

細胞離脱の実行役分子 Lzts1 による大脳形成制御

川口 綾乃

1. 大脳発生における細胞産生

生物種に応じた多様な形態を示す大脳も、もとは一層の未分化な神経上皮細胞が、神経前駆細胞（いわゆる神経幹細胞、放射状グリア）として分裂増殖を繰り返しつつ種々の細胞を生み出すことによって形成される。発生過程において通常の神経前駆細胞は放射状（radial）に長い形体をしており、細胞体・核は脳室帯（ventricular zone：VZ）にある。細胞体は細胞周期に応じて細長い頂端側突起の中をエレベーター運動し、G2期に脳室面へ向かい、M期に脳室面で分裂する。脳室面、すなわち神経上皮としての頂端側apical面で分裂することから、このような神経前駆細胞はaRG [apical radial glia；あるいはapical progenitor cells (AP)] とも呼ばれる（図1A）。ニューロン産生期にあたる胎生中期の大脳壁を脳室面側からながめると、突起の足先が細胞接着構造 [アドヘレンスジャンクション (AJ)] によって緊密にパックされた頂端側の上皮構造がよくわかる^{1,2)}。

ニューロン産生期である胎生中期には、多くのaRGは一つのニューロン系分化細胞（ニューロンや、ニューロンしか産生しない中間前駆細胞）と一つのaRGを生み出す「非対称分裂」を行う。ライブ観察などの実験技術の進歩によって、このような非対称分裂の場合であっても、ほとんどのaRGは脳室面に対して水平方向に分裂することが明らかになっている。すなわち非対称分裂でも分裂面（cleavage plane）は脳室面に垂直であり、これは前駆細胞を2個生み出す「対称分裂」時と同様である（この意味において、古い教科書に掲載されている分裂面方向と対称分裂・非対称分裂を対応づけたモデルは正しくない¹⁾）。非対称分裂によって生じた二つの細胞は、誕生後も脳室面のAJを相続し、数時間の後、分化細胞のみが頂端側突起を

脳室面から離脱させて外層へと移動を開始する（neuronal delamination）。機能的な脳組織構造が形成されるためにはこの離脱開始のタイミング制御は重要であり、そこには上皮間葉転換やニューロン分化に関連する複数の転写因子が関与することが報告されている^{1,2)}。一方で、それら転写因子の下流で具体的に細胞離脱を引き起こすメカニズムには未解明な部分が多く、特に分化細胞「だけ」を、その誕生から数時間のうちに速やかに脳室面から離脱させる分子機構は不明であった。

2. ニューロン移動開始の実行役分子 Lzts1

筆者らの研究グループは最近、この分化早期の細胞を遅延なく脳室面から離脱させる「実行役分子」としてLzts1 (leucine zipper putative tumor suppressor 1) を同定した³⁾。これまで我々は、単一細胞トランスクリプトーム解析に基づいて神経系の前駆細胞を分類し⁴⁾、さらにaRGの経時的な個性の変遷と細胞周期進行との関係について明らかにしてきた⁵⁾。その過程で、分化開始に伴いきわめて早期の段階で発現上昇する遺伝子の一つとして見いだした分子がLzts1である。Lzts1はN-ミリスチル化シグナル配列を持つタンパク質で、微小管重合の阻害作用を持ち⁶⁾、種々のがんへの関連性が報告されるとともに⁷⁾、神経系においては大脳皮質ニューロンのシナプス成熟に関与することが報告されている⁸⁾。

大脳原基におけるLzts1の局在はきわめて特徴的で、抗Lzts1抗体染色した組織を脳室面側から観察すると、AJを示すZO-1のメッシュ状シグナルのうち、一部のみがリング状に強いシグナルを示す（図1B）。これは分化早期の細胞、すなわちこれから離脱しようとする頂端側突起のAJリングであり、このような局在パターンを示す分子はこれまで報告がなかった。抗Lzts1抗体を用いた免疫電子顕微鏡法では、頂端側突起先端のAJベルトの細胞内側に金粒子が観察され、Lzts1は細胞骨格系も含めたAJ関連分子と相互作用していると思われる。

マウス胎仔大脳原基に生体内エレクトロポレーションによりLzts1を過剰発現させると、過剰発現された細胞はほぼすべて頂端側突起を退縮させ脳室面から離脱する。このとき、分化細胞の離脱時に報告される²⁾ アクトミオシ系の活性化を介した突起先端におけるAJリングの収縮と

名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物学分野（〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65）

Lzts1 as a master regulator of neuronal delamination in cerebral development

Ayano Kawaguchi (Nagoya University Graduate School of Medicine, Department of Anatomy and Cell Biology, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920817

© 2020 公益社団法人日本生化学会

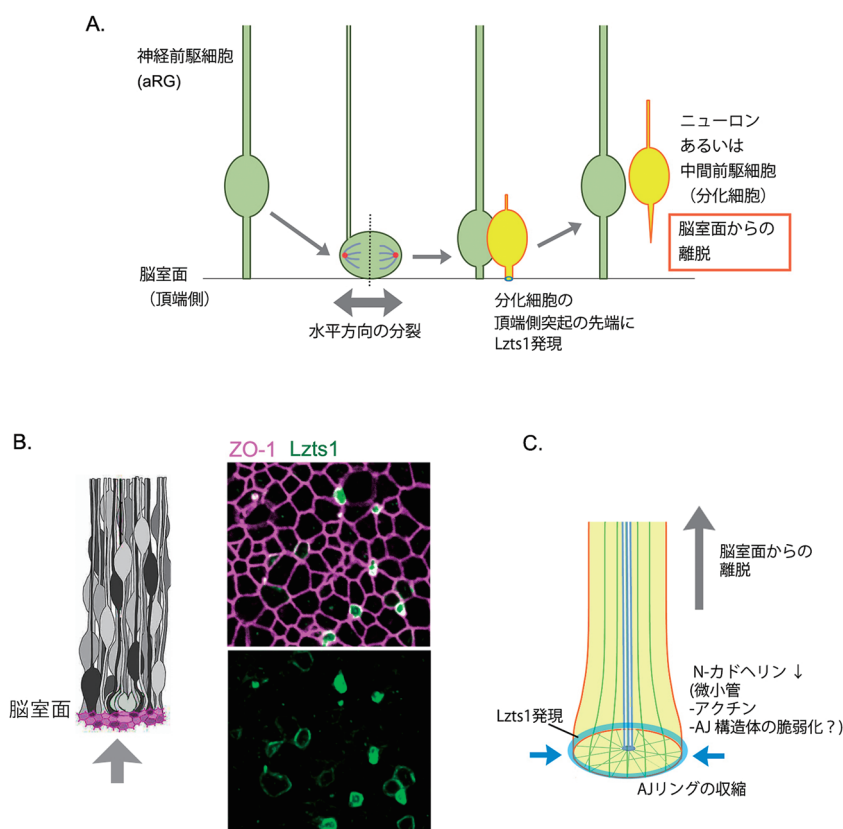


図1 ニューロン系分化細胞（幼若ニューロン，中間前駆細胞）の脳室面からの離脱

(A)ニューロン産生の時期でもほとんどの神経前駆細胞aRGは脳室面に水平方向に分裂する。生じる二つの細胞はともに脳室面を引き継ぐことにより頂端側突起を有し、後にニューロン系分化細胞のみが頂端側突起を脳室面から離脱させ大脳壁の外層へと移動していく。(B)マウス胎仔の大脳壁組織を脳室面側から観察。抗ZO-1抗体陽性（マゼンタ）のアドヘレンスジャンクション（AJ）のメッシュの一部にのみ抗Lzts1抗体陽性のシグナル（緑）が観察される。これは今から離脱しようとする分化細胞の突起の先端である。スケール：5マイクロメートル。(C)分化細胞離脱におけるLzts1の作用モデル。アクトミオシン系活性化により頂端側突起の先端を収縮させるとともに、頂端側の微小管-アクチン-AJ構造体²⁾を変化させ、AJのN-カドヘリン発現低下をもたらし速やかな細胞離脱が起こる。文献3を改変。

接着分子カドヘリンの発現低下が起こっていた。また逆にLzts1のノックダウンやノックアウトによって分化細胞の脳室面からの離脱・移動が遅延した。これらのことから、Lzts1は、誕生直後の分化細胞で早期に発現上昇し、分化細胞を遅延なく脳室面から離脱させる「実行役分子」であることが明らかになった（図1C）³⁾。アクトミオシン系の活性化のみでは突起離脱は起こらないことから、この離脱にはLzts1によるアクトミオシン系と微小管系への作用がともに関与していると推察される。

一方、Lzts1を大脳原基に強制発現させると、「外層へ向かう放射状突起を有した未分化な前駆細胞」が多数、脳室下帯（subventricular zone：SVZ）に出現した。またこれらの細胞は、アクトミオシン系の活性化を介した分裂直前のすばい細胞体の動き（mitotic somal translocation：MST）を示した³⁾。これらはいわゆるoRG（outer radial glia；後述）の特徴でもある^{1,9)}。そこでLzts1とoRG誕生との関連

性に注目して、さらに研究を進めることとなった。

3. 外層の神経前駆細胞 outer radial glia (oRG)

outer radial glia (oRG)はその名のとおりに、VZよりも外層・外側（そとがわ）のSVZに存在する、放射状に長い突起を持った別のタイプの神経前駆細胞である。basal radial glia (bRG)と呼ばれることもある。特にヒト、サルやフェレットなど脳回を有し複雑な大脳組織構造を持つ生物種の発生期の脳には豊富に存在し、厚い増殖帯を形成している^{1,9,10)}。マウスのように脳回を有さない、よりシンプルな大脳を持つ生物種でもoRGは存在するが、その数や増殖能は限られている（図2A）。脳の進化という点では、oRGが誕生し前駆細胞自身の増殖と多数のニューロン産生を果たすことが大脳皮質の巨大化に貢献しているものと考えられる。それゆえ2010年にHansenらがヒト大脳原基

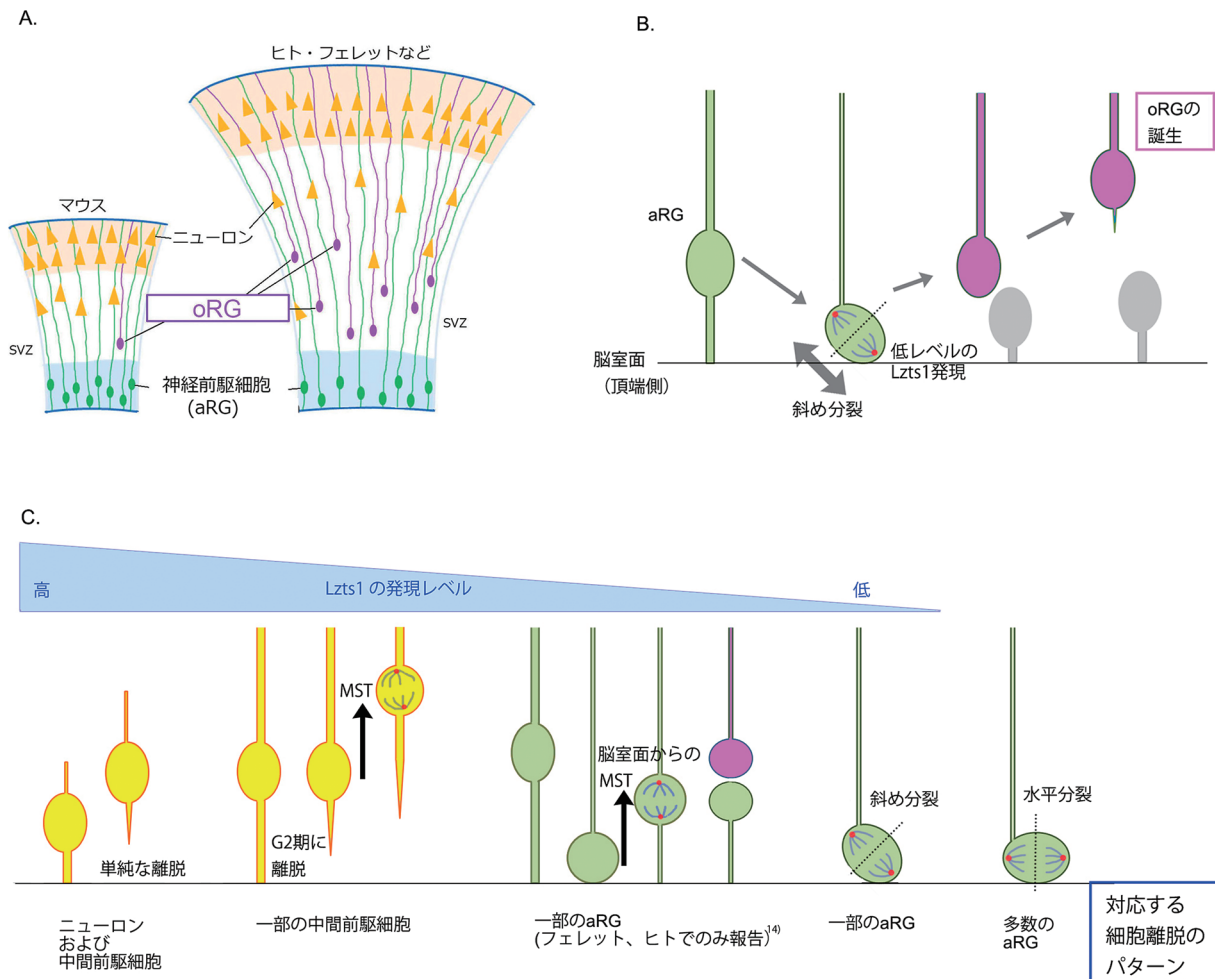


図2 outer radial glia (oRG) の誕生への Lzts1 の関与

(A) oRG は SVZ に存在する未分化な神経前駆細胞で、特に大脳にシワがある生物 (フェレットやヒト) に豊富に存在する。マウスにも少数の oRG が存在する。(B) oRG を生み出す神経前駆細胞 aRG の斜め分裂。斜め分裂によって脳室面を引き継がない細胞が誕生し、それが外層・外側 (そとがわ) へと移動して oRG となる。Lzts1 は頂端側の AJ リングの収縮と中心体の側方への固定を弱める作用によって斜め分裂を引き起こすと考えられる。(C) 斜め分裂を含め、大脳発生過程で観察される脳室面からの多様な細胞離脱現象は、Lzts1 を含む共通の分子機構のもとで行われている連続的な現象、すなわちスペクトラムとして俯瞰的に理解できる。MST (mitotic somal translocation) は細胞分裂直前のすばやい細胞体の動きでアクチン系系の活性化による。

内でその存在を報告して以来¹⁰⁾, oRG の増殖や分化を制御する機構の解析は大脳発生研究におけるホットピックの一つとなってきた。特に海外研究グループを中心として、セルソーターで分離したヒト oRG や、単一細胞レベルでのヒト oRG の大規模トランスクリプトーム解析が行われ、oRG の増殖制御に特徴的なシグナル経路が明らかにされてきている^{1, 11)}。しかしその一方で、そもそも個体発生の過程で oRG がどのように誕生するのか、それを制御する分子機構は十分に解明されていなかった。

oRG は、大脳発生の限られた時期に、脳室面での aRG の分裂によって生み出される。前述のように、通常 aRG は脳室面に対して水平方向に分裂するが、oRG 誕生の時期には分裂方向が斜めのものの出現頻度が増加する¹²⁾。ま

た実際に各種変異体モデルマウスなどで aRG の分裂方向が斜め・垂直な場合に脳室面を引き継がない娘細胞が誕生し、この娘細胞が oRG 様の性質を示すことから¹³⁾, aRG の分裂方向の変化が oRG 誕生の引き金であると考えられた (図2B)。

4. 低レベルの Lzts1 発現により oRG が誕生する

マウス単一細胞遺伝子発現情報によると、Lzts1 は一部の aRG でも低レベルで発現している。Lzts1 発現が oRG 誕生に関連するのであれば、低レベルな Lzts1 発現は aRG の斜め分裂を引き起こすのだろうか。実際にマウス aRG に Lzts1 を低レベルで発現させたところ、予想どおりに分裂

軸が傾き斜め分裂が増加した。また逆にLzts1発現をノックアウトしたaRGでは斜め分裂の頻度が減少し、結果としてSVZに存在するoRG様細胞の数が減少した。ただし前述のように、マウスではそもそもoRGの数は少なく増殖能も限られている。そこで大脳にシワを持ち、よりoRGの数が多生物種であるフェレットをモデル動物にして追加の実験を行った。フェレット胎仔脳への生体エレクトロポレーションによるLzts1ノックアウト操作によってoRG数が減少することが確認され、oRGの正常な数の誕生にLzts1が必要であることを明らかにすることができた³⁾。

Lzts1は微小管の重合を負に制御する⁶⁾と同時に、アクトミオシン系を活性化作用を有する。したがってLzts1はこれら細胞骨格系の制御を介して、分裂期aRG内での中心体の側方への固定を減弱させることと、分裂期細胞のAJリングを狭めるという両者の作用によってaRGの斜め分裂を惹起しているのだろうと推察される(図2B)。

5. 多様な細胞離脱現象をスペクトラムとして理解する

このようなLzts1の機能解析を通して、ニューロン分化細胞の脳室面からの離脱とoRG誕生という一見異なる二つの生命現象が、共通の分子機構のもとで行われていることが明らかになった。一方、これまでの脳原基のスライス培養を用いた細胞離脱のライブ観察によって、脳室面からの離脱にはさまざまなパターンがあることが報告されている¹⁾。脳室面で誕生した幼若ニューロンや中間前駆細胞の頂端側突起の離脱はその代表例であるが、たとえば中間前駆細胞には、G2期に頂端側突起を離脱したのちMSTを示しSVZで分裂するものもある。またヒトやフェレットのoRG誕生時には、低頻度ながら、脳室面で分裂期に入った直後にMSTを示して分裂するパターンもある¹⁴⁾。我々がLzts1を強制発現させた細胞をライブ観察したところ、興味深いことに、これらの多様な細胞挙動がLzts1の発現レベルに応じて出現した(図2C)。これは、斜め分裂を含めた多様な細胞離脱現象は、共通の分子機構のもとで行われている連続的な現象、すなわちスペクトラムとして俯瞰的に理解できるということを示している。またoRG誕生のタイミング制御という視点で解釈すると、このことは結果として脳の発生過程でニューロン産生の時期に「ニューロン産生能力を持った前駆細胞がSVZへ移動する」という現象を担保しているものと考えられる。

6. おわりに

Lzts1が分化細胞の頂端側突起の先で、細胞骨格系にどのように作用し頂端の収縮とAJでのカドヘリン局在の低下をもたらしているのかについては今後のさらなる研究が

必要である。

Lzts1はマウス、マーモセットからヒトまでよく保存されている。ヒトoRGの遺伝子発現情報¹¹⁾によるとLzts1は確かにヒトoRGでも発現しており、またマーモセット脳原基の組織内でもLzts1がマウスやフェレット同様の発現パターンを示していた³⁾。これらのことから、Lzts1がヒトoRG誕生にも関与している可能性は高いと予想しているが、その確認も今後の課題の一つである。

誕生するoRGの数という点で考えると、Lzts1はニューロン分化に関連するプロニューラル転写因子であるNeurog2の下流で発現上昇する遺伝子である³⁾ことから、未分化な神経前駆細胞の中で一定程度のニューロン分化関連因子の発現を許容する細胞状態¹⁵⁾が、結果としてoRG誕生を促していることが今回の研究によって示唆された。多数のoRGが誕生する、より複雑で巨大な大脳皮質を形成するヒト脳発生の過程では、その「許容」の程度が他の生物種に比して大きいことが想像され、今後その制御機構を明らかにすることが、進化に伴う脳組織構造変化の理解へとつながるものと期待される。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物学分野のメンバーや共同研究者の方々とともに行われたものです。ここに深く感謝申し上げます。

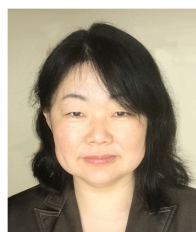
文 献

- 1) Uzquiano, A., Gladwyn-Ng, I., Nguyen, L., Reiner, O., Götz, M., Matsuzaki, F., & Francis, F. (2018) Cortical progenitor biology: Key features mediating proliferation versus differentiation. *J. Neurochem.*, **146**, 500–525.
- 2) Kasioulis, I., Das, R.M., & Storey, K.G. (2017) Inter-dependent apical microtubule and actin dynamics orchestrate centrosome retention and neuronal delamination. *eLife*, **6**, 6.
- 3) Kawaue, T., Shitamukai, A., Nagasaka, A., Tsunekawa, Y., Shinoda, T., Saito, K., Terada, R., Bilgic, M., Miyata, T., Matsuzaki, F., et al. (2019) Lzts1 controls both neuronal delamination and outer radial glial-like cell generation during mammalian cerebral development. *Nat. Commun.*, **10**, 2780.
- 4) Kawaguchi, A., Ikawa, T., Kasukawa, T., Ueda, H.R., Kurimoto, K., Saitou, M., & Matsuzaki, F. (2008) Single-cell gene profiling defines differential progenitor subclasses in mammalian neurogenesis. *Development*, **135**, 3113–3124.
- 5) Okamoto, M., Miyata, T., Konno, D., Ueda, H.R., Kasukawa, T., Hashimoto, M., Matsuzaki, F., & Kawaguchi, A. (2016) Cell-cycle-independent transitions in temporal identity of mammalian neural progenitor cells. *Nat. Commun.*, **7**, 11349.
- 6) Ishii, H., Vecchione, A., Murakumo, Y., Baldassarre, G., Numata, S., Trapasso, F., Alder, H., Baffa, R., & Croce, C.M. (2001) FEZ1/LZTS1 gene at 8p22 suppresses cancer cell growth and regulates mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10374–10379.
- 7) Vecchione, A., Baldassarre, G., Ishii, H., Nicoloso, M.S., Belletti, B., Petrocca, F., Zanesi, N., Fong, L.Y., Battista, S., Guar-

- nieri, D., et al. (2007) Fez1/Lzts1 absence impairs Cdk1/Cdc25C interaction during mitosis and predisposes mice to cancer development. *Cancer Cell*, **11**, 275–289.
- 8) Mayanagi, T., Yasuda, H., & Sobue, K. (2015) PSD-Zip70 deficiency causes prefrontal hypofunction associated with glutamatergic synapse maturation defects by dysregulation of Rap2 activity. *J. Neurosci.*, **35**, 14327–14340.
 - 9) Ostrem, B.E., Lui, J.H., Gertz, C.C., & Kriegstein, A.R. (2014) Control of outer radial glial stem cell mitosis in the human brain. *Cell Rep.*, **8**, 656–664.
 - 10) Hansen, D.V., Lui, J.H., Parker, P.R., & Kriegstein, A.R. (2010) Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*, **464**, 554–561.
 - 11) Johnson, M.B., Wang, P.P., Atabay, K.D., Murphy, E.A., Doan, R.N., Hecht, J.L., & Walsh, C.A. (2015) Single-cell analysis reveals transcriptional heterogeneity of neural progenitors in human cortex. *Nat. Neurosci.*, **18**, 637–646.
 - 12) LaMonica, B.E., Lui, J.H., Hansen, D.V., & Kriegstein, A.R. (2013) Mitotic spindle orientation predicts outer radial glial cell generation in human neocortex. *Nat. Commun.*, **4**, 1665.
 - 13) Shitamukai, A., Konno, D., & Matsuzaki, F. (2011) Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J. Neurosci.*, **31**, 3683–3695.
 - 14) Gertz, C.C., Lui, J.H., LaMonica, B.E., Wang, X., & Kriegstein, A.R. (2014) Diverse behaviors of outer radial glia in developing ferret and human cortex. *J. Neurosci.*, **34**, 2559–2570.
 - 15) Shimojo, H., Ohtsuka, T., & Kageyama, R. (2008) Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron*, **58**, 52–64.

著者寸描

●川口 綾乃 (かわぐち あやの)



名古屋大学大学院医学系研究科（細胞生物学分野）准教授。博士（医学）。

■略歴 1995年大阪大学医学部医学科卒業。3年間の眼科臨床を経て2002年大阪大学大学院医学系研究科修了。同年より理化学研究所発生再生科学総合研究センター研究員、08年より現職。

■研究テーマと抱負 頑強な脳発生に貢献する、神経前駆細胞の運命決定の仕組みに興味を持って研究しています。

■ウェブサイト <https://researchmap.jp/akawa>

■趣味 小学生の頃から推理小説・探偵小説が好きでシャーロック・ホームズが憧れでした。研究の中での仮説の立案と検証は、探偵業に似ているかもしれません。