

大脳新皮質の層形成とリーリンクスケード
：リーラーフェノタイプ動物を用いて

神戸大学医学部教授

寺島俊雄

1 研究の背景と目的

研究の背景

正常マウスの大脳皮質の発生は、深層ほど発生初期に生まれた細胞で占められるが、リーラーマウスは、表層ほど発生初期に生まれたニューロンで占められる。その結果、リーラーマウスの大脳皮質は逆転する（図1）。1995年にリーラーマウスの原因遺伝子リーリンが単離され、その構造が決定されたことにより、リーリン遺伝子がコードするリーリン蛋白の分子構造（図2）や大脳皮質におけるリーリン産生細胞（カハール・レチウスニューロン）が明らかとなった。しかしリーリン蛋白が欠如すると、何故、大脳皮質が逆転するか依然として不明である。最近、リーリン遺伝子の発現は正常であるが、リーラーフェノタイプを示すミュータント系統（スクランブラー、ヨタリ、SRKラット）が多数発見された。これらのリーラーフェノタイプ動物脳組織の組織構築や遺伝子解析をすることにより、リーリン蛋白の細胞生物学的意義や、リーリン蛋白により調節を受ける物質群の全貌が明らかとなることが期待される。実際、ヨタリマウス、スクランブラーマウスの研究から両ミュータントの原因遺伝子がmdab-1であることがわかった。mdab-1蛋白は、非受容体型チロシンキナーゼ（Src, Fyn）に結合するアダプター蛋白であり、cdk-5 を介して細胞内骨格の制御を行っていると考えられる。興味あることに、Fyn やcdk-5 のノックアウトマウスの大脳皮質の細胞構築もリーラーフェノタイプを示す。このようにリーラーフェノタイプ動物を研究することにより、リーリンおよびリーリン受容体の下

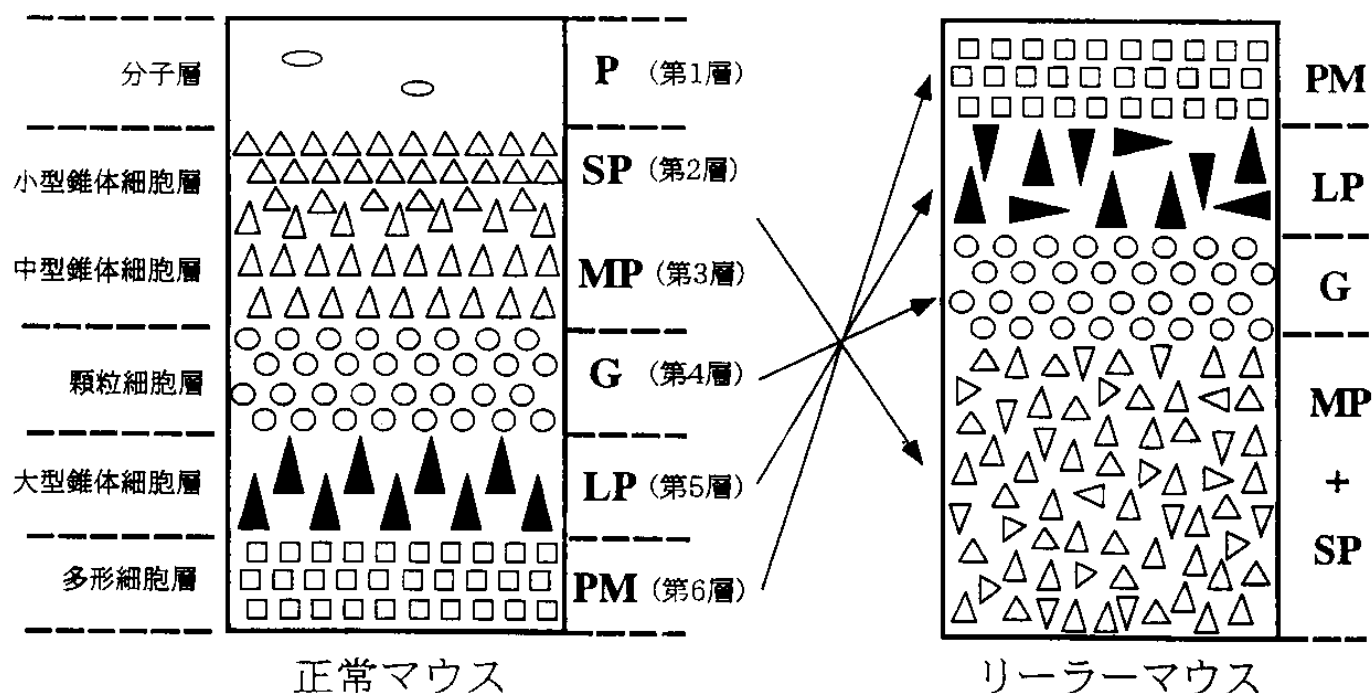


図1 リーラー大脳皮質の細胞構築

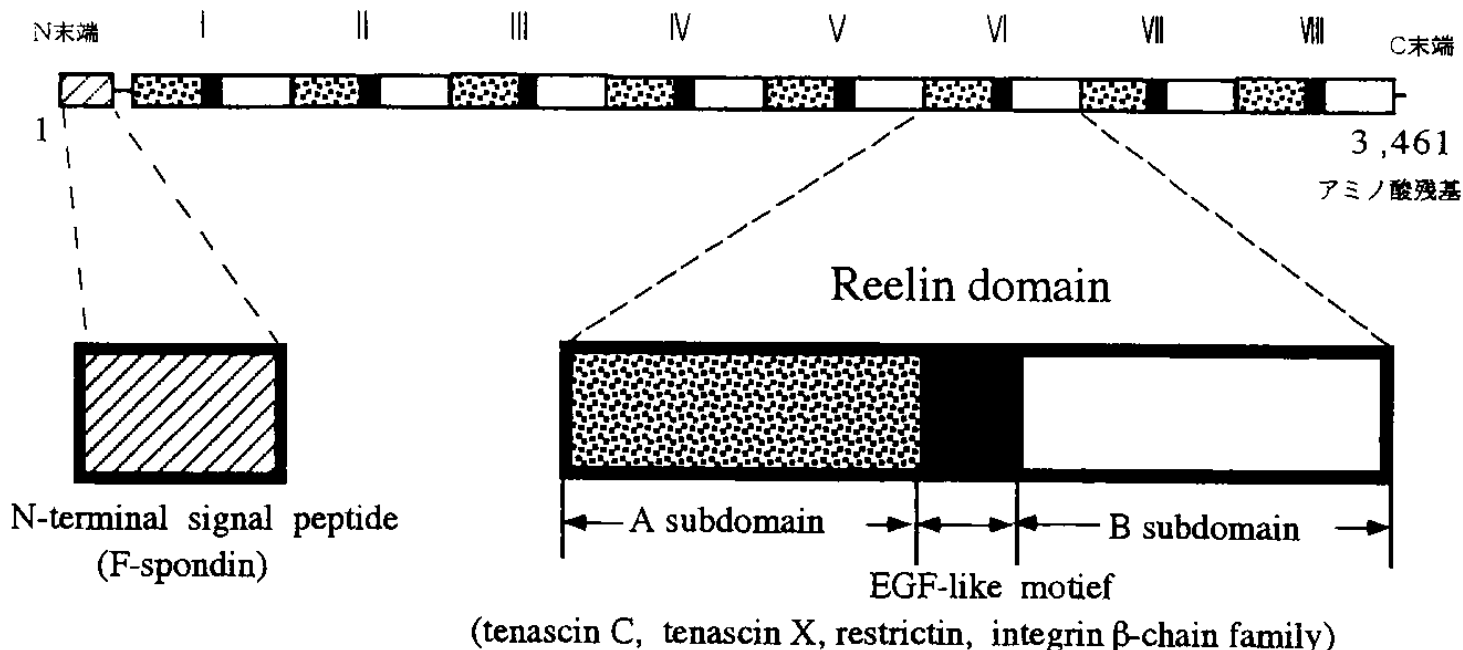


図2 リーリン蛋白の構造

流のシグナル伝達系分子が明らかとなり、いわばリーリンカスケードともいべき新しい情報伝達系が提唱されている（図3）。しかし、リーリン受容体自体は未発見であり、またリーリンとmdab1蛋白をつなぐ分子群も同定されていない。またリーリンと受容体の間に介在するコファクターの存在（Rカドヘリン）も予測されているが、その詳細は不明である。結局のところ、リーリンカスケードを構成する分子群の詳細は全く不明であるといわざるを得ない。リーリンカスケードのミッシングリングを解くためには、種々のリーラーフェノタイプ動物におけるリーリンやFyn、Src、mdab-1等の関連蛋白の発現を調べたり、その原因遺伝子を明らかにすることは重要であり、本研究を構想するに至った。

研究の目的

大脳新皮質は哺乳類において初めて出現し、6層構造を形成するが、この層形成のメカニズムを知る上でリーラーマウスの果たした役割は大きい。本研究は、さまざまなリーラーフェノタイプ動物を用いて、リーリンカスケードに属する未知の物質を追求するとともに、既知のリーラーフェノタイプ動物原因遺伝子産物の大脳皮質における局在を形態学的に調べ、大脳皮質形成におけるリーリンカスケード分子群の機能的意義を明らかにすることを目的とする。

2 研究方法・研究内容

（実験）

1) 大脳皮質の細胞構築の研究（神経回路網の側面から）

ジャクソン・リーラー、オレルアン・リーラー、ヨタリ、SRKラットのヘテロ親を交配し、ホモ個体を得た。生後21日にこれらのホモ個体の脊髄、視床腹外側核、反対側運動野にFast Blue、Diaminido Yellow、

細胞内

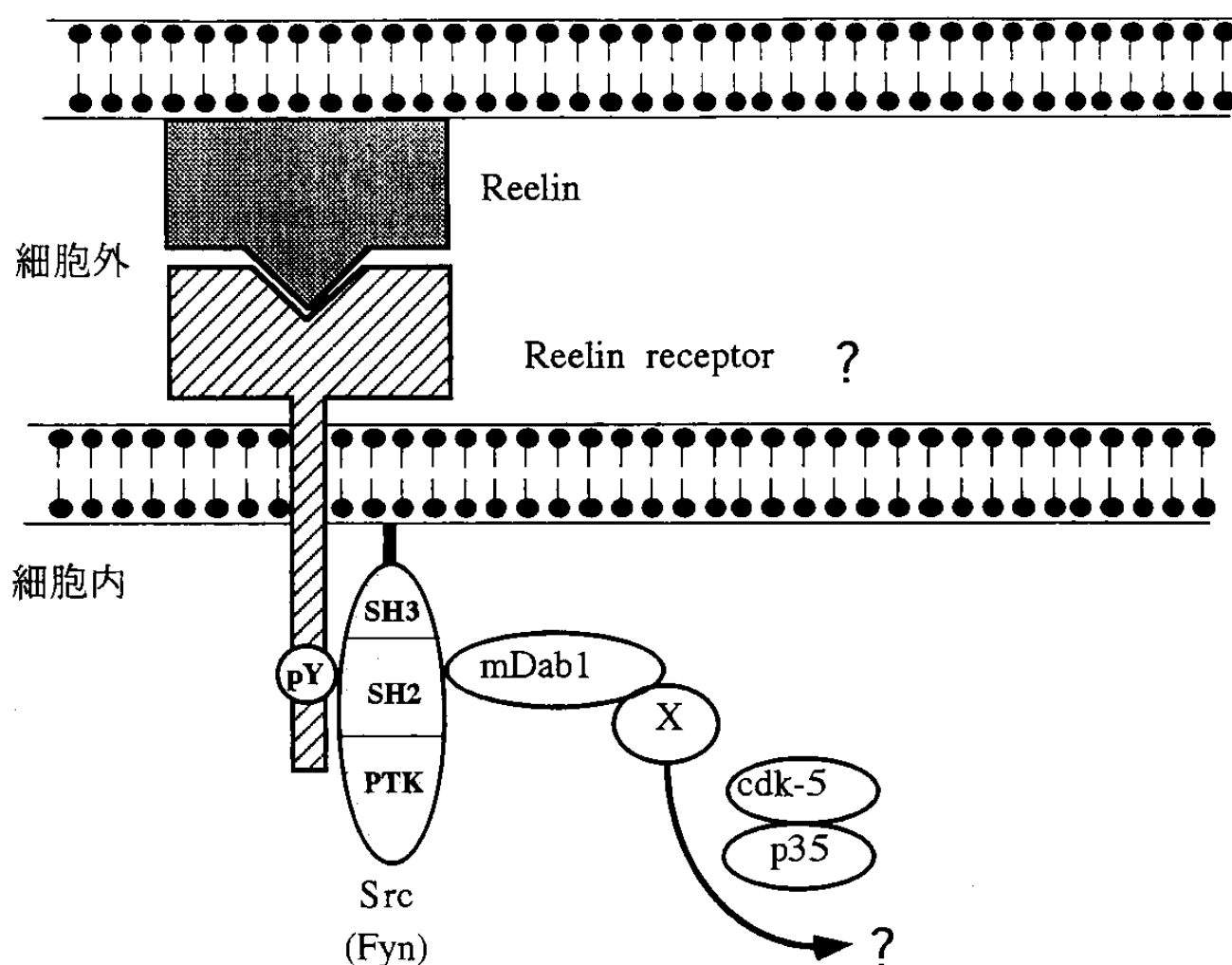


図3 リーリン カスケード モデル

Dextran Amine を注入し、それぞれ皮質脊髓路、皮質視床投射路、脳梁交連線維系ニューロンを逆行性に標識して、それぞれ皮質第5層、皮質第6層、皮質2 / 3層ニューロンの分布を調べた。さらに、これらの動物の胎児や生後幼若期の動物を得て、胎児の場合は灌流した後にDiIのpostmortem labeling法により、生後幼若動物の場合は成体と同じ方法で、皮質脊髓路ニューロン、皮質視床投射ニューロン、脳梁交連線維系ニューロンを逆行性に標識した。以上の研究によりこれら4種のリーラフェノタイプ動物の大脳皮質の細胞構築異常が同一であるか否か決定することを目的とした。

2) SRKラットの原因遺伝子の分子生物学的研究

塩基配列が既知のリーラフェノタイプ動物の原因遺伝子リーリン、mdab-1遺伝子のさまざまな領域の配列をもとにラット脳RNAよりRT-PCR法により部分クローニングを行い、ラットcDNAプローブ断片を作成した。これらのプローブを用いてSRKラット脳におけるリーリン、mdab-1遺伝子の発現をノザン法で、またゲノムにおけるその遺伝子の存

在を genomic Southern 法で調べた。また抗リーリン抗体、抗 mdab-1抗体、抗cdk-5抗体等を用いてウエスタンブロッティング法により蛋白レベルでの発現を調べた。

(結果と考察)

1) 大脳皮質の細胞構築の研究 (神経回路網の側面から)

ジャクソン・リーラー、オレルアン・リーラー、ヨタリ、SRKラットおよびこれらの対照動物のFast Blue にて標識される皮質脊髄路ニューロンは、いずれも標識ニューロンは皮質の全層に異所性に分布した(図4)。Diaminido Yellow で標識される皮質視床投射ニューロンは、これらの4種の動物においていずれも大脳皮質の最表層に局限して分布した。さらにDextran Amineにより逆行性に標識された脳梁交連線維系ニューロンは、4種のミュータントいずれも皮質の最深層に分布していた。以上より、この4種のミュータント間で異所性皮質脊髄路ニューロン、異所性皮質視床投射ニューロン、異所性脳梁交連線維系ニューロンのいずれの分布に差異を認めないことより、これらの4種のミュータント動物は極めて密接に関連した遺伝子異常によると推測された。

2) SRKラットの原因遺伝子の分子生物学的研究

SRKラットは上記のようにリーラーフェノタイプを特徴とする異常を示すことから、リーラーマウスの原因遺伝子リーリンがSRKラットで正常に発現しているか検討した。SRKラットの小脳と大脳のノザン分析により、SRKラットではリーリンmRNA の発現が著しく減少していることがわかった。リーリンcRNA を用いたin situ hybridization 法によれば、正常

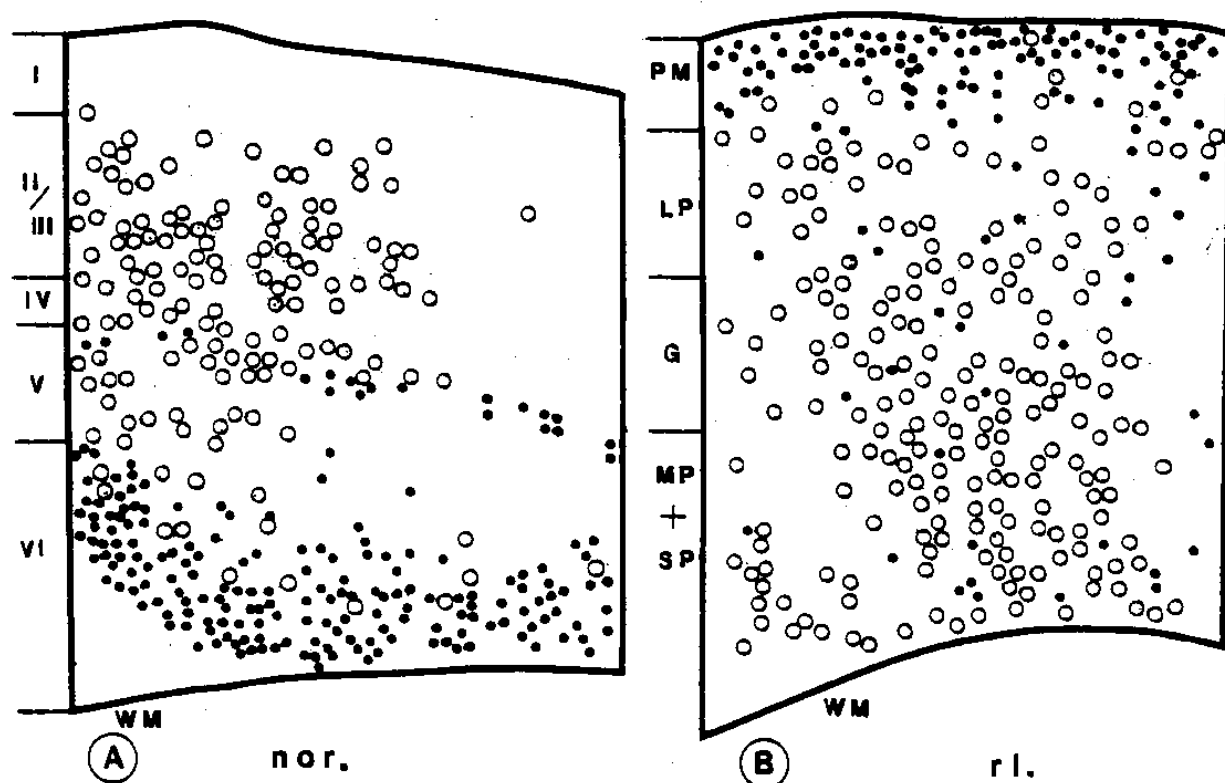


図4 正常マウス(A)およびリーラーマウス(B)大脳皮質における皮質視床投射ニューロン(●)と脳梁交連線維系ニューロン(○)の大脳皮質における分布

Comparison of PCR fragments of *reelin* amplified from normal and SRK brain cDNAs

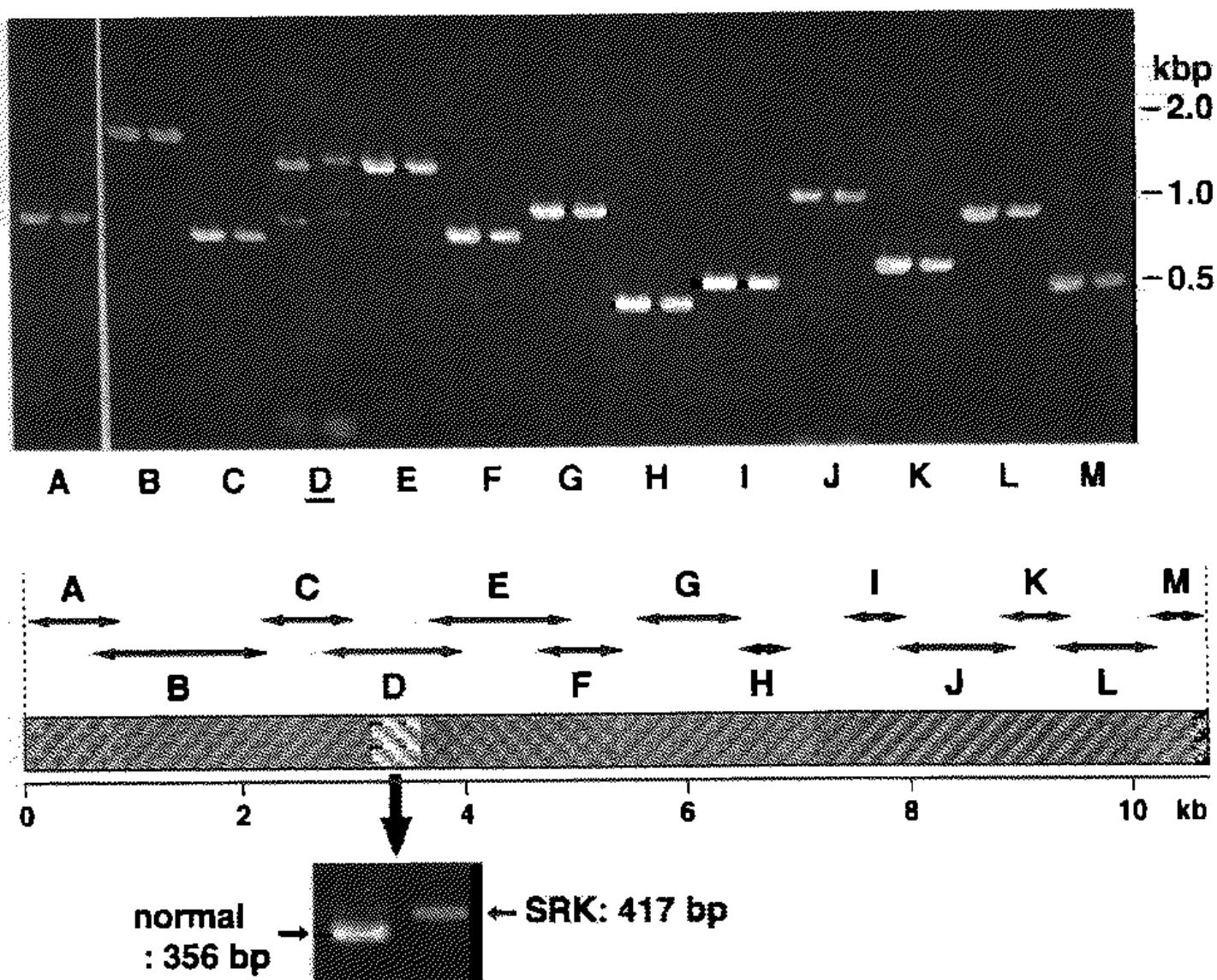


図5 正常およびSRKラット脳のcDNAより増幅したリーリン遺伝子のPCR断片の比較

ラットの胎生20日動物の脳皮質の最表層にあるカハール・レチウス細胞がリーリンmRNAを発現していたが、SRKラットではごくわずかに脳皮質の最表層のカハール・レチウス細胞と思われる細胞がごく微弱なリーリンmRNAシグナルを発現した。一方、genomic Southern分析によりSRKラットのリーリン遺伝子に制限酵素多型があることを我々は既に証明していたが、この制限酵素多型を示す領域のDNA配列を調べたところ、短い挿入配列があり、しかもこの挿入配列にはインフレームでストップコドンがあることがわかった（図5）。またリーリン蛋白を選択的に認識するCR-50単クローン抗体を用いて生後0日の正常ラットとSRKラットの脳

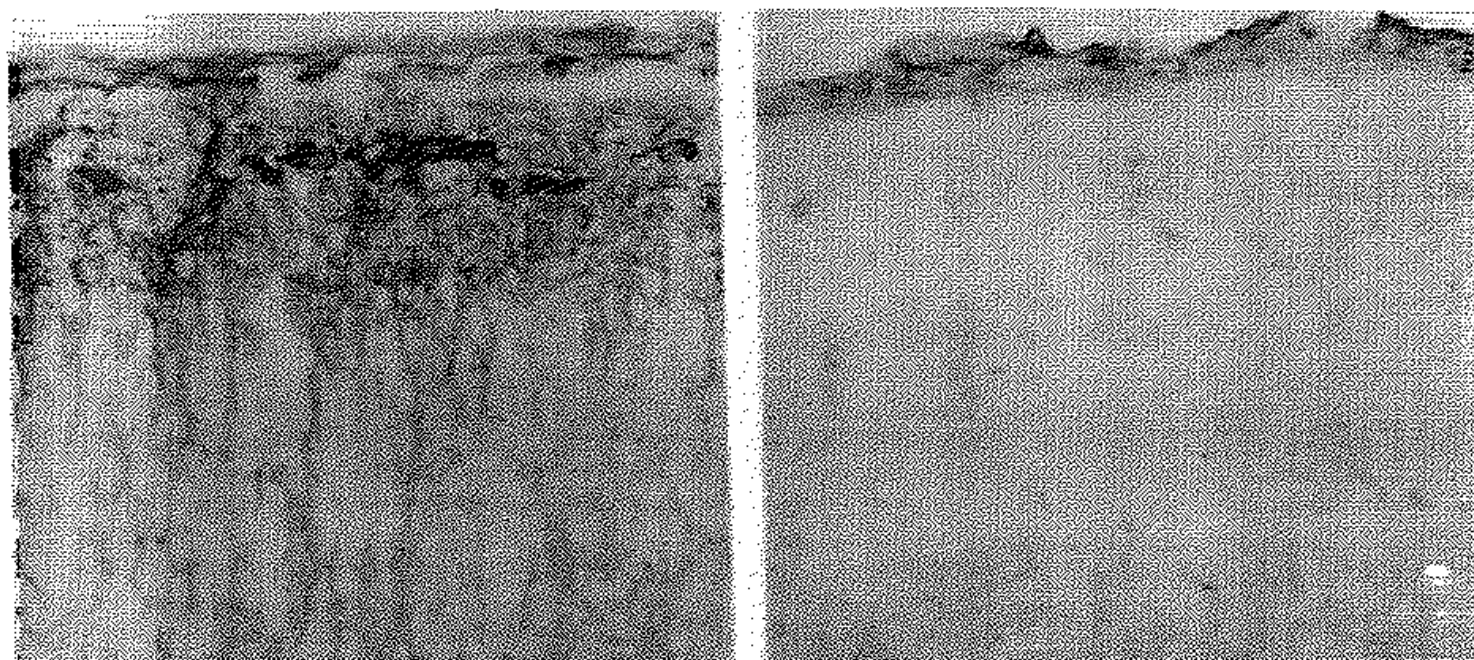


図6 正常（左図）およびSRKラット（右図）のCR-50免疫組織化学

皮質を免疫染色すると、正常ラットでは皮質最表層にCR50免疫陽性のカハール・レチウス細胞が標識されるが、SRKラットでは全く免疫標識細胞が認められない（図6）。しかしカルレチニン抗体を用いた大脳皮質の免疫組織化学によれば、SRKラットの大脳皮質の最表層に扁平化したカハール・レチウス細胞がカルレチニン免疫陽性を示すことより、SRKラットにおいても正常位置にカハール・レチウス細胞自体は存在する。

以上より、SRKラットではリーリン遺伝子内の挿入配列異常により何らかの理由でその転写翻訳産物が崩壊するか、あるいは転写リーリンmRNAが何らかの理由で分解しやすいと思われる。いづれにしてもSRKラットは、現在まで知られているリーラーマウス（エジンバラタイプ、オルレアンタイプ、*supfos* トランスジェニックマウス）とは全く異なる新しいタイプのリーラーラットであることが本研究により初めて示された。

3 研究結果

本研究により、ジャクソン・リーラー、オルレアン・リーラー、ヨタリ、SRKラットの大脳皮質層構造が、神経回路の観点から全く同一のフェノタイプを示すことがわかった。このことはカハール・レチウスニューロンが分泌するリーリン・タンパクと移動中のニューロンに発現するmDab1 タンパクが極めて密接に関連することを意味している。また本研究により、SRKラットの原因遺伝子がラット・リーリンであること、またSRKラットでは、リーリン遺伝子に62塩基の挿入があり、またその中にストップ・コドンがあるためリーラーフェノタイプとなることが判明した。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究の実験対象であるリーラーフェノタイプ動物は、神経芽細胞の移動障害の結果、大脳皮質では、細胞構築が逆転する。このようなリーラーフェノタイプ動物がヒトのどのような先天性疾患のモデルか不明である。リーラーマウス同様に神経芽細胞移動障害の結果、大脳皮質の層構造が障害を受ける先天性疾患として滑沢脳や福山型筋ジストロフィーなどが知られているが、これらの疾患はいずれもリーリンやmDab1の異常によるものではない。ヒト・リーラー奇形の発見のために本研究は大きな基礎を与えたと思う。

5 発表論文

- (1) Ikeda, Y., and Terashima, T., Corticospinal tract neurons are radially malpositioned in the sensory-motor cortex of the shaking rat Kawasaki. *J. Comp. Neurol.*, 383: 370-380, 1997.
- (2) Ikeda, Y., and Terashima, T., Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Devel. Dynamics*, 210: 157-172, 1997.
- (3) Terashima, T., Miwa, A., Kanegae, Y., Saito, I., and Okado, H., Retrograde and anterograde labeling of cerebellar afferent projection by the injection of recombinant adenoviral vectors into the mouse cerebellar cortex. *Anat. Embryol.*, 196: 363-382, 1997.
- (4) Fujimoto, Y., Setsu, T., Ikeda, Y., Miwa, A., Okado, H., and Terashima, T., Ambiguous nucleus neurons innervating the abdominal esophagus are malpositioned in the reeler mouse. *Brain Res.*, 811: 156-160, 1998.
- (5)* Woodhams, P. L., and Terashima, T., Laminar boundaries persist in the hippocampal dentate molecular layer of the mutant shaking rat Kawasaki, despite aberrant granule cell migration. *J. Comp. Neurol.*, 409, 57-70, 1999.
- (6)* Setsu, T., Ikeda, Y., Woodhams, P. W., and Terashima, T., The branchiogenic motoneurons innervating facial, masticatory, and esophageal muscles show aberrant distribution in the reeler-phenotype mutant rat, Shaking rat Kawasaki (SRK). Submitted to *J. Comp. Neurol.* (acceptable)
- (7)* Woodhams, P.L., and Terashima, T., Abberant trajectory of entorhino-dentate axons in the mutant shaking rat Kawasaki: a DiI-labeling study. Submitted to *Europ. J. Neurosci.* (acceptable)
- (8) 寺島俊雄、薛富義、吉川知志、池田やよい、リーラーマウス顔面神経核の細胞構築、解剖学雑誌 74: 411-420, 1999.

- (9) 寺島俊雄、吉川知志、マウス大脳皮質の形成異常：リーラーマウスを中心に、脳の科学 21 : 1319-1324, 1999.
- (10) 寺島俊雄、岡戸晴生、組換えアデノウイルスを用いた神経回路標識法、蛋白・核酸・酵素45 : 537-547, 2000

* は本研究援助によるものである。