

研究課題別評価

1 研究課題名: 大脳皮質の生後発達の分子基盤

2 研究者氏名: 岩里琢治

3 研究の狙い:

高等動物の神経回路が機能的なものとして成熟するためには、生後の一定期間に外界からの適切な刺激を受け、微調整されることが必須である。こうした活動依存的回路発達の実体および分子機構はほとんど未解明である。私は、マウス体性感覚野第4層のバレル形成という優れたモデル系に注目して、この問題に取り組んできた。本研究では、NMDA型グルタミン酸受容体 (NMDAR) と cAMP という神経可塑性の中心的分子が、バレル形成という発達期可塑性に関して、体性感覚経路のどこで、どのように働いている(あるいは働いていない)かを、明らかにしようとした。そのために、条件的遺伝子ノックアウトの手法を用いたが、未だ発展途上の技術であり、その開発、改良も同時に行ってきた。

4 研究成果:

4-1. 研究の背景: バレルは、1970年に報告されて以来、発達期可塑性のモデルとして注目されてきた。しかし、方法論的な困難のため、その分子レベルの機構は未解明であった。1990年代半ばに、遺伝子ノックアウトの手法が導入され、ようやくバレル形成に関与する分子が同定され始めた。しかし、これらの研究で用いられたのは全て全身性のノックアウトであったため、多くの場合、広範囲な異常がみられ、そのためそれぞれの分子が経路のどこでどのように働くかという問題を明らかにすることができなかった。さきがけ研究に先行して、私達は、Cre/loxP 組換えシステムを応用し、体性感覚系の脳幹、視床という中継核での遺伝子機能を保存したまま、大脳皮質においてのみ遺伝子をノックアウトすることを可能とし、問題解決の手がかりをえた。また、大脳皮質の興奮性神経細胞でのみ NMDAR を欠損する CxNR1KO マウスを作製、解析することにより、大脳皮質 NMDAR がバレル形成において重要な働きをすることを明らかにした (Iwasato et al., 2000)。

4-2. NMDAR: NMDAR はシナプス後膜に局在するイオン透過型グルタミン酸受容体であり、活性化されるとカルシウム流入によって、様々な経路を動かす「可塑性の鍵」となる分子である。CxNR1KO マウスの第4層で、バレル形成のどのステップがどのように障害されているかを詳細に解析することによって、NMDAR によるバレル形成機構を知る手がかりが得られるはずである。

生後数日の間にヒゲを傷害して入力を遮断すると、対応するバレルが縮小し、隣接するバレルが拡大するという可塑性があることが知られている。従来、薬理学的手法を用いた研究から、この種の可塑性に大脳皮質 NMDAR が関与すると考えられていた。本研究において、この仮説を、CxNR1KO マウスを用いて検証した。その結果、大脳皮質の興奮性神経細胞の NMDAR がなくても、この種の可塑性が正常に起きることを見いだした。私は、「この種の可塑性」には大脳皮質ではなく脳幹や視床といった中継核での機構が重要であり、薬理学的阻害実験では大脳皮質だけでなく視床などの NMDAR の機能が阻害されたために、可塑性が減少したと考えている。私達の条件的遺伝子欠損マウスの系では、薬理学にみられるような、分子特異性、領域特異性に関する不確かさはなく、大脳皮質興奮性神経細胞の NMDAR はヒゲ傷害によって誘導される視床-皮質軸索の微調整には関与しない、ということが明らかとなった。この研究は、米国のグループとの共同研究として、こちらの主導でおこなったものだが、共同研究者の博士号取得のため、筆頭第一著者を譲った。

CxNR1KO マウスの解析より、ポストシナプス側に存在する NMDAR がプレシナプス側、ポストシナプス側それぞれの回路微調整に重要な働きをすることはわかっていた (Iwasato et al., 2000)。本研究では、CxNR1KO マウスのプレ側、ポスト側でどのような異常が起きているかをより詳細に解析した。ポストシナプス側に関しては、ゴルジ染色によって樹状突起の方向性を解析した。野生型マウスでは、

樹状突起はバレル中心に向かって非対称的な伸展をするが、CxNR1KO マウスでは、そのような方向性はみられなかった。また、プレ側としては、単一視床-皮質軸索終末の形態を発達段階を追って解析した。その結果、生後3日目ごろから、野生型と比較して、CxNR1KO マウスでは、側方により広い領域に投射することが明らかとなった。また、層特異性に関して、野生型マウスの視床-皮質軸索は、第4層に選択的に投射するが、そのような傾向は CxNR1KO マウスでは薄れていることが明らかとなった。これらの結果は、ポストシナプスに存在するNMDARがポスト側、プレ側双方に働きかけ、ヒゲと一群の第4層神経細胞との1対1対応を形成することを示唆する。第4層細胞の細胞体クラスターであるバレルが形成されるまでには、さらに多くの機構の関与が必要であることは自明だが、その最初かつ最も重要なステップは1対1対応が形成されることであるはずであり、そのステップに大脳皮質 NMDAR が関与していることが示された。

今後は、CxNR1KO マウス体性感覚野第4層のシナプスレベルの形態、生理学的な解析を行うことにより、NMDAR の機能をより詳細に解析していきたい。また、CxNR1KO マウスは、NMDAR 下流の分子をスクリーニングするための材料としても有効であると考えられ、その方向の研究を進めたい。

4-3. cAMP: アデニル酸シクラーゼ1(AC1) の自然発生変異マウスの解析から、cAMP 経路がバレル形成に重要であることが知られている。しかし、この全身性の変異マウスを用いた研究では、AC1 を起点とする cAMP 経路が、体性感覚経路のどこで機能しているかについては解明できなかった。cAMP は NMDAR と同様に可塑性に関して、多くの経路の起点となる重要な分子であり、その機能する領域によって異なった作用が期待される。バレル形成機構の理解のためには、この分子の作用する場所を明確にすることは、重要と考えられた。私達は、先に開発した大脳皮質興奮性神経細胞特異的遺伝子欠損システムと、今回新しく作製した floxed AC1 マウスを交配することによって、大脳皮質特異的 AC1 ノックアウト (CxAC1KO)マウスを作製した。結果は、未発表であるため、ここには記載できないが、従来の考え方とは異なる AC1 の新しい作用の仕方が明確となった。さらに、このマウスは、これまでに隠されていた可能性のある微小な(しかし重要な)AC1 の機能を知るための有益な材料となることが示された。この研究は、今後1年間ぐらいの予定で第一報にまとめたいと考えています。また、このマウスの解析の途中で、いくつかの予想外の結果に遭遇し、その解決の中で条件的遺伝子ノックアウトを使った研究の進め方に関して多くを学ぶことができた。

4-4. Emx1-Cre マウス: 2000年の論文で発表した大脳皮質特異的 Cre (Emx1-Cre)マウスは、3種類の方法で作製した計5系統の1つであり、他の4系統のマウスの解析は、時間の制約上保留されていた。4.2のテーマで遭遇した問題点解決のための必要性から、本研究において、5系統に関して、発達段階を追って Cre/loxP 組換えのパターン、および Cre 蛋白質の発現のパターンを詳しく解析した。その結果、大脳皮質興奮性神経細胞で遺伝子ノックアウトを行う点では、すべて共通であるが、それぞれ少しずつ異なった特徴を持つことが明らかとなり、目的によって選択できる貴重なリソースを提供することができた。この解析を行ったことは、私自身の条件的遺伝子ノックアウト法に関する理解を深め、上述の問題点解決のための大きな力となった。極言すれば、この解析を行っていなければ、問題点に気付かず間違った結論を導いていた可能性も捨てきれない。

5 自己評価:

バレル形成において、どのような分子がどこでどのように働いているかを知るという目標は、残念ながらまだ入り口のあたりをうろついている段階である。条件的遺伝子ノックアウトの手法は、時間がかかるので、敬遠されたり、不適切に簡略化されて使用されることがしばしば見受けられる。しかし、本研究によって、NMDAR, AC1 の働き方について少しずつ明確になってきているのは間違いなく、それは従来の方法ではなしえなかったことである。発達期可塑性の研究の確実な発展のためには、結局、時間がかかっても条件的遺伝子ノックアウトの手法を洗練しながら、一步一步解析を進めることも必要と考えられる。この3年間の研究の進展のスピード、深みに関しては決して満足のいくものとはいえない。今後は、これまでに作製したマウスや培った経験を活かし、もう少し研究のスピード、幅、深み

を増して行きたいと思う。

6 研究総括の見解:

神経生物学の重要課題であり、応募時までに蓄積した自己の優れた研究成果を踏まえて、バレル形成の構築という非常に困難な目的に挑戦した。Conditional Knock Out 等の手法を果敢に導入して着実に成果を挙げてきた。中でも、従来の常識とは異なり、大脳皮質 NMDAR は末梢感覚器の傷害によって誘導される可塑性に大きく関与しないことを明示し公表したことは高く評価できる。いずれにせよ、解析が容易でなく時間を要する課題であるので、進捗のスピードは今一步であるが、豊かなデータの蓄積がなされているので今後の展開に十分期待できる。

7 主な論文等:

主な原著論文

1. Lee, L.-J., Iwasato, T., Itohara, S., Erzurumlu, R. Exuberant Thalamocortical Axon Arborization in Cortex-Specific NMDAR1 Knockout Mice. *J. Comp. Neurol.* (in press)
2. Iwasato, T.+, Nomura, R., Ando, R., Ikeda, T., Tanaka, M and Itohara, S.+ Dorsal Telencephalon-Specific Expression of Cre Recombinase in PAC Transgenic Mice. *Genesis* 38, 130-138 (2004) +The corresponding authors
3. Inoue, H., Tsukita, K., Iwasato, T., Suzuki, Y., Tomioka, M., Tateno, M., Nagao, M., Misawa, H., Saïdo, T.C., Miura, M., Itohara, S., Takahashi, R. The crucial role of caspase-9 in the disease progression of a transgenic ALS mouse model. *EMBO J.* 22, 6665-6674 (2003)
4. Datwani, A. *, Iwasato, T.*, Itohara, S., and Erzurumlu, R.S.+, Lesion-induced thalamocortical axonal plasticity in the S1 cortex is independent of NMDA receptor function in excitatory cortical neurons. *J. Neurosci.* 22, 9171-9175 (2002).
* *The first two authors contributed equally to this work.*
+ *The corresponding authors*
5. Datwani, A., Iwasato, T., Itohara, S., and Erzurumlu, R.S. NMDA receptor-dependent pattern transfer from afferents to postsynaptic cells and dendritic differentiation in the barrel cortex. *Mol Cell Neurosci*; 21: 477-92 (2002).

招待講演

1. 岩里 琢治 背側終脳特異的遺伝子操作法の開発と体性感覚野神経回路発達研究への応用 2003年神経化学学会(新潟)シンポジウム
2. Takuji Iwasato Genetic Dissection of Barrel Formation in the Rodent Somatosensory System. Workshop on "the Molecular Basis of Synaptic Plasticity" (2004年7月1-2日: 米国、New York University)

主な口頭発表(シンポジウム、ワークショップ、海外学会)

1. 岩里 琢治 マウス体性感覚野の発達と NMDA 受容体機能、24回日本分子生物学会年会(2001年12月9-12日: 横浜)ワークショップ
2. Takuji Iwasato Genetic Dissection of Activity-dependent Development of the Mouse Somatosensory Cortex: Roles of NMDA receptor in the barrel formation. 特定領域A 神経回路の成熟と特異的機能発現のメカニズム 冬の公開シンポジウム(2002年1月30日: 東京)(英語発表)
3. Takuji Iwasato, Ryochi Nomura, Reiko Ando, Shigeyoshi Itohara. Cerebral Cortex-Specific Gene Manipulation by PAC Transgenic Mouse. 32nd Annual Meeting, Society for Neuroscience (2002年11月7日: 米国)
4. 岩里 琢治 体性感覚野マップ精緻化の分子機構: マウス逆遺伝学的解析 平成14年

シナプス研究会 (2002年12月5-6日:生理研)シンポジウム

分担執筆

1. Reha S. Erzurumlu and Takuji Iwasato 『Patterning of the Somatosensory Maps with NMDA Receptors』: 図書名「Development and Plasticity in sensory Thalamus and Cortex」, Guido, Erzurumlu, Zoltan 編 Kluwer Academic/ Plenum Publishers(印刷中)
2. 岩里琢治 『大脳皮質神経回路のメカニズムをタンパク質、遺伝子レベルで探る-マウス体性感覚(バレル)野をモデル系として』 「運動とタンパク質・遺伝子」柳原大、内藤久士編 有限会社ナップ 50-65頁(2004年)
3. 岩里琢治 『神経活動依存的メカニズムによる脳回路発達』 「みる見るわかる脳・神経科学入門講座 下巻」渡辺雅彦編 株式会社羊土社 73頁-87頁 (2002年)

総説

1. 岩里琢治 『げっ歯類バレル構造の活動依存的発達』 蛋白質酵素増刊「神経回路の機能発現のメカニズム」大森治紀、澁木克栄、野田亮、山森哲雄編 49巻3号 351-357頁(2004年)
2. 岩里琢治、糸原重美 『マウス遺伝学による神経回路網精緻化の研究』 生体の科学 54巻2号 138-145頁 (2003年)