構造が神経分化にどのような影響を与えているのかを解析した。

その結果、junction を失った細胞は、速やかに VZ から排出され、SVZ や IMZ に移動することが観察された。移動した細胞の性質を神経分化に伴って発現する転写因子の染色により調べたところ、apical progenitor としての性質を維持できず、細胞周期も脱出していく傾向にあることが分かった。また、これらの分化の促進は、恒常的に活性型の Notch1 を発現させることにより抑制されることから、これらの細胞は未分化を維持するための Notch のシグナルを受け取ることができなくなっていると考えられた。

実際に、Notch のリガンドである Dll1 を発現する細胞は VZ 内の apical 側に層状に局在していることから、apical junction を失い、強制的に VZ から排除された細胞は Delta を発現している細胞から空間的に隔絶されることにより未分化を維持できなくなったと考えられる。

これらの結果は、apico-basal の極性は、未分化を維持するためのシグナル発する細胞と、それを受け取る細胞を空間的に閉じこめることにより、progenitor の維持を適切に行い、また、そこから脱出する細胞の分化を速やかに促進する事を保証する役割があると推察される(図参照)。

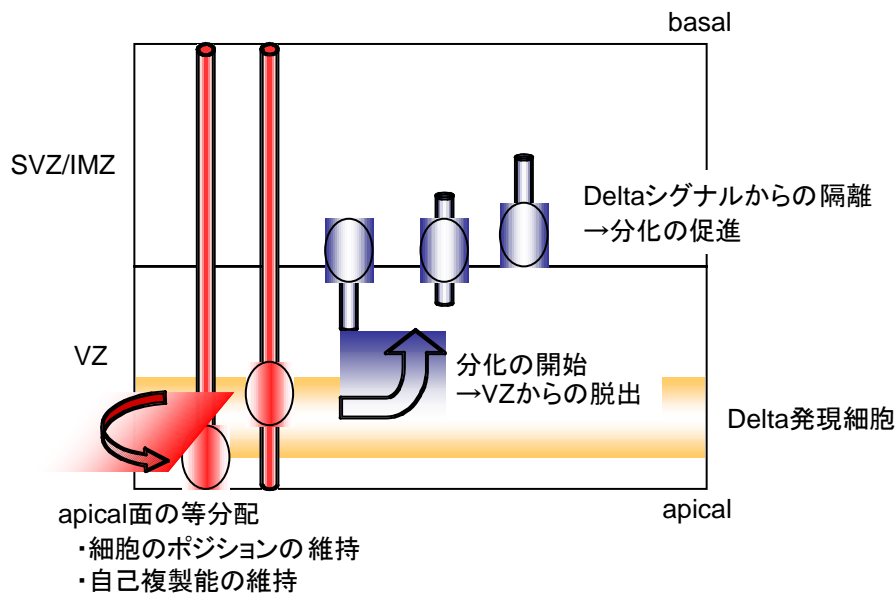


図 マウス発生脳における分化・未分化の空間的な制御

#### II-4) 胎生期脳の神経上皮組織における細胞周期に依存した細胞内核運動の研究

##### <目的>

哺乳類の脳の発生過程で、中枢神経系の神経細胞は、神経管を縁取る脳室帯に存在する「神経上皮細胞」から生み出される。神経上皮細胞は細胞分裂を経て「自己複製的増殖」、さらには「神経細胞への分化」という発生学上の運命をたどる。単純な神経管から複雑な脳が形成していく過程では、空間的、時間的な秩序を伴った神経上皮細胞の増殖・分化が必須であり、これら一連の「神経発生の原理」を解明することは、「脳の構築」を知る際の根幹となる。

神経上皮細胞から神経細胞が産生される際に、二種類の細胞分裂様式の存在が知られている。一つの「神経上皮細胞」から、「神経上皮細胞」「神経細胞」を一つずつ産生する「非対称的・幹細胞的神経発生分裂」と、一度の分裂で二つの「神経細胞」を生む「対称的・分化特異的分裂」である。両者の大きな違いは、組織内で細胞分裂が起こる場所である。前者の幹細胞的分裂は脳室帯表層で見られる事に対し、後者の分化特異的分裂は脳室帯よりさらに基底膜側で起こる。すなわち、神経上皮細胞の分裂位置は細胞運命決定と深く関わると考えられ、分裂細胞の局在メカニズムを知ること、は、「神経発生の原理」を解明する上で重要である。

「エレベーター運動」と呼ばれる細胞核運動(図 II-4.1)の理解は、その鍵といえる。神経上皮細胞の幹細胞的分裂は脳室帯表層で起こるが、その細胞核は「細胞周期」に伴って、組織内を往復運動する。脳室帯表層で細胞分裂期(M期)が起こり、その後のG1期では、基底膜側に細胞核が移行する。DNA合成期であるS期に核は脳室帯基底膜側に局在し、その後のG2期間に細胞核は再び基底膜側から表層側に逆方向に移行する。「エレベーター運動」は1935年 Sauer によりその概念

が提唱され、1960年代に藤田らにより実験的に証明された。この細胞核運動に関与する分子として、アクチン、微小管、モーター蛋白質などが報告されているが、その最大の特徴である「細胞周期に従った核移行」という点で、未だ本質的な機構の解明がなされていない。本研究では、胎生期の脳構築における神経発生の仕組みを知る上で重要な、「エレベーター運動」メカニズムの細胞生物学的解明を研究目的とする。

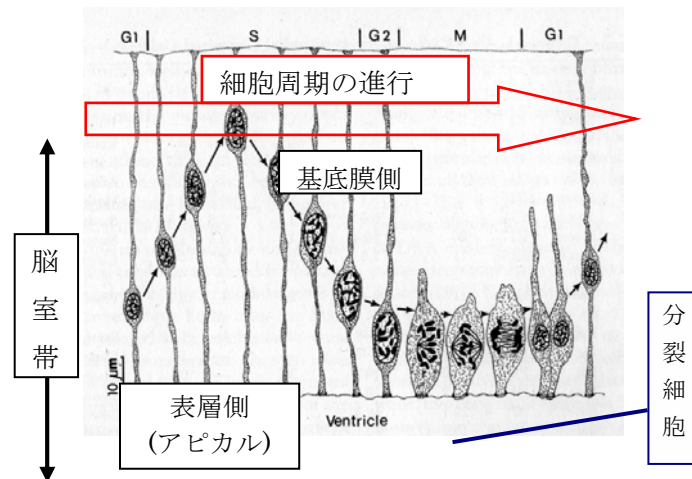


図 II-4.1 神経上皮細胞のエレベーター運動  
細胞周期 (G1→S→G2→M) の進行に従って、細胞核は脳室帯内で上下運動を行う。

#### <研究成果>

細胞核の S→G2→M 期の基底膜→表層方向への移動には、細胞骨格系のうち、微小管・中心体に関わることが近年報告されている (Tsai et al., 2005; Tamai et al., 2007; Xie et al., 2007)。我々は、エレベーター運動を理解するための予備的実験として、微小管細胞骨格が神経上皮細胞の核移動に果たす役割の検討を、発生中の脳組織において行った。具体的には、マウス胎児の頭部を培養液中で数時間培養し、微小管を脱重合する薬剤であるノコダゾール添加の有無を行ったサンプルにおける細胞核の位置を、培養後の組織免疫染色により検討した。(図 II-4.2)。コントロールでは、細胞分裂(M)期のマーカーである抗リン酸化ヒストン H3 抗体でラベルされた細胞核は脳室帯の「表層側」に観察され、DNA 合成期を示す BrdU (30 分間ラベル) の取り込まれた細胞核は脳室帯「基底膜側」に集積した(図2, 上)。2時間のノコダゾール添加により、抗リン酸化ヒストン H3 抗体でラベルされた細胞核(=細胞分裂期)は脳室帯に散らばる形での局在が観察され、BrdU (30 分間) 陽性細胞体(=DNA 合成期)との位置関係に異常が見られた。すなわち、ノコダゾール処理による微小管脱重合により、細胞核運動に影響をもたらすことから、エレベーター運動に微小管細胞骨格系が関与していることが確認された。この研究は小曾戸による。

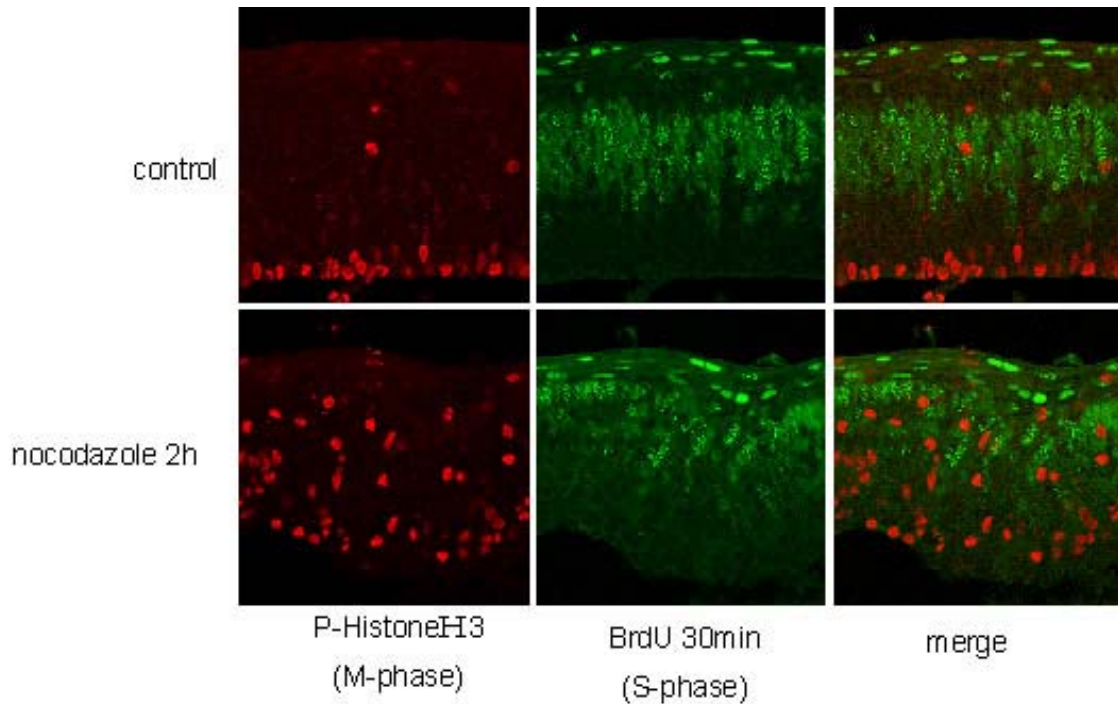


図 II-4.2 ノコダゾール処理による微小管脱重合により、エレベーター運動に異常が見られる。赤；抗リン酸化ヒストン H3 抗体染色（細胞分裂期）、緑；30 分の間に BrdU の取り込まれた細胞核（DNA 合成期）

## II-5) 単一細胞の網羅的な遺伝子発現プロファイルによる哺乳類神経前駆細胞の分化制御機構の解明

### <目的>

ヒトを含む、哺乳類の脳の発生過程では、分裂能を持つ前駆細胞は、分裂し自分自身を増やしながらも、大量のニューロンやグリアを産生していく。前駆細胞は、その分化能力から、ニューロンとグリアの両方の細胞に分化しうる未分化な前駆細胞「神経幹細胞」と、神経幹細胞から生じ分裂能を持つが限られた種類の細胞しか産生しない「中間前駆細胞」に分けることができる。

最近のマウス脳原基の3次元培養のタイムラプス観察による研究(Noctor ら、2004; 宮田ら、2004)などにより、神経幹細胞は、放射状の形態をしており、その細胞体は VZ(脳室帯)に存在して細胞周期に応じてエレベーター運動をし、脳室表面で分裂すること、分裂により生じた娘細胞は、胎生中期の場合は、神経幹細胞自身、ニューロンのみを産生する中間前駆細胞の一種である Basal progenitor, あるいはニューロンとなることが明らかとなった(図 II-5.1)。Basal progenitor は脳室表面の神経幹細胞の分裂により誕生し、SVZ(脳室下帯)へ移動したのち、一度だけ分裂して2つのニューロンを生み出す。

一方、このような前駆細胞から生じる娘細胞の運命はどのようにして決定されているのか、その分子機構の解明は、ショウジョウバエなどのモデル生物に比べて進んでいない。その一因は、哺乳類

大脳には多様な細胞系譜をたどる種々の前駆細胞が混在しているにもかかわらず、分子マーカーが不足しているため、前駆細胞をその種類ごとに明確に区別して研究を行なうことができなかったことにある。

そこで我々は、この問題を克服するため、単一細胞レベルでの網羅的な遺伝子発現プロファイリングを作製することを計画した。最もニューロンの産生が活発な時期である胎生中期に注目し、多数の前駆細胞から遺伝子発現プロファイルを得て解析することで、この時期のマウス大脳原基において、神経幹細胞を含む前駆細胞の運命がどのような分子機構で決定されるのかを明らかとすることが、本研究の目的である。

#### <研究成果>

##### a) 胎生中期のマウス大脳からの単一細胞由来 cDNA の作製と、既知のマーカー遺伝子発現による分類

我々は、単一細胞由来 cDNA を用いて先駆的研究を行なって来た斎藤通紀チームリーダー(理化学研究所、哺乳類生殖細胞研究チーム)と共同研究を行ない、胎生中期(胎生 14 日目)のマウス大脳の VZ/SVZ から無作為に取り出した単一細胞から、global PCR 法を用いて cDNA を作製・増幅し、計 102 個の単一細胞由来 cDNA を作製した。まず、これらの細胞がどのような細胞であるのかを知るために、細胞周期制御に関連する遺伝子(Ki67, cyclin B1, cyclin E1)、SVZ で発現する遺伝子(svet1, EphA3, HuB)、前駆細胞の分化や未分化に関連する転写因子等(Hes1, Neurog2, Pax6, Sox2)等の既知のマーカー遺伝子の各単一細胞 cDNA サンプル中での発現を、リアルタイム PCR で調べた。得られた結果に基づいて、単一細胞 cDNA サンプルを前駆細胞とニューロンに分け、さらに前駆細胞の集団から、SVZ に存在する Basal progenitor(Svet1+)、VZ に存在する前駆細胞の中でおそらく未分化な前駆細胞(Hes1+Neurog2-)とおそらくよりニューロンの方へ分化が進んでいる前駆細胞(Hes1-Neurog2+)という、典型的なマーカー遺伝子発現パターンを示す cDNA サンプルを抽出することができた。

##### b) DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現プロファイルの作製

得られた cDNA サンプル中には、上記のような典型的なマーカー遺伝子発現パターンを示さない前駆細胞も多数含まれていた。そこで、次のステップとして、各単一細胞由来 cDNA サンプルに対して DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現プロファイルを作成し、その情報を用いて、全ての前駆細胞を分類することを試みた。作成した単一細胞由来 cDNA の中から、解析可能であった全ての前駆細胞サンプルを含む 76 個のサンプルを、理化学研究所機能ゲノミクスサブユニットの支援のもと、DNA マイクロアレイ(GeneChip)で解析し、得られたデータの品質を確認したのち、最終的に計 70 個のサンプルについて、ゲノム・ワイドな遺伝子発現プロファイルを得ることができた。

##### c) ゲノムワイドな遺伝子発現情報に基づく前駆細胞の分類

次に、この時期の前駆細胞の種類にはどのようなものがあるのか知るために、得られた遺伝子発

現情報の細胞方向でのクラスター解析を行なった。この解析により、ゲノムワイドに遺伝子発現のパターンが似た細胞群を、同一のクラスター(細胞集団)として捉えることができる。2種類の異なる方法によるクラスター解析(上記の典型的な前駆細胞間で発現の異なる遺伝子を用いた解析[図 II-5.2A]と、使用可能な全ての遺伝子を用いた解析[図 II-5.2B])、および、クラスター間で発現量に差のある遺伝子の in situ ハイブリダイゼーションによる検討により、我々は、胎生中期の大脳原基に存在する前駆細胞は、その遺伝子発現パターンから3つの細胞集団に分かれることを明らかとした(Cluster I, II, III)。典型的なマーカー遺伝子発現を示さなかった前駆細胞の多くは、Cluster Iに含まれていた(図2)。

#### d) 前駆細胞間の細胞系譜の確認と、マーカー遺伝子の同定

Cluster II は VZ 内に、一方 Cluster III は SVZ 内に存在する前駆細胞であるが、その遺伝子発現パターンは類似しており、共通して発現している遺伝子が多数存在していた。そこで、この2種の前駆細胞の細胞系譜上の関係を、Cluster II と III に発現し Cluster I には発現しない Tbr2 遺伝子のプロモーター制御下に EGFP を発現するトランスジェニックマウス(pTbr2:EGFP)を利用して検討した。その結果、Cluster III 細胞はSVZ内の Basal progenitor であり、Cluster II 細胞は、VZ内をSVZへ移動中の、幼若な Basal progenitor であることが明らかとなった。また、遺伝子発現プロファイルや in situ ハイブリダイゼーションの情報から、Cluster I 細胞はこの時期の神経幹細胞であると結論づけられた。我々は同時に、これらの Cluster I, II, III にそれぞれに特徴的に発現する遺伝子(新規マーカー遺伝子)を多数同定することができた。

#### e) 前駆細胞の種類の多様化に関わるシグナルの同定

Cluster II 細胞(幼若な Basal progenitor)は、脳室表面での Cluster I 細胞(神経幹細胞)の分裂により生じる。このような前駆細胞の種類の多様化が、どのようなメカニズムで制御されているのかは不明である。そこでまず、神経幹細胞(Cluster I)と Basal progenitor(Cluster II,III)間で発現レベルに差の見られる遺伝子群が、どのようなシグナル経路に関与しているかを知るために、パスウェイ解析を行った。最も変動が大きかったのが Notch シグナルであった。これまでの多くの研究により、Notch シグナルが神経幹細胞の未分化性の維持に重要であることは知られていたが、具体的に、それが前駆細胞の種間の分化にどのように関与しているのか、また、そのシグナルの送り手である Delta をどのような細胞が発現しているのかは不明であった。そこで Notch シグナル関連分子の発現を、遺伝子プロファイルを用いて検討したところ、Cluster II 細胞(幼若な Basal progenitor)が Delta を一過的に発現して周囲の神経幹細胞を維持していることが分かった。さらに、分散培養およびスライス培養系に Notch シグナルの阻害剤を加え、神経幹細胞に与える影響を検討した。Notch シグナルを阻害すると、神経幹細胞はまず Cluster II(幼若な Basal progenitor)のマーカー遺伝子を一過的に発現したのち Cluster III(SVZ の Basal progenitor)特異的なマーカー遺伝子が発現するようになった。このような細胞の多くは分散培養系で一度だけ分裂して非前駆細胞(ニューロン)を生み出すことから、

Notch の活性を低下させると神経幹細胞は Basal progenitor になることが示された(図 II-5.3)。すなわち、神経幹細胞の娘細胞が Basal progenitor に運命決定される過程には Notch シグナルの低下が重要な役割を担っていることが示唆された。上記の成果は、理研 CDB 機能ゲノミクスユニットおよび哺乳類生殖細胞研究チームとの共同研究であり、Kawaguchi et al.として投稿中。

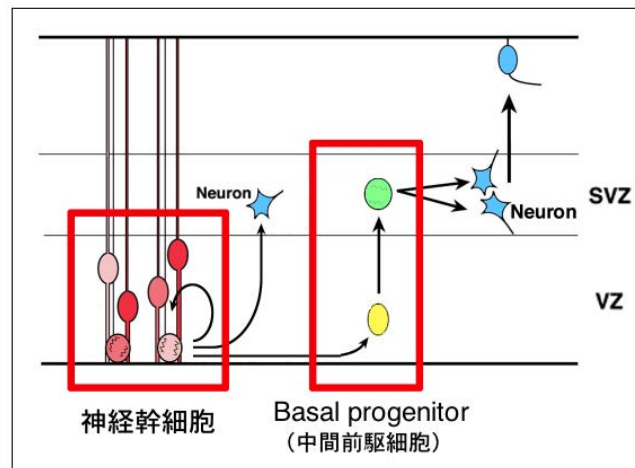


図 1 : 最近の研究で明らかとなった胎生中期の大脳原基の前駆細胞の種類。

神経幹細胞から生じた basal progenitor は SVZ へ移動し、そこで分裂して 2 個のニューロンを生み出す。VZ:脳室帯、SVZ:脳室下帯。

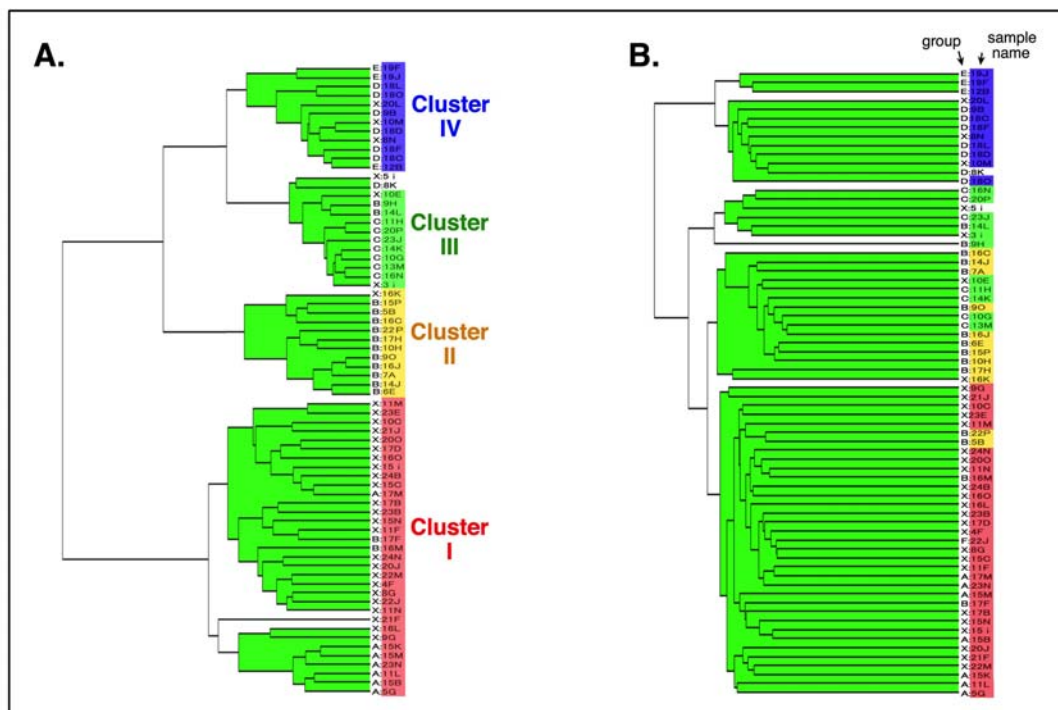


図 2 : 胎生中期由来の単一細胞遺伝子発現プロファイルを用いた細胞方向でのクラスター解析。

A. 典型的な前駆細胞種間で差がある遺伝子セットを用いた解析結果。前駆細胞はその遺伝子発現パターンから、3 つの集団(Cluster I, II, III)に分かれる。B. 利用可能な全ての遺伝子セットを用いた解析結果。Cluster II 細胞と Cluster III 細胞は遺伝子発現パターンが似ている。



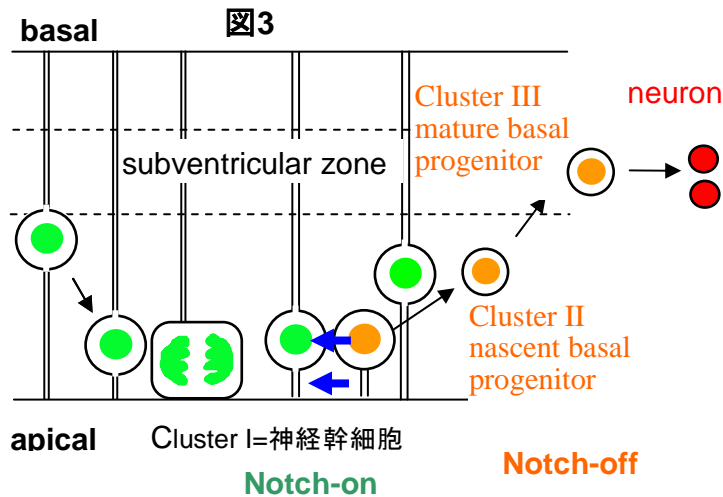


図3：胎生中期の神経幹細胞の分化制御。

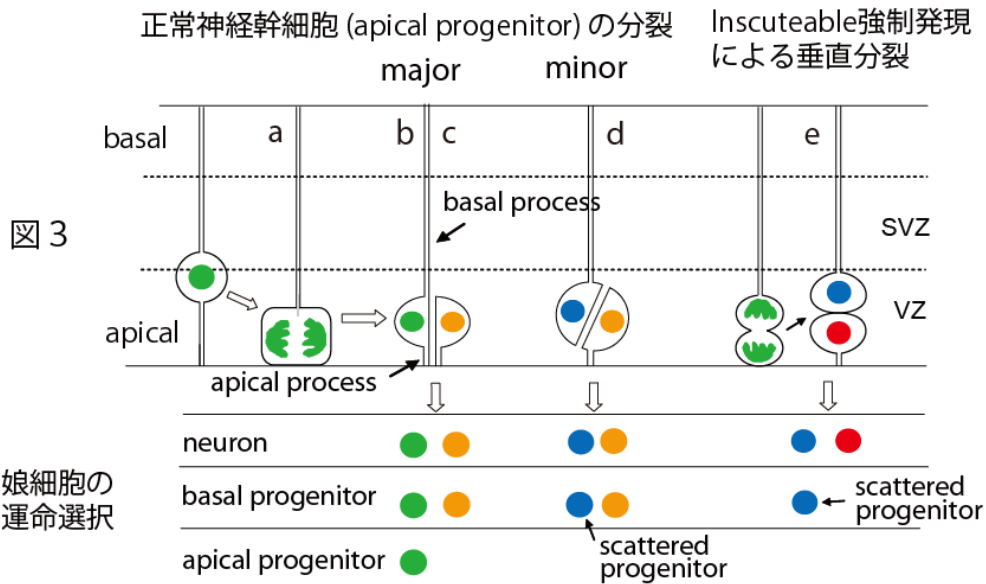
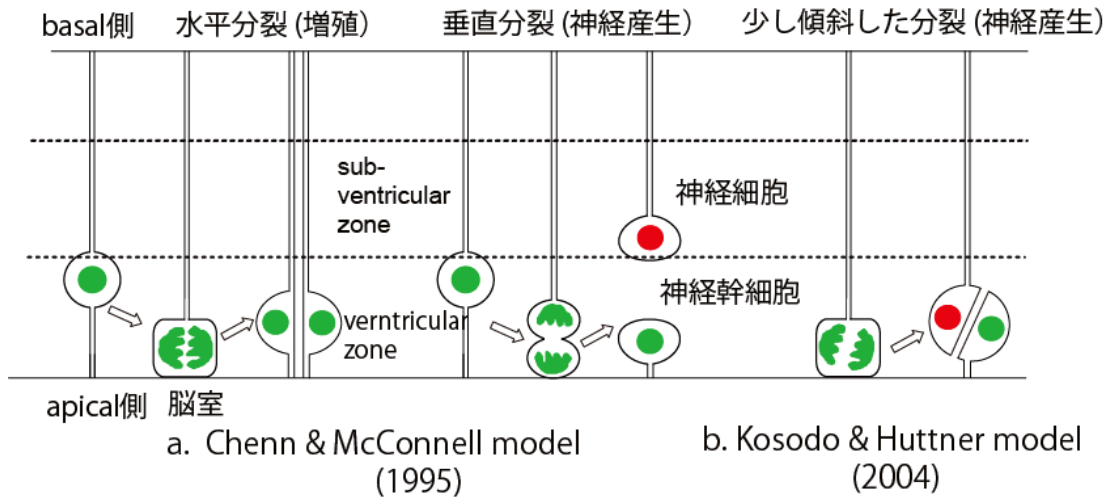
胎生中期の神経前駆細胞は、3種に分かれる。Cluster II 細胞は幼弱な Basal progenitor であり、Delta を一過的に発現し、Cluster I 細胞 (神経幹細胞) の未分化性を維持していることが明らかとなった。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

### 神経幹細胞の非対称分裂とその制御

哺乳類神経前駆細胞における分裂軸制御の研究は1995年の報告を皮切りに、現在に至るまで多くのグループから分裂軸制御の重要性を示すモデルが提唱されてきた。しかしながらそれらのモデルの多くは組織学的解析を基盤としたものがほとんどであり、直接的に分裂軸を改変することによりその意義を解析した研究は皆無であった。それに加えて、野生型脳における分裂軸に関する報告も各研究間で大きく異なるなど、哺乳類における分裂軸制御の研究は混沌とした状況が続いていた。本研究では組織学的な手法に加えて、脳スライスを用いたタイムラプス観察を駆使することにより野生型マウス胎児脳での神経前駆細胞における分裂軸を明らかにした。さらに本研究ではマウスの発生工学的手法を積極的に取り入れることにより、分裂軸制御における LGN 遺伝子の役割、さらには apico-basal 細胞極性が神経前駆細胞の維持に重要な役割を担っていることを示すことが出来た。これらの結果は、哺乳類の神経分化制御機構の解明において非常に重要な情報となり、その分子メカニズムの解明に大きな貢献を果たすことを期待させる。

これまでの神経産生のモデルの多くは、すべて分裂軸の方向と極性軸の直交(90度の角度を持つ)が対称分裂を導き、そこからのずれが非対称分裂を生じるという極性細胞の一般的なモデルに従っていたが、本研究から、そのモデルは正しい結論ではないことが明らかになった。なぜなら、野生型ではほとんど全ての分裂軸がほぼ均一に上皮面に平行な方向を向いているからである。そして、むしろ、分裂軸がきちんと制御される理由は、apical progenitor を維持するためであることが判明した。すなわち、apical progenitor を生じる必要条件が分裂方向の制御にあることを明らかにすることが出来た。



### 単一細胞解析による神経前駆細胞の種類同定と遺伝子マーカーの同定

本研究で行われた神経幹細胞の単一細胞解析からは、神経幹細胞と前駆細胞のゲノムワイドな遺伝子発現情報を得た。これらの情報に基づいて我々は、各前駆細胞群に特徴的な、いわゆるマーカー遺伝子を多数同定し、前駆細胞群の間の細胞系譜上の関係を明らかにすることができた。特に、単一細胞レベルで解析を行うという手法を用いたことで、初めて、前駆細胞の一過的な状態であるCluster II細胞を明確に同定できたと言える。

我々の得た、多数の単一細胞遺伝子発現プロファイルは、神経発生におけるある細胞種特異的に発現するマーカー遺伝子を必要としている研究者や、特定の遺伝子やシグナル経路の役割を研究している研

究者に対して、有益な情報を与えることが期待される。さらに、我々が同定した新規マーカー遺伝子の中にはいくつかの表面抗原も含まれており、今後、これらの表面抗原を利用し、セルソーターを用いて細胞を生きのまま分離することで、特定の前駆細胞のみに焦点を絞った研究を行うことも可能であると考えられる。

### 神経幹細胞の分化制御機構—Notch signal feedback loop

前駆細胞は、その分化能力からいくつかの種類があることは知られていたが、そのような前駆細胞の種類が多様化を生じるメカニズムについての報告はほとんどなかった。我々はこの研究で、(1)胎生中期の前駆細胞は、その遺伝子発現パターンから3種類に分類されること、(2)誕生直後の幼弱な Basal progenitor が Delta を一過的に発現して、その周囲の神経幹細胞を維持していること、(3)神経幹細胞が分裂し、生じた娘細胞が Basal progenitor になる、その運命決定の引き金の一つは、分裂中あるいは直後の Notch シグナルの低下であることを明らかとした。Basal progenitor は、SVZ に移動して一度だけ分裂し、2つのニューロンを生み出す前駆細胞である。したがって、哺乳類の神経発生においてもは、神経幹細胞から生じた Basal progenitor (およびニューロン) が Delta を一過的に発現し、その母である神経幹細胞を維持するという、幹細胞—前駆細胞間のネガティブフィードバック制御が存在し、それは Notch シグナルに側方抑制に基づいていると言って良い。この仕組みが、ニューロンの産生量のコントロールの根幹をなすと考えられる。

また、我々の単一細胞遺伝子発現プロファイルをさらに解析したところ、神経幹細胞の集団内において、Hes1 や Neurog2 といった娘細胞の運命を決定づける遺伝子の発現レベルに高い細胞間バリエーションが観察された。このようなバリエーションが他の細胞分化に関係する多くの遺伝子発現レベルと相関していないことから、これらの遺伝子の発現レベルは同一細胞内でも変動していることが示唆された。胎生中期の神経幹細胞からは、神経幹細胞自身、ニューロン、Basal progenitor が生じるが、この娘細胞の組み合わせは多様である。我々の見た神経幹細胞中の運命決定因子の発現バリエーションが、このような娘細胞の組み合わせの多様性を含む、神経幹細胞の集団としての性質に関与している可能性もある。

### 方法論の応用性

本研究を進めるにあたっては、数多くの real time recording の系を確立する必要があり、そこで得られた方法論は将来ともに神経発生研究の基礎的な技術となるはずである。また、前駆細胞の単一細胞レベルのゲノムワイドな遺伝子発現情報から、脳発生における神経幹細胞のたどる細胞系譜を明らかにすることができたことから、単一細胞レベルの解析の新たな有効性が明らかにされた。さらにこの方法論によって、神経発生を細胞の集団として捉える視点を提供することができた。その意味で、本研究の手法は独創的であり、哺乳類神経発生の他の時期のみならず、多細胞生物を扱う他の生物学研究分野にも広く応用可能であると考えられる。

### 3.2 脳神経幹細胞とその子孫ニューロンの挙動の網羅的観察・記録(名古屋大学大学院 医学系 研究科 宮田グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

##### <実施方法>

宮田グループでは、脳皮質形成の過程および網膜形成の過程に焦点をあて、神経前駆細胞の形態、細胞産生挙動、娘ニューロンの移動および配置の様子をライブ観察し、さらに、外科的、薬理的、あるいは遺伝子強制操作的手法による各種実験を行うことで、細胞現象の理由を分子の言葉で説明することを目指してきた。

##### <研究実施内容>

脳および網膜原基を蛍光色素(脂溶性色素 Dil)により標識し、次いでスライス(200-300  $\mu\text{m}$  厚)を作成し、コラーゲンゲルに埋めて培養皿底に付着させたのち培養液を加える。1回の実験あたり50-100 スライスを作成し、手動撮影の場合は4-8 スライス/皿、自動撮影の場合は20-30 スライス/皿の割合で培養皿に分配する。一定の強度を有するゲルがスライスの過度の圧迫を防ぎ、スライスは細胞の活動に依存して時間とともにほぼ自由にそのサイズを増大させることができる。ただし、細胞がスライスを離れてゲルに流出するなどの好ましくない現象を防ぐために、培養は最長3日間、多くは1-2日にとどめている。倒立型蛍光顕微鏡により手動および自動式のタイムラプス観察を行なう。細胞標識は全くランダムに起こる。散発的な標識が得られたスライスのみを観察の対象とする。1細胞/スライスを原則(これにより後述の免疫染色が可能となる)とし、2-3細胞/皿、10-20細胞/実験という収穫率での観察を標準とする。目的に応じて時間分解能、総観察時間を加減し、ライブ観察を行なった後、スライスを固定し、寒天に包埋ののちビブラトームにより40-50  $\mu\text{m}$  厚に薄切りにしたのち免疫染色に供する。「ライブ観察したまさにその細胞」のについての分子情報を獲得するために、細胞骨格タンパク、細胞周期関連タンパク、種々の転写因子、上皮構造関連分子などに対する抗体、およびその他の神経前駆細胞マーカーまたはニューロンマーカーなどでの染色を行う。

##### <研究結果>

マウス網膜原基の前駆細胞(P, progenitor の意)の分裂の様式として「 $P \rightarrow P + P$ 」(娘細胞2つともがやがて分裂する = 娘前駆細胞として振舞う)というケースに注目し、娘前駆細胞の細胞周期全長にわたる観察を行い、多くの場合で、姉妹である娘前駆細胞たち(ここではP1とP2とする)の細胞周期長、細胞周期依存的運動(「エレベーター運動」)の軌跡、細胞産生能という3項目に関してP1とP2は異なっているということが判明(Saito et al., Dev. Growth Differ. 45, 219, 2003)した。網膜にお

ける細胞分裂の観察に関して同年に海外の2グループから、ゼブラフィッシュ (Neuron 37, 587, 2003), ラット (Development 130, 2329, 2003) を材料とする成果が発表された。

「P/P 分裂における非対称性」は網膜のみならず、大脳皮質原基も自身の構築のために用いている重要な細胞産生戦略であるということが引き続き判明した (Mityata et al., Development 131, 3133, 2004; 2007年10月時点での被引用回数 67回)。大脳原基では、細胞周期進行に関連した前駆細胞の運動の結果として「どこで分裂をするか」ということも P1 と P2 との間で異なることが分かった。P1 が脳室に面する箇所では非対称な分裂をするとき P2 はニューロン層に近い箇所 (脳壁の深部) でニューロン産生専門的な分裂をする。ニューロンづくりとその運搬を同時に進める効率性が読み取れる。同様の形態観察結果が UCSF の Kriegstein のグループから同年に報告 (Nat. Neurosci. 7, 136, 2004) されたが、宮田グループでは、bHLH 型転写因子 Neurogenin2 がこの深部分裂型前駆細胞の挙動に重要な役割を果たしていることもウイルスを用いた強制発現実験などを通じて独自に突き止めた。

次に、脳室面で誕生した娘細胞がニューロン層にむけての移動に関する新知見を得た (Ochiai et al., Neurosci. Res. 57, 326, 2007)。観察の過程で注目された「力・機械的作用が脳の形成に貢献するか否か、もしイエスならばいかにしてなのか」との問題に取り組み、娘細胞の保有する突起が「よじれ+引っ張り」から解放されることで「バネ」のように働き、速やかな核・細胞質移動、すなわち効率的な脳の「建築」に貢献することを見いだした (Miyata and Ogawa, Curr. Biol. 17, 146, 2007)。各々の細胞骨格成分に対する個別の阻害実験を通じて、中間系フィラメントがよじれ形成に強く貢献していること、すなわち、双極型細胞の体内で中間系フィラメントが微小管、アクチンフィラメントという他の細胞骨格繊維と「建材」としての役割分担をしていることが分かった。

細胞の産生の際であり、また、旅立ちの場所でもある脳室面を直視し、そこでのアドヘレンスジャンクションのステージ依存的、また細胞周期依存的な動態について観察を行い、マウス大脳皮質原基では胎生 12 日目に最も脳室面の細胞突起密度が高い (アドヘレンスジャンクションの網を構成する一つ一つの網の目が細かい) ことが判明した (Nishizawa et al. Dev. Dyn. In press)。

この他に、各種ミュータント動物における前駆細胞・ニューロンの挙動の解析に関してスライス培養を使って協力し、アドヘレンスジャンクション関連分子、細胞内シグナリング分子、転写因子の役割についての理解を深めることに貢献した (Imai et al., Development 133, 1735, 2006; Hirai et al., J. Neurosci. 26, 11992, 2006; Tamai et al., Genes to Cells 12, 983, 2007)。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

ここ数年に本研究を通じて行われた三次元システムにおける脳原基細胞の形態的観察の結果を機能的な実験に結びつける努力によって、脳形成にあずかる分子の機能の理解が深まって来ている。そして、今後もそうした理解は一層進むと期待される。そのことは、脳・脊髄・網膜などの形成原

理の理解, ひいては先天性疾患の病態・病因の解明のために役立つと考えられる. また, 再生医療を念頭に置いて種々の幹細胞からニューロンを作り出す努力の延長線上に移植や人工神経系組織など秩序だった構造の形成を目指す取り組みを考える上でも, 神経前駆細胞の三次元的挙動に関する基礎的知見の蓄積は大きな意義がある. さらに, 大脳皮質原基の脳室帯をマウスとヒトで比較するとヒトがマウスよりも重層化が著しいことが知られており, そのことがヒト型の大脳新皮質形成の基盤となったとも推察されているので, その高度重層化がなぜかを解くためにも本研究で得られた知見は貢献できると考えられる. すなわち, 基礎医学的, 病理学的, 再生医療的, および進化的観点の研究に, 幅広く結びつくことが期待できる.

### 3.3 神経前駆細胞と神経細胞の移動による脳構築プロセスの解析

(東北大学 大学院医学系研究科 形態形成解析分野 大隅典子グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

##### a) 神経幹細胞の細胞周期と核の移動の制御機構の解析

神経幹細胞として機能する神経上皮細胞の細胞周期と核のエレベーター運動 (interkinetic nuclear movement: INM) は巧妙にコーディネートされており, 幹細胞から適切な前駆細胞や神経細胞を生じるために重要な役割を果たしていると予想されるが, その制御機構はほとんどわかっていない. 転写因子である Pax6 は大脳皮質原基の神経上皮細胞に強く発現しているが, Pax6 変異マウス胚の大脳皮質原基では, S 期の細胞の分布異常, 脳室帯での細胞分裂の増加が報告されている. Pax6 変異胚においてエレベーター運動に異常が生じている可能性を検証するため, 抗リン酸化ヒストン抗体による免疫染色によってラット胚大脳皮質原基における分裂期の細胞の分布を定量化したところ, Pax6 変異ラット胚では正常胚に比べ脳室面での細胞分裂が少なく, 脳室帯での細胞分裂が多いことが分かった. また, ラット胚大脳皮質のスライス培養標本を作製し, 正常胚と Pax6 変異胚のエレベーター運動を蛍光顕微鏡によりタイムラプス観察した結果, Pax6 変異胚では核が脳室面に到達する前に分裂する細胞と, 核が脳室面から離れる途中で分裂する細胞が多数観察された. 以上から, Pax6 変異胚ではエレベーター運動に異常が生じ, これが異所的な細胞分裂を引き起こしていると考えられた. さらに, 脂溶性色素 DiI を用いた大脳皮質原基スライス培養法により, 野生型ラット胚と Pax6 変異ラット胚の神経上皮細胞の核の挙動をタイムラプス観察し, Pax6 変異胚神経上皮細胞で観察された異常が INM の異常に起因することを確認した.

##### Pax6 変異胚におけるエレベーター運動異常の原因解析

Pax6 変異ラット胚で観察された異常な INM の原因を究明するにあたり, タイムラプス観察により脳室面側 (apical) の細胞突起の固定に不具合が生じている可能性が考えられたため, Pax6 の下流遺伝子を中心に細胞間接着装置や細胞内物質輸送マシナリーの局在様式について調べることにした.

まず、脳室面側の突起先端部に存在する細胞間接着装置 (adherens junction) について免疫染色および電子顕微鏡により観察したところ、野生型と *Pax6* 変異胚の間で明らかな差は認められなかった。次に、*Pax6* 変異ラット胚で観察された異常な INM の原因を究明するにあたり、脳室面側に存在する細胞内機構に着目

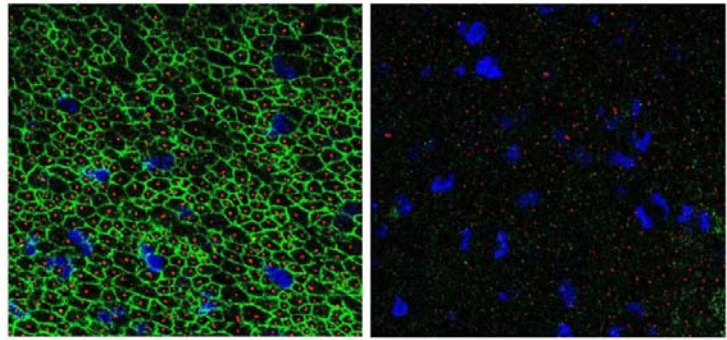


図1:野生型(左)および *Pax6* 変異(右)ラット胚終脳片 whole mount 免疫染色試料を脳室面から共焦点顕微鏡観察した像。*Pax6* 変異胚では delta-catenin (緑) の発現が著しく低下している。青:中心体を示す gamma-tubulin の染色

し解析を行った。免疫染色ならびに電子顕微鏡により神経上皮細胞の中心体の局在を調べたところ、*Pax6* 変異ラット胚において中心体の局在や中心体に付随する一次線毛 (primary cilia) の形成が乱れていることが観察された。さらに、大脳皮質原基スライス培養法ならびに子宮内胎児操作を併用した電気穿孔法により、神経上皮細胞の INM と中心体の挙動を同時にタイムラプス観察したところ、野生型胚では S-G2 期に中心体は脳室面側にじっと止まっているのに対し、*Pax6* 変異胚では S-G2 期にかけて中心体が頻繁にその位置を変えていた。*Pax6* 変異ラット胚における異常な INM は、この中心体の位置の異常により引き起こされるものと結論した (Tamai *et al.* Genes Cells. 2007)。

### INM の異常を引き起こす *Pax6* 下流因子の探索

*Pax6* 変異胚で認められた INM の異常および中心体の挙動異常に関連する分子の候補を探索するために、マイクロアレイ法により *Pax6* 変異胚で発現が低下している因子の中で、細胞骨格や細胞接着に関連することが知られている FEZ および delta-catenin に着目した。免疫染色の結果、FEZ1 および delta-catenin とともに、神経上皮細胞の先端側に特異的な局在が認められ、*Pax6* 変異胚終脳ではその発現が著しく低下していた(図1)。一方、N-cadherin、Par3、Par6 など、上皮細胞の先端側に局在が報告されている他の因子については、*Pax6* 変異胚で発現変化が認められなかった。現在、FEZ1 および delta-catenin の発現量の低下について Western blot により検証するとともに、FEZ1 および delta-catenin の機能阻害を行うために、子宮内電気穿孔法による遺伝子導入を用いた RNA 干渉法の実験系を確立しつつある。

### b) *Pax6* 変異ラットの嗅球形成位置の異常の解析

*Pax6* 変異ラットでは、本来嗅球が形成されるべき終脳吻側ではなく側面に嗅球形成が生じることを手がかりとして、嗅球の初期形成機構について解析を行った。全胚培養法および終脳器官培養法下で細胞標識することにより、僧帽細胞という最初に嗅球構築に関わるニューロンの移動が *Pax6* 変異ラットにおいて異常であることを見いだした。GFP 発現ラットをドナー細胞とした細胞移植により、この異常は細胞非自律的に制御されることを明らかにした。また、野生型初期ラット脳を回転培養し嗅

上皮からの神経投射を除外した場合にも嗅球の形成位置は正常であることから、嗅球形成の位置に関しては終脳内在的な機構が働いていることが示唆された。*Pax6* 変異ラットの嗅球形成位置の異常は、全胚培養下で *Pax6* 遺伝子を導入することにより回復した。以上のことから、嗅球の初期形成には *Pax6* 依存的な終脳のパターン化が必要であることが明らかになった (Nomura & Osumi, 2004)。

### 嗅皮質形成に関する解析

終脳の表層を接線方向に腹側へ移動するニューロンの配置に関して、*Pax6* 変異ラットおよびマウスではこのニューロン集団が *Pax6* の発現境界である終脳の背腹境界で停止せず、腹側の線条体原基まで侵入することを手がかりとして、嗅皮質形成に関する解析を行った。上記と同様に GFP 発現ラットをドナー細胞とした細胞移植を行うことにより、嗅皮質ニューロンの異常は細胞非自律的に制御されることを明らかにした。嗅皮質ニューロンの終脳腹側への侵入を阻止する分子機構を探るために、各種阻害抗体を終脳の培養系に添加して阻害効果のある分子をスクリーニングしたところ、Eph/ephrin シグナルが候補として浮かび上がった。嗅皮質ニューロンは Eph を発現し、終脳腹側は ephrin-A5 を発現しており、*Pax6* 変異ラット終脳腹側における ephrin-A5 の発現は野生型に比して有意に低下していた。全胚培養下で ephrin-A5 を野生型ラット胚終脳背側で発現させると、その部位に嗅皮質ニューロンは侵入できなかった。さらに全胚培養下で ephrin-A5 を *Pax6* 変異ラット胚終脳腹側で発現させると、異常な異所性のニューロン侵入が阻止され、正常な表現型に回復した。Ephrin-A5 のノックアウトマウスの表現型を解析したところ、*Pax6* 変異体と同様に嗅皮質形成の異常があることが分かった。以上のことから、嗅皮質形成には *Pax6* およびその下流の Eph/ephrin シグナルが関わることを示された (Nomura *et al.* Development 2006)。

### c) 神経幹細胞の増殖と分化を統合する分子機構の網羅的解析

野生型脳と *Pax6* 遺伝子変異動物脳で発現する遺伝子のプロファイルについてマイクロアレイ法を用いて比較し、定量 RT-PCR および *in situ* ハイブリダイゼーション法により発現様式を確認することにより、*Pax6* の下流遺伝子として脂肪酸結合タンパク質をコードする *Fabp7* を見いだした。電気穿孔法による遺伝子導入を行い、RNA 干渉法 (siRNA 法) による FABP7 の機能阻害を行ったところ、神経上皮の形態が異常になり、細胞増殖の減少とニューロン分化の亢進が認められた。したがって、*Pax6* は FABP7 を介し、神経上皮細胞の性質の維持に深く関わることを示された (Arai, Y. *et al.* *J. Neurosci.* 2005)。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

脳の発生の鍵となる転写因子 *Pax6* に着目して展開した本研究により、胎生期の神経幹細胞である神経上皮細胞の特質の一端を明らかにすることができた。今後は、さらに *Pax6* によって支配される因子を同定することを通じて、半世紀以上前に示唆された INM の分子メカニズムや、神経上皮細



胞の分化運命決定に関する新たな知見を得ることが期待される。近年、統合失調症などの精神疾患の原因が脳の発生発達過程に求められるという「神経発達仮説 neurodevelopmental theory」が提唱されていることを考え合わせると、このように脳の発生原理を遺伝子レベルで理解することによって、精神疾患発症のメカニズムに迫ることが可能となることが期待される。

### 3.4 細胞間相互作用の研究(京都大学 再生医科学研究所 瀬原グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

##### ①研究のねらい

##### 神経・支持細胞間シグナリングの時間的・空間的制御機構の解明

脳は神経とその機能を支える細胞集団、オリゴデンドロサイト・アストロサイトなどから成る。神経発生の過程においてそれら支持細胞は、生まれた神経の生存を支え、神経の軸索伸長や移動に関与する。脊椎動物の中枢神経系のような複雑な神経系では、その役割は特に重要であると考えられる。面白いことに、神経系の構築においては、まず神経細胞が分化し、この神経細胞が自分を支えるグリア細胞の分化・移動・生存に関わるシグナルを出すことが知られている。その代表的なものが、ErbB リガンドのグリア増殖因子である。しかし、神経細胞が出すそれら細胞間シグナル分子を明らかにするだけでは、神経組織の構造と機能が正しく構築される仕組みを理解することはできない。我々は、神経がそれらのシグナルを支持細胞に送る時間的・空間的な制御機構を、プロテアーゼ制御を中心に解明する。

##### ②実施方法

本研究において我々のグループは、神経筋接合部形成を中心に、そのような神経・支持細胞間シグナリングの時間的・空間的制御機構の解明を目指す。それは、中枢神経系に比べ、(a) 神経筋シナプスはその形成に関与する細胞が限られており、(b)シナプスのサイズが大きく観察しやすい、(c) また可塑性があまりないことから解析しやすいなど、研究上有利な系と考えるからである。

##### ③研究成果

##### (1) 形態形成におけるメルトリン $\beta$ の役割

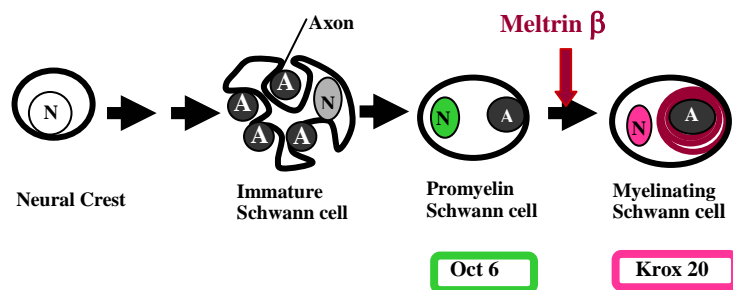
本研究では、第一に、神経組織形成の時間的・空間的制御機構に重点をおいた研究のひとつとして、膜分子 ADAM プロテアーゼに着目した。それは、我々がクローニングした ADAM ファミリープロテアーゼ、メルトリン  $\beta$  が、グリア増殖因子を膜貫通領域直上部で切断し可溶型に変換する活性をもつことを見出したことから、このプロテアーゼが神経組織の形成に何らかの形で関与していることが期待されたからである。

そのような期待からメルトリン  $\beta$  プロテアーゼ欠損マウスを作成したところ、心臓心室中隔・弁など

の内臓組織形成の欠損に加えて、副腎の節前神経繊維の束化の異常が見られること、ほとんどのマウスが出生直後に死ぬことを見出した (Kurohara *et al.*, *Developmental Biol.*, 2004)。心内膜形成の欠損は、神経堤細胞系譜特異的にメルトリン  $\beta$  を発現することによりレスキューされ、内皮細胞系譜特異的発現ではレスキューできなかったことから、メルトリン  $\beta$  は神経堤細胞で必要とされることがわかった。さらに、神経堤細胞や内皮細胞系譜依存的 Cre で活性化される LacZ 遺伝子の発現により、神経堤細胞や内皮細胞系譜をラベルし、メルトリン  $\beta$  が心臓内膜形成初期に必要な内皮細胞の上皮間葉転換や、神経堤細胞の移動には関与せず、内膜形成後半の、左右内膜丘の癒合に関与することを示した (Komatsu *et al.*, *Developmental Biol.*, 2007)。

## (2) 神経再生におけるメルトリン $\beta$ の役割

上記のように、心臓形成におけるメルトリン  $\beta$  の役割や機能がわかりつつあるが、一方強い発現を示すにも関わらず、末梢神経における役割は不明である。そこでひとつのアプローチとして、メル

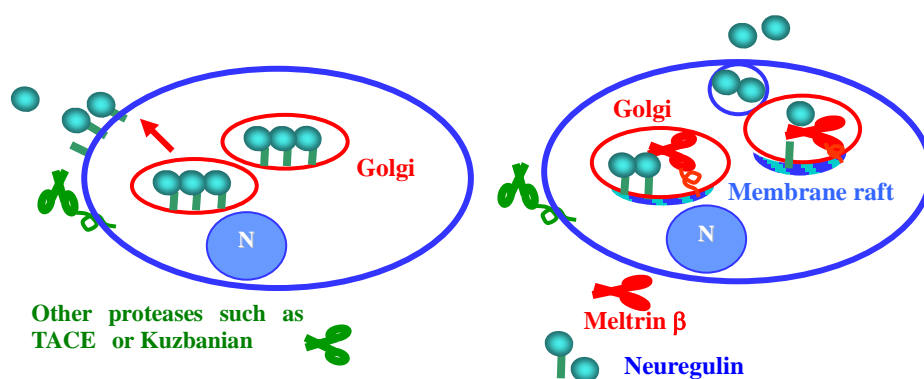


リン  $\beta$  ノックアウトマウスのうち、数パーセント(ただし129・B6 mixed background)の個体が成体まで生きのびることから、これらのマウスを用いて坐骨神経損傷後の神経再生におけるメルトリン  $\beta$  の役割を検討した。その結果、メルトリン  $\beta$  ノックアウトマウスでは神経組織の再生が遅れること、Wallerian 変性や軸索伸長は正常に進行するが、ミエリン形成が遅れることを見出した。そこで、神経堤細胞由来の Schwann 細胞の分化を、転写因子などのマーカー遺伝子の発現を指標に調べた。Schwann 細胞のプロミエリン段階からミエリン形成段階への細胞分化にはプロミエリン段階を維持する Oct6 の発現に引き続き、ミエリン形成に必須の Krox20 の活性化を必要とする。ノックアウトマウスでは、Krox20 の活性化と、それにとまなう Oct6 の発現抑制、ミエリン蛋白である myelin basic protein(MBP)や Protein0(P0)遺伝子の活性化が遅れることがわかった。また、ミエリン形成は、PI3K-AKT 経路の活性化を必要とするが、この活性化がノックアウトマウスでは抑えられていることがわかった。以上のように神経再生においてメルトリン  $\beta$  は、PI3K-AKT 経路の活性化制御を介して、Schwann 細胞の分化を制御することが明らかになった(投稿準備中)。

## (3) メルトリン $\beta$ によるグリア増殖因子の認識・切断制御機構

培養神経細胞を用いた研究において、メルトリン  $\beta$  は膜型グリア増殖因子を切断する、いわゆる ectodomain shedding の活性をもつ。(1)から(3)で示したように、メルトリン  $\beta$  の心臓神経堤細胞での役割や神経堤細胞由来 Schwann 細胞の分化における役割は、神経堤細胞で強く発現するグリア

増殖因子切断への関与を強く示唆するものである。これが生理的基質であるかどうかは、未だ証明にいたっていない。ひとつの大きな理由は、ectodomain shedding が、当初考えられていたよりも複雑に制御されているからである。例えばこの増殖因子切断は、細胞表面と細胞内の両方で起こることがわかっている。また、同じプロテアーゼファミリーに属する TACE(ADAM17)もグリア増殖因子切断能を持つプロテアーゼとして報告された。そこで我々は、同じ基質に対し、異なる ADAM が時間的・空間的に異なる切断制御を行う、という作業仮説のもとに、メルトリン $\beta$ のグリア増殖因子の認識・切断機構を調べ、他のプロテアーゼと比較検討した。発生過程後根神経節神経細胞、あるいは樹立神経細胞において、メルトリン $\beta$ とグリア増殖因子は、ともにコレステロールリッチな脂質二重層上のマイクロドメイン、いわゆる膜ラフト画分に存在することを見出し、さらにグリア増殖因子の切断に、メルトリン $\beta$ が膜ラフトに局在することが必須であることを示した(Wakatsuki et al., J Neurochem., 2004)。これは、膜ラフトをこわすと ectodomain shedding を活性化する他の ADAM、TACE や Kuzbanian とは逆の性質である。さらに、メルトリン $\beta$ は、後根神経節細胞のゴルジ装置およびその周辺に主に局在し、それら細胞内で恒常的にグリア増殖因子を切断することを明らかにした。この研究では、グリア増殖因子の切断を生きた細胞内でとらえることに、はじめて成功するとともに、TACE 欠損細胞を用いた解析により、メルトリン $\beta$ によるグリア増殖因子の切断が、TACE に依存しないものであることも示すことができた。(Yokozeki et al., Genes to Cells, 2007)一方、TACE の場合は、細胞表面、あるいはその近傍における切断が見られ、またその切断能は、phorbol ester TPA によって活性化された。このように、メルトリン $\beta$ と TACE が、空間的あるいは時間的に異なる切断制御を行うことで、同じ膜型増殖因子(ErbB リガンド)の活性制御を分担していることがわかった。



## ②成果のまとめ

以上のように、メルトリン $\beta$ は、心臓形成・末梢神経組織の再生に関与することを示し、その共通する役割として、神経堤細胞に由来する細胞の分化に関与することを明らかにした。メルトリン $\beta$ は、神経堤細胞で強く発現し、その増殖や移動、分化など多彩な機能を担うことが知られる、膜型 ErbB リガンドニューレグリンを切断する能力があり、しかも基質を細胞内で恒常的に切断するという点で、

他の ADAM プロテアーゼとは性質を異にするがわかってきた。今後、このような特色をもつプロテアーゼの、神経組織構築、神経・グリア間シグナリングにおける位置づけを、分子・細胞レベルで明らかにしていきたい。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

現在のところ、呼吸制御系、NMJ 形成、そして Schwann 細胞分化におけるメルトリン  $\beta$  の役割は、グリア増殖因子のアイソフォームのひとつ、タイプ III ニューレグリンとオーバーラップするものである。また、Schwann 細胞の分化においては、タイプ I あるいは可溶性増殖因子が、ERK の活性化を介して Oct6 陽性プロミエリン段階への分化あるいはその段階への脱分化に、それに対し2つの膜貫通ドメインをもつタイプ III ニューレグリンが、PI3K-AKT 経路を介してミエリン形成段階への分化に関与することが知られる。メルトリン  $\beta$  は、タイプ I グリア増殖因子の切断を介して神経細胞あるいは心臓神経堤細胞内でこの増殖因子を枯渇させ、ミエリン形成段階タイプ III ニューレグリン依存的な ErbB レセプター活性化シグナルにスイッチさせる機能をもつことが考えられる。NMJ 形成や呼吸制御系の研究を通して、その分子実体を解明したいと考える。

## 3.5 細胞系譜研究グループ(国立遺伝学研究所 一色グループ)

### (1) 研究実施内容及び成果

#### 1. 研究のねらい

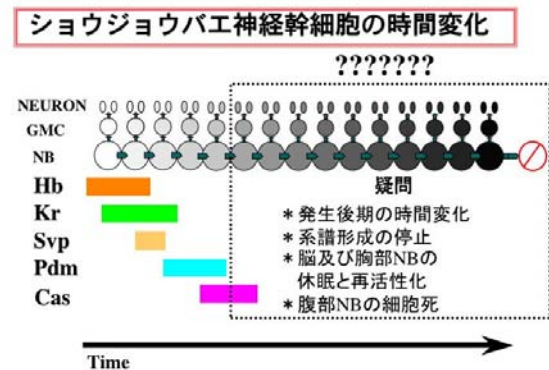
発生過程において神経幹細胞の個性は常に一定ではなく時間とともに変化していく。このため、一つの幹細胞は非対称的分裂を繰り返しながら多様な子孫神経細胞を特定の順番で作り出していくことができる。我々のグループは、幹細胞系譜の再現的な観察が比較的容易に行えるショウジョウバエ中枢神経系をモデル系として、この神経幹細胞の時間変化を司る分子メカニズムを解明することを目指している。以前、我々は、ほぼ全てのショウジョウバエ神経幹細胞が、胚発生期前半において Hunchback、Krüppel、Pdm、Castor という4種の転写因子を順次発現し、これらの転写因子の発現を自律的に切り替えることを報告した。しかしながら、神経幹細胞は Castor 発現開始以降も胚発生期だけでも10回程分裂するにもかかわらず、Castor 発現開始以降の神経幹細胞の時間変化についてはほとんど謎であった。さらに、胚発生終了後、ほとんどの腹部の神経幹細胞は死滅する一方、脳と胸部の神経幹細胞の多くは、一旦長い休止に入って維持され、幼虫期の途中で非対称的細胞分裂を再び開始し、一幹細胞あたり平均100個にも及ぶ成虫神経系を形成する神経細胞群を産生する。この幼虫期の時間変化のメカニズムもほとんど未知のまま残されていた。本研究では、こうした幹細胞の休眠、再活性化、幼虫型への変化も含めた幹細胞系譜形成後期過程を追跡して、ショウジョウバエ神経幹細胞の時間変化の全容を捉えることを目指した。

## 2. 研究実施内容と結果

### a. 幹細胞系譜後期過程の記載的解析とモデル幹細胞系譜の確立

Hunchback, Krüppel は、神経幹細胞で順次発現されて神経幹細胞の時間変化そのものを制御している。後期過程においても、ほぼ全ての神経幹細胞で一過的に発現される同様な因子が存在すると考えた。そこで、まず、未知の後期特異的因子や系譜分子マーカーの同定を目的として、公開データベースの登録されている転写産物の発現様式を指標にして神経系で広範囲

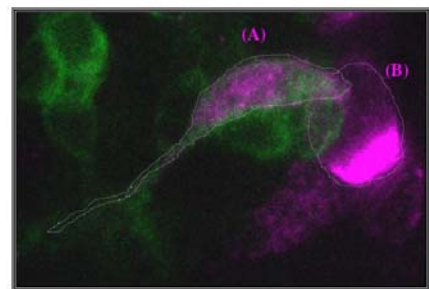
に時期特異的に発現される遺伝子を探索した。その結果、線虫 *heterochronic* 遺伝子 *lin-29* のホモログ (以後 *dmlin-29* と呼ぶ) を後期特異的分子マーカーの一つとして見いだした。*heterochronic* 遺伝子群とは、線虫の幼虫発生期において細胞に時間的個性を与える役割を持つ遺伝子群であり、*lin-29* は最も後期特異的な時間的個性の決定を担っている。*dmlin-29/lin-29* は Krüppel に非常に類似した Zn フィンガーモチーフを持つ転写因子をコードしている。次に、dmLin-29 やその他の後期特異的分子マーカーに対する抗体を作製し、それらを用いた免疫染色を行うことにより、後期特異的因子の発現順序を解析した。引き続いて、特定の神経幹細胞系譜におけるそれらの因子の発現を詳細に解析することにより、その特定の神経幹細胞の系譜形成を、これまで観察が難しかった休眠期も含めて胚発生期から幼虫期まで、一分裂単位の精度で再現的に追跡できる系を確立した。



### b. 神経幹細胞の休眠

ショウジョウバエの胸部および腹部神経節は繰り返し構造をなしており、体節内の位置情報に従って半体節あたり約30個の神経幹細胞 (NB) が形成される。これらは全て同定可能で名前が付けられている。神経系形成の早い時期においては、共通の名前を持つ腹部と胸部の神経幹細胞 (例: NB2-4Abdominal と NB2-4Thoracic) は、多くが非常に類似した系譜形成を行うことが知られていた。

しかしながら、上記の幹細胞系譜の解析結果から、神経系形成中期から後期にかけては、多くの胸部神経幹細胞は相当する腹部幹細胞に比べてかなり早い段階で分裂を停止し、それまでの球状の形態から長い突起と非常に小さな核を持つ形態へと変化して休眠に入ることを見出した。さらに、神経幹細胞は、休眠に入ると同時に、時期特異的因子の発現変化を停止することがわかっ



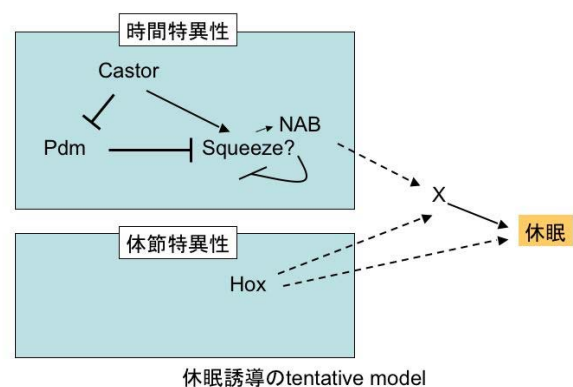
休眠中の神経幹細胞(A)と隣接する分裂中の幹細胞(B)

た。その後、休眠していた神経幹細胞は、幼虫期に入って再活性化されると、時期特異的因子の発現変化を再開し、相当する腹部神経幹細胞が胚発生終期に示すのと同様の転写因子発現切り替えを示すことが観察された。以上のことから、神経幹細胞の転写因子発現変化による時間変化は、胚期、幼虫期を通じて個々の細胞ごとに進行しており、休眠期ではその進行が一時的に停止されることが強く示唆された。

### c. 神経幹細胞の休眠への移行を制御する機構

#### c-1 時期特異的転写因子群

胚期と幼虫期の時間変化が継続的であり、休眠によって一時停止されるのであるとすると、幼虫、成虫の神経系に必要な細胞が正しく生成されるためには、休眠への移行を促すメカニズムは胚発生期において系譜中の規定された段階で働くことが重要であると考えられる。すなわち、神経幹細胞で時間特異的に発現している転写因子群が、多様な種類の神経細胞を生み出すのに重要であるばかりでなく、休眠に入るタイミ



ングをも制御している可能性が高いと考えた。本研究では、Castor 変異において、Castor 一つ前の時期特異的転写因子である Pdm の発現が脱抑制されることにより、これまで見出した Castor より後期で発現する全ての時期特異的転写因子の発現がほぼ消失することを見出していた。そこで、Castor 変異体において休眠に異常が生じているかを検討したところ、Castor 変異では休眠が起こらず、胚発生終了まで神経幹細胞が分裂し続け、形態も球状のままであった。一方、Pdm 変異体では休眠が通常より早く起こることが観察された。これらのことから、時期特異的転写因子群が休眠のタイミングを制御していることがわかった。さらに、Pdm/Castor の制御下にある後期特異的転写因子 Grainyhead は休眠への移行には関与しておらず、加えて、神経幹細胞は Castor の発現終了後しばらくして休眠することから、Pdm/Castor の制御下であって休眠の制御を行う未知の因子の存在が浮かびあがった。

このような未知因子の同定を目指して、*castor* 遺伝子の変異体と野生型での遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析により比較し、*castor* 変異体で発現が変動している遺伝子を探索した。その結果、Castor 変異で発現が消失するものとして、既に報告されていた NAB という転写コファクターを見出した。つづいて、NAB の機能が欠損すると、胸部神経幹細胞は、休眠せず、休眠する直前あたりで生成される神経細胞を生成しつづけ、腹部神経幹細胞も相同の時間特異性を持つ神経細胞を生成し続けることを明らかにした。このことから、NAB は休眠、後期特異的神経細胞形成の相方に

において重要な役割を果たす分子であることがわかった。また、NAB の発現よりもさらに休眠に入るタイミングに近い時期に一過的に発現されて、NAB が欠損すると発現が消失する遺伝子を見出しており、この遺伝子が休眠の制御に関与しているかどうかの検討を開始したところである。

## c-2 HOX 遺伝子

休眠が体節特異的に起こることから、胸部体節／腹部体節の特異性を決定するHOX 遺伝子の休眠への関与が予想された。そこで、胸部体節特異的に発現している *Antennapedia* の機能欠損が休眠に及ぼす影響を調べた。*Antennapedia* 機能変異体では神経幹細胞は、正しいタイミングで休眠できずに、野生型よりも長い間細胞産生を続け、通常幼虫で生成されるべき分子マーカー発現を示す細胞を産生することが認められた。また、腹部特異的 HOX 遺伝子である *abd-A* を神経幹細胞特異的に胸部で異所的に発現した場合にも *Antennapedia* 機能変異体と同様の表現型が観察された。以上のことは、HOX 遺伝子の恐らく内在的な働きによって休眠の時期が決定されていることを強く示唆している。さらに、上記のように HOX の発現を操作した場合でも、時間特異的因子の発現切り替え自体はほぼ正常であることから、HOX と時間特異的因子群は独立した経路で休眠のタイミングの決定に関与していることが示された。また、休眠せず通常以上に分裂が続く状況において幼虫で生成されるべき神経細胞の生成が肺発生期に早期に認められたことは、休眠をはさんで胚発生期と幼虫期の神経幹細胞の時間変化が継続して行われていることを強く支持する。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

1. 神経幹細胞系譜の全長を明らかにしたことにより、ショウジョウバエにおいて必要な数と種類の神経細胞を生み出すために用いているメカニズムの仕組みの大枠をとらえることができた。系譜形成の時間的制御を司るメカニズムとして他によく知られているのが線虫の *heterochronic* 遺伝子カスケードである。このカスケードには *Hunchback* 相同遺伝子と *Krüppel* 相同遺伝子が各一つずつ含まれ、4種類の時間的細胞特性を生み出している。ショウジョウバエの神経幹細胞系譜形成では、*Hunchback/Castor* (*Castor* は *Hunchback* と同じ DNA 結合特性を有する。)タイプと *Krüppel/dmLin-29* タイプの Zn フィンガーがペアになった発現が、(I)*Hunchback/Krüppel*→(II)*Castor/ /Squeeze*(*Lin-29* ホモログの一つ)/*Krüppel*→(III)*Castor/dmLin-29*→(終了)の順番で、3回繰り返される。このようにして似た分子を使い回し、さらに (I) (II) (III)を連結させる発現制御が組み込まれることによって、ショウジョウバエの幹細胞系譜は効率的により多様な細胞を産生しうる仕組みとなっているらしい。どのようにして一つの系譜に3セット組み込まれ得たのか、発生メカニズムの進化の観点からも大変興味深い問題であると考えている。また、時期特異的転写因子群間の制御ネットワーク全体を数理モデル化するのに十分な知見とツールが他ラボの成果を含めて蓄積されてきたので、*FeedForward Loop* を用いた数理モデル化の共同研究を最近立ち上げた。今後、モデルシミュレーションと実験間でフィードバックを繰り返すことにより、この系譜システムについてより理解を深めていく予定である。

2. 神経幹細胞を維持し、適切な時期に適切な種類の神経細胞群を適切な数生み出すためには、休眠の機構は非常に重要である。本研究で明らかにしたショウジョウバエ神経幹細胞の休眠の機構が、神経幹細胞の休眠の一般的な理解に今後つながっていくことを期待している。また、時期特異的転写因子群と体節特異的な構造の形成を司る HOX 遺伝子群が具体的にどのような分子メカニズムによって休眠の制御を行うのかを探求することにより、本研究の成果をさらに発展させていきたい。



## 4 研究参加者

### 1) 脳構築プログラム研究グループ (松崎 文雄)

研究項目：脳構築プログラム研究グループ (松崎 文雄)

脳の発生の遺伝的プログラムの解析

氏名	所属	役職(身分)	研究項目	参加時期
松崎 文雄	理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター	グループディレクター	脳構築プログラムの研究	H14.11～
泉 裕士	同上	理研研究員	同上	H14.11～H19.12
川口 綾乃	同上	理研研究員	同上	H14.11～
塩井 剛	理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター CREST	理研研究員  CREST 研究員	同上	H14.11～H18.3  H18.4～
久田 香奈子	同上	理研テクニカルスタッフ	ショウジョウバエ研究 全般の補助	H14.11～H18.3
斉藤 麻衣	同上	理研研究員	同上	H14.11～H17.7
末次 妙子	同上	理研研究員	脊椎動物研究全般の 補助	H14.11～
太田 奈緒	同上	理研研究員	ショウジョウバエ系統維持と形質転換体作成	H14.11～
前田 真岐	同上	京都大学医学研究科 博士課程6年	脳構築プログラムの研究	H14.11～H19.3
井川 知子	同上	理研テクニカルスタッフ	川口綾乃の補助	H15.4～H19.7
山本 融	同上	理研研究員	脳構築プログラムの 研究	H15.5～H18.3
岩下 美里	同上	理研テクニカルスタッフ	山本融の補助	H16.4～
森 麻子	同上	理研テクニカルスタッフ	塩井剛の補助	H16.4～
山本 佳宏	同上	神戸大学自然科学研究科 博士課程3年	脳構築プログラムの 研究	H16.4～
Woongjoon Moon	同上	理研研究員	同上	H16.8～H19.8
今野 大治郎	CREST	CREST 研究員	同上	H17.1～
田中 佑美	理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター	理研アシスタント	事務補佐	H17.2～H18.3
岩野 智彦	CREST 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター	CREST 研究員  理研研究員	脳構築プログラムの 研究	H17.4～H19.8  H19.9～
下向 敦範	CREST	CREST 研究員	同上	H17.4～
小川 裕規	理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター	理研研究員	同上	H17.4～

氏名	所属	役職(身分)	研究項目	参加時期
加藤 智朗	同上	神戸大学博士課程 2 年生	同上	H17. 4～
北島 敦	同上	理研研究員	同上	H17. 8～
小曾戸 陽一	同上	理研研究員	同上	H17. 9～
中村 麻衣子	同上	理研アシスタント	事務補佐	H18. 4～H19. 3
瀧澤 千絵子	同上	理研研究員	脳構築プログラムの研究	H19. 1～
石外 純子	同上	理研アシスタント	事務補佐	H19. 4～

## 2) 脳細胞構築研究グループ (宮田 卓樹)

研究項目：

脳神経幹細胞とその子孫ニューロンの挙動の網羅的観察・記録

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
宮田 卓樹	名古屋大学大学院 医学系研究科 細胞生物学分野	教授	神経幹細胞のタイムラプス観察・画像解析および機能実験	H14. 11～
田崎(齋藤)加奈子	同上	D4 (ただし平成 16 年度 CRES 研究補助員)	同上	H14. 11～
西沢 祐治	同上	助手(助教)	同上および電子顕微鏡	H17. 4～
神田 理恵子	同上	D1	神経幹細胞の観察・機能実験	H17. 4～
今福 宏司	同上	技術補佐員	電子顕微鏡	H17. 4～
正岡 実	同上	技官	画像解析および機能実験の補助	H17. 4～
落合 和	同上	助手(助教)	神経幹細胞のタイムラプス観察・画像解析および機能実験	H17. 9～H19. 9
田所 竜介	同上	CREST 研究員	神経幹細胞の遺伝子制御	H17. 11～H19. 8
美濃部 さやか	同上	D3 (三重大医学部より受け入れ)	神経幹細胞の観察・機能実験	H17. 11～
木村 宮子	同上	M2	神経幹細胞の観察・機能実験	H18. 4～
中谷 彩矢和	同上	M1	神経幹細胞の観察・機能実験	H19. 4～

### 3) 細胞移動研究グループ (大隅 典子)

研究項目：神経前駆細胞と神経細胞の移動による脳構築プロセスの解析

氏名	所属	役職(身分)	研究項目	参加時期
大隅 典子	東北大学大学院 医学系研究科 形態形成解析分野	教授	脳発生過程における細胞移動の役割の研究	H14.11～
若松 義雄	東北大学大学院 医学系研究科 器官構築学分野	講師	同上	H14.11～
野村 真	東北大学大学院 医学系研究科 形態形成解析分野	助教	同上	H14.11～H19.8
高橋 将文	〃	助教	同上	H14.11～
前川 素子	〃	D4	同上	H14.11～H18.3 離脱
玉井 洋	〃	D4	同上	H14.11～H18.3 離脱
櫻井 勝康	〃	D3	同上	H15.4～H20.3
福崎 麗	〃	D3	同上	H17.4～H19.9
鈴木 亨	〃	D1	同上	H16.4～
恒川 雄二	〃	D1	同上	H16.4～
金久保 佐知子	東北大学大学院 医学系研究科 眼科学分野	D4	同上	H15.4～H18.3
沼山 恵子	東北大学大学院 工学研究科	助教	同上	H15.4～
新井 洋子	東北大学大学院 医学系研究科 形態形成解析分野		同上	H14.11～H17.3
中村 典子	〃		同上	H14.11～H17.3

4) 細胞間相互作用研究グループ (瀬原 淳子)

研究項目：

- 1) グリア細胞産生機構
- 2) 神経分化における ADAM の役割
- 3) シナプス形成

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
瀬原 淳子	京都大学 再生医科学研究所	教授	細胞間相互作用研究全般	H14. 11～
栗崎 知浩	同上	助教	グリア細胞産生機構	H14. 11～
若月 修二	同上	特任助手	シナプス形成	H14. 11～ H18. 10
黒原 一人	同上	博士研究員	神経分化における ADAM の役割	H14. 11～H15. 3
越前谷美智子	同上	非常勤研究員	グリア細胞産生機構	H17. 4～
飯田 敦夫	同上	COE 研究員	シナプス形成	H18. 4～
栗崎 智美	同上	産学官連携研究員	グリア細胞産生機構	H19. 4～
佐藤 文規	同上	日本学術振興会研究員	シナプス形成	H19. 4～
増田 亜紀	同上	技術員	グリア細胞産生機構	H14. 11～H17. 7
志賀 明香	同上	技術員	神経分化における ADAM の役割	H18. 4～H19. 10
高塚 志保	同上	技術員	神経分化における ADAM の役割	H19. 11～
黒田 信子	同上	技術員	シナプス形成	H18. 10～
正木 めぐみ	同上	博士過程	神経分化における ADAM の役割	H14. 11～H18. 3
橘高 大二	同上	博士過程	シナプス形成	H14. 11～H15. 3
遠藤 真輝	同上	博士過程	神経分化における ADAM の役割	H14. 11～H15. 9
横関 智一	同上	博士過程	グリア細胞産生機構	H14. 11～H19. 3
小松 紘司	同上	修士課程	シナプス形成	H14. 11～H19. 3
入江 直樹	同上	博士過程	シナプス形成	H14. 11～
湯本 法弘	同上	博士過程	シナプス形成	H14. 11～
星野 託広	同上	博士過程	グリア細胞産生機構	H14. 11～H15. 3
川本 敦司	同上	博士過程	神経分化における ADAM の役割	H18. 4～H19. 10
八藤 由之	同上	博士過程	グリア細胞産生機構	H18. 4～H19. 5
東 利圭	同上	博士過程	神経分化における ADAM の役割	H15. 4～H16. 9
篠崎 史典	同上	博士過程	シナプス形成	H17. 4～H17. 10
大西 絵理	同上	修士課程	グリア細胞産生機構	H16. 7～H18. 3
王 霄月	同上	修士課程	グリア細胞産生機構	H17. 4～H19. 3
坂口 和弥	同上	修士課程	神経分化における ADAM の役割	H18. 4～
木村 剛隆	同上	修士課程	神経分化における ADAM の役割	H18. 4～
工藤 寛明	同上	修士過程	神経分化における ADAM の役割	H19. 1～
木村 祐介	同上	修士課程	シナプス形成	H19. 4～

## 5) 細胞系譜研究グループ (一色 孝子)

研究項目：

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
一色 孝子	情報・システム研究 機構 国立遺伝学研究所	准教授	ショウジョウバエ神経幹細胞の時間 変化全般	H14. 11～
辻 拓也	同上	研究員	ショウジョウバエ神経幹細胞の休眠	H18. 4～
長谷川 恵理	同上	研究員	ショウジョウバエ神経幹細胞の特性 と時間変化	H18. 4～
岡村 勝友	同上	学振研究員	ショウジョウバエ神経幹細胞の時間 変化全般	H16. 8～H19. 6
草野 亜弓	同上	助手	ショウジョウバエ神経幹細胞の時間 変化の解析	H15. 4～H17. 3
堀内 貴之	同上	同上	同上	H17. 4～H18. 2

## 5 招聘した研究者等

該当なし

## 6 成果発表等

### (1) 原著論文発表

#### 1) 脳構築プログラム研究グループ (松崎 文雄)

(国内誌 0 件、国際誌 10 件)

1. Konno D, Shioi G, Shitamukai A, Mori A, Kiyonari H, Miyata T, Matsuzaki F. Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat Cell Biol.* **100**, 93-101 (2008) published online: 16 December 2007
2. Shirai T, Yorimitsu T, Kiritooshi N, Matsuzaki F, Nakagoshi H. Notch signaling relieves the joint-suppressive activity of Defective proventriculus in the *Drosophila* leg. *Dev Biol.* published on line on Sep 18 (2007).
3. Fujimura Y., Iwashita M., Matsuzaki F. and Yamamoto T.  
MDGA1, an IgSF molecule containing a MAM domain, heterophilically associates with axon- and muscle-associated binding partners through distinct structural domains.  
*Brain Res.* 1101,12-19. (2006).
4. Izumi, Y., Ohta, N., Hisata K., Raabe, T. and Matsuzaki, F.  
*Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization.  
*Nat. Cell Biol.* 8, 586-593 (2006).
5. Kawaguchi,A., Ogawa,M., Saito,K., Matsuzaki,F., Okano,H., Miyata,T.  
Differential Expression of Pax6 and Ngn2 Between Pair-Generated Cortical Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 78(6), 784-795(2004)
6. Izumi,Y., Ohta,N., Itoh-Furuya,A., Fuse,N. and Matsuzaki,F.  
Differential functions of G protein and Baz/aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division. *J.Cell Biol.* 164(5), 729-738 (2004)
7. Shirai T, Maehara A, Kiritooshi N, Matsuzaki F, Handa H,Nakagoshi H., Differential requirement of EGFR signaling for the expression of defective proventriculus gene in the *Drosophila* endoderm and ectoderm. *Biochem Biophys Res Commun.*, 311, 473-477(2003).
8. Fuse, N., Hisata, K., Katzen, L.A., and Matsuzaki, F., Heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size asymmetry in *Drosophila* neuroblast divisions. *Curr. Biol.*, 13, 947-954 (2003).
9. Hayashi,S., Ito,K., Sado,Y., Taniguchi,M., Akimoto,A., Takeuchi,H., Aigaki,T., Matsuzaki,F., Nakagoshi,H., Tanimura,T., Ueda,R., Uemura, T., Yoshihara,M.,and Goto,S.,GETDB, a database

compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps. *Genesis*, 34, 58-61 (2002).

10. Nakagoshi, H., Shirai, T., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F., Refinement of wingless Expression by a Wingless- and Notch-Responsive Homeodomain Protein, Defective Proventriculus. *Dev. Biol.*, 249, 44-56 (2002).

## 2) 脳細胞構築研究グループ (宮田 卓樹)

(国内誌 0 件、国際誌 13 件)

1. Tamami H, Shinohara H, Miyata T, Saito K, Nishizawa Y, Nomura T and Osumi N, Pax6 transcription factor regulates interkinetic nuclear movement in cortical progenitor cells via centrosomal stabilization. *Genes to Cell*. 12, 983-996, 2007
2. Miyata, T., Ogawa, M. Twisting of neocortical progenitor cells underlies a spring-like mechanism for daughter cell migration. *Curr. Biol*. 17, 146-151, 2007
3. Ochiai, W., Minobe, S., Ogawa, M., Miyata, T. Transformation of pin-like ventricular zone cells into cortical neurons. *Neurosci. Res.* 57, 326-329, 2007
4. Hirai, S., Cui, D.F., Miyata, T., Ogawa, M., Kiyonari, H., Suda, Y., Aizawa, S., Banba, Y., and Ohno, S. The c-jun N-terminal kinase activator dual leucine zipper kinase regulates axon growth and neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 26, 11992-12002, 2006
5. Imai, F., Hirai, S., Akimoto, K., Koyama, H., Miyata, T., Ogawa, M., Noguchi, S., Sasaoka, T., Noda, T, and Ohno, S.: Inactivation of aPKC $\epsilon$  results in the loss of adherens junctions in neuroepithelial cells without affecting neurogenesis in mouse neocortex. *Development* 133, 1735-1744, 2006
6. Muto, T., Miyata, T., Kashiwagi, S., Miyawaki, A., and Ogawa, M.: Dynamic behavior of individual cells in developing organotypic brain slices revealed by the photoconvertible protein Kaede. *Exp. Neurol.* 200, 430-437, 2006.
7. Naruse, M., Nakahira, E., Miyata, T., Hitoshi, S., Ikenaka, K., and Bansai, R: Induction of oligodendrocyte progenitors in dorsal forebrain by intraventricular microinjection of FGF-2. *Dev. Biol.* 297, 262-273, 2006
8. Zou, P., Muramatsu, H., Miyata, T., and Muramatsu, T.: Midkine, a heparin-binding growth factor, is expressed in neural precursor cells and promotes their growth. *J. Neurochem.* 99, 1470-1479, 2006

9. Miyata, T., Saito, K., Nishizawa, Y., Murayama, A., Masaoka, M., and Ogawa, M.: Modern slice culture for direct observation of production and migration of brain neurons. *Nagoya J. of Med. Sci.* 67: 65–70, 2005
10. Kawaguchi, A., Ogawa M., Saito, K., Matsuzaki, F., Okano, H., and Miyata, T.: Differential expression of Pax6 and Ngn2 between pair-generated cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 78, 784–795, 2004
11. Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., and Ogawa, M.: Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131, 3133–3145, 2004
12. Saito, K., Kawaguchi, A., Kashiwagi, S., Yasugi, S., Ogawa, M., and Miyata, T.: Morphological asymmetry in dividing retinal progenitor cells. *Develop. Growth Differ* 45, 219–229, 2003
13. Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kuramochi, H., and Ogawa, M.: Visualization of cell cycling by an improvement in slice culture methods. *J. Neurosci. Res.* 69, 861–868, 2002

### 3) 細胞移動研究グループ (大隅 典子)

(国内誌 0 件、国際誌 31 件)

1. De Pietri Tonelli D, Calegari F, Fei JF, Nomura T, Osumi N, Heisenberg CP, Huttner WB. Single-cell detection of microRNAs in developing vertebrate embryos after acute administration of a dual-fluorescence reporter/sensor plasmid.. *Biotechniques* **41(6)**, 727–732, 2006
2. Fushimi K, Osumi N, Tsukahara T. NSSRs/TASRs/SRp38s function as splicing modulators via binding to pre-mRNAs. *Genes Cells* 2005;10, 531–541.
3. Kohwi, M., Osumi, N, Rubenstein, JLR, and Alvarez-Buylla, A. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J. Neurosci.* 2005;25(30), 6997–7003.
4. Maekawa, M., Takashima, N. Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasa, S. and Osumi, N. Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis *Genes Cells* 2005;10, 1001–1014.
5. Tomita, Y., Matsumura, K., Wakamatsu, Y., Matsuzaki, Y., Shibuya, I., Kawaguchi, H., Ieda, M., Kanakubo, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., Osumi, N., Okano, H. and Fukuda, K. Cardiac neural crest cells as dormant multipotential stem cells in the mammalian heart. *J Cell Biol.* 2005;170(7), 1135–1146.
6. Arai, Y., Funatsu, N., Numayama-Tsuruta, K., Nomura, T., Nakamura, S. and Osumi, N. Role of Fabp7,



- a downstream gene of Pax6, in maintenance of neuroepithelial cells during early embryonic development of the rat cortex. *J. Neurosci.* 2005;25(42), 9752–9761.
7. Ogawa, Y., Takebayashi, H., Takahashi, M., Osumi, N., Iwasaki, Y. and Ikenaka, K. Gliogenic radial glial cells show heterogeneity in the developing mouse spinal cord. *Dev Neurosci.* 2005;27(6), 364–377.
  8. Nomura, T., Holmberg, J., Frisen, J. and Osumi, N. Pax6-dependent boundary defines alignment of migrating olfactory cortex neurons via the repulsive activity of ephrin-A5. *Development* 2006;133, 1335–1345.
  9. Kasai, K., Takahashi, M., Osumi, N., Sinnarajah, S., Takeo, T., Ikeda, H., Kehrl, J. H., Itoh, G., and Arnheiter, H. (2004). The G12 family of heterotrimeric G proteins and Rho GTPase mediate Sonic hedgehog signalling. *Genes Cells* 9, 49–58.
  10. Wakamatsu, Y., Endo, Y., Osumi, N., and Weston, J. A. (2004). Multiple roles of Sox2, an HMG-box transcription factor in avian neural crest development. *Dev Dyn* 229, 74–86.
  11. Nomura, T., and Osumi, N. (2004). Misrouting of mitral cell progenitors in the Pax6/small eye rat telencephalon. *Development* 131, 787–796.
  12. Wakamatsu, Y., Osumi, N., and Weston, J. A. (2004). Expression of a novel secreted factor, Seraf indicates an early segregation of Schwann cell precursors from neural crest during avian development. *Dev Biol* 268, 162–173.
  13. Kobayashi, K., Takahashi, M., Matsushita, N., Miyazaki, J., Koike, M., Yaginuma, H., Osumi, N., and Kaibuchi, K. (2004). Survival of developing motor neurons mediated by Rho GTPase signaling pathway through Rho-kinase. *J Neurosci* 24, 3480–3488..
  14. Takahashi, M., and Osumi, N. (2005). Identification of a novel type II classical cadherin: rat cadherin19 is expressed in the cranial ganglia and Schwann cell precursors during development. *Dev Dyn* 232, 200–208.
  15. Nagase, T., Nagase, M., Osumi, N., Fukuda, S., Nakamura, S., Ohsaki, K., Harii, K., Asato, H., and Yoshimura, K. (2005). Craniofacial anomalies of the cultured mouse embryo induced by inhibition of sonic hedgehog signaling: an animal model of holoprosencephaly. *J Craniofac Surg* 16, 80–88.
  16. Yokoo, T., Ohashi, T., Shen, J. S., Sakurai, K., Miyazaki, Y., Utsunomiya, Y., Takahashi, M., Terada, Y., Eto, Y., Kawamura, T., et al. (2005). Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 3296–3300.

17. Horie, M., Sango, K., Takeuchi, K., Honma, S., Osumi, N., Kawamura, K., and Kawano, K.: Subpial neuronal migration in the medulla oblongata of Pax-6-deficient Rats. **Eur. J. Neurosci.** **17**, 49-57, 2003
18. Yamada R, Mizutani-Koseki Y, Hasegawa T, Osumi N, Koseki H, Takahashi N.: Cell-autonomous involvement of Mab2111 is essential for lens placode development. **Development** **130**, 1759-1770, 2003.
19. Fujino M, Osumi N, Ninomiya Y, Iseki S, Shibasaki Y, Eto K.: Disappearance of epidermal growth factor receptor is essential in the fusion of the nasal epithelium. **Anat Sci Int.** **78**, 25-35, 2003.
20. Endo, Y., Osumi, N, Wakamatsu, Y.: Deltex/Dtx mediates NOTCH signaling in regulating Bmp4 expression for cranial neural crest formation during avian development. **Devel. Growth Differ.** **45(3)**, 241-248, 2003
21. Nagase, T., Sanai, Y., Nakamura, S., Asato, H., Harii, K., and Osumi, N.: Roles of HNK-1 carbohydrate epitope and its synthetic glucuronyltransferase genes on migration of rat neural crest cells. **J. Anat.** **203**, 77-88. 2003
22. Kasai, K., Takahashi, M., Osumi, N., Sinnarajah, S., Takeo, T., Ikeda, H., Kehrl, J.H., Itoh, G., Arnheiter, H.: The G12 family of heterotrimeric G proteins and Rho GTPase mediate Sonic hedgehog signaling. **Genes Cells** **9(1)**, 49-58, 2004
23. Wakamatsu, Y., Endo, Y., Osumi, N., Weston, J. A.: Multiple roles of SOX2, a HMG-box transcription factor in avian neural crest development. **Dev. Dyn.** **229**, 74-86, 2004.
24. Nomura, T., and Osumi, N.: Misrouting of mitral cells in *Pax6/Small eye* rat telencephalon. **Development** **131**, 787-796, 2004
25. Shimoda, Y., Tajima, Y., Osanai, T., Katsume, A., Kohara, M., Kudo, T., Narimatsu, H., Takashima, N., Ishii, Y., Nakamura, S., Osumi, N., & Sanai, Y.: Pax6 controls the expression of Lewis x epitope in the embryonic forebrain by regulating  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase IX expression. **J. Biol. Chem.** **277**, 2033-2039, 2002.
26. Takahashi, M. & Osumi, N.: Pax6 regulates specification of ventral neuron subtypes in the hindbrain by establishing progenitor domains. **Development** **129**, 1327-1338, 2002.
27. Hirata, T., Nomura, T., Takagi, Y., Sato, Y., Tomioka, N., Fujisawa, H., & Osumi, N.: Mosaic development of the olfactory cortex with Pax6-dependent and independent components. **Dev. Brain Res.** **136**, 17-26, 2002.

28. Endo, Y., Osumi, N., & Wakamatsu, Y.: Bimodal functions of Notch-mediated signaling are involved in neural crest formation during avian ectoderm development. *Development* **129**, 863–873, 2002.
29. Ohsaki, K., Osumi, N., and Nakamura, S.: Altered whisker patterns induced by ectopic expression of Shh and topographically represented by barrels. *Dev. Brain Res.* **137(2)**:159–70, 2002
30. Sakamaki, K., Inoue, T., Asano, M., Sudo, K., Kazama, H., Sakagami, J., Sakata, S., Ozaki, M., Nakamura, S., Toyokuni, S., Osumi, N., Iwakura, Y. and Yonehara, S.: Ex vivo whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart. *Cell Death Diff.* **9**, 1196–206, 2002.
31. Takahashi, M., Sato, K., Nomura, T., & Osumi, N.: Manipulating gene expressions by electroporation in the developing brain of mammalian embryos. *Differentiation* **70**, 155–162, 2002.

#### 4) 細胞間相互作用研究グループ (瀬原 淳子)

(国内 0 件、国際 9 件)

1. Yokozeki, T., Wakatsuki, S., Hatsuzawa, K., Black, R.A., Wada, I., Sehara-Fujisawa, A.. (2007) Meltrin  $\beta$ /ADAM19 Mediates Ectodomain Shedding of Neuregulin  $\beta$  1 in the Golgi Apparatus: Fluorescence Correlation Spectroscopic Observation of the Dynamics of Ectodomain Shedding in Living Cells. *Genes to Cells*, 12(3): 329–43
2. Dyczynska E, Sun D, Yi H, Sehara-Fujisawa A, Blobel CP, Zolkiewska A.. (2007) Proteolytic processing of delta-like 1 by ADAM proteases. *J Biol Chem.*, 282(1): 436–44
3. Tanabe, C., Hotoda, N., Sasagawa, N., Sehara-Fujisawa, A., Maruyama, K. & Ishiura, S.. (2007) ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP  $\alpha$ -secretase in A172 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 352(1):111–7.
4. Komatsu, K., Wakatsuki, S., Yamada, S., Yamamura, K., Miyazaki, J., Koni, P.A., Sehara-Fujisawa, A.. (2007) Meltrin  $\beta$  expressed in cardiac neural crest cells is required for ventricular septum formation of the heart, *Developmental Biology*, 303(1):82–92.
5. Yumoto, N., Wakatsuki, S., Sehara-Fujisawa, A.. (2005) The acetylcholine receptor  $\gamma$ -to- $\epsilon$  switch occurs in individual endplates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331: 1522–1527
6. Watabe-Uchida, M., Masuda, A., Shimada, N., Endo, M., Shimamura, K., Yasuda, K., and Sehara-Fujisawa A.. (2004) Novel Metalloprotease-Disintegrin, Meltrin  $\epsilon$  (ADAM35), Expressed in Epithelial Tissues during Chick Embryogenesis. *Dev. Dynamics*, 230: 557–568

7. Wakatsuki, S., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A.. (2004) Lipid rafts identified as locations of ectodomain shedding mediated Meltrin  $\beta$  /ADAM19 *J. Neurochemistry*, 89(1): 119-23
8. Kurohara, K., Komatsu, K., Kurisaki, T., Masuda, A., Irie, N., Asano, M., Sudo, K., Nabeshima, Y., Iwakura, Y., and Sehara-Fujisawa, A.. (2004) Essential Roles of Meltrin  $\beta$  / ADAM19 in Heart Development. *Developmental Biol.* 267: 14-28
9. Kurisaki, T., Masuda, A., Sudo, K., Sakagami, J., Higashiyama, S., Matsuda, Y., Nagabukuro, A., Tsuji, A., Nabeshima, Y., Asano, M., Iwakura, Y., Sehara-Fujisawa, A.. (2003) Phenotypic analysis of Meltrin alpha (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin alpha in adipogenesis and myogenesis. *Mol Cell Biol.* 23(1): 55-61.

## (2) その他の著作物

### 1) 脳構築プログラム研究グループ (松崎 文雄)

《英文総説》

1. Matsuzaki F, and Sampath K. Wiring the nervous system: from form to function. *Development* 134, 1819-1822. (2007).
2. Matsuzaki, F. Drosophila G-protein signalling: intricate roles for Ric-8? *Nat. Cell Biol.* 7, 1047-1049 (2005).

《和文総説》

1. 松崎文雄:神経細胞分化と非対称分裂  
蛋白質核酸酵素 50, No.6, 494, 595-600 (2005) 共立出版株式会社.
2. 泉裕士、松崎文雄:ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂における三量体Gタンパク質の役割 生化学 77 巻, 2号, みにれびゆう,(2005).
3. 松崎文雄: 特集 「解明が進む細胞極性:その仕組みと生命現象における」 巻頭言  
細胞工学 24, No.3, (2005) 秀潤社.
4. 泉裕士、松崎文雄:非対称分裂を制御する細胞極性  
細胞工学 24, No.3, 特集:解明が進む細胞極性:その仕組みと生命現象における役割 247-251(2005)  
秀潤社.
5. 松崎文雄:非対称細胞分裂:細胞の非対称から多様性を生むメカニズム  
実験医学, 21, 9, 特集:器官・形態形成から再生へ, 1182-1187(2003) 羊土社.

## 2) 脳細胞構築研究グループ (宮田 卓樹)

1. 宮田卓樹 大脳皮質形成過程における細胞動態の3次元ライブ観察 日本顕微鏡学会和文誌「顕微鏡」(2007, 印刷中)
2. Miyata T. Morphology and mechanics of daughter cells "delaminating" from the ventricular zone of the developing neocortex. *Cell Adhesion and Migration* 1: 99-101, 2007
3. Miyata, T. Asymmetric cell division during brain morphogenesis. In "Asymmetric division" (pp.121-142, Macieira-Coelho Ed.): *Progress in Molecular and Subcellular Biology* (Springer-Verlag, 2007)
4. 宮田卓樹 大脳皮質原基におけるニューロンの誕生と旅立ち *実験医学* 25, 333-337, 2007
5. 宮田卓樹 移動ニューロンの骨格と接着:神経上皮長屋の屋根裏部屋にて *蛋白質核酸酵素増刊* 51, 721-726, 2006
6. 宮田卓樹 神経上皮における細胞周期、運命決定、組織形成運動のリンク *実験医学* Vol.23 No.9 (増刊)(2005)
7. 宮田卓樹 「脳室下帯」における皮質ニューロン産生 *脳* 21 Vol.8 No.3, 2005
8. 橋本光広、宮田卓樹 小脳の縦縞状区画化と皮質形成: Purkinje 細胞の誕生日・移動・配置の分子機構 *脳の科学*, 25:543-549, 2003

## 3) 細胞移動研究グループ (大隅典子)

1. 大隅典子, 前川素子, 櫻井勝康: 統合失調症のニューロン新生障害仮説. *実験医学*, 22(16): 2312-12317, 2004
2. 沼山恵子, 新井洋子, 大隅典子: 神経新生に関与する転写因子. *実験医学増刊*, 23(1): 149-156, 2005
3. 櫻井勝康, 大隅典子: 脳の領域化と神経分化のメカニズム. *医学のあゆみ*, 212(10): 859-864, 2005
4. 高橋将文, 大隅典子: 2. 3章 神経系における細胞増殖・分化の制御「発生における細胞増殖制御」(竹内隆 岸本健雄編)(シュプリンガー・フェアラーク), pp77-85, 2004
5. 大隅典子: 「バイオ研究で絶対役立つプレゼンテーションの基本」(羊土社), 2004
6. 新井洋子, 野村 真, 大隅典子: 第6節 発生異常 Pax6 変異体「モデル動物の作製と維持」(森脇和郎, 山村研一, 米川博通編)(エル・アイ・シー), pp901-910, 2004

7. 玉井 洋, 大隅典子: 第1部 Notch シグナリング「キーワードで理解するシグナル伝達イラストマップ」(山本 雅、仙波憲太郎編)(羊土社), pp39-41, 2004
8. 前川素子、大隅典子: 第2部 神経 [1] 神経発生「キーワードで理解するシグナル伝達イラストマップ」(山本 雅、仙波憲太郎編)(羊土社), pp191-200, 2004
9. 大隅典子訳: 「心を生みだす遺伝子」(岩波書店), 2005
10. 大隅典子: 発生生物学-神経系を例として 再生医学 *Molecular Medicine*臨時増刊号 **40**, 9-17, 2003
11. 中村典子、若松義雄、大隅典子: 中枢神経系の発生と発生異常 *小児外科* **35(3)**, 292-299, 2003
12. 長瀬 敬、朝戸裕喜、波利井清紀、大隅典子: 顔面の発生における神経堤細胞の役割 *小児外科* **35(3)**, 300-307, 2003
13. 金久保佐知子、大隅典子: 神経堤症とは? *小児眼科プライマリ・ケア 月刊眼科診療プラクティス* **6(11)**, 108-109, 2003

#### 4) 細胞間相互作用研究グループ (瀬原 淳子)

1. 瀬原淳子: 形態形成における膜型 ADAM プロテアーゼの役割 エクトドメインシェディングの観点からの考察、細胞工学、秀潤社、Vol.26 No.10 pp.1131-1135 2007
2. 小松紘司、瀬原淳子: meltrin  $\beta$  と心内膜床形成、分子心血管病、先端医学社 7-2 号 2006
3. 若月修二、瀬原淳子: ADAM ファミリーとその機能、実験医学増刊号「タンパク質修飾・分解の新機能に迫る」(田中啓二、西道隆臣、編集)、22 (2): pp. 125-130 2004
4. 栗崎知浩、瀬原淳子: 発生における ADAM プロテアーゼの役割、細胞工学、22(6): 632-635 2003

### (3) 学会発表 (国際学会および主要な国内学会発表)

#### ①招待講演

##### 1) 脳構築プログラム研究グループ (松崎 文雄)

#### ①招待講演 (国内会議 16 件、国際会議 13 件)

1. Fumio Matsuzaki: Spindle orientation in neural progenitor cells and its role in neurogenesis  
JSPS-CDB Joint Meeting, RIKEN CDB Kobe, October 23-24, 2007.

2. Fumio Matsuzaki: Asymmetric choice between self-renew and differentiation in neural progenitor division. A\*STAR-RIKEN Joint Symposium, Biopolis, Singapore May 16-17 2007.
3. Fumio Matsuzaki: Asymmetric Division in Drosophila Neural Stem Cells. 23rd Radiation Biology Center International Symposium "Stem Cells and Their Chromosomes". Kyoto March 16, 2007.
4. Matsuzaki, F. Self-renewal and differentiation in Drosophila neural progenitor divisions. Temasek Lifesciences Laboratory, Singapore. May 15th, 2007.
5. Fumio Matsuzaki: Asymmetric Division in Drosophila Neural System Cells UK-APDBN Joint Meeting, Kobe, February 8, 2007
6. 泉 裕士、Thomas Raabe 松崎 文雄 : 非対称細胞分裂における、分裂軸方位の制御機構 日本分子生物学会 2006 フォーラム 名古屋 12/8 2006
7. 松崎文雄: 細胞極性に基づいた増殖と分化の制御 Joint Forum IFMS (京大再生研), IMEG (熊大発生研), CDB (理研発生・再生研) 京都 10/10、2006
8. Matsuzaki, F.: Asymmetric division of Drosophila neural progenitor cells. Department of Developmental Biology Pasteur Institute, Paris. June 29, 2006.
9. Matsuzaki, F.: Regulation of spindle orientation during asymmetric cell division. The 15th EMBO Workshop on Molecular and Developmental Biology of Drosophila, Crete, June 18-23, 2006.
10. Matsuzaki, F., Regulation of spindle orientation during symmetric and asymmetric divisions in Drosophila 平成 17 年度文部科学省科学研究費特定領域研究主催国際シンポジウム 「細胞周期制御」 名古屋、2005 年 11 月 21-22 日
11. 松崎文雄: 脳構築の遺伝的プログラム: 神経幹細胞から神経細胞の形成 戦略的基礎研究推進事業「生物の発生・分化・再生」第 4 回公開シンポジウム、東京、10/4-10/5 2005
12. 熊本大学・生命資源研究支援センター招待講演会「非対称細胞分裂: 細胞の多様性を生むしくみ」熊本大学 8/22, 2005
13. 松崎 文雄、泉 裕士: ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称細胞分裂を制御する細胞極性 第

5 回日本蛋白質科学会、福岡、6/30 2005

14. 松崎 文雄、泉 裕士、Thomas Raabe : 幹細胞の非対称分裂における分裂軸の制御機構、第 38 回日本発生生物学会大会、仙台、6/2 2005
15. 東京大学医科学研究所セミナー  
「非対称分裂：細胞の多様性を形成する仕組み」  
東京大学医科学研究所 5/16. 2005
16. 泉裕士、太田奈緒、松崎文雄：ショウジョウバエ神経幹細胞の紡錘体方向の制御機構、第 27 回日本分子生物学会年会、12/9/2004、神戸
17. Matsuzaki,F., Izumi,Y. and Fuse,N. : “Cell polarity and asymmetric division of *Drosophila* neural stem cells” , 第 77 回日本生化学会大会、10/13/2004、横浜
18. 松崎文雄、泉裕士、布施直之 : Cell polarity and asymmetric division in neurogenesis、第 27 回日本神経科学大会、9/21/2004、大阪
19. Matsuzaki,F., Fuse,N., Izumi,Y., Hisata,K., Ohta,N., Saito,M. and Yamamoto,Y. : “Asymmetric division of neuroblasts” , The Fourteenth International Workshop on the Molecular and Developmental Biology of *Drosophila*, Crete, Greece, June 20-26, 2004.
20. 松崎文雄、泉裕士、布施直之、久田香奈子 : ” Cell size asymmetry and spindle orientation in asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts” 、第 27 回日本分子生物学会、12/9/2004、神戸
21. 東京工業大学セミナー「非対称分裂：細胞の大きさと運命を制御する細胞極性」  
東京工業大学 7/16, 2004
22. Matsuzaki, F. :Asymmetric division and polarity of *Drosophila* neural stem cells, International Symposium ” Dynamics of Neural Deveopmant” , Osaka, August 10-11, 2003.
23. Matsuzaki ,F. :” Asymmetric division of *Drosophila* neural stem cells”  
ショウジョウバエ研究会 第 2 回日韓シンポジウム, 7/31~8/1, 2003 東京
24. Fuse,N., Hisata,K., Katzen,A.L., and Matsuzaki,F. : “*Drosophila* heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size in neuroblast asymmetric divisions” , CDB



Symposium 2003 “Origin and Formation of Multicellular Systems” 3/24~26/2003、神戸

25. 京都大学院医学系研究科特別コース 細胞工学・再生生物学セミナー  
「細胞の極性から発生を考える」  
京都大学再生医科学研究所 2002年9月9日
26. Matsuzaki ,F.:Asymmetric division of neural stem cells. “New Horizons in Developmantal Biology” Nobel Forum at Karolinska Institute in Stockholm, 日本学術振興会コロキウム, May 28-29, 2002
27. Matsuzaki,F.: Asymmetric cell divisions of the *Drosophila* neural stem cells. The 13 th EMBO Workshop on Molecular and Developmental Biology of Drosophila, Crete, June 23-29, 2002.
28. Matsuzaki ,F.: Asymmetric divisions of Drosophila neural stem cells,  
第 35 回日本発生生物学会・細胞生物学会合同シンポジウム Symposium” asymmetric cell divisions and cell fate decisions” Joint meeting of Japan Developmental Biology Society and Japan Cell Biology Society, Yokohama, May 22, 2002.
29. 松崎文雄：非対称細胞分裂-細胞の極性から多様性を生じるしくみ. 日本分子生物学期第 2 回春期シンポジウム. 5/13/2002, 広島

## 2) 脳細胞構築研究グループ (宮田 卓樹)

### ①招待講演 (国内会議 6 件、国際会議 7 件)

1. Takaki Miyata: Large-scale monitoring of daughter cells generated at the ventricular surface of the developing Neocortex:time-table for transcription factor expression and behavior. Neurogenesis2007 (5月15日・16日, 2007年 日本科学未来館)
2. 宮田卓樹 (名古屋大学大学院・医・細胞生物): 神経前駆細胞の極性・細胞周期・運命決定: 三次元的な知と謎: 日本分子生物学会 2006 フォーラム 名古屋国際会議場 (12月8日)
3. 宮田卓樹: 三次元培養による神経前駆細胞の観察: 極性・細胞周期・運命をみつめる第 4 回 COE リエンゾラボ研究会サマー・リトリート・セミナー (8月28日・29日 2006年 阿蘇いこいの村)
4. Takaki Miyata : Links between cell cycling, cell-fate determination, and nuclear movement of neural progenitor cells 6/21/2006 第 20 回国際生化学・分子生物学会議 国

立京都国際会館

5. Takaki Miyata: Developing cerebral wall seeks efficiency in segregation between progenitor cells and daughter neurons. 基礎生物学研究会 (3月16日・17日 2006 自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンター)
6. Takaki Miyata: Twisting of neocortical progenitor cells underlies springness-dependent daughter-cell migration. Keio University School of Medicine International Symposium(1月30日・31日, 2006)
7. Takaki Miyata: Twisting of neocortical progenitor cells underlies springness-dependent daughter-cell migration. NAIST-CDB International Symposium (12月1日～2日 2005年 奈良県新公会堂 能楽ホール)
8. Takaki Miyata: Interkinetic unclear movement in the developing brain: Linkage between cell cycling, fate determination, and somaltraslocation of neural progenitor cells. 細胞周期国際シンポジウム (11月21日～22日 2005年 愛知厚生年金会館)
9. 宮田卓樹: 前駆細胞の挙動から読み解く大脳皮質形成戦略: ニューロン産生位置に注目して 第110回日本解剖学会シンポジウム (3月29日 2005年 富山: 富山医科歯科大学)
10. Takaki Miyata: Asymmetric P/P divisions during CNS development: Their cytogenetic and histogenetic roles studied by slice culture 生理研未来開拓国際シンポジウム (11月13日 2004年 岡崎: 自然科学研究機構・生理学研究所)
11. 宮田卓樹, プルキンエ細胞の誕生・移動・配置の謎, 生理研シナプス研究会 (12月2日 2004年 岡崎: 自然科学研究機構・生理学研究所)
12. Takaki Miyata, Masaharu Ogawa: What is the neuroepithelium? Lesson from surface-dividing vs. non-surface-dividing cortical progenitor cells 国際シンポジウム (Vertebrate Neural Development) (7月22日 2004年 淡路島)
13. 宮田卓樹 Production and delivery of cortical neurons by “radial glial cells” in the developing cerebral wall 第80回日本生理学会 シンポジウム (3月25日 2003年 福岡: 福岡国際会議場)

3) 細胞移動研究グループ (大隅典子)

- ①招待講演 (国内会議18件、国際会議3件)

1. 大隅典子 脳をつくる遺伝子  
国際ゾンタエリアミーティング 仙台 H18.5.21
2. Fukuzaki, U  
The search ofr downstream target genes of Pax6, using microarray analysis  
The 9the internatinal syposium on future medial engineering based on  
bio-nanotechnology(Tohoku University 21st Century COE Programme 仙台 H19.1.9
3. 大隅典子 (東北大学大学院医学系研究科) 心を生みだす遺伝子  
第13回「脳の世紀1」シンポジウム 東京 H17.9.21
4. 大隅典子 The role of Pax6 transcription factor in cortical development NAIST-CDB  
International Symposium Frontiers in Developmental Biology 奈良 H17.12.2
5. 沼山 恵子, 大隅 典子 神経発生における転写因子 Pax6 の役割  
東京工業大学大学院生命理工学研究科 国際バイオフィォーラムシンポジウム  
分子神経科学2005 横浜 H17.12.2
6. 大隅典子 神経系構築の分子メカニズム 脳と心のメカニズム第6回冬のワークショップ  
北海道 H18.1.12
7. Osumi, N. Pax6 regulates neuronal migration via patterning the cerebral cortex  
慶應義塾大学医学部国際シンポジウム 東京 H18.1.30
8. 大隅典子、前川素子、高嶋記子、斎藤喜人、井ノ口馨  
生後における神経申請と感覚運動ゲート機構 第28回日本神経科学学会横浜 H17.7.27
9. 大隅典子  
言語の遺伝子は何を変えたか? 第7回日本進化学会 仙台 H17.8.27
10. 大隅典子  
ニューロン新生と脳のしなやかな発達 CREST 脳の機能発達と学習メカニズムの解明 第  
1回公開シンポジウム 東京 H17.11.19
11. 大隅典子: 神経発生の遺伝的プログラム. 第14回遺伝医学セミナー 2004年9月5日大阪
12. 前川素子、湯浅茂樹、大隅典子: Pax6 haploinsufficiency impairs hippocampal neurogenesis.  
Neuro2004 (第27回日本神経科学学会・第47回本神経化学大会合・同大会)

2004年9月22日大阪

13. 若松義雄：神経上皮細胞の非対称分裂時における細胞内因子の動態の解析. Neuro2004（第27回日本神経科学学会・第47回本神経化学大会合・同大会） 2004年9月22日 大阪
14. 大隅典子：ニューロン新生低下と行動異常の関連. Neuro2004（第27回日本神経科学学会・第47回本神経化学大会合・同大会） 2004年9月23日 大阪
15. 小林憲太、高橋将文、松下夏樹、宮崎純一、小池正人、八木沼洋行、大隅典子、貝淵弘三、小林和人：Rho/Rho-kinase シグナル伝達系による運動神経細胞の生存の制御 Neuro2004（第27回日本神経科学学会・第47回本神経化学大会合・同大会） 2004年9月23日 大阪
16. 大隅典子：顔面発生と神経堤細胞. 日本歯科医学会総会 2004年10月30日 横浜
17. 沼山恵子、新井洋子、船津宣雄、中村俊、大隅典子：ラット初期胚菱脳における Pax6 下流遺伝子ネットワークの網羅的解析. 日本分子生物学会第27回 2004年12月10日 神戸
18. 新井洋子、沼山恵子、新井洋子、船津宣雄、中村俊、大隅典子：Pax6 標的遺伝子 Fabp7 は神経前駆細胞の未分化性を維持する. 日本分子生物学会第27回 2004年12月13日 神戸
19. Osumi, N., Nomura, T., Inoue, T.: Boundaries in the rostral brain: how formed and how used in formation of the brain architecture. EMBO Meeting, 14 June 2003, Heidelberg
20. Osumi, N and Takahashi, M.: The role of Pax6 in specification of neurons in the hindbrain. 第26回神経科学大会、2003年7月25日、名古屋
21. 高橋将文、大隅典子：転写因子 Pax6 が制御する菱脳腹側神経上皮の区画化とニューロンサブタイプの決定、日本神経科学大会、7/8/2002、東京

#### 4) 細胞間相互作用研究グループ (瀬原 淳子)

##### ①招待講演 (国内7件、国際3件)

1. 瀬原淳子：生きた細胞内でおこる膜型増殖因子の細胞外ドメイン切断を観察する、シンポジウム「タンパク質の凝集と分解の細胞生物学 Protein aggregation and proteolysis」、第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会 (2007.5.28 福岡)
2. 瀬原淳子：形態形成・病気における ADAM ファミリーの役割、Translational medicine Seminar (2006.7.9 静岡)

3. 瀬原淳子：形態形成・疾病における役割から探る ADAM プロテアーゼの機能、大阪大学蛋白質研究所セミナー「Membrane-proximal proteolysis: 膜近傍におけるプロテオリシス研究の最先端」(2006. 2. 21 大阪)
  4. 瀬原淳子：膜型増殖因子の切断制御における ADAM プロテアーゼの役割、群馬大学生体調整研究所シンポジウム「細胞内膜輸送のダイナミクス」(2005. 11. 15 群馬)
  5. Shuji Wakatsuki, Megumi Masaki, Koji Komatsu, Norihiro Yumoto, Tomohiro Kurisaki and Atsuko Sehara-Fujisawa: Roles of Meltrins, Members of ADAM Proteases, in Development and Diseases in Plenary Session VI “Proteolysis in Development and Disease”, 4th General Meeting of the International Proteolysis Society (2005. 10. 15 Canada)
  6. 瀬原淳子：形態形成・病気における ADAM プロテアーゼメルトリンの役割と機能、第 154 回 CARD セミナー (2005. 8. 22 熊本)
  7. 瀬原淳子：形態形成における ADAM プロテアーゼの役割、臨床研 30 周年記念シンポジウム：新しい生命科学の潮流-臨床研 OB を招いて- (2005. 1. 21 東京)
  8. 瀬原淳子：形態形成における ADAM プロテアーゼの役割と機能、第 9 回病態と治療におけるプロテアーゼ とインヒビター研究会 (2004. 7. 31 愛知)
  9. Kazuto Kurohara, Koji Komatsu, Tomohiro Kurisaki, Shuji Wakatsuki, Atsuko Sehara-Fujisawa: ROLES OF MELTRIN BETA IN HEART、シンポジウム「ADAM Family」、3rd General Meeting of the International Ploteolysis Society (第3回国際蛋白分解学会) (2003. 11. 11 名古屋)
  10. Atsuko Fujisawa-Sehara: Roles of ADAMs in ErbB Signalling、Second International Workshop of the SFB549 on Signalling from the ECM to the Nucleus in Animals and Plants (2003. 2. 20 ドイツ)
- 5) 細胞系譜研究グループ (一色 孝子)
- ①招待講演 (国内会議 1 件、国際会議 0 件)
1. 一色 孝子 (国立遺伝学研究所 新分野創造センター)  
神経系における時間的な発生メカニズム  
「発生システムのダイナミクス」終了シンポジウム (2006 9. 5 掛川)
- ②口頭発表
- 1) 脳構築プログラム研究グループ (松崎 文雄)

②口頭発表（国内会議4件、国際会議0件）

1. 川口 綾乃 単一細胞の網羅的遺伝子発現プロファイルにより明らかとなった哺乳類神経前駆細胞の性質  
第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同大会 2007.9.10 横浜
2. 塩井 剛 マウス脳発生における神経前駆細胞の分裂軸制御の役割  
第28回日本炎症・再生医学会 2007.8.2 東京
3. 今野 大治郎 哺乳類脳形成における神経前駆細胞分裂軸制御の役割  
第40回日本発生生物学会 第59回日本細胞生物学会合同大会 2007.5.30 福岡
4. Matsuzaki, F., Izumi, Y and Fuse, N., : “Cell size asymmetry and spindle orientation in asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts”, The 5<sup>th</sup> UK-Japan Cell Cycle Workshop, 4/13~16/2004、奈良

2) 脳細胞構築研究グループ（宮田 卓樹）

②口頭発表（国内会議3件、国際会議1件）

1. 美濃部さやか, 宮田卓樹・落合 和 : 神経前駆細胞における Rac1 の役割日本解剖学会第66回中部支部学術集会 (10月14日・15日2006年 三重大学 三翠ホール)
2. T. Miyata <sup>1,2</sup>, K. Saito <sup>1</sup>, Y. Nishizawa <sup>1</sup>, M. Ogawa <sup>2</sup> Cell cycle-dependent and lineage-restricted expression of neurogenin2 regulates the position of mitoses in the developing cortex : Society for Neuroscience 34<sup>th</sup> Annual Meeting 口演 (10月25日2004年 サンディエゴコンベンションセンター)
3. 宮田卓樹 : 大脳皮質における組織構築戦略をスライス培養によって読み解く . CREST シンポジウム 口演 (11月11日2004年 東京 : 日本科学未来館)
4. 宮田卓樹 : 大脳皮質前駆細胞は放射状に受動的伸長されている 第27回日本分子生物学会 (12月10日2004年 神戸 : 神戸国際展示場)

3) 細胞移動研究グループ（大隅典子）

②口頭講演（国内会議9件、国際会議1件）

1. Numayama-Tsuruta, K., Arai, Y., Hoshino, M., Funatsu, N., Nakamura, S. and Osumi, N. Analysis of downregulated genes in the developing brain of Pax6 mutant rat revealed on microarrays.  
16<sup>th</sup> International Workshop on Rat Genetic Systems メルボルン H18.12.1

2. 恒川 雄二、高橋 将文、大隅 典子  
CyclinD2 mRNAおよびタンパク質の細胞内局在と神経上皮細胞のニューロン分化に対する機能についての検討  
平成18年度神経発生討論会 岡崎 H18.12.21
  3. 新井洋子、船津宣雄、野村真、中村俊、大隅典子：Pax6 下流候補遺伝子 B-FABP (fabp7)の機能解析. 日本発生生物学会第37回 2004年6月4日 名古屋
  4. 中村典子、大隅典子、若松義雄：鳥類胚神経幹細胞の非対称分裂における Transitin の細胞内局在メカニズム. 日本発生生物学会第37回 2004年6月6日名古屋
  5. 長瀬敬、吉村浩太郎、長瀬美樹、藤田敏郎、大隅典子：マウス胚神経管血管新生メカニズムの解析. 日本発生生物学会第37回 2004年6月6日 名古屋
  6. 中村典子、大隅典子、若松義雄：鳥類胚の神経幹細胞の非対称分裂の経時的観察、第36回日本発生生物学会、2003年6月11日、札幌
  7. 新井洋子、船津宣雄、中村俊、高橋将文、野村真、大隅典子：Pax6 下流候補遺伝子 B-FABP (fabp7)の同定、第36回日本発生生物学会、2003年6月13日、札幌
  8. 新井洋子、船津宣雄、中村俊、野村真、高橋将文、大隅典子：Pax6 標的候補遺伝子 B-FABP (fabp7) の発現制御解析、2003年12月12日、神戸
  9. 野村 真、大隅典子：Pax6 変異体における終脳神経細胞の移動異常の解析、第35回発生生物学会、5/21~23/2002、横浜
  10. 野村 真、大隅典子：哺乳類胚長期培養系を用いた嗅球発生機構の解析、第45回日本神経科学学会年会、7/18/2002、札幌
- 4) 細胞間相互作用研究グループ (瀬原 淳子)
- ②口頭講演 (国内7件、国際2件)
1. 瀬原淳子, 若月修二, 小松紘司, 横関智一, 宮川剛, 山村研一, 宮崎純一, 初沢清隆, 和田 郁夫：形態形成における膜型プロテアーゼメルトリン $\beta$  (ADAM19)の役割と機能、シンポジウム「形態形成を制御する細胞外環境—その未知なるもの Role of extracellular environments in development and morphogenesis」、日本分子生物学会2006フォーラム分子生物学の未来 (2006.12.6 愛知)
  2. Shuji Wakatsuki, Kazuto Kurohara, Norihiro Yumoto, Kouji Komatsu and Atsuko

- Sehara-Fujisawa : Roles of Meltrin beta (ADAM19) in the ectodomain shedding of neuregulin beta 1, a membrane anchored glial growth factor, 2005 Keystone Symposia (2005. 4. 1 USA)
3. Atsuko Sehara : Roles of ADAM proteases in Morphogenesis, Joint Forum IFMS (京大再生研), IMEG (熊大発生研), CDB (2004. 11. 22 兵庫)
  4. Kazuto Kurohara, Kouji Komatsu, Tomohiro Kurisaki, Aki Masuda, Naoki Irie, and Atsuko Sehara-Fujisawa : Essential roles of Meltrin  $\beta$  (ADAM19) in endocardial cushion development, Cardiac Development and Congenital Heart Disease, Keystone Symposia (2004. 3. 9 USA)
  5. 黒原一人、小松紘司、若月修二、富田幸子、浅野雅秀、岩倉洋一郎、鍋島陽一、瀬原淳子 : 心臓形成におけるメルトリン  $\beta$  /ADAM19の役割、シンポジウム「心臓大動脈を形づくる細胞の起源とその細胞分化」、第26回日本分子生物学会年会 (2003. 12. 10 神戸)
  6. Tomohiro Kurisaki, Kazuto Kurohara, Shuji Wakatsuki, Aki Masuda, Mitsuko Uchida, Kyoko Shirakabe, Kohji Komatsu, Masateru Endo, Naoki Irie, Norihiro Yumoto, Yoichiro Iwakura, Yo-ichi Nabeshima, Atsuko Sehara-Fujisawa : Roles of Meltrins in Morphogenesis, ワークショップ「発生・疾患にかかわるADAM・ADAMTSプロテアーゼ研究の現状」、第76回日本生化学会大会 (2003. 10. 15 神奈川)
  7. 瀬原淳子 : 細胞間シグナルを制御する ADAM プロテアーゼ、ワークショップ “Intercellular Adhesions and Signalings”、第 56 回日本細胞生物学会大会 (2003. 5. 16 滋賀)
  8. 黒原一人、栗崎知浩、若月修二、増田亜紀、白壁恭子、浅野雅秀、岩倉洋一郎、鍋島陽一、瀬原淳子 : 形態形成におけるメタロプロテアーゼディスインテグリン (ADAM) ・メルトリンの役割、ワークショップ「形態形成における細胞の移動・分化のシグナルとその制御機構」、第 25 回日本分子生物学会年会 (2002. 12. 12 神奈川)
  9. 黒原 一人, 栗崎 知浩, 白壁 恭子, 若月 修二, 増田 亜紀, 岩倉 洋一郎, 鍋島 陽一, 瀬原 淳子 : 形態形成における ADAM ファミリーの役割、第 75 回日本生化学会大会 (2002. 10. 15 京都)
- 5) 細胞系譜研究グループ (一色 孝子)
- ②口頭講演 (国内会議 1 件、国際会議 0 件)
1. 草野 亜弓 (国立遺伝学研究所 系統生物研究センター)  
ショウジョウバエ神経幹細胞系譜形成に関与する因子の探索



日本発生生物学会第37回大会 (2004. 6. 名古屋)

③ポスター発表

1) 脳構築プログラム研究グループ (松崎 文雄)

③ポスター発表 (国内会議 14 件、国際会議 4 件)

1. 塩井 剛 マウス神経発生における LGN 遺伝子の役割  
第 40 回日本発生生物学会 第 59 回日本細胞生物学会合同大会 2007. 5. 28~30 福岡
2. 川口 綾乃, 井川 智子, 粕川 雄也, 上田 泰己, 栗本 一基, 斎藤 通紀, 松崎文雄 :  
単一細胞遺伝子発現解析法を用いた、大脳神経前駆細胞の制御因子の探索、第 29 回日本神  
経科学大会、京都、7/21 2006
3. 山本 佳宏, 泉 裕士, 松崎 文雄 : ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂において運命  
決定因子の局在制御に関わる新規因子の解析、第 39 回日本発生生物学会大会、広島 6/2 2006
4. 塩井 剛、末次妙子、川口綾乃、宮田卓樹、斎藤哲一郎、松崎文雄 : タイムラプスシステム  
を用いたマウス神経前駆細胞の分裂パターンの解析  
戦略的基礎研究推進事業「生物の発生・分化・再生」第 4 回公開シンポジウム、東京 10/4-10/5  
2005
5. Matsuzaki, F.: Regulation of spindle orientation during divisions of neural stem cells  
and epithelial cells in *Drosophila*. 15th International Society of Developmental  
Biologists Congress, Sydney, September 5-6, 2005.
6. Izumi, Y., Raabe, T. and Matsuzaki, F.: Regulation of mitotic spindle orientation in  
*Drosophila* neuroblasts. The 7<sup>th</sup> Meeting of the Japanese *Drosophila* Research Conference,  
Awaji Yumebutai, July 8, 2005.
7. Yamamoto, Y., Izumi, Y. and Matsuzaki, F.: Regulation of the cell-fate determinant  
localization in *Drosophila* neuroblasts. The 7<sup>th</sup> Meeting of the Japanese *Drosophila*  
Research Conference, Awaji Yumebutai, July 8, 2005.
8. Izumi, Y., Raabe, T. and Matsuzaki, F.: Regulation of mitotic spindle orientation in  
*Drosophila* neuroblasts. 46th Annual *Drosophila* Research Conference, San Diego,  
California, March 30-April 3, 2005.
9. 塩井剛、末次妙子、川口綾乃、宮田卓樹、斎藤哲一郎、松崎文雄 : “タイムラプスシステム  
を用いたマウス神経前駆細胞の分裂パターンの解析” : 戦略的基礎研究推進事業「生物の発

生・分化・再生」第3回公開シンポジウム、11/11/2004、東京

10. Fuse N., Hisata K., Katzen, A.L. and Matsuzaki F.: “*Drosophila* heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size in neuroblast asymmetric divisions”, 44<sup>th</sup> annual *Drosophila* research conference, Chicago, USA, March 6-8, 2004.
11. Izumi Y., Ohta N., Furuya-Ito A., Saito M. and Matsuzaki F.: ” G•1 subunit of heterotrimeric G proteins is required for neuroblast asymmetric division”, 44<sup>th</sup> annual *Drosophila* research conference, Chicago, USA, March 5-9, 2004.
12. 布施直之、松崎文雄：神経発生における幹細胞の不等分裂の役割、第26回日本分子生物学会年会、12/12/2003、神戸
13. 泉裕士、太田奈緒、松崎文雄：ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂における三量体 G 蛋白質経路と Baz/DaPKC 経路の独立した機能、第26回日本分子生物学会年会、12/10/2003、神戸
14. Fuse, N., Hisata, K., Katzen, A.L., and Matsuzaki, F.: “*Drosophila* heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size in neuroblast asymmetric divisions”, ショウジョウバエ研究会第6回研究集会, 7/29~30/2003, 東京
15. Izumi, Y., Ohta, N., Furuya-Ito, A., Saito, M., and Matsuzaki, F.: ” G•1 subunit of heterotrimeric G proteins is required for neuroblast asymmetric division”, ショウジョウバエ研究会第6回研究集会, 7/29~30/2003, 東京
16. Saito, M., Izumi, Y., Igo, T., and Matsuzaki, F.: “Analysis of mutations affecting stem cell morphology”, ショウジョウバエ研究会第6回研究集会, 7/29~30/2003, 東京
17. 布施直之、久田香奈子、松崎文雄：ショウジョウバエ神経幹細胞の不均衡分裂のメカニズム、第25回日本分子生物学会年会、12/14/2002、横浜
18. 泉裕士、古屋亜佐子、太田奈緒、斉藤麻衣、松崎文雄：ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂異常突然変異のスクリーニング、第25回日本分子生物学会年会、12/11-12/2002、横浜

## 2) 脳細胞構築研究グループ (宮田 卓樹)

### ③ポスター発表 (国内会議 22 件、国際会議 4 件)

1. Takaki Miyata, Wataru Ochiai, Masaharu Ogawa: Large-scale monitoring of daughter cells

- generated at the ventricular surface of the developing neocortex: time-table for transcription factor expression and behavior. Neurogenesis2007 (5月15日・16日2007年 日本科学未来館)
2. Wataru Ochiai, Takaki Miyata: Ngn2 acts upstream of Tbr2 for neuron supply in the developing neocortex Neurogenesis2007 (5月15日・16日2007年 日本科学未来館)
  3. 田所竜介, 正岡実, 宮田卓樹: Piwi ファミリー遺伝子はマウス脳室帯に発現する 第40回日本発生生物学会大会 (5月28~30日2007年 福岡国際会議場)
  4. 落合 和, 高原大志, 宮田卓樹: 胎生期神経前駆細胞において Ngn2 は Tbr2 の発現を誘導し、ニューロン分化を促進する 第40回日本発生生物学会大会 (5月28~30日2007年 福岡国際会議場)
  5. 宮田卓樹, 落合和, 高原大志, 小川正晴: 胎生期大脳皮質壁の脳室面出誕生する娘細胞における転写因子発現のタイムテーブル Neuro2007 (9月10~12日2007年 パシフィコ横浜)
  6. 落合和, 高原大志, 宮田卓樹: 胎生期神経前駆細胞の Ngn2 は Tbr2 の発現を誘導する: Neuro2007 (9月10~12日2007年 パシフィコ横浜)
  7. 美濃部さやか, 宮田卓樹, 落合和: 胎生期大脳皮質の脳室帯において Rac1 は不均一に発現する: Neuro2007 (9月10~12日2007年 パシフィコ横浜)
  8. 西沢祐治, 今福宏司, 宮田卓樹: 神経前駆細胞が構築する脳室面構造: ステージ依存的細胞密度の変化と細胞増殖との関係: 第39回日本発生生物学会大会 (広島国際会議場 6月1日2006年)
  9. 落合 和, 伊野 学, 宮田卓樹: 胎生期脳室面における神経上皮細胞のニューロン旅立ち機構の解明: 第39回日本発生生物学会大会 (広島国際会議場 6月1日2006年)
  10. 神田理恵子, 宮田卓樹: 神経上皮細胞はいかにして極性を持つのか: 三次元培養法による解析: 第39回日本発生生物学会大会 (広島国際会議場 6月1日2006年)
  11. 美濃部さやか, 宮田卓樹: 神経前駆細胞における Rac1 の役割:
  12. 田所竜介, 宮田卓樹: Piwi 相同遺伝子はマウス脳室帯に発現する: 日本分子生物学会 2006 フォーラム (12月7日・8日2006年 名古屋国際会議場)

13. 神田理恵子, 宮田卓樹 : 神経上皮細胞はいかにして極性を持つのか : 三次元培養法による解 : 日本分子生物学会 2006 フォーラム (12月7日・8日 2006年 名古屋国際会議場)
14. 田所竜介, 宮田卓樹 Piwi 遺伝子はマウス脳室帯に発現する CREST 第5回公開シンポジウム (12月15日 2006年 品川コクヨホール)
15. 神田理恵子、宮田卓樹 : 神経上皮細胞はいかにして極性を持つのか : 三次元培養法による解析 CREST 第5回公開シンポジウム (12月15日 2006年 品川コクヨホール)
16. 宮田卓樹 : 大脳皮質形成が「バネ力」を利用する可能性 : 神経前駆細胞の突起はよじれているか? 第38回日本発生生物学会 ポスター発表 (6月2日 2005年 仙台 : 仙台国際センター)
17. 宮田卓樹, 正岡 実, 伊藤佳永、小川隼人, 宮崎史子、横山和正, 田崎加奈子、西沢祐治、今福宏司 小川正晴 : 小脳プルキンエ細胞の誕生と移動 : スライス培養法による観察 : 第28回日本神経科学大会 (7月26日 2005年 横浜 : パシフィコ横浜)
18. 宮田卓樹、西沢祐治、今福宏司 : 大脳皮質前駆細胞の形態と力学的特性 : 「生物の発生・分化・再生」H17年シンポジウム(10月4日・5日 2005年 コクヨホール)
19. 宮田卓樹 : 大脳皮質ニューロン移動に「バネの力」が使われる可能性 : 神経前駆細胞の突起はよじれかつ、引っ張られている : 日本生物物理学会第43回年会 (11月23日~25日 2005年 札幌コンベンションセンター)
20. 宮田卓樹 : 脳室面か非脳室面か : 大脳皮質前駆細胞の分裂位置決定の細胞社会学的意義と分子機構 : 日本発生生物学会 (6月5日 2004年 名古屋 : 名古屋国際会議場)
21. Takaki Miyata: Asymmetric Production of Surface-dividing and Non-Surface-Dividing Cortical Progenitor Cells: What Induces paired mitotic daughter Cells to Stay or Go? 第16回国際解剖学会 (8月25日 2004年 京都 : 京都国際会議場)
22. 宮田卓樹, 齋藤加奈子, 小川正晴 : 大脳皮質原基の非脳室面分裂細胞は、脳室面で生まれ、細胞周期進行中に脳室面離脱離脱を決める : 第27回日本神経科学会 (9月25日 2004年 大阪 : 大阪国際会議場)
23. 宮田卓樹, 齋藤加奈子, 小川正晴 : スライス培養によるマウス大脳及び網膜神経幹細胞の分裂様式の解析 CREST シンポジウム ポスター発表 (5月30日 2003年 東京 : 日本科学未来館)

24. 齋藤加奈子, 川口綾乃, 柏木佐織, 八杉貞雄, 小川正晴, 宮田卓樹: ニワトリ胚網膜における ganglion neurons 前駆細胞の形態的非対象分裂: 第36回日本発生生物学会 ポスター発表 (6月11日2003年 札幌: 札幌コンベンションセンター)
25. 川口綾乃, 小川正晴, 齋藤加奈子, 松崎文雄, 岡野栄之, 宮田卓樹: Asymmetric retention of Pax6 and Ngn2 in clonally generated cortical neuron pairs in vitro. 第26回日本神経科学大会 ポスター発表 (7月24日 2003年 名古屋: 名古屋 国際会議場)
26. 宮田卓樹, 川口綾乃, 齋藤加奈子, 小川正晴 Slice culture reveals that "Symmetric" (Progenitor → progenitor + progenitor) divisions in the mammalian neuroepithelium are morphologically asymmetric and can even be asymmetric in cell output 第1回 CDB(理研発生再生研)シンポジウム ポスター発表 (3月24日2003年 神戸: ポートピアホテル)

### 3) 細胞移動研究グループ (大隅典子)

#### ③ポスター発表 (国内会議 27 件、国際会議 23 件)

1. Takahashi, M., Tsunekawa, Y. and Osumi, N.  
The subcellular localization of CyclinD2 protein in the mammalian neuroepithelial cells  
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress Kyoto. H18.6.20
2. Fukuzaki, U., Nomura, T. and Osumi, N.  
The role of Dmrt4 in mammalian brain development.  
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress Kyoto. H18.6.20
3. Numayama-Tsuruta, K., Arai, Y., Hoshino, M., Funatsu, N., Nakamura, S. and Osumi, N.  
Analysis of the Pax6-binding enhancer element of Fabp7, the most down-regulated gene in the developing brain of Pax6 mutant rat revealed on microarrays  
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress Kyoto. H18.6.20
4. Fukuzaki, U. and Osumi, N.  
Identification of Dmrt4 as a downstream target of Pax6.  
16th International Workshop on Rat Genetic Systems メルボルン H18.12.1
5. Tsunekawa, Y., Takahashi, M. and Osumi, N

- The localization of CyclinD2 mRNA and protein in endfeet of neuroepithelial cells during murine neurogenesis  
Spring 2007 meeting a joint meeting of The Genetics society, The British Society for Developmental Biology and The British Society of Cell Biology Edinburgh H19.3.30
6. Takahashi, M. and Osumi, N.  
Expression analysis of cadherin7 and cadherin20 in the Pax6 mutant rat hindbrain: Pax6 is required for proper expression of cad7 and establishment of rhombomere boundaries  
Spring 2007 Meeting a joint meeting of The Genetics society, The British Society for Developmental Biology and The British Society of Cell Biology Edinburgh H19.3.31
  7. Fukuzaki, U., Nomura, T. and Osumi, N.  
Identification of Dmrt4 as a downstream target of Pax6.  
日本発生生物学会第39回大会 広島 H18.6.1
  8. 恒川雄二、高橋将文、大隅典子  
哺乳類神経上皮細胞における CyclinD2mRNA およびタンパク質の細胞内局在様式の解析  
日本発生生物学会第39回大会 広島 H18.6.2
  9. Tsunekawa, Y., Takahashi, M. and Osumi, N  
Analysis of subcellular localization of CyclinD2 mRNA and protein in mammalian neuroepithelial cells  
The 9th international symposium on future medical engineering based on bio-nanotechnology(Tohoku University 21<sup>st</sup> Century COE Programme 仙台 H19.1.9
  10. Takahashi, M. and Osumi, N.  
Live imaging of neuroepithelial cells in the rat spinal cord and hindbrain by confocal laser-scanning microscopy  
The 9th international symposium on future medical engineering based on bio-nanotechnology(Tohoku University 21st Century COE Programme 仙台 H19.1.9
  11. Numayama-Tsuruta, K. and Arai, Y. and Osumi, N  
The rat Small eye homozygote (rsey2/rsey2) can be regarded as a Pax6 null mutant  
The 9th international symposium on future medical engineering based on bio-nanotechnology(Tohoku University 21st Century COE Programme 仙台 H19.1.9
  12. Shinohara, H.

Pax6 transcription factor is required for interkinetic nuclear migration in the developing cerebral cortex

The 9th international symposium on future medical engineering based on bio-nanotechnology (Tohoku University 21st Century COE Programme 仙台 H19.1.9

13. Kanakubo, S. Nomura, T. Wakamatsu, Y. Shimazaki, T. Okano, H. Tamai, M. and Osumi, N. Developmental contributions and a stem cell-like character of neural crest-derived cells in murine eye structure CDB Symposium 2005 神戸 H17.4.11
14. 前川素子、湯浅茂樹、大隅典子 海馬神経新生における転写因子 Pax6 の役割 第三回幹細胞シンポジウム 淡路島 H17.4.22
15. Arai, Y. and Osumi, N. The role of Fabp7, a downstream target of Pax6, in maintenance of neuroepithelial cells during cortical development Cortical Development Santorini H17.5.13
16. 高橋将文、大隅典子 コンフォーカルレーザー顕微鏡によるラット神経管神経上皮細胞のライブイメージング解析 第2回東北大学バイオサイエンスシンポジウム 仙台 H17.5.16
17. 野村真、大隅典子 哺乳類と鳥類における終脳背側領域の発生様式の比較解析 日本発生生物学会第38回大会 仙台 H17.6.3
18. H. Tamai, T. Miyata, K. Saito, Y. Nishizawa, T. Nomura, N. Osumi Pax6 transcription factor is required for interkinetic nuclear migration in the developing cerebral cortex 6th International Symposium on Future Medical Engineering based on Bio-nanotechnology (21st Century COE Program) 仙台 H17.11.21
19. 前川素子、湯浅茂樹、大隅典子：生後脳海馬神経新生における幹細胞シンポジウム。2004年4月26日 東京
20. 長瀬敬、吉村浩太郎、長瀬美樹、藤田敏郎、大隅典子：Sonic Hedgehog シグナル阻害マウス胚における神経管内血管新生の異常。日本炎症再生学会 2004年
21. 酒井大輔 田中靖子、遠藤幸徳、大隅典子、岡本治正、若松義雄：神経堤形成過程における Slug 遺伝子の発現制御メカニズム。日本発生生物学会第37回 2004年6月5日 名古屋
22. 若松義雄、大隅典子、James A. Weston：シュワン細胞で特異的かつ一過的に発現する新規分泌因子をコードする遺伝子、Serf の発現と機能。日本発生生物学会第37回

2004年6月5日名古屋

23. 松田佳昌、福田公子、若松義雄、八杉貞雄：ニワトリ胚胃上皮の細胞分化における Notch シグナルの機能解析. 日本発生生物学会第 37 回 2004 年 6 月 5 日名古屋
24. 小林憲太、高橋将文、松下夏樹、宮崎純一、小池正人、八木沼洋行、大隅典子、貝淵弘三、小林和人：脊髄運動神経細胞の生存における Rho GTPase シグナル伝達系の役割. 戦略的創造研究推進事業 (CREST/SORST) Joint Symposium “脳神経科学の最先端 2004” 2004 年 10 月 6 日 東京
25. 沼山恵子、新井洋子、船津宣雄、中村俊、大隅典子：ラット初期胚神経管のマイクロアレイ遺伝子発現解析による Pax6 下流因子の網羅的探索「生物の発生・分化・再生」研究領域 第 3 回公開シンポジウム 2004 年 11 月 11 日 東京
26. 高橋将文、若松義雄、大隅典子：ラット・ニワトリ胚神経系における cadherin 7, 19 遺伝子の発現様式の比較. 日本分子生物学会第 27 回 2004 年 12 月 10 日 神戸
27. 金久保佐知子、野村真、若松義雄、大隅典子：成体マウス眼組織を構成する神経堤由来細胞の特性の検討. 日本分子生物学会第 27 回 2004 年 12 月 9 日 神戸
28. 金久保佐知子、野村真、若松義雄、島崎琢也、岡野栄之、玉井信、大隅典子：成体マウス虹彩組織への神経堤由来細胞の寄与とその幹細胞的特性の検討. 日本眼科学会総会 2005 年 3 月 26 日 京都
29. Tamai, H., Miyata, T., Saito, K. and Osumi, N.: Pax6 transcriptional factor is involved in interkinetic nuclear migration in the developing cerebral cortex. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2004 年 4 月 29 日 Fort Lauderdale
30. Matsuda, Y., Fukuda, K., Wakamatsu, Y. and Yasugi, S.: Notch signaling regulates epithelial cell differentiation during the gland formation in the chicken stomach. 13th The Conference of the International Society of Differentiation. 2004 年 9 月 7 日 Honolulu
31. Wakamatsu, Y., Sakai, D., Fukusaki, U. and Osumi, N.: Patterning of embryonic ectoderm and induction of neural crest formation. 13th The Conference of the International Society of Differentiation. 2004 年 9 月 8 日 Honolulu
32. Arai, Y., Nomura, T. and Osumi, N.: Identification and functional analysis of fabp7



- as a target gene of Pax6. 4th Forum of European Neuroscience 2004年7月11日 Lisbon
33. Maekawa, M. and Osumi, N.: Pax6 promotes postnatal neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus. 4th Forum of European Neuroscience 2004年7月13日 Lisbon
  34. Nomura, T. and Osumi, N.: Impaired neuronal migration patterns in the Pax6 mutant telencephalon. 4th Forum of European Neuroscience 2004年7月13日 Lisbon
  35. Kobayashi, K., Takahashi, M., Matsushita, N., Miyazaki, JI., Koike, M., Yaginuma, H., Osumi, N., Kaibuchi, K and Kobayashi, K.: Survival of developing motor neurons mediated by Rho/Rho-kinase signaling Pathway. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting 2004年10月27日 San Diego
  36. 野村真、大隅典子：哺乳類嗅球発生における Pax6 遺伝子の機能解析、CREST 生物の発生・分化・再生 第2回公開国際シンポジウム、2003年5月30日、東京
  37. 玉井洋、宮田卓樹、齋藤加奈子、大隅典子：Pax6 遺伝子変異ラット胚における神経上皮細胞のエレベーター運動の異常、第36回日本発生生物学会、2003年6月11日、札幌
  38. 野村真、大隅典子：哺乳類嗅覚中枢の発生における Pax6 遺伝子の役割、2003年6月12日、札幌
  39. 若松義雄、酒井大輔、遠藤幸徳、大隅典子：鳥類胚において Sox2 は神経堤の形成を抑制する、第36回日本発生生物学会、2003年6月13日、札幌
  40. 酒井大輔、遠藤幸徳、大隅典子、若松義雄：神経堤細胞の形成過程における Slug 遺伝子の発現制御メカニズム、第36回日本発生生物学会、2003年6月13日、札幌
  41. 前川素子、高嶋紀子、井ノ口馨、大隅典子：Impaired cell proliferation in the dentate gyrus in Pax6 heterozygous mutant rat. 第26回神経科学大会、2003年7月24日、名古屋
  42. 高橋将文、大隅典子：胎生期ラット神経系における Cadherin-7, 19, 20 遺伝子の発現様式の解析、第26回日本分子生物学年会、2003年12月12日、神戸
  43. Osumi, N., Takashima, N., Ikegami, S., Maekawa, M., Inokuchi, K.: Small eye rat: a model for schizophrenia. Cold Spring Harbor Meeting on Rat Genomics and Models. 2003年12月12日、Cold Spring Harbor, USA

44. 新井洋子、船津宣雄、中村 俊、大隅典子：DNA マイクロアレイを用いた Pax6 下流候補遺伝子の網羅的探索、第 35 回発生生物学会、5/21~23/2002、横浜
45. 若松義雄、中村典子、大隅典子：鳥類胚の神経系未分化細胞の非対称分裂に関する中間径フィラメント、TRANSITIN、第 35 回発生生物学会、5/21~23/2002、横浜
46. 酒井大輔、遠藤幸徳、大隅典子、若松義雄：神経堤細胞の形成に関する転写制御群の相互関係の解析、第 35 回発生生物学会、5/21~23/2002、横浜
47. Nomura Tadashi., Osumi Noriko. : impaired migration of the olfactory bulb neurons in the Pax6 mutant、3rd Forum of European Neuroscience. 7/15/2002、Paris
48. Takahashi Masanori., Osumi Noriko. : Pax6 Regulates Specification of Ventral Neuron Subtypes in the Hindbrain by Establishing Progenitor Domains. 3rd Forum of European Neuroscience. 7/16/2002、Paris
49. Osumi, N.,., Takashima, N., Ikegami, S., Watanabe, Y.,., Inokuchi, K. : Fear sensing and sensorimotor gating abnormalities in Pax6 mutant rats. 3rd Forum of European Neuroscience. 7/16/2002、Paris
50. 高橋将文、大隅典子：転写因子 Pax6 が制御する菱脳腹側神経上皮の区画化と神経細胞サブタイプの決定、戦略的基礎研究「脳を知る」合同シンポジウム、11/25/2002、京都

4) 細胞間相互作用研究グループ (瀬原 淳子)

③ポスター発表 (国内 10 件、国際 2 件)

1. Kouji Komatsu, Shuji Wakatsuki, Norihiro Yumoto, Shu-ichi Yamada, Ken-ichi Yamamura, Jun-ichi Miyazaki, Pandelakis A. Koni, Atsuko Sehara-Fujisawa : Meltrin $\beta$  expressed in cardiac neural crest cells is required for ventricular septum formation of the heart.、21世紀COEプログラム「融合的移植再生治療を目指す国際拠点形成」平成19年度国際シンポジウム「Integration of Transplantation Therapy and Regenerative Medicine」(2007. 6. 29 京都)
2. Atsuko Sehara-Fujisawa : Observation of ectodomain shedding of membrane-anchored growth factors in living cells、Gordon Research Conference -Matrix Metalloproteinases- (2007. 6. 3 Italy)
3. Kouji Komatsu, Shuji Wakatsuki, Shu-ichi Yamada, Ken-ichi Yamamura, Jun-ichi Miyazaki, Pandelakis A. Koni, Atsuko Sehara-Fujisawa : Meltrin $\beta$  expressed in cardiac neural

- crest cells is required for ventricular septum formation of the heart. UK-APDBN Joint Meeting on Development and the Emergence of Function in the Nervous System (2007. 2. 8 兵庫)
4. 若月修二, 小松紘司, 湯本法弘, 瀬原淳子: 末梢神経再生過程における膜型メタロプロテアーゼメルトリン $\beta$ の機能、日本分子生物学会 2006 フォーラム分子生物学の未来 (2006. 12. 7 愛知)
  5. Kouji Komatsu, Shuji Wakatsuki, Shuichi Yamada, Kenichi Yamamura, Jun-ichi Miyazaki, Pandelakis A Koni, Atsuko Sehara-Fujisawa: Meltrin  $\beta$  expressed in cardiac neural crest cells is required for ventricular septum formation of the heart, 日本分子生物学会2006フォーラム分子生物学の未来 (2006. 12. 7 愛知)
  6. Tomoichi YOKOZEKI, Shuji Wakatsuki, Kiyotaka Hatsuzawa, Black Roy, Ikuo Wada, Atsuko Sehara: Meltrin beta/ADAM19 Mediates Ectodomain Shedding of Neuregulin beta1 in the Golgi Apparatus: Fluorescence, Correlation Spectroscopic Observation of the Dynamics of Ectodomain Shedding in Living Cells, 日本分子生物学会2006フォーラム分子生物学の未来 (2006. 12. 6 愛知)
  7. 湯本法弘、若月修二、瀬原淳子: 骨格筋型AchRサブユニット変換を指標とした筋成熟機構の解析とin vitroにおける解析系の確率: 第26回日本分子生物学会年会 (2003. 12. 12 神戸)
  8. 小松紘司、黒原一人、若月修二、岩倉洋一郎、瀬原淳子: 心臓の形態形成におけるMeltrin  $\beta$ /ADAM19の機能解析、第26回日本分子生物学会年会 (2003. 12. 12 神戸)
  9. Kazuto Kurohara, Tomohiro Kurisaki, Aki Masuda, Shuji Wakatsuki, Yo-ichi Nabeshima, Yoichiro Iwakura, and Atsuko Fujisawa-Sehara: ROLES OF MELTRIN BETA/ADAM19 IN HEART DEVELOPMENT、第1回CDBシンポジウム-The Origin and Formation of Multicellular Systems (2003. 3. 25 神戸)
  10. 内田光子、増田亜紀、島田直子、遠藤真輝、嶋村健児、安田國雄、瀬原淳子: 新規 ADAM 遺伝子メルトリン $\epsilon$ のクローニングとその解析、第25回日本分子生物学会年会 (2002. 12. 11 神奈川)
  11. 黒原一人、栗崎知浩、増田亜紀、浅野雅秀、須藤カツ子、鍋島陽一、岩倉洋一郎、瀬原淳子: メルトリン $\beta$ /ADAM19 遺伝子の機能解析、第25回日本分子生物学会年会 (2002. 12. 11 神奈川)

12. 若月修二、栗崎知浩、瀬原淳子：脂質ラフトにおける膜型メタロプロテアーゼ Meltrin $\beta$ の機能、第25回日本分子生物学会年会（2002.12.11 神奈川）

5) 細胞系譜研究グループ（一色 孝子）

③ポスター発表（国内会議3件、国際会議2件）

1. 辻 拓也、一色孝子（国立遺伝学研究所 新分野創造センター）

ショウジョウバエ神経幹細胞の時間変化と休眠

第5回幹細胞シンポジウム（2007. 5. 18 淡路）

2. 辻 拓也（国立遺伝学研究所 新分野創造センター）

ショウジョウバエ神経幹細胞の時間変化と休眠

平成18年度神経発生討論会(2006. 12. 20 岡崎)

3. Takako Isshiki, Kusano Ayumi (National Institute of Genetics)

Aging of Neuroblast at late stages of embryogenesis and in larvae.

46<sup>th</sup> Annual Drosophila Conference (2004.4.1 San Diego)

4. Takako Isshiki, Katsutomo Okamura, Kusano Ayumi: (National Institute of Genetics)

Temporal change of *Drosophila* neural progenitors.

Keystone Symposia “Stem Cell” (2005.3.29 Whistler)

5. 草野 亜弓、一色 孝子（国立遺伝学研究所 系統生物研究センター）

ショウジョウバエ神経幹細胞に内在する時間的発生プログラムの解明

第26回日本分子生物学会年会（2003. 12. 神戸）

#### (4) 特許出願

該当なし

#### (5) 受賞等

①新聞報道

2)脳細胞構築研究グループ(宮田 卓樹)

H19.1.23 毎日新聞(全国), 朝日新聞(中京・東海), 中日新聞に, 論文発表内容の紹介記事.

#### (6) その他特記事項

該当なし

## 7 研究期間中の主な活動

### ワークショップ・シンポジウム等

#### 1) 脳構築プログラム研究グループ(松崎 文雄)

1. 第8回日本ショウジョウバエ研究集会 オーガナイザー:松崎 文雄  
(2007.7.2~7.4 淡路夢舞台)

#### 2) 脳細胞構築研究グループ(宮田 卓樹)

##### 「地域科学技術理解増進活動推進事業」

2007年7月31日と8月2日の両日, 科学技術振興機構による同事業の採択企画の一つとして, 「培養技術を使って体ができるしくみの謎にせまる」と題する研究室公開・体験学習を開催しました。高校生4人・中学生5人・小学生8人(名古屋市10人を含む愛知県16人, 三重県1人)の合計17人が, 2日とも2時間(合計6回)のコースに参加しました。

#### 4)細胞間相互作用研究グループ (瀬原 淳子)

1. ワークショップ“Intercellular Adhesions and Signalings”(オーガナイザー:瀬原淳子、長瀬昭良)、第 56 回日本細胞生物学会大会(2003.5.16 滋賀)
2. ワークショップ「発生・疾患にかかわる ADAM・ADAMTS プロテアーゼ研究の現状」(オーガナイザー宮田敏行、瀬原淳子)、第 76 回日本生化学会大会(2003.10.15 神奈川)
3. シンポジウム「ADAM Family」、3rd General Meeting of the International Proteolysis Society(第 3 回国際蛋白分解学会)(招待オーガナイザー:瀬原淳子(2003.11.11 名古屋))
4. ワークショップ「高次生命現象を支える ECM 環境と細胞のクロストーク」(オーガナイザー:西脇清二、瀬原淳子)、第 27 回日本分子生物学会年会(2004.12.10 兵庫)
5. Development and Diseases in Plenary Session VI “Proteolysis in Development and Disease”、4th General Meeting of the International Proteolysis Society(招待オーガナイザー:瀬原淳子)(2005.10.15 Canada)
6. シンポジウム「形態形成を制御する細胞外環境—その未知なるもの Role of extracellular environments in development and morphogenesis」(オーガナイザー:瀬原淳子、西脇清二)、日本分子生物学会2006フォーラム分子生物学の未来(2006.12.6 愛知)

(海外から招聘した研究者等)

1. Carl P. Blobel (Professor, Arthritis and Tissue Degeneration Program and Departments of Medicine and Physiology & Biophysics, Hospital for Special Surgery, Weill Medical College of

Cornell University) (2006.6.21)

2. Steven J. Burden (Professor & Coordinator, Molecular Neurobiology Program, Skirball Institute, NYU Medical School) (2007.3.26)

## 8. 結び

本研究プロジェクトは脳の構築の基本原理を明らかにすることを目標としてすすめられた。モデル動物として理解の進んでいるショウジョウバエの知見を発展させることを基盤として、哺乳類にも共通な原理と固有なメカニズムを求めるという戦略を採用した。ショウジョウバエの神経幹細胞の非対称分裂の様式は、哺乳類においても皮膚の幹細胞や免疫系の細胞で同様なメカニズムが働いていることが最近実証されており、私たちの研究成果も大いに貢献していると考えている。他方、哺乳類の脳の発生の中でもっとも基本的なステップである幹細胞から神経細胞が生じるメカニズムに関しては10年前に提出された古いドグマが通用していたが、本研究でそれが誤りであることが示された。このように基本的な事柄に関して、既成概念が覆ってしまったことは我々にとっても驚きであり、本研究プロジェクトの最大の成果の一つであろう。古い概念を打ち崩した後には、新しいモデルを創出する作業が待っている。そして、それを様々な角度から検証し、正しい理解に到達することが今後の私たちの大きな目標のひとつである。



独立行政法人 理化学研究所 発生・再生科学総合センター 非対称細胞分裂研究グループ