

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

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座

(塩坂 貞夫 教授)

小林 憲太

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所属 (主指導教官)	バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座 (塩坂 貞夫 教授)		
氏名	小林 憲太	提出	平成 16年 5月 7日
題目	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		
<p>動物の発生過程で生まれた神経細胞は、その後期過程において一部は生存し、残りはプログラム細胞死 (PCD) を起こす。一般的に、神経細胞の生死はその標的組織から供給される神経栄養因子に依存すると考えられている。低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho は、細胞の骨格、形態、運動、接着、軸索の退縮やアポトーシスなど、様々な細胞応答を制御している。セリン/スレオニンキナーゼである Rho-kinase は、Rho の標的タンパク質の一つであり、Rho の制御下で種々の機能を発揮している。In vitro における Rho/Rho-kinase シグナル伝達系の機能は詳細に解析されているが、in vivo におけるこのシグナル伝達系の役割は不明な点が多い。本研究では、脊髄運動神経細胞の発生における Rho/Rho-kinase シグナル伝達系の役割を解析した。運動神経細胞における Rho と Rho-kinase の活性を抑制するために、Cre-loxP システムを用いて、RhoA のドミナントネガティブ変異体 (RhoA DN) あるいは Rho-kinase のドミナントネガティブ変異体 (Rho-K DN) を運動神経細胞に発現誘導したトランスジェニックマウス (RhoA DN マウスと Rho-K DN マウス) を作製した。発生初期の RhoA DN マウスにおいて運動神経細胞の発生を解析したところ、運動神経細胞の数が顕著に減少しており、この細胞数の減少はアポトーシスに起因することが明らかになった。また、運動神経軸索のパターニングには顕著な異常は認められなかった。発生初期の Rho-K DN マウスにおいても同様のことを検討した結果、RhoA DN マウスに類似した発生障害が認められた。さらに、Rho-K DN マウスを用いて、誘導されるアポトーシスのタイムコースを解析したところ、アポトーシスは発生初期の PCD が始まる前の時期に顕著に誘導されることが明らかになった。次に、発生後期の PCD が起こる時期においても</p>			

アポト - シスのタイムコースを解析した結果、Rho-K DN マウスでは、野生型マウスと比較してわずかにアポト - シスの誘導が促進されていることが明らかになった。また、運動神経細胞に神経栄養因子を供給する筋肉組織やシュワン細胞の発生には異常は認められなかった。以上の結果から、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系は、発生過程における脊髄運動神経細胞の生存、特に発生初期における生存に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

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

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座

(塩坂 貞夫 教授)

平成 16 年 5 月 12 日提出

序論

動物の発生過程で生まれた神経細胞は、その後期過程において一部は生存し、残りはプログラム細胞死 (PCD) を起こす。一般的に、神経細胞の生死はその標的組織から供給される神経栄養因子に依存すると考えられている (Oppenheim, 1991)。神経栄養因子の供給を十分に受けることの出来る細胞は生存し、そうでない細胞は PCD を起こして死滅する。神経栄養因子による生存の促進作用は、様々なシグナル伝達系によって媒介される (Pettmann and Henderson, 1998; Sendtner et al., 2000; Huang and Reichardt, 2001)。一方、最近になって標的組織に由来する神経栄養因子に依存しない神経細胞死の存在が明らかになってきた (Oppenheim et al., 2001)。例えば、ニワトリの頸髄に存在する運動神経細胞は、発生の初期でまだ標的組織とシナプスを形成していない時期に PCD を起こす (Homma et al., 1994; Yaginuma et al., 1996)。また、ニワトリの脊髄運動神経細胞で、早期に生まれたものと後期に生まれたものそれぞれを初代培養した実験から、運動神経細胞は、生まれた時期と神経栄養因子が必要となる時期との間に、一時的に神経栄養因子の供給を受けなくても生存できる時期があるということが明らかにされている (Mettling et al., 1995)。

低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho には、RhoA、RhoB、RhoC などのアイソフォームが存在し、細胞内分子スイッチとして外来シグナルを細胞骨格や核に伝達する (Hall, 1998; Kaibuchi et al., 1999)。Rho を介するシグナル伝達系は、細胞の骨格、形態、運動、接着、分裂やアポトーシスなど、様々な細胞応答を制御する (Kaibuchi et al., 1999; Aznar and Lacal, 2001)。特に神経細胞において、このシグナル伝達系は成長円錐の挙動や樹状突起の形態などを調節していることが明らかにされている (Luo, 2000)。Rho-dependent serine/threonine protein kinase (Rho-kinase/ROK/ROCK) は、Rho の主要な標的タンパク質の一つであり、ROK /ROCKII、ROK /ROCKI という二種類のアイソフォームが存在する (Leung et al., 1995; Ishizaki et al., 1996; Matsui et al., 1996)。Rho-kinase は、Rho の制御下でアクチンストレスファイバーやフォーカルコンタクトの形成、神経軸索の退縮など、様々な細胞機能を伝達する (Amano et al., 1997; Amano et al., 1998; Hirose et al., 1998)。ショウジョウバエを用いた遺伝学的な解析から、Rho と Rho-kinase は、原腸形成、分節構造の形成や表皮組織の極性形成に重要な役割を果たしていることが明らかにされている (Barrett et al., 1997; Strutt et al., 1997; Magie et al., 1999; Winter et al., 2001)。さらに、脊椎動物の発生過程では、これらのシグナル伝達分子が、頭部形態形成、心臓形成、左右軸の形成などに必須であることが報告されている (Wünnenberg-Stapleton et al., 1999; Wei et al., 2001)。

運動神経細胞は、神経細胞の運命決定、軸索パターンニングや神経細胞の生死を

制御する分子メカニズムを解明するのに非常に優れたモデルシステムである。本研究では、脊髄運動神経細胞の発生における Rho/Rho-kinase シグナル伝達系の役割を解析した。運動神経細胞における Rho と Rho-kinase の活性を抑制するために、Cre-loxP システムを用いて、RhoA のドミナントネガティブ変異体 (RhoA DN) あるいは Rho-kinase のドミナントネガティブ変異体 (Rho-K DN) をそれぞれ運動神経細胞に発現誘導したトランスジェニックマウスを作製した。ノックアウト法は、複数種あるアイソフォームの中で一つのアイソフォームの機能を欠失させる手法であるが、他のアイソフォームによる redundant な compensation を受けて表現型が観察出来ない可能性がある。しかし、他のアイソフォームの活性も抑制することが出来るトランスジェニック法では、このような可能性が極めて少ない。本研究により、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系は、発生過程における脊髄運動神経細胞の生存、特に発生初期における生存に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

材料と方法

トランスジーンのコストラクション

核内移行シグナル配列を有する Cre リコンビナーゼの 1.2-kb DNA フラグメントを pBST-N プラスミド (Kobayashi et al., 1992) の EcoRI サイトに挿入し、pCre プラスミドを作製した。次に、ヒトのドーパミン β -ヒドロキシラーゼ (DBH) 遺伝子の 4-kb 5'-flanking region を pCre プラスミドの上流に挿入し、pDBH-Cre プラスミドを作製した。サイトメガロウイルス (CMV) の遺伝子プロモーター (0.9-kb) の下流にウサギの β -グロビン遺伝子の第二イントロン配列を連結し、pCMV-int プラスミドを作製した。さらにこの下流に loxP 配列で挟まれたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子と ポリアデニレーションシグナル配列 (PA) を順に連結し (Sasaoka et al., 1992)、pCMV-CAT-PA プラスミドを作製した。2 番目の loxP 配列と PA の間に、ユニーク配列として ClaI サイトを作製した。0.6-kb の RhoA のドミナントネガティブ変異体 (RhoA^{N19}) (Amano et al., 1998) と 1.4-kb の Rho-kinase のドミナントネガティブ変異体 (RB/PH(TT)) (Amano et al., 1998) を pCMV-CAT-PA プラスミドの ClaI サイトに挿入して、pCMV-CAT-RhoA DN プラスミドと pCMV-CAT-Rho-K DN プラスミドを作製した。

トランスジェニックマウスの作製

マウスの受精卵にトランスジーンをマイクロインジェクションし、その受精卵を偽妊娠マウスに移植して子孫を得た。トランスジェニックマウスは、切断した尾から抽出したゲノム DNA を用いて、サザンハイブリダイゼーションを行っ

て検定した。ニワトリ β -アクチン遺伝子プロモーター (CAG)/loxP/CAT/loxP/ β -ガラクトシターゼ (β -gal) 遺伝子という融合遺伝子をトランスジェーンとして有する CAG-CAT-Z レポーターマウス (Araki et al., 1995) を大阪大学の宮崎純一先生より御供与頂いた。DBH-Cre トランスジェニックマウスと CAG-CAT-Z レポーターマウスを交配させ、両方のトランスジェーンを有するダブルトランスジェニックマウスを作製した。このダブルトランスジェニックマウスを用いて X-gal 染色を行い、Cre-loxP 組み換え反応を解析した。本研究では、発生過程の運動神経細胞で効率良く組み換えを起こすという理由で、DBH-Cre/6-8 というトランスジェニックラインを使用した (後述)。CAT-RhoA DN トランスジェニックマウスと CAT-Rho-K DN トランスジェニックマウスを用いて、脊髄における CAT 遺伝子の発現をノザンハイブリダイゼーションによって定量的に解析した。本研究では、CAT 遺伝子の発現量が高かった CAT-RhoA DN/4-18 と CAT-Rho-K DN/3-1 というトランスジェニックラインを使用した。DBH-Cre/6-8、CAT-RhoA DN/4-18、CAT-Rho-K DN/3-1 各々のトランスジェニックマウスには、発育上の異常は認められなかった。全てのマウスは福島県立医科大学動物実験施設のガイドラインに従って扱った。

ダブルトランスジェニックマウス胎仔の遺伝子型検定

トランスジェニックマウスの胎仔は、卵黄嚢から抽出したゲノム DNA に対して PCR を行って検定した。PCR は、ゲノムテンプレート1 μ gを用いて、94 5分 94 20秒、58 30秒、72 2分を 30 サイクル 72 5分 4 という条件で行った。DBH-Cre トランスジェニックマウスの検定に用いたプライマー配列は、5'-ACCAGCCAGCTATCAACTCG-3' と 5'-TTACATTGGTCC-AGCCACC-3' である。CAG-CAT-Zトランスジェニックマウスの検定に用いたプライマー配列は、5'-GCGTTACCCAACCTAATCG-3' と 5'-TGTGAGCGAGTAACAACC-3' である。CAT-RhoA DN トランスジェニックマウスに用いたプライマー配列は、5'-ACTCATCTCAGAAGAGGATCTG-3' と 5'-TCACAAGACAAGGCAACCAGATT-3' である。CAT-Rho-K DNトランスジェニックマウスに用いたプライマー配列は、5'-ACTCATCTCAGAAGAGGA-TCTG-3' と5'-TTCATTCAGTTCTTTCTGATATTTG-3' である。

X-gal 染色

氷冷した 0.01M PBS 内で、妊娠マウスの子宮内からマウスの胎仔を摘出し、4%パラホルムアルデヒド溶液で4 時間、一晩固定した。次に、10%シュクロ-ス/0.01M PBS に浸して 4 時間、一晩静置した。引き続き20%シュクロ-ス/0.01M PBS に浸して 4 時間、一晩静置した。胎仔を OCT コンパウンド (Tissue-Tek) で

包埋し、クライオスタット (Leica, CM1900) で20 μm の凍結切片を作製し、スライドガラスに張り付けた。切片に X-gal 染色溶液 (1 mg/ml 4-chloro-5-bromo-3-indolyl- β -galactoside, 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 2 mM MgCl_2 , 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% Nonidet P-40/PBS) を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、一晩反応させた。0.01M PBS で10分間洗浄したのち、70%メタノール中に10分間浸した。再び 0.01M PBS で洗浄してから、ニュートラルレッドに20分間浸した。流水中で洗浄した後、蒸留水で洗浄した。次に70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール、100%エタノールに順に15秒ずつ浸して脱色した。最後にキシレンに10分間浸した後、エンテランニューウ (MERCK, UN1866) で封入した。

免疫染色と画像解析

X-gal 染色と同様の方法でマウスの胎仔を包埋し、10 μm の凍結切片を作製してスライドガラスに張り付けた。切片を 0.01M PBS で5分間、2回洗浄した。次に 0.01M クエン酸ナトリウム溶液に浸して、電子レンジで1分間煮沸し、室温で15分間静置した (Takahashi and Osumi, 2002)。TBST バッファー (NaCl 8 mg/ml、KCl 0.2 mg/ml、Tris 3 mg/ml、0.1% Tween20) で、5分間、3回洗浄してから、2% Normal Swine Serum (DAKO X0901)/TBST に浸して室温、30分間ブロッキングした。次に、ブロッキングバッファーで希釈した種々の1次抗体を4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。モノクローナル抗体として、抗 Isl1 抗体 (39.4D6, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, 1:100)、抗ニューロフィラメント抗体 (2H3, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, 1:100)、抗 active form of caspase-3 抗体 (PharMingen, San Diego, CA, 1:200) を使用した。ポリクローナル抗体として、抗 β -gal 抗体 (Cappel, West Chester, PA, 1:300)、抗 myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase 抗体 (Kawano et al., 1999, 1:100)、抗リン酸化 MBS 抗体 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, 1:100)、抗 S100 抗体 (Dako, Glostrup, Denmark, 1:200) を使用した。TBST で5分間、3回洗浄してから、ブロッキングバッファーで希釈した種々の2次抗体を室温で1時間反応させた。2次抗体として、FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG、Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG、Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, 1:500) を使用した。TBST で5分間、3回洗浄してから、ベクタシールド (VECTOR H-1000) で封入した。画像は、蛍光顕微鏡 (Leica DMRE HC) と、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM510) で観察し、CCD カメラ (Zeiss) と Axiovision ソフトウェアシステムを用いて画像の取込みを行った。

単一細胞における蛍光輝度の測定は、以下の報告に従って行った (Matsushita

et al., 2002)。抗 Isl1 抗体と、抗 MBS 抗体もしくは抗リン酸化 MBS 抗体を用いた蛍光二重染色により得られた画像を輝度が飽和しないような一定の露出時間のもと、CCD カメラで取込みを行った。そして、取り込んだ画像の輝度を Simple PCI software (Complix Inc., Cranberry Township, PA, USA) にて定量的に測定した。

逆転写 PCR (RT-PCR) 法

摘出したマウスの胎仔に ISOGEN (Nippon Gene, Toyama, Japan) を加えてホモジェナイズし、total RNA を抽出した。逆転写の条件は以下の通り。total RNA 1 µg、oligo dT プライマー (GIBCO 18418-012) 1 µl、Diethyl Pyrocarbonate (DEPC) 水10 µlを混合し (反応液 1)、70 °C で10分間反応させる。次に、反応液 1 に10 X PCR バッファー 2 µl、25 mM MgCl₂ 2 µl、10 mM dNTP 1 µl、0.1M DTT 2 µl を加え、42 °C で5分間反応させる。続いて、Molony murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) を1 µl 加えてから、42 °C 50分 72 °C 15分 4 °C で反応させ、さらに RibonucleaseH (GIBCO 18021-071) を1 µl加えて37 °C で30分間反応させる。このようにして作製した1本鎖 cDNA を PCR 反応によって増幅した。PCR は、1本鎖 cDNA 溶液1.5 µlを用いて、94 °C 4分 94 °C 20秒、55 °C 30秒、72 °C 1分を 35 サイクル 72 °C 5分 4 °C という条件で行った。CAT 遺伝子に対しては、5'-CAGTCAGTTGCTCAATGTACC-3' と 5'-ACTGGTGAAACTCACCCA-3' というプライマーを用いた。RhoA DN と Rho-K DN に対するプライマーは、"ダブルトランスジェニックマウス胎仔の遺伝子型検定" と同じものを使用した。

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL 染色)

TUNEL 染色は、一部改変を加えつつ、次の報告に従って行った (Takahashi and Osumi, 2002)。切片を PBT バッファー (0.1% Tween 20/PBS) で5分間、2回洗浄したのち、"免疫染色と画像解析" と同様に煮沸処理を行った。PBT バッファーで5分間、3回洗浄してから、TdTBuffers (カコジル酸ナトリウム 32 mg/ml、25 mM Tris-HCl (pH 6.6)、BSA 0.024 mg/ml、0.2% Tween20、1.5 mM CoCl₂) で室温、5分間反応させた。その後、TdT 反応液 (TdTBuffers 1 ml、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 4.8 µl、biotin-14-dATP (GIBCO 19524-016) 1.25 µl) で37 °C、1時間反応させた。TBST バッファーで10分間、3回洗浄してから、2% Normal Swine Serum/TBST に浸して室温、30分間ブロッキングした後、抗 Isl1 抗体 (1:100) + streptoavidin-Oregon Green 488

conjugates (Molecular Probes, Eugene, OR) (1:100) / ブロッキングバッファ
ーで、室温、2時間反応させた。TBST バッファで5分間、3回洗浄してから、
Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG (1:300) / ブロッキングバッファ
ーで、室温、1時間反応させた。TBST バッファで5分間、3回洗浄した後、ベク
タシールドで封入した。

軸索のラベリング

Yaginuma et al.(1996)の報告に従って行った。脂溶性の蛍光色素である Dil
(1,1'-diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)
(Molecular Probes) を最終濃度が0.1%になるようにエタノールと
dimethylsulfoxide (DMSO) の9:1混合液に溶解した。加圧ポンプを用いて、こ
の Dil 溶液を脊髄の腹側領域、前腕 (forelimb)、筋節 (myotome) に注入した。
注入後、マウスの胎子を4%パラホルムアルデヒド溶液に浸して、遮光しながら
室温で3日間静置した。マイクロスライサー (DOSAKA EM CO., LTD DTK-
1000) を用いて150 μ mの切片を作製し、蛍光顕微鏡で観察した。

電子顕微鏡

マウスの胎子を 2%パラホルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒド (ナカラ
イ)/0.01M PBS で 4℃、一晩固定した。実体顕微鏡下で頭頸部を切り出した。
組織を 7.5%シュクロース/0.01M PBS にて 4℃で 10 分、3 回洗浄し、1%四酸
化オスミウム溶液 (Merck) にて遮光しながら 4℃で 2 時間反応させた。以後の
操作は全て室温で行なった。蒸留水で 10 分、3 回洗浄したのち、1%酢酸ウラン
溶液を 1 時間反応させ、ブロック染色を行なった。蒸留水で 10 分、3 回洗浄し
てウラン溶液を除いた後、50%、70%、80%、90%、95%、100%エタノール溶
液にて 10 分ずつ段階的に脱水し、QY-1 (n-ブチルグリシジルエーテル) (日新
EM)溶液で 10 分間置換した後、EPON 樹脂 (TAAB 社) に一晩浸透させ、70℃
で 48 時間 EPON 樹脂の重合反応を行ない、組織の包埋を行なった。ウルトラ
ミクロトーム (RMC MT6000) を用いて 90 nm の超薄切片を作成し、電子染色
(1%酢酸ウラン 10 分、酢酸鉛溶液 (片山化学)) を施した後、電子顕微鏡(JEOL
JEM-1200EX)で観察した。

結果

RhoA DN 遺伝子と Rho-K DN 遺伝子の条件的発現誘導

発生過程の運動神経細胞において内在性の Rho と Rho-kinase の活性を抑制
するために、Cre-loxP システムを用いて神経細胞特異的に RhoA DN 遺伝
子と Rho-K DN 遺伝子を発現誘導した (Gu et al., 1993; Fig. 1A)。ヒト DBH

プロモーター遺伝子の制御下で Cre 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスとして、DBH-Cre マウスを作製した。このプロモーター遺伝子は、交感神経節の細胞、運動神経細胞や感覚神経細胞などいくつかの神経細胞に遺伝子を発現誘導することが報告されている (Kapur et al., 1991; Mercer et al., 1991; Kobayashi et al., 1992)。Cre-loxP 組み換え反応がどの組織の細胞で起こっているかを検討するために、DBH-Cre マウスと CAG-CAT-Z マウスを交配させ、両方のトランスジーンを持つダブルトランスジェニックマウス (Cre⁺/Z⁺ マウス) を作製した。Cre⁺/Z⁺ マウスの胸髄レベル (thoracic) で横断面に沿った凍結切片を作製し、X-gal 染色を行った (Fig. 1B)。胎生9.5日目 (E9.5) に神経管の腹側領域に染色シグナルが認められた。このシグナルは、脳室側の一部の細胞にも認められた。これらの細胞は、運動神経細胞の前駆細胞であると考えられる。E10.5 と E11.5 では、腹側神経管に強いシグナルが認められると同時に、交感神経節 (sympathetic ganglion; SG) や後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) の一部の細胞にもシグナルが認められた。次に、腹側神経管において染色シグナルを有する細胞が、運動神経細胞であるか否かを検討した。E10.5の Cre⁺/Z⁺ マウスを用いて thoracic レベルの凍結切片を作製し、運動神経細胞のマーカー遺伝子である Isl1 の抗体と β-gal の抗体を用いた二重免疫染色を行った (Fig. 1C)。その結果、ほぼ全ての Isl1 陽性細胞が β-gal 陽性であることが分かった (90-95%, n = 4)。これらの結果から、DBH 遺伝子プロモーターに依存した Cre-loxP 組み換え反応は、ほぼ全ての発生過程の運動神経細胞で起こっていることが明らかになった。

次に、CMV 遺伝子プロモーターに loxP 配列で挟まれた CAT 遺伝子を連結した遺伝子カセットの下流に、RhoA DN 遺伝子もしくは Rho-K DN 遺伝子を挿入したトランスジーンを持つトランスジェニックマウス (CAT-RhoA DN マウスと CAT-Rho-K DN マウス) を作製した (Fig. 1A)。これらのマウスを DBH-Cre マウスと交配させ、ダブルトランスジェニックマウス (Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウス) を作製した。Cre-loxP 組み換え反応によって誘導されるドミナントネガティブ変異体の発現を解析するために、E10.5 の Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスそれぞれから total RNA を抽出し、RT-PCR 法でドミナントネガティブ変異体の転写産物を検出した (Fig. 1D)。その結果、ダブルトランスジェニックマウスではドミナントネガティブ変異体が発現しており、Cre⁻/RhoA DN⁺ マウスや Cre⁻/Rho-K DN⁺ マウスでは発現していないことが分かった。これらの結果から、ドミナントネガティブ変異体は、ダブルトランスジェニックマウスに特異的に発現誘導されていることが明らかになった。

Rho/Rho-kinase シグナル伝達系の活性化は、ミオシンフォスファターゼの構成サブユニット (MBS) のリン酸化を促進することが知られている

(Kawano et al., 1999)。Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスそれぞれの運動神経細胞において、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系が抑制されているか否かを検討した。E10.5 の野生型マウス、Cre⁺/RhoA DN⁺ マウス、Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスを用いて thoracic レベルの凍結切片をそれぞれ作製し、抗 Isl1 抗体と、抗 MBS 抗体もしくは抗リン酸化 MBS 抗体を用いた二重免疫染色を行った。Isl1 陽性細胞における MBS とリン酸化 MBS の蛍光シグナルの輝度をそれぞれのマウスに関して測定し、野生型の蛍光輝度に対するダブルトランスジェニックの蛍光輝度の比率を算出した (Table 1)。MBS の蛍光シグナルの輝度は、野生型とダブルトランスジェニックの間では変化はなかった。このことは、野生型とダブルトランスジェニックの運動神経細胞における MBS の発現量は同じであることを示している。一方、ダブルトランスジェニックにおけるリン酸化 MBS の蛍光シグナルの輝度は、野生型のものと比較して顕著に減少していることが分かった。Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスでは、31% (n = 4; p < 0.001)、Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスでは、21% (n = 4; p < 0.01) 減少していた。これらの結果から、ダブルトランスジェニックマウスの運動神経細胞では、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系が抑制されていることが明らかになった。

RhoA DN の発現は、発生過程の運動神経細胞においてアポトーシスの誘導を増強する

はじめに、Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスにおける運動神経細胞の発生を解析した。運動神経細胞の発生を検討するために、E10.5 と E12.5 で thoracic レベルの凍結切片を作製し、抗 Isl1 抗体を用いた免疫染色を行った。野生型マウスと Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスそれぞれの染色像を Fig. 2A に示した。E10.5 では、Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスの Isl1 陽性細胞の数が野生型マウスのものと比較して顕著に減少していることが分かった。このことを定量的に解析するために、野生型マウスと Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスの頸髄 (upper cervical)、上腕髄 (brachial)、腰髄 (lumbar) のレベルに対しても同様に Isl1 の免疫染色を行い、upper cervical、brachial、thoracic、lumbar 各々のレベルで Isl1 陽性細胞をカウントした (Fig. 2B)。その結果、Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスの Isl1 陽性細胞は、野生型マウスのものと比較して、upper cervical では56%、brachial では51%、thoracic では48%、lumbar では42% 減少していた。E12.5 の thoracic では、Isl1 陽性の体性運動神経細胞 (somatic motor neuron; SM) と内臓性運動神経細胞 (visceral motor neuron; VM) は、それらのカラムの存在する位置が異なるため、区別が可能である (Fig. 2A)。それぞれの運動神経細胞の数をカウントして、野生型マウスと Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスの間で比較した (Fig. 2B)。Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスでは、野生型マウスと比較して、SM は58%に、VM は65%に減少していた。次に、Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスにおける運動神経細胞の

減少が、アポトーシスに起因するか否かを検討した。E10.5 の野生型マウスと Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスを用いて、cervical、brachial、thoracic、lumbar 各々のレベルで凍結切片を作製し、TUNEL 染色を行った (Fig. 2C)。Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスでは、全てのレベルにおいて神経管の腹側領域に顕著な TUNEL 陽性シグナルが認められた。一方、野生型マウスでは TUNEL 陽性シグナルはほとんど認められなかった。従って、Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスにおける運動神経細胞の減少は、アポトーシスに起因することが明らかになった。

次に、Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスにおける運動神経軸索のパターニングを検討した。E10.5 と E12.5 の胎仔に対して、脂溶性の蛍光色素である Dil を用いて、運動神経軸索を順行性、逆行性にラベルした。E10.5 では、順行性ラベルのために腹側神経管に Dil を注入し、逆行性ラベルのために forelimb に Dil を注入した。E12.5 では、forelimb と myotome に Dil を注入し、逆行性ラベルを行った。E10.5 の野生型マウスでは、運動神経軸索が腹側神経管から腹側へ伸長し、forelimb の基部まで到達していたが、forelimb を構成する組織には到達していなかった (Fig. 3A)。E12.5 になると、運動神経軸索は forelimb の筋肉組織や myotome に到達していた (Fig. 3A)。Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスは、見かけ上野生型マウスと同じ運動神経軸索のパターニングを示したが、E12.5 において、僅かな軸索束の defasciculation が観察された (Fig. 3B 挿入図)。このことは、運動神経細胞数の減少に起因していると考えられる。以上の結果から、RhoA DN の発現によって、運動神経細胞のアポトーシスが顕著に誘導されるが、見かけ上の運動神経軸索のパターニングは保たれることが明らかになった。

Rho-K DN の発現は、発生過程の運動神経細胞においてアポトーシスの誘導を増強する

Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスにおける運動神経細胞の発生を Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスと同様の手法で解析した。認められた表現型は、Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスで観察されたものと類似していた。E10.5 と E12.5 で thoracic レベルの凍結切片を作製し、抗 Isl1 抗体で免疫染色を行い、野生型マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスにおける Isl1 陽性細胞の数をカウントした結果、E10.5 では41%、E12.5 では SM と VM がそれぞれ26%、33%減少していた (Fig. 4A)。TUNEL 染色の結果、運動神経細胞の減少はアポトーシスに起因することが分かった (Fig. 4B)。データには示していないが、cervical、brachial、lumbar 各々のレベルでも顕著なアポトーシスが誘導されることを確認した。運動神経軸索のパターニングにも、見かけ上異常は認められなかったが、僅かな軸索束の defasciculation が観察された (Fig. 4C 挿入図)。Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスでは、共に運動神経細胞に顕著なアポトーシスが誘導されるという類似した発生異常が認められた。このことは、運動神経細胞の生存には主に Rho-

kinase を介した Rho のシグナル伝達系が重要な役割を果たしていることを示唆している。また、Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスの運動神経軸索のパターニングは、見かけ上正常に保たれていたことから、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系は、軸索パターン形成には必須ではないことが明らかになった。

ドミナントネガティブ変異体の発現は、発生初期の運動神経細胞においてアポトーシスの誘導を増強する

マウスの正常な発生過程では、脊髄運動神経細胞の PCD は E12.5 から E16.5 にかけて起こる (Lance-Jones, 1982; Yamamoto and Henderson, 1999)。ダブルトランスジェニックマウスに誘導されるアポトーシスに関して、E9.5 から E11.5 の間でタイムコースを追って検討した。Rho-kinase を介した Rho のシグナル伝達系のアポトーシス誘導に対する影響を解析するために、ダブルトランスジェニックマウスは Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスを使用した。種々の発生ステージで thoracic レベルの凍結切片を作製し、抗 Isl1 抗体を用いた免疫染色と TUNEL 染色を組み合わせることで二重染色を行った (Fig. 5A)。E9.5 で、発生過程の運動神経細胞においてわずかに TUNEL 陽性シグナルが観察されはじめた。そのシグナルの数は E10.5 まで増加し続け、E11.5 では減少していた。E10.5 の二重染色の結果を共焦点レーザー顕微鏡で解析した結果、Isl1 陽性細胞の20-25% (n = 4) に TUNEL 陽性シグナルが認められた (Fig. 5A)。さらに、アポトーシスが誘導されている運動神経細胞において caspase-3 が活性化されているか否かを検討するために、抗 Isl1 抗体と抗 active form of caspase-3 抗体を用いた二重免疫染色を行った。この結果を共焦点レーザー顕微鏡で解析したところ、変性している運動神経細胞において caspase-3 が活性化されていることが分かった (Fig. 5B)。さらに、電子顕微鏡を用いて、アポトーシスを起こしている運動神経細胞の超微形態を解析したところ、クロマチン構造の凝集、細胞質電子密度の増加、細胞体の萎縮など、典型的なアポトーシスの形態変化が認められた (Fig. 5C)。また、アポトーシスを起こした運動神経細胞が、ファゴサイトシスによって取り込まれるところも観察された (Fig. 5C)。以上の結果から、Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスでは、運動神経細胞は生まれるが、PCD が起こる時期よりも早い初期の発生時期に顕著なアポトーシスが誘導されることが明らかになった。

発生後期のダブルトランスジェニックマウスにおいて誘導される運動神経細胞のアポトーシス

運動神経細胞における Rho/Rho-kinase シグナル伝達系の抑制が、PCD の時期に相当する後期の発生段階で、運動神経細胞の発生に影響を与えるか否かを

検討した。E14.5 と E16.5 の thoracic レベルの凍結切片を作製し、抗 Isl1 抗体を用いた免疫染色と TUNEL 染色を組み合わせることで二重染色を行った (Fig. 6A)。E14.5 では、野生型マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスの両方に TUNEL 陽性シグナルが観察された。E16.5 では、野生型マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスのどちらにも TUNEL 陽性シグナルは観察されなかった。また、後期の発生段階においても、Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスの Isl1 陽性細胞の数は野生型マウスのもよりも少ないことが分かった (Fig. 6B)。E14.5 と E16.5 各々で、野生型の Isl1 陽性細胞数に対する Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスの Isl1 陽性細胞数の比率を算出したところ、E14.5 では 0.73 ± 0.02 となり、E16.5 では、 0.68 ± 0.01 となった。従って、Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスでは野生型マウスと比較して、E14.5 から E16.5 にかけてわずかにアポトーシスが增強されていることが明らかになった ($p < 0.05$, Student's t test)。

ダブルトランスジェニックマウスにおける筋肉組織とシュワン細胞の発生

運動神経細胞は、limb の筋肉組織や myotome とシナプスを形成し、それらの標的組織から神経栄養因子の供給を受けてその生存が促進されることが知られている (Oppenheim, 1991)。神経軸索の周囲を覆うシュワン細胞も、神経栄養因子を供給することによって運動神経細胞の生存を促進する。もしダブルトランスジェニックマウスにおいて、これらの組織や細胞の発生に異常があれば、運動神経細胞のアポトーシスは、これらの発生異常によって二次的に引き起こされたものである可能性が出てくる。この可能性を検討するために、limb とシュワン細胞の発生を解析した。E16.5 の野生型マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスを用いて forelimb の横断面に沿った凍結切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った結果、Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスの forelimb の筋肉組織は見かけ上正常であることが分かった (Fig. 7A)。また、E16.5 の野生型マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスを用いて thoracic レベルの凍結切片を作製し、シュワン細胞のマーカー遺伝子である S100 の抗体とニューロフィラメントの抗体を使用して二重免疫染色を行った (Fig. 7B)。その結果、野生型マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウス共に、運動神経軸索の周囲にシュワン細胞が正常に発生していることが分かった。以上の結果から、ダブルトランスジェニックマウスに認められた運動神経細胞のアポトーシスは、運動神経細胞それ自体における Rho/Rho-kinase シグナル伝達系の抑制に起因していることが明らかになった。

考察

本研究では、脊髄運動神経細胞の発生における Rho/Rho-kinase シグナル

伝達系の役割を解析した。発生過程の運動神経細胞において Rho と Rho-kinase の活性を抑制するために、Cre-loxP 組み換え反応を利用して、RhoA DN と Rho-K DN をこれらの神経細胞に発現誘導した。RhoA DN の発現によって、脊髄の腹側神経管に顕著なアポトーシスが誘導されたが、運動神経軸索の見かけ上のパターンニングは正常であった。Rho-K DN の発現によって認められた発生異常は、RhoA DN の発現によって観察されたものと類似していた。さらに、Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスを用いた解析から、運動神経細胞に誘導されるアポトーシスは PCD がはじまる以前の発生初期に顕著に増強され、PCD の時期にあたる発生後期では、わずかに増強されることが明らかになった。また、Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスの筋肉組織やシュワン細胞は正常に発生していた。以上の結果から、主に Rho-kinase を介する Rho のシグナル伝達系は、発生過程にある運動神経細胞の生存に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

ダブルトランスジェニックマウスで認められた PCD がはじまる以前のアポトーシスの増強は、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系が発生初期 (E9.5-E11.5) の運動神経細胞の生存を促進していることを意味する。Dil による運動神経軸索のラベル実験から、初期の発生段階 (E10.5) では、軸索は limb の筋肉組織や myotome など、最終的にシナプスを形成する標的組織にはまだ到達していないことが分かった。このことは、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系が、最終標的組織から供給される神経栄養因子に依存しない生存のメカニズムに関与していることを示している。最近、最終標的組織に由来する神経栄養因子に依存しない神経細胞死の存在が示唆された (Oppenheim et al., 2001)。実際に、伸長中の軸索は最終標的組織に到達する以前から電気生理学的な活性を有することが報告されている (Milner and Landmesser, 1999; Hanson and Landmesser, 2003)。伸長中の軸索は、最終標的組織に到達する以前に様々な組織 (中間標的組織) と相互作用する。Rho/Rho-kinase シグナル伝達系が、発生初期の運動神経細胞の生存を促進するメカニズムの一つとして、このシグナル伝達系が、中間標的組織から供給される神経栄養因子の作用を媒介している可能性が考えられる。椎板 (sclerotome) や limb の間葉組織 (limb mesenchyme) から肝細胞増殖因子 (HGF) が分泌され、脊髄運動神経細胞の生存を促進することが報告されている (Ebens et al., 1996)。一方、培養中の上皮細胞では、HGF によって誘導される細胞運動の上昇に Rho/Rho-kinase シグナル伝達系が重要な役割を果たしていることが明らかにされている (Fukata et al., 1999)。これらの報告から、発生初期の運動神経細胞において、中間標的組織から供給される HGF の下流で Rho/Rho-kinase シグナル伝達系が機能して、運動神経細胞の生存を促進している可能性が考えられる。他の可能性としては、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系が細胞の接着を制御して、アポトーシスの実行を阻害している可能性が考えられる。このシグナル伝達系は、インテグリンを介した細胞-細胞外マトリック

ス相互作用の制御に関与している (Howe et al., 1998)。不適切な細胞-細胞外マトリックスの相互作用は、細胞骨格の制御を破綻させ、アポトーシスを誘導する (Frisch and Sreaton, 2001)。これらの報告から、発生過程の運動神経細胞では、インテグリンを介した細胞-細胞外マトリックス相互作用の制御に Rho/Rho-kinase シグナル伝達系が機能して、アポトーシスの誘導を阻害している可能性が考えられる。

Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスにおいて、PCD の時期に相当する後期の発生段階 (E14.5-E16.5) では、わずかに運動神経細胞のアポトーシスが增強されていた。一般的に、PCD の時期における細胞の生死は、最終標的組織から供給される一定量の神経栄養因子に依存すると考えられている (Oppenheim, 1991; Pettmann and Henderson, 1998; Sendtner et al., 2000; Huang and Reichardt, 2001)。Rho は nerve growth factor (NGF) レセプターファミリーの一つに結合し、網膜神経細胞の軸索伸展を制御することが明らかにされている (Yamashita et al., 1999)。また、Rho は、NGF、neurotrophin-3 や brain-derived neurotrophic factor によって引き起こされる軸索の形態変化を媒介することが報告されている (Özdinler and Erzurumlu, 2001)。以上の報告から、PCD の時期では Rho/Rho-kinase シグナル伝達系がこれら神経栄養因子の下流で機能し、運動神経細胞の生存を促進している可能性が考えられる。

運動神経細胞の前駆細胞は神経管腹側部の特定の領域で生まれる (Ericson et al., 1997)。Cre⁺/Z⁺ マウスにおける解析から (Fig. 1B)、発生過程の運動神経細胞だけでなく、その前駆細胞と考えられる細胞にも Cre-loxP 組み換え反応が認められた。Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスを用いてアポトーシスのタイムコースを検討した結果から、運動神経細胞はその性質を獲得した後にアポトーシスを起こすことが分かった。これらのことは、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系の抑制は、運動神経細胞の運命決定には影響を与えないことを示している。また、これまでの neuroblastoma 細胞を用いた実験から、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系は成長円錐の形態や軸索の退縮を制御していることが明らかにされている (Amano et al., 1998; Hirose et al., 1998; Luo, 2000)。しかし、ダブルトランスジェニックマウスの脊髄における運動神経軸索パターンニングは、見かけ上正常であった。従って、脊髄における運動神経軸索のパターンニングには、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系を介した成長円錐や軸索の形態制御機構は必須ではない可能性が高い。脊髄運動神経細胞にはいくつかの特定の細胞集団があり、それぞれが腹側神経管の異なる位置にカラム構造を作って、個々のカラムに由来する軸索はそれぞれ limb の異なる領域に投射する (Goulding, 1998; Lin et al., 1998; Shirasaki and Paff, 2002)。しかし、本研究で用いた軸索のラベリング法ではそれぞれの軸索を詳細に判別することが出来ないため、個々の軸索パターンニングにおいて微細な異常が存在する可能性は否定できない。

DBH 遺伝子プロモーターに依存した Cre-loxP 組み換え反応は、運動神経細胞だけではなく、SG の細胞と DRG を構成する一部の細胞にも起こる (Fig. 1B)。つまり、ダブルトランスジェニックマウスでは、SG や DRG にもドミナントネガティブ変異体が発現誘導される。Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスにおけるこれらの神経細胞の発生を検討したところ、SG と DRG は、神経節の形態やサイズ、節に含まれる細胞数において正常であった (data not shown)。このことから、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系はこれらの神経細胞の発生には必須ではないことが示唆された。最近、他の低分子量 GTP 結合タンパク質である Ras や Rap1 がこれらの神経細胞の生存に重要な役割を果たしていることが明らかにされている (Klesse and Parada, 1998; Mazzoni et al., 1999; York et al., 2000)。

本研究では、DBH 遺伝子プロモーターを利用して、特定の細胞において Cre-loxP 組み換え反応を起こすシステムを確立した。この Cre-loxP 組み換えシステムによって、発生過程にある特定の神経細胞における Rho/Rho-kinase シグナル伝達系の機能解析が可能となった。このシステムは、ある特定の神経細胞における Rho や Rho-kinase 以外の興味深い遺伝子の役割を発生学的、生理学的、病理学的に解析するために非常に優れたシステムであると考えられる。

謝辞

本研究に取り組む機会を与えていただき、懇切丁寧な御指導をいただきました福島県立医科大学の小林和人先生に厚く御礼申し上げます。奈良先端科学技術大学院大学博士前期過程在籍時から現在に至るまで、研究のみならずあらゆる面で格別の御指導を賜りました貝淵弘三先生に心より感謝いたします。本学での博士号取得にあたり、多大な御尽力をいただきました塩坂貞夫先生に心より感謝いたします。八木沼洋行先生、大隅典子先生、高橋将文先生、小池正人先生には、組織学的な解析法を御教授いただいたと同時に非常に有益なディスカッションをしていただきました。村上富士夫先生と天野睦紀先生には、非常に有益なディスカッションをしていただきました。松下夏樹先生、佐野裕美先生、高橋巖君には組織学的な実験をご援助頂きました。宮崎純一先生からは、CAG-CAT-Z レポーターマウスを御供与頂きました。Werner Müller 博士からは Cre recombinase 遺伝子を御供与頂きました。以上の皆様からのご協力やご支援に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K
(1997) Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase.
Science 275:1308-1311.
- Amano M, Chihara K, Nakamura N, Fukata Y, Yano T, Shibata M, Ikebe M, Kaibuchi K
(1998) Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and
Rho-kinase. Genes Cells 3:177-188.
- Araki K, Araki M, Miyazaki J, Vassalli P (1995) Site-specific recombination of a
transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. Proc Natl
Acad Sci USA 92:160-164.
- Aznar S, Lacal JC (2001) Rho signals to cell growth and apoptosis. Cancer Lett 165:1-10.
- Barrett K, Leptin M, Settleman J (1997) The Rho GTPase and a putative RhoGEF
mediate a signaling pathway for the cell shape changes in *Drosophila* gastrulation.
Cell 91:905-915.
- Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Hanson MG Jr, Bladt F, Birchmeier C, Barres BA,
Tessier-Lavigne M (1996) Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal
chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. Neuron 17:1157-
1172.

- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM, Briscoe J (1997) Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90:169-180.
- Frisch SM, Screaton RA (2001) Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 13:555-562.
- Fukata Y, Oshiro N, Kinoshita N, Kawano Y, Matsuoka Y, Bennett V, Matsuura Y, Kaibuchi K (1999) Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility. *J Cell Biol* 145:347-361.
- Goulding M (1998) Specifying motor neurons and their connections. *Neuron* 21:943-946.
- Gu H, Zou YR, Rajewsky K (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through *Cre-loxP*-mediated gene targeting. *Cell* 73:1155-1164.
- Hall, A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.
- Hanson MG, Landmesser LT (2003) Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in the early embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci* 23:587-600.
- Hirose M, Ishizaki T, Watanabe N, Uehata M, Kranenburg O, Moolenaar WH, Matsumura F, Maekawa M, Bito H, Narumiya S (1998) Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in

- neuroblastoma N1E-115 cells. *J Cell Biol* 141:1625-1636.
- Homma S, Yaginuma H, Oppenheim RW (1994) Programmed cell death during the earliest stages of spinal cord development in the chick embryo: a possible means of early phenotypic selection. *J Comp Neurol* 345:377-395.
- Howe A, Aplin AE, Alahari SK, Juliano RL (1998) Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol* 10:220-231.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S (1996) The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J* 15:1885-1893.
- Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M (1999) Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 68:459-486.
- Kapur RP, Hoyle GW, Mercer EH, Brinster RL, Palmiter RD (1991) Some neuronal cell populations express human dopamine β -hydroxylase-*lacZ* transgenes transiently during embryonic development. *Neuron* 7:717-727.
- Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M,

- Kaibuchi K (1999) Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* 147:1023-1037.
- Klesse LJ, Parada LF (1998) p21 ras and phosphatidylinositol-3 kinase are required for survival of wild-type and NF1 mutant sensory neurons. *J Neurosci* 18:10420-10428.
- Kobayashi K, Sasaoka T, Morita S, Nagatsu I, Iguchi A, Kurosawa Y, Fujita K, Nomura T, Kimura M, Katsuki M, Nagatsu T (1992) Genetic alteration of catecholamine specificity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1631-1635.
- Lance-Jones C (1982) Motoneuron cell death in the developing lumbar spinal cord of the mouse. *Brain Res* 256:473-479.
- Leung T, Manser E, Tan L, Lim L (1995) A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* 270:29051-29054.
- Lin JH, Saito T, Anderson DJ, Lance-Jones C, Jessell TM, Arber S (1998) Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression. *Cell* 95:393-407.
- Luo L (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 1:173-180.
- Magie CR, Meyer MR, Gorsuch MS, Parkhurst SM (1999) Mutations in the Rho1 small GTPase disrupt morphogenesis and segmentation during early *Drosophila*

development. *Development* 126:5353-5364.

Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996) Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* 15:2208-2216

Matsushita N, Okada H, Yasoshima Y, Takahashi K, Kiuchi K, Kobayashi K (2002) Dynamics of tyrosine hydroxylase promoter activity during midbrain dopaminergic neuron development. *J Neurochem* 82:295-304.

Mazzoni IE, Said FA, Aloyz R, Miller FD, Kaplan D (1999) Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J Neurosci* 19:9716-9727.

Mercer EH, Hoyle GW, Kapur RP, Brinster RL, Palmiter RD (1991) The dopamine - hydroxylase gene promoter directs expression of *E. coli lacZ* to sympathetic and other neurons in adult transgenic mice. *Neuron* 7:703-716.

Mettling C, Gouin A, Robinson M, el M'Hamdi H, Camu W, Bloch-Gallego E, Buisson B, Tanaka H, Davies AM, Henderson CE (1995) Survival of newly postmitotic motoneurons is transiently independent of exogenous trophic support. *J Neurosci* 15:3128-3137.

- Milner LD, Landmesser LT (1999) Cholinergic and GABAergic inputs drive patterned spontaneous motoneuron activity before target contact. *J Neurosci* 19:3007-3022.
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453-501.
- Oppenheim RW, Calderó J, Esquerda J, Gould TW (2001) Target-independent programmed cell death in the developing nervous system. In: *Handbook of brain and behaviour in human development* (Kalverboer AF, Gramsbergen A, eds), pp. 343-407. Groningen: Kluwer.
- Özdinler PH, Erzurumlu RS (2001) Regulation of neurotrophin-induced axonal responses via Rho GTPases. *J Comp Neurol* 438:377-387.
- Pettmann B, Henderson CE (1998) Neuronal cell death. *Neuron* 20:633-647.
- Sasaoka T, Kobayashi K, Nagatsu I, Takahashi R, Kimura M, Yokoyama M, Nomura T, Katsuki M, Nagatsu T (1992) Analysis of the human tyrosine hydroxylase promoter-chloramphenicol acetyltransferase chimeric gene expression in transgenic mice. *Mol Brain Res* 16:274-286.
- Sendtner M, Pei G, Beck M, Schweizer U, Wiese S (2000) Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res* 301:71-84.
- Shirasaki R, Pfaff SL (2002) Transcriptional codes and the control of neuronal identity.

Annu Rev Neurosci 25:251-281.

Strutt DI, Weber U, Mlodzik M (1997) The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature* 387:292-295.

Takahashi M, Osumi N (2002) Pax6 regulates specification of ventral neurone subtypes in the hindbrain by establishing progenitor domains. *Development* 129:1327-1338.

Wei L, Roberts W, Wang L, Yamada M, Zhang S, Zhao Z, Rivkees SA, Schwartz RJ, Imanaka-Yoshida K (2001) Rho kinases play an obligatory role in vertebrate embryonic organogenesis. *Development* 128:2953-2962.

Winter CG, Wang B, Ballew A, Royou A, Karess R, Axelrod JD, Luo L (2001) *Drosophila* Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* 105:81-91.

Wünnenberg-Stapleton K, Blitz IL, Hashimoto C, Cho KW (1999) Involvement of the small GTPases XRhoA and XRnd1 in cell adhesion and head formation in early *Xenopus* development. *Development* 126:5339-5351.

Yaginuma H, Tomita M, Takashita N, McKay SE, Cardwell C, Yin QW, Oppenheim RW (1996) A novel type of programmed neuronal death in the cervical spinal cord of the chick embryo. *J Neurosci* 16:3685-3703.

Yamamoto Y, Henderson CE (1999) Patterns of programmed cell death in populations of

developing spinal motoneurons in chicken, mouse, and rat. *Dev Biol* 214:60-71.

Yamashita T, Tucker KL, Barde YA (1999) Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24:585-593.

York RD, Molliver DC, Grewal SS, Stenberg PE, McCleskey EW, Stork PJ (2000) Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol* 20:8069-8083.

Table 1. MBS のリン酸化レベルの定量

遺伝子型	蛍光輝度の相対値 (細胞数)	
	MBS	リン酸化 MBS
RhoA DN		
野生型	1.00 ± 0.05 (525)	1.00 ± 0.01 (466)
Cre ⁺ /RhoA DN ⁺	0.98 ± 0.05 (480)	0.69 ± 0.03 ^{**} (472)
Rho-K DN		
野生型	1.00 ± 0.05 (486)	1.00 ± 0.01 (476)
Cre ⁺ /Rho-K DN ⁺	1.00 ± 0.07 (511)	0.79 ± 0.07 [*] (487)

E10.5 の野生型マウスとダブルトランスジェニックマウスを用いて、thoracic レベルの凍結切片を作製し、抗 Isl1 抗体と抗 MBS 抗体もしくは抗リン酸化 MBS 抗体を用いた二重免疫染色を行った。Isl1 陽性細胞における MBS とリン酸化 MBS の蛍光シグナルの輝度をそれぞれのマウスに関して測定し、野生型の輝度に対するダブルトランスジェニックの輝度の比率を算出した。± SEM (n = 4)。輝度を測定した細胞数を括弧内に示した。Student's t test:

*p < 0.01、**p < 0.001。

Figure Legends

Figure 1. Cre-loxP 組み換え反応による RhoA DN と Rho-K DN の発現。(A) 発現誘導法の説明。DBH-Cre マウスと、CAT-RhoA DN マウスもしくは CAT-Rho-K DN マウスを交配させ、ダブルトランスジェニックマウス ($Cre^+/RhoA\ DN^+$ 、 $Cre^+/Rho-K\ DN^+$) を作製する。ダブルトランスジェニックマウスでは、Cre-loxP 組み換え反応により、特定の細胞で CAT 遺伝子が削除され、ドミナントネガティブ変異体の発現が誘導される。PA, ポリアデニレーションシグナル。(B) Cre-loxP 組み換え反応のパターン。DBH-Cre マウスと CAG-CAT-Z マウスを交配させて、ダブルトランスジェニックマウス (Cre^+/Z^+ マウス) を作製した。E9.5-E11.5 の Cre^+/Z^+ マウスを用いて、thoracic レベルの凍結切片を作製し、X-gal 染色を行った。染色シグナルは、発生過程の運動神経細胞が存在する腹側神経管の側方 (矢印) と、運動神経細胞の前駆細胞と思われる脳室側の細胞に認められた (矢頭)。また、交感神経節 (SG) と後根神経節 (DRG) にもシグナルが認められた。Scale bar, 50 μ m。(C) 発生過程の運動神経細胞における Cre-loxP 組み換え反応。E10.5 の Cre^+/Z^+ マウスを用いて、thoracic レベルの凍結切片を作製し、Isl1 の抗体と β -gal の抗体を用いた二重免疫染色を行った。Isl1 の染色シグナルは赤色、 β -gal の染色シグナルは緑色である。それらを重ね合わせた画像も示した。重ね合わせた画像を 4 倍拡大したものより、Isl1 のシグナルは核に、 β -gal のシグナルは細胞質に存在することが分かる。Isl1 陽性かつ β -gal 陽性の細胞は、核が赤色に、細胞質が緑色に見える。Scale bar, 50 μ m。(D) RhoA DN と Rho-K DN 遺伝子の発現誘導。E10.5 の $Cre^+/RhoA\ DN^+$ マウス、 $Cre^-/RhoA\ DN^+$ マウス、 $Cre^+/Rho-K\ DN^+$ マウス、 $Cre^-/Rho-K\ DN^+$ マウスそれぞれから total RNA を抽出し、RT-PCR でドミナントネガティブ変異体の転写産物を検出した。CAT、RhoA DN、Rho-K DN 各々の増幅産物のサイズは、順に 390 bp、617 bp、482 bp である。

Figure 2. $Cre^+/RhoA\ DN^+$ マウスにおける脊髄運動神経細胞の発生。(A) 抗 Isl1 抗体を用いた免疫染色。E10.5 と E12.5 の胎仔を用いて thoracic レベルの凍結切片を作製し、抗 Isl1 抗体を用いて免疫染色を行った。SM, 体性運動神経細胞; VM, 内臓性運動神経細胞。Scale bar, 50 μ m。(B) 脊髄運動神経細胞の数。E10.5 の胎仔の upper cervical、brachial、thoracic、lumbar 各々のレベルにおいて、Isl1 陽性細胞をカウントした。E12.5 では、thoracic レベルで SM、VM 各々の細胞数をカウントした。± SEM (n = 4)。Student's t test: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001。(C) TUNEL 染色。E10.5 の胎仔の upper

cervical、brachial、thoracic、lumbar 各々のレベルにおいて、TUNEL 染色を行った。Scale bar, 50 μm 。

Figure 3. Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスにおける脊髄運動神経軸索のパターニング。E10.5 の胎仔の運動神経軸索を順行性、逆行性にラベルして解析した。Dil 溶液を brachial レベルの腹側神経管に注入し、順行性にラベルした。また、forelimb に注入して逆行性にラベルした。E12.5 の胎仔の運動神経軸索を逆行性にラベルして解析した。Dil 溶液を forelimb と myotome に注入して、逆行性にラベルした。野生型マウスの結果を (A) に、Cre⁺/RhoA DN⁺ マウスの結果を (B) に示す。矢印と矢頭は、それぞれラベルされた軸索と細胞体を示している。腹側神経管から出て、腹側方向へ伸展する運動神経軸索を拡大したものを挿入図に示した。Scale bar, 500 μm 。

Figure 4. Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスにおける脊髄運動神経細胞の発生と軸索のパターニング。(A) E10.5 と E12.5 の胎仔の thoracic レベルにおける Isl1 陽性細胞の数をカウントした。± SEM (n = 4)。Student's t test: *p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001。 (B) TUNEL 染色。E10.5 の胎仔の thoracic レベルにおいて、TUNEL 染色を行った。Scale bar, 50 μm 。(C) 運動神経軸索のパターニング。E12.5 の胎仔の運動神経軸索を逆行性にラベルして解析した。Dil 溶液を forelimb と myotome に注入して、逆行性にラベルした。矢印と矢頭は、それぞれラベルされた軸索と細胞体を示している。腹側神経管から出て、腹側方向へ伸展する運動神経軸索を拡大したものを挿入図に示した。Scale bar, 500 μm 。

Figure 5. 発生初期の Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスの脊髄運動神経細胞に誘導されるアポトーシス。(A) アポトーシス誘導のタイムコース。様々な発生段階にある Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスの thoracic レベルの凍結切片を作製し、抗 Isl1 抗体を用いた免疫染色と TUNEL 染色を組み合わせる二重染色を行った。E10.5 の結果を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した結果、変性している運動神経細胞に TUNEL 陽性シグナルが認められた (矢印)。Scale bar, 25 μm 。(B) 変性している運動神経細胞における caspase-3 の活性化。E10.5 の Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスの thoracic レベルの凍結切片を作製し、抗 Isl1 抗体と抗 active form of caspase-3 抗体を用いて二重免疫染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した結果、変性している運動神経細胞に caspase-3 の活性が認められた (矢印)。Scale bar, 10 μm 。(C) アポトーシスを起こしている運動神経細胞の超微形態。E10.5 の Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスの thoracic レベルの超薄切片を作製し、電子顕微鏡で観察した。野生型マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マ

ウスそれぞれの運動神経細胞の電子顕微鏡像を示した。Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスでは、クロマチン構造の凝集、細胞質における電子密度の増加、細胞体の萎縮などが認められる。アポトーシスを起こした運動神経細胞が、ファゴサイト - シスによって取り込まれている (矢頭)。Scale bar, 2 μ m。

Figure 6. 発生後期の Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスの脊髄運動神経細胞に誘導されるアポトーシス。(A) Isl1 と TUNEL の二重染色。E14.5 と E16.5 の thoracic レベルの凍結切片を作製し、抗 Isl1 抗体を用いた免疫染色と TUNEL 染色を組み合わせ二重染色を行った。矢印は、運動神経細胞のカラム内に観察される TUNEL 陽性シグナルを示している。Scale bar, 50 μ m。(B) 運動神経細胞の数。± SEM (n = 4)。Student's t test: *p < 0.01、**p < 0.001。

Figure 7. Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスにおける筋肉組織とシュワン細胞の発生。(A) 筋肉組織を用いたヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色。E16.5 の野生型マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスを用いて forelimb の横断面に沿った凍結切片を作製し、HE 染色を行った。下のパネルは、破線で囲った領域を 25 倍に拡大したものである。B, 骨。Scale bar, 200 μ m。(B) S100 の抗体とニューロフィラメントの抗体を用いた二重免疫染色。E16.5 の野生型マウスと Cre⁺/Rho-K DN⁺ マウスを用いて thoracic レベルの凍結切片を作製し、抗 S100 抗体と抗ニューロフィラメント抗体を使用して、二重免疫染色を行った。運動神経軸索に沿って、シュワン細胞が観察される (挿入図中、矢頭)。Scale bar, 50 μ m。

Figure 1

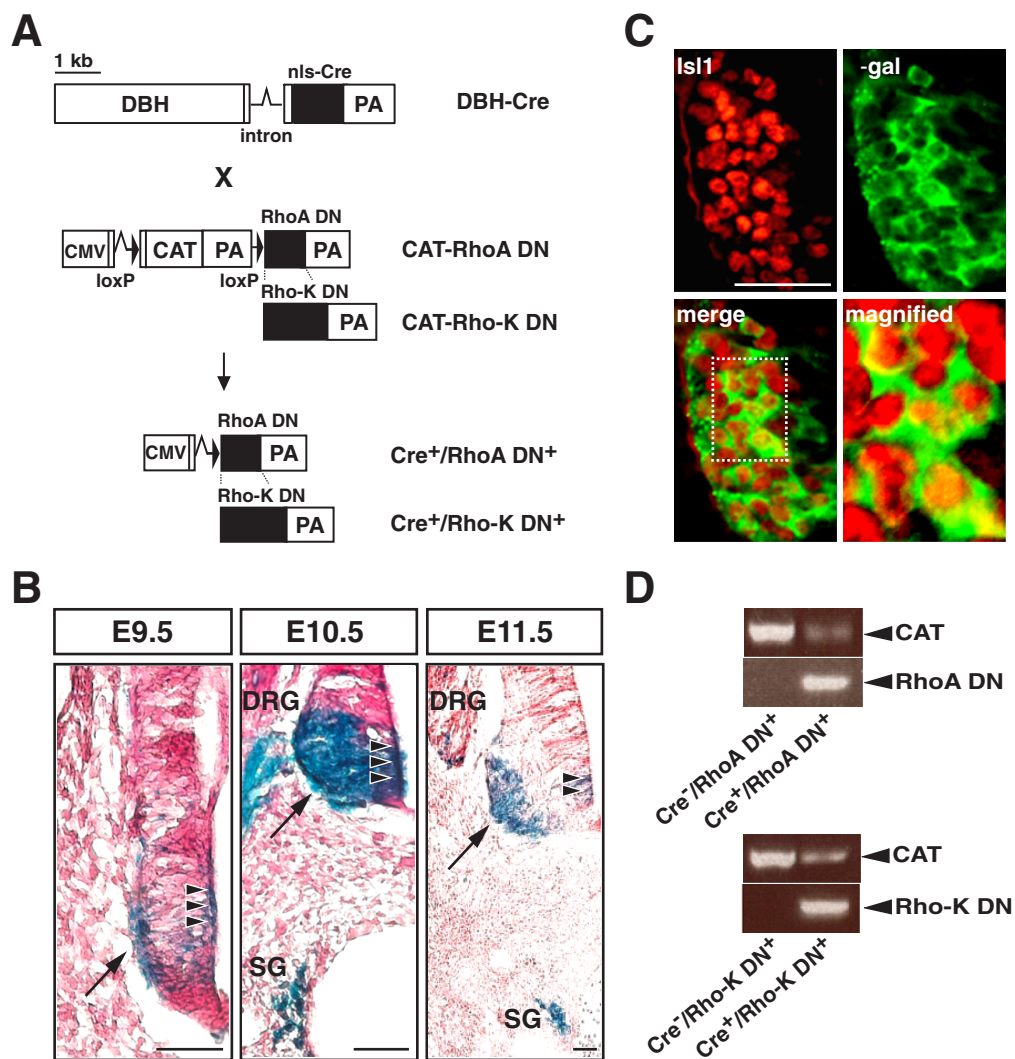


Figure 2

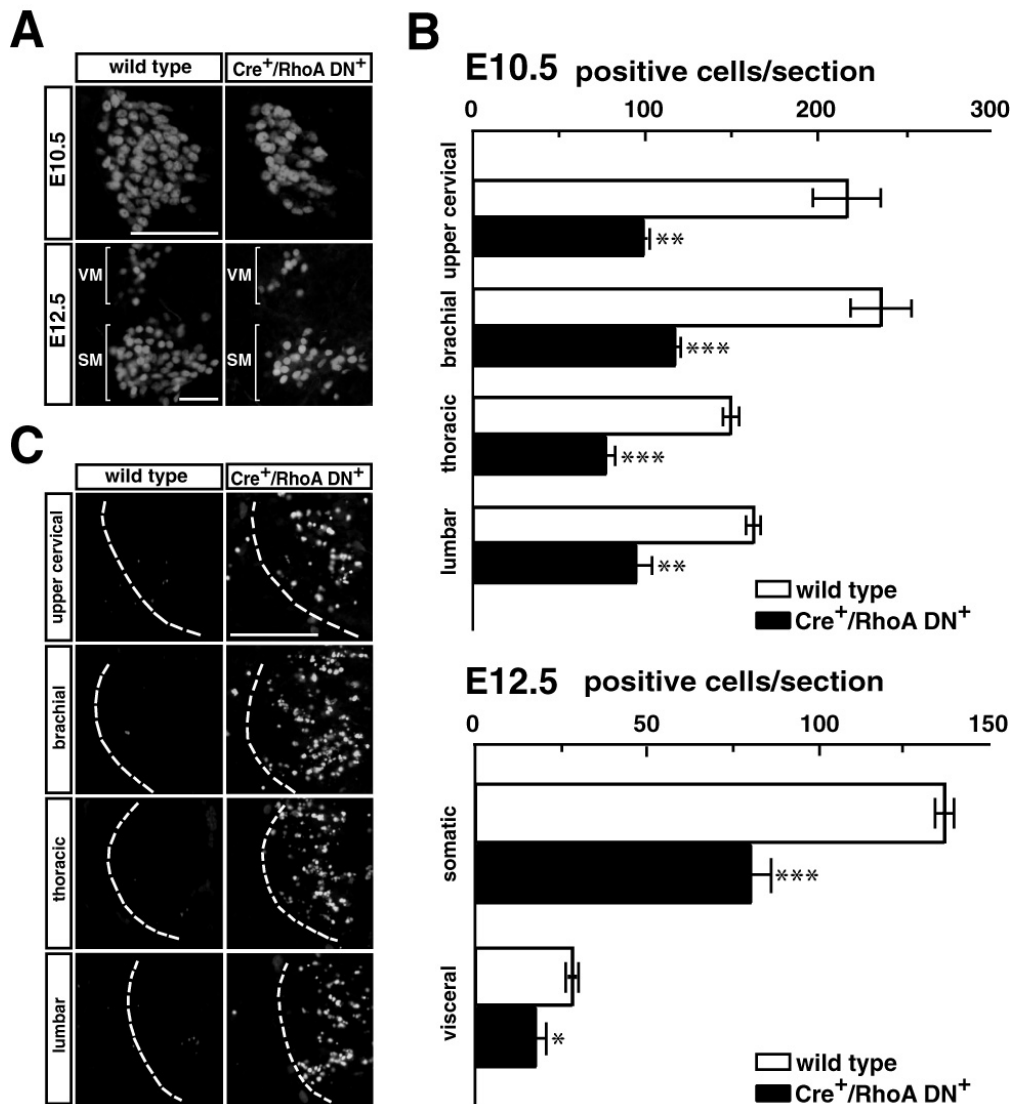


Figure 3

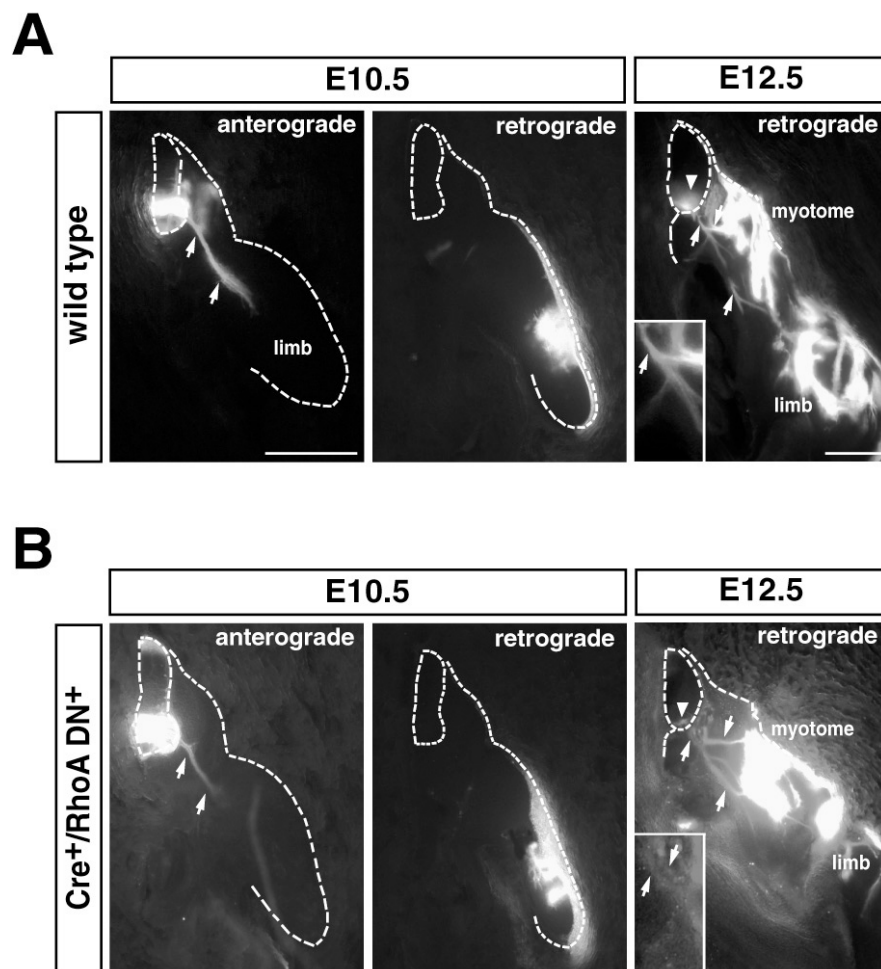


Figure 4

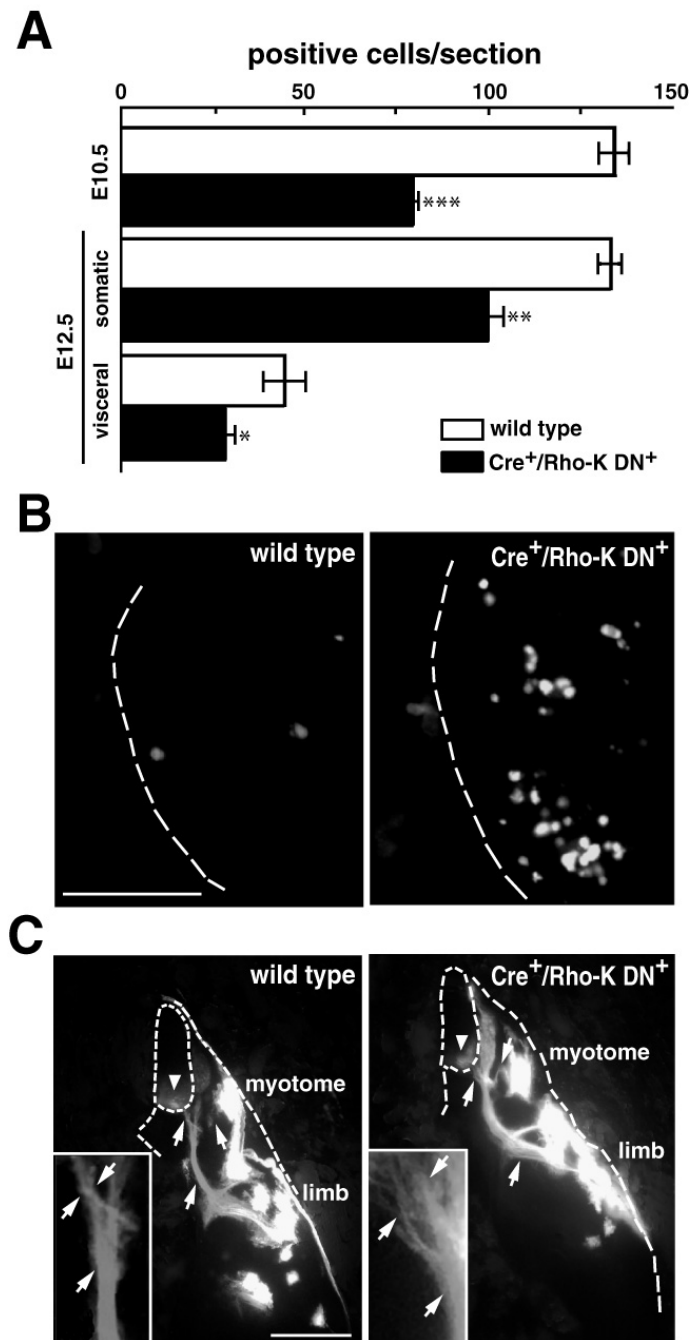


Figure 5

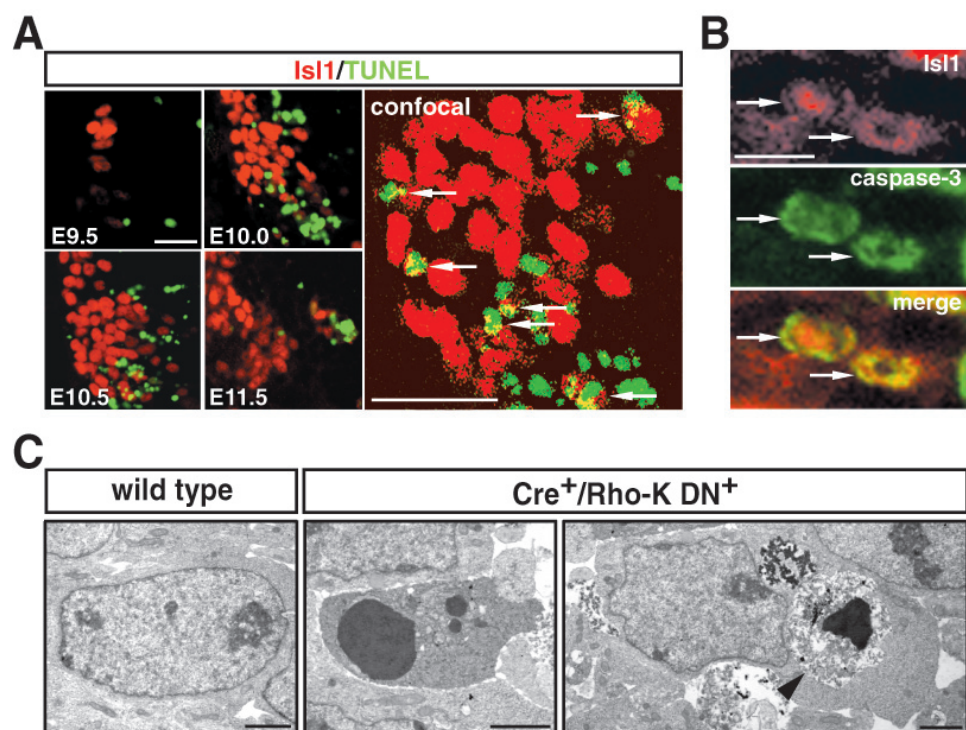


Figure 6

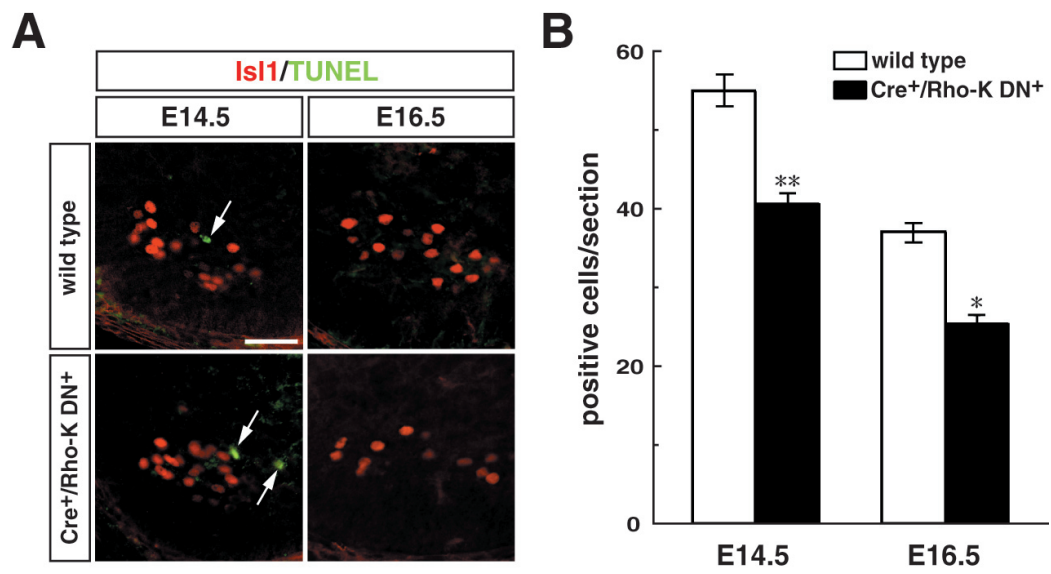


Figure 7

