

**「脳神経回路の形成・動作と制御」研究領域 領域活動・評価報告書**  
**－平成 25 年度終了研究課題－**

研究総括 村上 富士夫

1. 研究領域の概要

本研究領域は、脳の統合的理解を目指し、新たな視点に立って脳を構成する神経回路の形成やその動作原理ならびにその制御機構の 解明に挑戦する研究を対象とします。

具体的には、神経回路や脳の機能単位である神経核・層構造の形成、領域や神経細胞の特異性の獲得、単一神経細胞における情報処理、神経細胞間の情報伝達やその可変性、神経細胞のネットワークとしての機能発現や可変性、さらには複雑なネットワークの集合体である 領域・領域等々の形成機構および動作原理、ネットワークの制御機構の研究を対象とします。また、グリア細胞など神経細胞以外の神経系の 細胞の役割や、神経細胞数の維持の機構に関わる研究も含みます。さらに、神経回路形成や動作原理の解明の飛躍的發展につながるような、革新的な基盤技術の創出も対象とします。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 9件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1) 選考は、「脳神経回路の形成・動作と制御」領域に設けた選考委員13名の協力を得て、研究総括が行う。

2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。

3) 選考に当たっては、選考方針検討会を開いて検討し、さきがけ共通の選考基準(URL：<http://www.jst.go.jp/pr/info/info666/shiryuu4.html>)の他、以下の点を重視した。

提案が提案者自身の着想であることを特に重視し、

また分野・研究環境に関して採択課題が多様性を持つよう配慮する。

さらに提案者の性別あるいは実施場所の国内外を問わない。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき総括および領域アドバイザー14名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ2課題を推薦した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数		
			15件	内 訳	3年型
対象数	210件	33件			

( )内は大挑戦型としての採択数。

備考:

1)平成22年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・久場研究者、小宮山研究者、名越研究者

研究期間が 5 年で、今年度終了しないため。今年度は中間評価を実施する(中間評価結果：

<http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/mid-term/index.html>.)

・安部研究者

3年型大挑戦型として採択され、期間延長審査の結果、2年間延長することが決まったため。

・山東研究者(大挑戦)、杉山研究者

最先端・次世代研究開発支援プログラムに採択され、H22 年度末で研究を中断したため。

2)他の年度採択課題で今年度の事後評価対象となるものは該当なし。

## 5. 研究実施期間

平成22年10月～平成26年3月(3年型)

## 6. 領域の活動状況

領域会議はこれまでに9回実施している。会議では各研究者の発表時間を越える時間を質疑討論に充てて十分な議論を行い、多様な研究者間の相互刺激とアドバイザーからの助言を期した。また研究成果報告会と合わせ特別講演として外部より5名の著明な神経研究者、および6名の領域アドバイザーと総括に、研究の進め方を含めて講演していただいた。

研究費の執行にあたっては、進捗と研究環境を把握のうえ柔軟に対応した。

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:

全員について総括と技術参事がサイトビジットを実施したほか、必要に応じて総括または技術参事が訪問・面談して研究環境と進捗の把握に努めた。

## 7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成 25 年 11 月 評価会開催  
平成 26 年 3 月 研究総括による事後評価  
平成 26 年 5 月 被評価者への結果通知

## 8. 事後評価項目

- (1)外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況
- (2)得られた研究成果の科学技術への貢献

## 9. 評価結果

当領域は上記の概要にもあるように広大な神経科学分野の多様な研究を採択してきたことを反映して、本中間報告が対象とする9名の研究課題も方法的には生理学的、遺伝学的、生理学的、から神経システム論的アプローチまで、問題設定も神経回路形成から回路解析、神経疾患など多彩な組み合わせとなっている。これらの研究者が領域会議や懇親会で他の領域研究者と議論しながら相互に知識と視野を広め、単独では望めなかった地平をそれぞれが切り開き、また相互に協力も発生してきた。ほぼすべての研究者で研究成果がすでに論文発表となっており、そうでない場合でも近く大きい成果が見込まれる。なお期間中に5名の研究者が昇格を果たし、うち2名は教授に昇格している。

1. 大森 義裕 研究者「繊毛が神経回路形成・維持・機能発現に果たす役割とその分子メカニズム」  
神経細胞の繊毛にはレセプター分子が局在し、またその異常は各種の神経疾患・行動異常や肥満・糖尿病に関わることが認識されるようになってきたが、その分子メカニズムは不明であった。本研究では遺伝子改変マウスと遺伝子ノックダウンゼブラフィッシュを使って、プロテインキナーゼ Mak および ICK が神経細胞繊毛に局在し、その形態制御に重要であることを明らかにした。さらに Mak がリン酸化する分子を同定して解析を進めている。ICKについてもコンディショナルノックアウトマウスおよびゼブラフィッシュ変異体の解析により、繊毛内の分子輸送系への関わりを明らかにするとともに ICK が神経系において発生段階特異的に繊毛形成を制御することを見出した。これらは大きな成果と認められる。今後、両キナーゼ下流の分子メカニズムをさらに確立し、関係する神経回路を同定するとともに、キナーゼ上流のレセプター群との関係も明らかにしてゆくことにより、各種の神経繊毛関連疾患の治療・対処法に手掛かりが得られることが期待される。

2. 佐藤 純 研究者「ショウジョウバエ視覚系における機能的な神経回路形成機構の解明」  
昆虫脳で重要な視覚情報処理が行われるメダラ神経節は精妙な層構造と直行するカラム構造を有しており、

その形成メカニズムと神経回路構築におけるその意義を解明できれば、脊椎動物脳神経回路形成機構の理解にも大きな手掛かりが得られる予想される。本研究ではまずショウジョウバエのメダラ前駆体神経上皮における発現パターンとその経時変化から転写制御因子を絞り込んだ。そして、実際に Hth を始めとする一群の転写制御因子の働きによりまず同心円状の区画化と神経細胞タイプの運命決定が起こること、そしてストライプ状に神経前駆細胞で発現する転写制御因子を5個同定してこれらの間の作用によって特定の神経細胞種例えば Mi1 神経細胞が誘導されることを示した。さらに特定の転写制御因子のもとに細胞接着因子 N-cadherin が発現して Mi1 に特徴的な神経突起の敷設が起こることも示した。これらは特に重要な発見であり、すでに論文発表を行なっている。今後、このような解析を異なる細胞系譜についても展開して原理の普遍性を確立し、また敷設途上の神経突起を介する神経細胞間のクロストークの解析も推進できれば、脊椎動物脳の神経回路構築の理解にも大きい先導的インパクトを与えるものと十分に期待できる。

### 3. 竹林 浩秀 研究者「脳の左右非対称性形成機構とその生理学的意義の解析」

本研究は竹林研究者が先に偶然発見した左右非対称にトランスジーンを発現する Tg144 トランスジェニックマウスを解析することにより、脳左右差の未知の側面を抉り出そうとしたものである。脳組織学的解析ではトランスジーン発現が左右ランダムに起こり脱メチル化剤の影響を受けることなどを示した。さらに挿入遺伝子座の解析を完成させ、また利き手テストによる行動解析ならびに体左右軸に関わる iv 変異との関係解析も行い、Tg144 左右非対称発現はこれらとは独立の現象であることを明らかにした。本研究で開発した活動依存性ハイブリッドプローブにより今後この発現左右差の機能的意義に手掛かりが得られることが望まれる。長期的な視点でこの不思議な現象に取り組み、その意義が急転解明される時が来ると期待されるが、そのためにもこれまでの知見を記載報告し、またリソースを公共化することが望ましい。

### 4. 竹本 さやか 研究者「リン酸化による大脳辺縁系情動回路修飾機構の解明」

竹本研究者は先にプロテインキナーゼ CaMKI $\gamma$  を同定クローニングし、この酵素が情動に関わる扁桃体などに特徴的な分布をなすこと、また培養神経細胞の突起伸展に関わることを明らかにした。本研究では CaMKI $\gamma$  の情動神経回路における役割を、その組織学的局在、酵素学的解析、BDNF から Ca を介するシグナル系の解析、さらに遺伝子改変マウスを用いた行動解析によって明らかにしようとしたものである。この間の研究により CaMKI $\gamma$  が扁桃体中心核神経細胞の棘突起に局在し生化学的分析結果と対応すること、他の CaMK とは異なり低 Ca でベーサルな酵素活性を示すこと、その欠失細胞で BDNF の神経突起伸展作用が消失すること、さらにその欠損マウスでは社会行動の異常を示すことを見出しており、これらは重要な成果である。また扁桃体においてより精密な遺伝子制御実験を可能にするためのツール開発も進めている。近く行動実験の成果を含め大きく纏まった成果が十分に期待できる。今後遺伝子欠損マウスでのレスキュー実験が成功し、in vitro での実験結果と生体での知見との関係をより明確にすることができれば、自閉症やモルヒネ中毒など扁桃体に関わる神経疾患の病理と対処法に手掛かりが得られることも期待できる。

### 5. 田中 暢明 研究者「脳の内的環境を制御する神経伝達機構」

動物行動の基本パターンは対応する神経回路により定式化されているものの、個体の置かれた状況により行動表出を適切に修飾する神経回路が介在し、モノアミン、ペプチドホルモンなどの神経伝達/修飾物質が後者に関わると考えられるが、そのような機能的回路の実体と機能様式は未だ不明な部分が多い。本研究では遺伝学的な実験操作が容易かつ豊富なショウジョウバエを用い、嗅覚応答行動、具体的には性フェロモン応答・産卵行動や求餌行動などに着目し、行動表出修飾の有力なメカニズムとなる応答閾値調節に関して神経回路の観点からアプローチしたものである。交尾に伴い雌バエに移入する特定のペプチドホルモンが、雄フェロモンを感知する特定の嗅覚神経細胞のカルシウム応答の閾値を引き上げること、他方でこのペプチドは雌の産卵環境への嗅覚的誘因物質フェニルアセトアルデヒドに対する応答閾値は変化させないことを見出したことは興味深い成果である。また個体行動レベルでの解析を進めるための実験装置の開発を進めており、空腹と選択行動について予備的成果が得られている。今後得意とする蛍光顕微鏡による神経線維連絡解析と併せて特定行動を調節修飾する回路のメカニズムの解明が進むことが期待される。

### 6. 戸島 拓郎 研究者「神経軸索ガイダンスを制御する普遍的シグナル伝達の時空間解析」

神経軸索が正しい標的に誘導されるメカニズムについては古くから研究がなされて、軸索ガイダンス因子に関する研究は大きく進んだ。それを受容する成長円錐における細胞内メカニズムについてはその研究が遅れていたが、先の戸島研究者らによる小胞体からの Ca 放出および膜トラフィッキングの意義に関する先導的発見により大きく展開した。本研究では、Ca シグナルから膜トラフィッキングへのシグナル系、および環状ヌクレ

オチド(cAMP, cGMP)シグナルなどについて解析を展開し、プロテインキナーゼ/フォスファターゼ群の関与によるエクソ/エンドサイトーシスの制御、および両環状ヌクレオチド濃度の軸索先端部における空間分布などを見出し、成長円錐の方向転換を制御するメカニズムの機構の理解を大きく進展させたものであり、その意義は非常に大きい。こうして浮き彫りにされてきた軸索ガイダンスの精妙複雑な分子メカニズムに基づき、生体内での複数のガイダンス因子シグナルの統合・増幅を理解できる視界が開け、またこの重要な生理プロセスの正確性を保証するロバストネスが得心できるようになった。今後は、準備を進めている生体組織内での解析においてこれらの発見が確認・拡張され、さらに他の細胞種との関係を含め in vivo 特有の現象の解析が進展して、例えば脊髄損傷などの臨床的課題において単なる軸索再生のみでなく機能的再生へと誘導できる手掛かりが得られることが期待される。

#### 7. 中村 渉 研究者「自発行動リズムを制御する体内時計神経回路基盤の解明」

哺乳類概日リズムのマスタークロックとされる視交叉上核内の機能回路およびそこから周期的行動に至る神経回路についてはなお多くが不明である。本研究では3つの角度からマウス視交叉上核の機能に解析を加え、時計遺伝子 Per1 の欠損下でも視交叉上核には電気活動の概日リズムが保たれること、給餌時間制限下の摂食時間予知行動を Cry1 等3個の時計遺伝子ノックアウトマウスにおいて解析して本行動リズムにこれらの遺伝子群が関与すること、また視交叉上核内の多神経活動記録法により加齢動物では顕著なリズムの乱れがあることを明らかにできたことは興味深い成果である。今後は3つの角度から得られた知見の統合的な理解が進めば、このような視交叉上核の機能リズムにおけるウルトラディアンリズムの関与、およびこのような現象に関わる神経伝達物質等機能分子やリズム形成の機構の解析が進展し、長期的には概日リズムの変調と各種疾患の関係が明らかになることが期待される。

#### 8. 林 朗子 研究者「光遺伝学を用いた前頭前野シナプスと個体レベル行動との関連解析」

統合失調症では最近の研究により脳のグルタミン酸作動性シナプス機能の異常が特に注目されている。本研究では生体脳で個々のスパインを可視化・経時観察する技術を、DISC1 ノックダウンや Calcineurin ノックダウンなどの統合失調症モデルマウスの前頭前野に適用してスパインの形態変化の動態を計測し、作業記憶の障害に対応づけることができた。さらに、スパイン形態に強く関わる Rac1 に着目し、その活性を光により精密に時空間制御できるコンストラクトに軸索輸送と後シナプス局在機能を仕組んだ“記憶プローブ”を作出して、実際にこれが長期増強スパインに集積することを示した。これは学習にともなうシナプスレベルの変化を可視化できるもので高く評価できる。さらにこのレポータープローブを改変し、シナプス単位でその形態・機能を操作することにも成功しており、シナプス生理学に新しい境地を開く成果である。今後は、このような技術を駆使して統合失調症の遺伝的要因だけでなく環境要因の解析も展開することができれば、社会的にもきわめて大きいインパクトを与えることになるであろう。

#### 9. 水谷 健一 研究者「大脳皮質細胞構築における血管発生制御機構の意義」

発生初期の神経組織における血管内皮(前駆)細胞と神経細胞の分化・移動との関係は重要であるが研究が進んでいない分野である。本研究では発生期のマウス大脳皮質を材料とし局所の酸素環境に着目して解析を進めたものである。大脳皮質組織への血管の侵入を血管レポーターマウスを用いて詳細に調べたところ、その中間層が血管網形成の一つの要となっていることを見出したことは興味深い。さらにマイクロ酸素センサーや免疫組織学的方法による解析を経て、中間層の上部が比較的低酸素環境にあると考え、また神経前駆細胞における活性酸素種(ROS)が鍵を握っていると想定しているが、そこから神経細胞の移動等神経回路構築への関係については今後の解析が待たれる。一方、発生期の大脳皮質中間層の神経細胞で発現する転写因子 Prdm8 が遊走途上の神経細胞の形態を制御していることを明らかにした研究は論文発表した。今後、血管からのシグナルは酸素濃度だけで説明できるかなどを含めて血管系が神経発生に果たす役割がより明確になることが期待される。

#### 10. 評価者

研究総括 村上 富士夫 大阪大学大学院生命科学研究科・特任教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成26年3月末現在)

上村 匡 京都大学大学院生命科学研究科・教授

岡本 仁 (独)理化学研究所脳科学総合研究センター・副センター長

貝淵 弘三 名古屋大学大学院医学系研究科・教授  
 影山 龍一郎 京都大学ウイルス研究所・教授  
 狩野 方伸 東京大学大学院医学系研究科・教授  
 川口 泰雄 自然科学研究機構生理学研究所・教授  
 小坂 俊夫 九州大学大学院医学研究院・教授  
 立花 政夫 東京大学大学院人文社会系研究科・教授  
 能瀬 聡直 東京大学大学院新領域創成科学研究科・複雑理工学専攻・教授  
 平田 たつみ 情報・システム研究機構国立遺伝学研究所・准教授  
 藤田 一郎 大阪大学大学院生命機能研究科・教授  
 虫明 元 東北大学大学院医学系研究科・教授  
 袖崎 通介 慶應義塾大学医学部・生理学・教授

(参考)

件数はいずれも、平成26年3月末現在。

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	34	34
口頭	29	17	46
その他	11	5	16
合計	40	56	96

(2) 特許出願件数

国内	国際	計
0	0	0

(3) 受賞等

佐藤 純

文部科学大臣表彰 若手科学者賞 (H24. 4)

竹林 浩秀

熊本医学会 奨励賞 (H23. 2)

熊本大学 研究活動表彰 (H23. 5)

竹本-木村 さやか

日本神経化学会 奨励賞 (H24.9)

戸島 拓郎

理化学研究所 研究奨励賞 (H23. 4)

日本神経科学学会 奨励賞 (H22. 9)

林(高木) 朗子

日本生物学的精神医学会 学術賞 (H22. 10)

(4) 招待講演

国際 2件

国内 13件

別紙

「脳神経回路の形成・動作と制御」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成26年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
大森 義裕 (兼任)	繊毛が神経回路形成・維持・機能発現に果たす役割とその分子メカニズム (大阪バイオサイエンス研究所、大阪大学)	大阪大学 准教授 (大阪バイオサイエンス研究所 副部長)	40
佐藤 純 (兼任)	ショウジョウバエ視覚系における機能的な神経回路形成機構の解明 (金沢大学)	金沢大学 教授 (金沢大学 特任准教授)	40
竹林 浩秀 (兼任)	脳の左右非対称性形成機構とその生理学的意義の解析 (熊本大学、新潟大学)	新潟大学 教授 (熊本大学 准教授)	47
竹本-木村 さやか (兼任)	リン酸化による大脳辺縁系情動回路修飾機構の解明 (東京大学)	東京大学 助教 (同上)	44
田中 暢明 (兼任)	脳の内的環境を制御する神経伝達機構 (京都大学、北海道大学)	北海道大学 特任助教 (京都大学 研究員)	43
戸島 拓郎 (兼任)	神経軸索ガイダンスを制御する普遍的シグナル伝達の時空間解析 (理化学研究所)	理化学研究所 研究員 (同上)	40
中村 涉 (兼任)	自発行動リズムを制御する体内時計神経回路基盤の解明 (大阪大学)	大阪大学 准教授 (大阪大学 特任准教授)	40
林 朗子(高木朗子) (兼任)	光遺伝学を用いた前頭前野シナプスと個体レベル行動との関連解析 (東京大学)	東京大学 助教 (東京大学 特任助教)	40
水谷 健一 (兼任)	大脳皮質細胞構築における血管発生制御機構の意義 (同志社大学)	同志社大学 准教授 (同志社大学 特任准教授)	47

# 研究報告書

## 「繊毛が神経回路形成・維持・機能発現に果たす役割とその分子メカニズム」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 大森 義裕

### 1. 研究のねらい

繊毛は、細胞表面から突出した構造体で微小管を軸にもつ細胞内小器官である。クラミドモナスのような単細胞生物から、線虫、昆虫、脊椎動物に至るまで広く保存されている。脊椎動物では、精子の鞭毛や、気管上皮の繊毛などの「動く繊毛」が古くから研究されてきた。しかし、近年、神経細胞に存在する繊毛にはレセプター分子が局在し、「アンテナ」の役割を担っていることが明らかになり注目されている。中でも、神経細胞の繊毛は「動かない繊毛」の好例であり、その分子メカニズムには不明な部分が多い。神経細胞において繊毛機能は重要であり、神経細胞における繊毛機能の異常は神経変性疾患や、精神遅滞、摂食行動の異常による肥満・糖尿病を引き起こす。例えば、網膜における繊毛異常は、網膜色素変性症など失明に至る神経変性疾患を引き起こす。また、繊毛異常による疾患であるバルデー・ビードル症候群やアストロム症候群では、精神遅滞、肥満や糖尿病が見られる。これは、発生期の繊毛異常による脳の発達異常や、視床下部摂食中枢の繊毛の異常により過食を引き起こす可能性が考えられている。これらのことから中枢神経系における繊毛の障害が神経回路の形成に異常を引き起こすことが予想される。

本研究提案では、まず繊毛が神経回路の維持に果たす役割を解明するために、網膜における視細胞変性をモデルとして解析を行う。組織特異的ノックアウトマウスの解析やプロテオミクス解析、ゼブラフィッシュを用いた遺伝子ノックダウンなどの手法を用いて、繊毛が神経細胞の維持に果たす役割を解明する。また、神経回路形成に繊毛が果たす役割を解明するために、網膜を含む中枢神経系の発生をモデルに解析を行う。更に、神経回路における繊毛の異常が動物の行動にどのような影響を与えるかを調べるために、視床下部ニューロンにおける繊毛の機能と摂食行動に焦点を当てて解析を行う。本研究を進めることにより、神経回路における繊毛の異常が関与する視覚障害や肥満、糖尿病などの疾患に対する発症機構の解明や治療法の確立に寄与することが期待される。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

私たちは、網膜視細胞の運命決定因子である Otx2 の網膜特異的欠損マウスの網膜におけるマイクロアレイ解析から視細胞特異的な発現を示す機能未知キナーゼ Mak を同定した。さらに、私たちは、Mak が網膜において視細胞特異的に発現し、視細胞の繊毛の長さ制御に重要であることを見出した。また、Mak 欠損マウスでは網膜色素変性症などの網膜変性疾患に見られる進行性の視細胞脱落が観察された。このことから Mak が視細胞の繊毛形成に重要であり、視細胞の生存に必須な遺伝子であることがわかった。脊椎動物には Mak のパラログである ICK が存在し、ICK は発達期の中枢神経系に広く発現する。私たちは、全身で ICK を欠損するマウスと中枢神経特異的 ICK 欠損マウス、網膜特異的 ICK 欠損マウスの 3 系統を作成し解析を行った。これらの研究から ICK は繊毛形成に重要であり、Shh カスケードを介して網膜や脳の発達に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、私たちは ICK が、繊毛の先端に局在し、キネシンや IFT 複合体など繊毛内輸送に関係する因子の折り返し機構に必須であることを見出した。現在、繊毛機能による摂食行動の制御や肥満との関連について研究を進めている。

### (2) 詳細

#### (1) 繊毛キナーゼ Mak は視細胞繊毛の長さ制御と視細胞の生存に必須である

繊毛は、細胞表面から突出した構造体で微小管を軸にもつ。繊毛には、レセプター分子が局在し、「アンテナ」の役割を担っている(図1)。

私たちは、網膜視細胞の運命決定因子である Otx2 欠損マウスの網膜における発現プロファイルの解析を行った(文献2)。網膜特異的 Otx2 欠損マウスでは、視細胞がアマクリン細胞に運命転換する。この解析から、機能未知キナーゼ Mak が Otx2 欠損網膜で発現が著しく

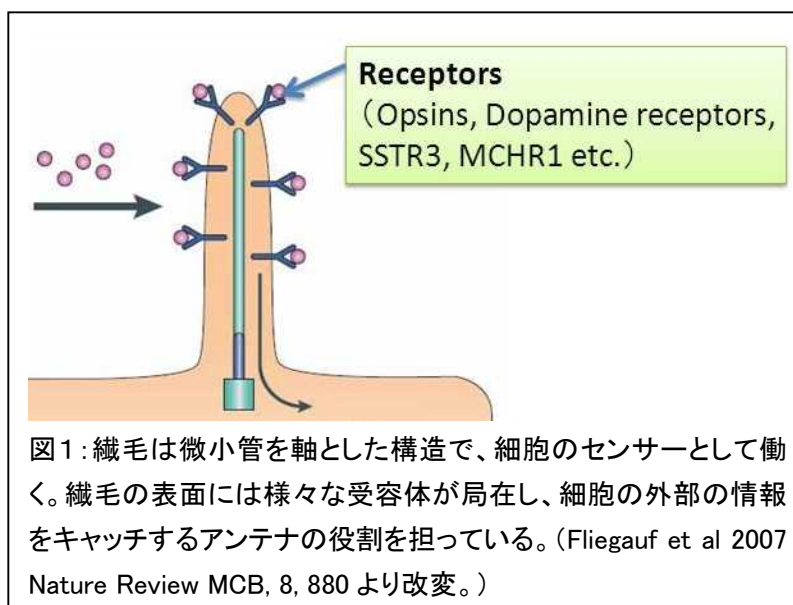


図1: 繊毛は微小管を軸とした構造で、細胞のセンサーとして働く。繊毛の表面には様々な受容体が局在し、細胞の外部の情報をキャッチするアンテナの役割を担っている。(Fliege et al 2007 Nature Review MCB, 8, 880 より改変。)

低下することを見出した。更に、in situ ハイブリダイゼーション解析により、Mak が網膜視細胞に特異的に強く発現することを見出した。Mak に対する抗体を作製し視細胞における局在を調べたところ、Mak は視細胞の繊毛に局在することがわかった(図2)。Mak の網膜における機能を調べるために、Mak 欠損マウスの網膜の免疫組織化学的解析を行ったとこ



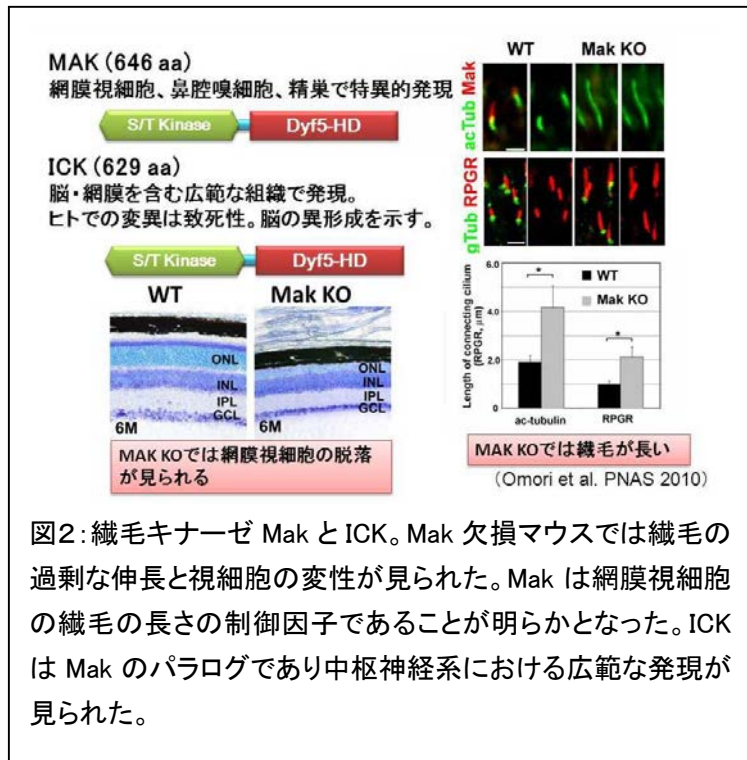
る、Mak 欠損マウスの視細胞では繊毛が過剰に伸長することが観察された(図2)。更に、Mak 欠損マウスでは、ヒトの網膜色素変性症に酷似した進行性の視細胞の脱落が見られた。これらのことから、Mak は視細胞の繊毛の長さを制御する因子であり、網膜色素変性症の発症に関与する可能性が示唆された。一方、網膜色素変性症の原因遺伝子がコードする RP1 蛋白質は微小管結合蛋白質であり、視細胞の繊毛に局在する。私たちは Mak がリン酸化するコンセンサス配列が RP1 に存在することを見出し、in vitro キナーゼアッセイにより Mak が RP1 をリン酸化することを明らかにした。RP1 の過剰発現は、繊毛を過剰に伸長させるが、Mak の発現により過剰な伸長が抑制された。視細胞では、Mak と RP1 のバランスにより、繊毛長を制御している可能性が示唆された(文献3)。

## (2)ICK は網膜前駆細胞や神経前駆細胞の繊毛の形成を制御する

脊椎動物には、Mak のパラログである ICK が存在する。ICK の変異は、endocrine-cerebro-osteodysplasia (ECO)と呼ばれる繊毛関連疾患を引き起こす。

私たちは、in situ ハイブリダイゼーション解析とノザン解析により ICK の発現パターンを調べた。ICK は発生期中枢神経系に高い発現を示すことがわかった。ICK に対

する抗体を作製し、繊維芽細胞における局在を調べたところ、ICK は繊毛の先端部分に局在することが観察された。中枢神経系における ICK の機能を調べるために、ICK の遺伝子欠損マウスを作製し解析を行った。まず、ICK のキナーゼドメインをコードする exon3 を loxP 配列で挟み、Cre リコンビナーゼ依存的に ICK の機能を欠失するマウス(ICK flox マウス)を作製した。このマウスを用いて、3種類の ICK 遺伝子欠損マウスを作製した(図3)。まず、ICK flox マウスに CAG-Cre マウスを掛け合わせることで ICK を全身で欠損するマウス(ICK KO)を作出した。また、発生期の網膜において Cre を発現する Dkk3-Cre マウスを用いて、ICK を網膜で欠損するマウス(ICK Dkk3 CKO)を作製した。ICK flox マウスに発生期中枢神経系で Cre を発現する Nestin-Cre マウスを掛け合わせることで、ICK を中枢神経系で欠損するマウス(ICK Nestin CKO)を作製し解析を行った。



ICK を全身で欠如する ICK KO マウスは、周産期致死であった。また、多指、骨形成異常、肺の形成異常が見られた。これらは、Sonic hedgehog (Shh) や Indian hedgehog (Ihh) カスケードの異常を示すものと考えられる。更に、脳室の拡大、水頭症の症状が見られた。E15.5 において脳室表面に存在する繊毛が著しく減少していることがわかった。

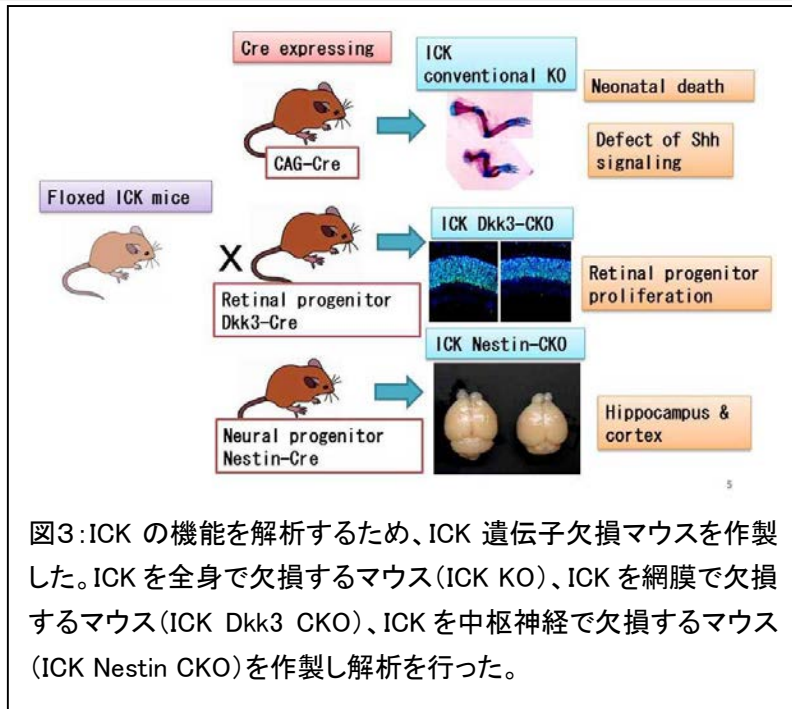


図3:ICK の機能を解析するため、ICK 遺伝子欠損マウスを作製した。ICK を全身で欠損するマウス(ICK KO)、ICK を網膜で欠損するマウス(ICK Dkk3 CKO)、ICK を中枢神経で欠損するマウス(ICK Nestin CKO)を作製し解析を行った。

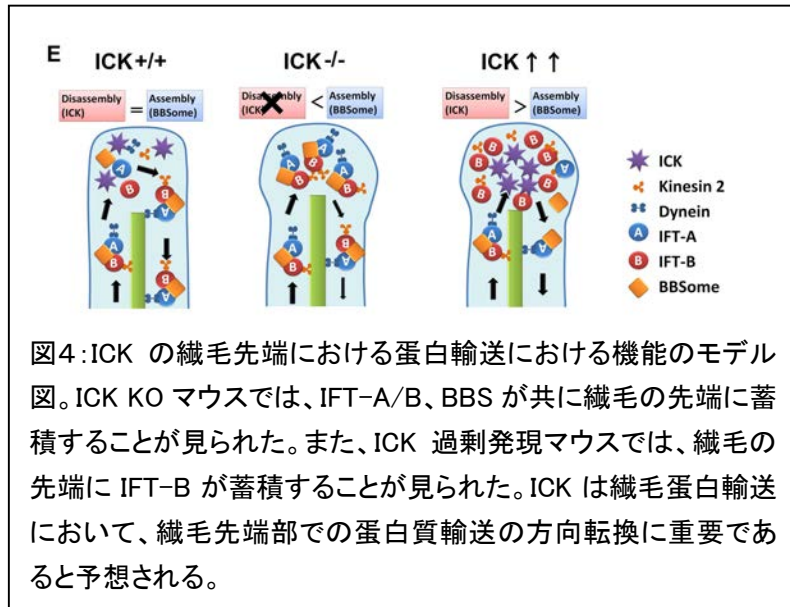
さらに ICK KO の MEF を用いて ICK の繊毛形成への影響を調べた。意外なことに、ICK KO 由来の MEF では繊毛の長さが短くなることがわかった。この結果は、Mak KO では繊毛長が過剰であったことを考えると興味深い。さらに、繊毛に局在する Shh カスケードに関与する分子(Smo, Gli)などの局在の変化を精査した。ICK KO マウスの MEF では、Shh シグナルに依存した Shh 関連因子の繊毛における局在化に異常が見られることから、ICK は Shh シグナルに重要な働きをもつ因子であることが明らかとなった。

繊毛では、繊毛内輸送(intraflagellar transport, IFT)と呼ばれるキネシンとダイニンをモーターとする輸送機構が発達している。私たちは、ゼブラフィッシュ変異体の解析により、Kif3b, Kif3c, Kif17 などの複数のキネシンが組織により、役割分担を行い、正常な繊毛形成に重要な役割を果たしていることを証明した(文献1)。次に、私たちは、ICK による IFT 制御の可能性を探索した。ICK KO の MEF を使って、繊毛における IFT とその関連分子の局在を調べた。ICK KO マウスでは、IFT-A/B 複合体、BBS が共に繊毛の先端に蓄積することが観察された。逆に、ICK を過剰に発現させた細胞では、繊毛の先端に IFT-B 複合体のみが蓄積することが見られた。この結果と、ICK が繊毛の先端部分に局在することを考え合わせると、ICK は繊毛蛋白輸送において、繊毛先端部での蛋白質輸送の方向転換に重要であることが予想される(図4)。この時の分子メカニズムについても、解析を行った。ICK のリン酸化部位と予想される配列を IFT のモーター蛋白質である Kif3a の C 末端に見出した。さらに、ICK がこの部位をリン酸化することを in vitro キナーゼアッセイにより証明した。このリン酸化部位に対するリン酸化抗体を作成し、この抗体を用いて細胞内局在を観察したところ、リン酸化された Kif3a は繊毛の先端部分に局在することがわかった。ゼブラフィッシュを用いたレスキュー実験において、ICK リン酸化部位を含む Kif3a の C 末端領域の Ser/Thr 残基が繊毛形成に重要であることを見出している。これらの結果から、私たちは ICK が繊毛の先端において Kif3a をリン酸化するメカニズムを明らかにした。

生後の中枢神経系における ICK の機能を調べるため、ICK Dkk3 CKO と ICK Nestin CKO

の解析を行った。網膜特異的な ICK 遺伝子欠損マウスである ICK Dkk3 CKO は、外見上正常に生育した。しかし、ICK Dkk3 CKO マウスでは網膜の厚みが野生型よりも薄いことがわかった。また、網膜神経細胞の幹細胞である神経上皮の繊毛の数が減少していることを見出した。更に、網膜形成期における細胞分裂が少ないことが観察され、ICK は繊毛形成を通じて網膜形成期の細胞周期を制御している可能性が示唆された。

一方、中枢神経系で ICK を欠損する ICK Nestin CKO は小脳の未発達、運動失調をはじめとした表現型を示した。発達期の小脳や海馬において、繊毛形成不全が見られた。興味深いことに、成長した脳における繊毛の形成は、野生型と違いが見られなかった。また、



ICK Nestin CKO の成体脳における繊毛型 GPCR の繊毛への局在にも異常は見られなかった。このことから、ICK は中枢神経系の発生期の繊毛形成に重要ではあるが、発達後の繊毛の維持には重要ではないことが示唆された。これまでに、発生段階特異的に繊毛形成を制御する因子は知られておらず、ICK は新しいカテゴリーの繊毛形成因子と考えられる(文献4)。

### 3. 今後の展開

私たちの発見の後、複数の研究者によって、網膜色素変性症患者のゲノム解析により、Mak の遺伝子変異がヒトにおいても進行性の視細胞の脱落を引き起こすことが証明され、新しい網膜色素変性症の発症メカニズムとして注目されている。また、キナーゼである Mak や ICK の活性は、何らかのシグナルに制御されている可能性が考えられる。これらの繊毛キナーゼがどのようなシグナルの制御を受けて繊毛形成を制御しているのか、といった点を明らかにすることも今後の課題である。

一方、脳の神経細胞には繊毛が発達し摂食行動などに重要な働きをしていることが予想されているが、その機能はわかっていない。私たちは繊毛に局在するレセプターを複数同定しており、今後、繊毛が神経細胞においてどのような役割を担っているのかを明らかにしたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

私が、さきがけ研究をスタートさせたとき、3つの狙いがあった。1つは、繊毛形成の分子メカニズムを解明すること、2つめは、繊毛機能の神経回路形成への関与を明らかにすること、

3つめは、繊毛機能が動物の行動を制御する機構を解明することである。

1つめの課題に関しては、これまでの研究をさらに掘り下げ、Mak が視細胞の繊毛の長さ制御を行うことにより、視細胞の生存を制御する因子であることを突き止め、そのメカニズムの中で Mak が RP1 のリン酸化を直接行うことを証明した。また、Mak のパラログである ICK が繊毛内モーターである Kif3a をリン酸化し、繊毛内輸送において、繊毛の先端における折り返し機構を制御する仕組みを解明した。更に、Mak と相互作用する蛋白質群のプロテオミクス解析により Mak のリン酸化ターゲット候補蛋白質を同定し、現在解析を進めている。

2つ目の課題に関しては、ICK のコンディショナル・ノックアウトマウスの解析から、ICK が大脳皮質や小脳、網膜の正常な形成に必須の因子であることを見出し、ICK が shh カスケードにおいて重要な役割を果たしていることを明らかにした。同時に、ICK が神経系において発生段階特異的に繊毛形成を制御する因子であることを見出した。これまでに ICK 以外には、そのような性質を持つ繊毛形成因子の報告はなく、ICK は新しいカテゴリーの繊毛形成因子として重要になると考えている(論文リバイス中)。

3つ目の課題に関しては、摂食行動に関与する繊毛局在受容体を新たに見出し、遺伝子改変マウスを用いて解析をすすめている。

初めの2つのテーマについては、当初、思っていた以上に大きな展開となり、成果を上げることに成功したと考えている。2つ目のテーマが予想以上に時間がかかったため、3つ目のテーマについては、さきがけの期間内に完了することができなかつたのは残念であるが、近いうちに結果をまとめて発表ができるよう準備すすめている。

また、研究環境という意味では、さきがけの期間中に、私は新しいポジションを得ることができた。私のさきがけ研究がスタートした時点では、(財)大阪バイオサイエンス研究所の副部長であったが、2013年から大阪大学蛋白質研究所の准教授としてより充実した環境で研究を行っている。このことも、さきがけ研究のおかげであると大変感謝している。

今後は、さきがけ研究で得られた成果をもとに、さらに中枢神経系を中心とした繊毛研究を進展させたいと考えている。また、さきがけ研究から展開した研究成果をもとに、今後も関連学会における活動や、教育活動、一般市民への講演活動なども積極的に行いたい。

## (2)研究総括評価

神経細胞の繊毛にはレセプター分子が局在し、またその異常は各種の神経疾患・行動異常や肥満・糖尿病に関わることが認識されるようになってきたが、その分子メカニズムは不明であった。本研究では遺伝子改変マウスと遺伝子ノックダウンゼブラフィッシュを使って、プロテインキナーゼ Mak および ICK が神経細胞繊毛に局在し、その形態制御に重要であることを明らかにした。さらに Mak がリン酸化する分子を同定して解析を進めている。ICK についてもコンディショナル・ノックアウトマウスおよびゼブラフィッシュ変異体の解析により、繊毛内の分子輸送系への関わりを明らかにするとともに ICK が神経系において発生段階特異的に繊毛形成を制御することを見出した。これらは大きな成果と認められる。今後、両キナーゼ下流の分子メカニズムをさらに確立し、関係する神経回路を同定するとともに、キナーゼ上流のリセプター群との関係も明らかにしてゆくことにより、各種の神経繊毛関連疾患の治療・対処法に手掛かりが得られることが期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |   |
|---|
| 1. Zhao C, <b>Omori Y</b> , Brodowska K, Kovach P, Malicki J. Kinesin-2 family in vertebrate ciliogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012,109(7):2388-2393  |
| 2. <b>Omori Y</b> , Katoh K, Sato S, Muranishi Y, Chaya T, Onishi A, Minami T, Fujikado T, Furukawa T. Analysis of transcriptional regulatory pathways of photoreceptor genes by expression profiling of the Otx2-deficient retina. PLoS One 2011,6(5):e19685   |
| 3. <b>Omori Y</b> , Chaya T, Katoh K, Kajimura N, Sato S, Muraoka K, Ueno S, Koyasu T, Kondo M, Furukawa T. Negative regulation of ciliary length by ciliary male germ cell-associated kinase (Mak) is required for retinal photoreceptor survival. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010, 107(52):22671-22676 |
| 4. Chaya T, <b>Omori Y</b> , Kuwahara R, Furukawa T, ICK is essential for cell type-specific ciliogenesis and the regulation of ciliary transport. EMBO J 2014 in press   |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 総説等の出版物

**大森義裕**、「古くて新しいオルガネラ、「繊毛」研究の広がり」、バイオメディア 2014, 3月号 in press

**大森義裕**、細胞工学「一枚の写真館-ニューロンに生える繊毛:細胞のアンテナとしての機能」2012, 4月号 31(4) pp399

**大森義裕**、古川貴久「繊毛キナーゼ Mak と微小管結合タンパク質 RP1 による繊毛の長さ調節機構」細胞工学 2011, 30(5) 5月号 536-537

加藤君子、荒木章之、**大森義裕**、古川貴久、「網膜視細胞の機能構築」実験医学、2011, 29(4) 3月号, 514-520

#### 著書

**Omori Y**, Furukawa T. Structure and development of the photoreceptor ribbon synapse. **Vertebrate Photoreceptors: Functional Molecular Bases** Springer Japan 2014 in press.

## 主な学会発表

### (国際学会)

2013 年 6 月 27 日 Shiran Kaikan, Kyoto

The 8th International Symposium of the Institute Network, 招待講演

Yoshihiro Omori, Taro Chaya, Takahisa Furukawa

Functional role of ciliary kinases in cilia development and human disease

2013 年 6 月 18 日 Riken CDB, Kobe

The 25th CDB Meeting, Cilia and Centrosomes 招待講演

Yoshihiro Omori, Taro Chaya, Takahisa Furukawa

Ciliary Kinase ICK is required for Ciliogenesis in Neural Progenitor Cells and Hedgehog Signaling

2012 年 5 月 24 日 Institute of Child health, London

Cilia in development and disease

Yoshihiro Omori, Taro Chaya, Kimiko Katoh, Takahisa Furukawa

Photoreceptor degeneration caused by defects of a ciliary kinase

2011 年 11 月 13 日 Washington DC convention center

北米神経科学会 年会 2011

Yoshihiro Omori, Taro Chaya, Kimiko Katoh, Takahisa Furukawa

Antagonistic regulation of ciliary length by ciliary kinase Mak and RP1 is required for photoreceptor survival

### (国内学会)

2013 6 月 21 日 京都国際会館

日本神経科学会大会 シンポジウム 招待講演

大森義裕、茶屋太郎、古川貴久

繊毛キナーゼ ICK は神経前駆細胞における繊毛形成とヘッジホッグシグナル伝達に重要である

Ciliary kinase ICK is essential for ciliogenesis in neural progenitor cells and Hedgehog signaling

2011 年 5 月 20 日 沖縄コンベンションセンター

日本発生生物学会、ワークショップ「Ciliary Biology」

オーガナイザー: 大森義裕、古川貴久

大森義裕、茶屋太郎、加藤君子、古川貴久

A ciliary kinase Mak and a microtubule-associated protein RP1 antagonistically regulate ciliary length in retinal photoreceptor cells

# 研究報告書

## 「ショウジョウバエ視覚系における機能的な神経回路形成機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 佐藤 純

### 1. 研究のねらい

脳の動作原理を理解するためには神経回路の発生過程から機能発現までを一貫して解析することが必要である。例えば神経細胞の産生順や細胞系譜が神経回路の形成・機能において重要な役割を果たすと考えられる。しかし、ほ乳類の脳は神経細胞の数・種類が多すぎるため、神経回路の発生と機能を結びつけて解析することは困難を極める。ショウジョウバエ視覚中枢は層構造・カラム構造を示すなど、ほ乳類の脳と構造的および機能的な特徴を共有しているが、神経細胞の数・種類はほ乳類と比較して遙かに少ない。さらに産生順と関連した多様な神経細胞の産出、細胞移動を伴う層構造・カラム構造形成など、ほ乳類の脳においても見られる神経発生の様々な要素を合わせ持つだけでなく、高度な遺伝学的ツールが利用可能であり、行動実験によって神経回路の機能を詳細に解析することが可能な優れたモデル系である。このようなハエ視覚中枢の特徴を利用して、機能的な神経回路が形成されるメカニズムを明らかにすることが本研究のねらいである。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

ショウジョウバエ視覚中枢は層構造・カラム構造といったほ乳類の脳において見られる構造的特徴を有しており、精密な遺伝子操作が可能であるため、脳神経回路の発生を研究する上で優れたモデル系である。中でもメダラ神経節はハエ視覚中枢の中でも特に重要な機能を果たすと考えられているが、その発生機構は全く分かっていなかった。本研究では発生過程のメダラを用いて産生順に依存した神経細胞のタイプ決定、転写因子発現による同心円状の区画化、神経投射制御の分子機構を明らかにし、これらの発生過程が神経回路の機能とリンクしていることを示した。

#### (2) 詳細

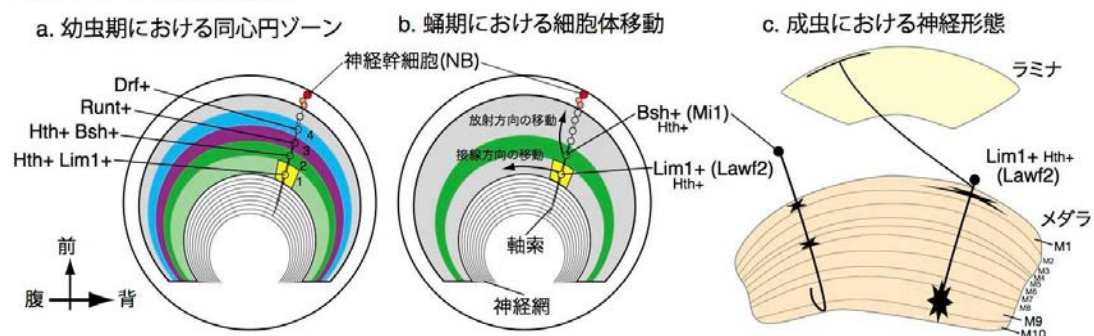
##### 発生過程の視覚中枢を同心円状に区画化する転写因子の発見

メダラ神経節は約100種類4万個の神経細胞が10層の層構造とそれと直交する800のカラム構造を示し、動体・形態・色覚といった全ての視覚情報処理に関与すると考えられている(図1c)。このように、メダラは非常に複雑な神経回路を構成し高度な機能を持つと考えられるが、その神経回路の実体はほとんど分かっていない。また、メダラにおける多様な神経細胞を産み出す発生機構も分かっていなかったため、100種類もの神経細胞を正確に産み分ける分子機構を明らかにすることにより、メダラをモデル系とした神経科学分野の創出につながると考えられた。

成虫においてみられるメダラ神経節は幼虫の時期にはメダラ前駆体として準備されて

いる。半球状のメダラ前駆体の表層には神経幹細胞(NB)が位置しており、これがメダラ前駆体の中心部に向かって多数の神経細胞を産み出す。本研究では進化的に保存された転写因子に着目し、幼虫期メダラ前駆体において特徴的な発現パターンを示す因子を探索した。その結果、Homothorax (Hth: Meis ファミリー), Brain-specific-homeobox (Bsh: Bsx ファミリー), Runt (Run: Runx ファミリー), Drifter (Drf: Brn ファミリー)の4つの転写因子の発現により、メダラ前駆体が同心円状に区画化されていることを見出した(図1a: 論文 1)。他にも、Lim1 など同心円ゾーンの一部においてのみ発現する転写因子も見出されており(図 1a)、このような転写因子発現の組み合わせによって神経細胞の多様性が制御されていると推測できる。

図1 メダラの発生機構



転写因子の発現と神経タイプとの間に相関関係があるかどうか調べるため、各転写因子の発現を正確に再現するような Gal4 系統を相同組換・BAC トランスジェニックなどの手法を駆使して作製した。このような Gal4 制御下で GFP を発現させることにより、特定の神経細胞を GFP でラベルすることができるが、さらにモザイク解析と組み合わせることにより、1つ1つの神経細胞の投射パターンを明らかにした。その結果、Bsh 陽性 Hth 陽性の神経細胞はかならず Mi1 と呼ばれるたった一種類のタイプの神経細胞に分化することがわかった(図 1c: 論文 1)。同様に、Lim1 陽性細胞は Lawf2 と名付けたこれまでに同定されていないタイプの神経細胞に分化することが分かった(図 1c)。しかし、Drf や Run 陽性細胞については単一の神経細胞タイプではなく、複数タイプの神経細胞に分化することがわかった。

ショウジョウバエの神経発生では能動的な細胞移動はほとんど知られていなかったが、メダラの神経細胞はそのタイプに応じて固有の移動パターンをしめすことが分かった。例えば Bsh 陽性細胞は蛹期に脳の内側から外側に向かって放射方向に移動し、逆に Lim1 陽性細胞は接線方向に移動する(図 1b)。このような細胞移動が神経回路形成においてどのような役割を果たしているのかは分かっておらず、今後の課題として残されている。

#### 産生順に依存した神経細胞のタイプ決定機構

このような同心円状の発現パターンはどのようなメカニズムによって決められているのだろうか？神経細胞が産み出された時期と同心円状の転写因子発現の間には強い相関が見られ、NB から産み出される産生順に従って神経タイプが決定されているのではないかと推測された(論文 1)。



ハエの胚期中枢神経系においては体節形成において重要な役割を果たす転写因子群 Hb-Kr-Pdm-Cas が NB において経時的にそして順番に発現する。これら転写因子がある時期において NB から産み出される神経細胞のタイプを決定しているのである。もし同じようなメカニズムが働いているのであれば、メダラの NB においても経時的に発現する転写因子が存在すると考えられる。しかし、胚期 NB において発現する Hb-Kr-Pdm-Cas はメダラ NB においては発現していなかった。我々は、これら転写因子とは全く異なる転写因子群がメダラ NB において順番にそして経時的に発現していることを見出した(図 3: 論文 4)。

発生初期のメダラ前駆体は神経上皮細胞(NE)から成るが、正中線側から順に NE が NB に分化する(図 2: 論文 4)。この時、最も正中線側に位置する NE が bHLH 転写因子の Lethal-of-scute(Lsc)を発現し、これによって NB への分化がトリガーされる。

このような分化の波は Proneural Wave と呼ばれ、Lsc の発現によって可視化される。NB は Proneural Wave の後方で順番に分化するので、正中線側の NB ほど古く、側面側の NB ほど新しい(図 2)。もし、メダラ NB においても胚期 NB と同様に経時的に発現する転写

因子が存在するとすれば、それらは Lsc の発現によって可視化される Proneural Wave からの距離に応じてストライプ状に発現すると考えられる。実際、我々はそのような発現パターンを示す転写因子を 5 つ同定した(図 3: 論文 4)。Hth は NE および分化したばかりの NB において発現するが、Klumpfuss(Klu)はより正中線側の領域で、Eyeless(Ey), Sloppy-paired(Slp)はさらに正中線側の領域で発現し、Dichaete(D)は最も正中線側の古い NB で発現する。また、これらの発現は徐々に発現が減衰するため隣り合う発現ドメインどうしはオーバーラップする。これら転写因子の働きによって産み出される神経細胞のタイプが決定されている可能性が考えられた。

このような NB における転写因子の経時的な発現はどのようにして制御されているのだろうか? 変異体と過剰発現をもちいた実験から、Ey は Slp の発現を誘導するが、Slp は Ey の発現を抑制すること、Slp は D の発現を誘導するが、D は Slp の発現を抑制することを見出した(図 4: 論文 4)。このような関係から Ey-Slp-D という転写因子発現の経時的な移り変わりを説明することができる。しかし、Hth および Klu に関してはこのような関係を見出すことはできなかった。Hth と Klu の発現は Ey-Slp-D とは別のメカニズムによって制御されているか、Hth や Klu の上流で働く別の転写因子が Ey-Slp-D

図2 Proneural WaveとNBの産生

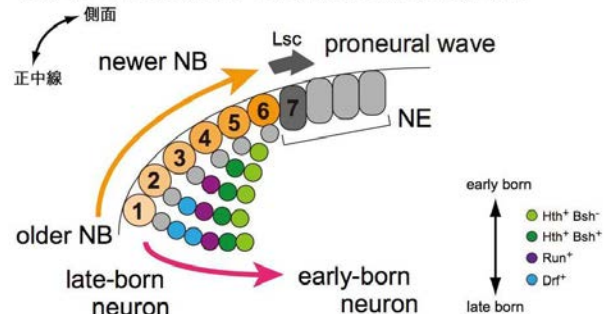
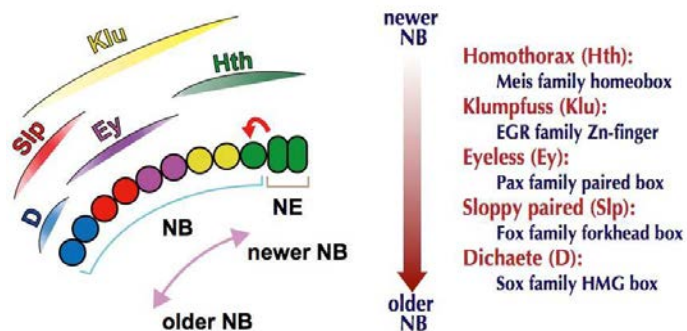


図3 NBにおいて経時的に発現する転写因子

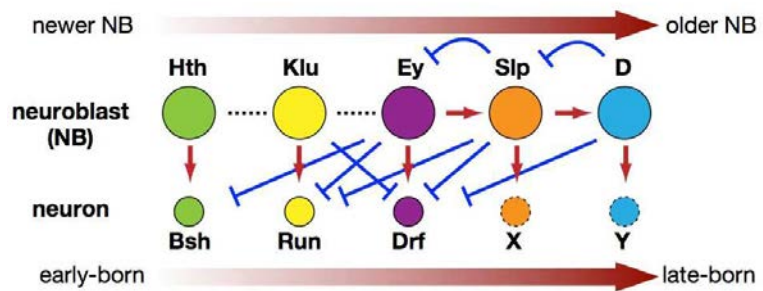


のような発現制御を受けている可能性が考えられる。

これら NB において経時的に発現する転写因子は産み出される神経タイプの決定においてどのような役割を果たしているのだろうか？一部の NB とその娘細胞を GFP によってラベルした実験から、Hth 陽性 NB は Bsh 陽性神経を、Klu 陽性 NB は Run 陽性神経を、Ey 陽性 NB は Drf 陽性神経を産み出すことが示唆された(図 4: 論文 4)。実際、変異体および過剰発現を用いた実験から、Hth, Klu, Ey はそれぞれ Bsh, Run, Drf 陽性細胞の産生を正に制御する

ことが示された。Slp や D によって産み出される神経タイプは明らかになっていないが、今後の研究によりそのような後期に生まれる神経タイプ特異的なマーカーが見出されるかもしれない。

図4 産生順に従って神経タイプを決定する分子機構



#### 転写因子の組み合わせによる神経細胞のタイプ決定機構

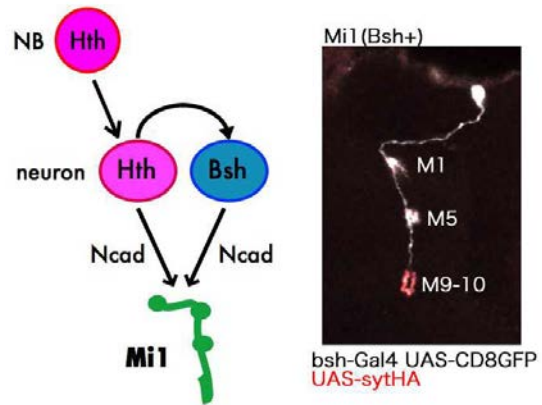
Hth を発現する同心円ゾーンから生まれた神経細胞は Mi1, Lawf1, Lawf2, Pm3 の 4 種類の神経細胞に分化する(図 1: 論文 1)。Bsh は Hth 発現領域の外側半分で発現し、Hth と Bsh 両方を発現する細胞が Mi1 となる。Mi1 の分化および形態形成において Hth と Bsh はそれぞれどのような役割を果たすのだろうか？

Mi1 はメダラにおいて投射が完結する local interneuron だが、*hth* 変異体および *bsh* 変異体では大きく形態が変化し、より高次の神経節であるロビュラに投射する Tm タイプの projection neuron となる(論文 1,2)。しかし、Hth は Bsh の発現を正に制御することから、*hth* 変異体において見られた Mi1 の形態異常は Bsh の発現が失われたためであるという解釈も可能である。*hth* 変異体の Mi1 に外来の Bsh を発現させても Mi1 の形態異常は抑圧されなかったことから、Mi1 の運命決定および形態形成には Hth と Bsh の両方の寄与が必要であると言える(図 5: 論文 2)。

Drf 陽性細胞は通常ロビュラに投射する Tm タイプの projection neuron に分化するが、Drf 陽性細胞において Hth および Bsh を異所的に発現させると Mi1 と似た神経細胞の分化を誘導することができた。このことから、Hth および Bsh は Mi1 の形成を誘導する能力があると言える。しかし、この異所的な Mi1 は樹状突起が通常の Mi1 よりも幅広く、形態的には異常な Mi1 であった。Drf 陽性細胞において Hth と Bsh の両方を同時に発現させたところ、通常の Mi1 により近い形態の神経細胞が誘導されたことから、Hth と Bsh が協調的に働くことが Mi1 の運命決定および形態形成において重要であると言える(図 5: 論文 2)。

Hth と Bsh は転写因子なので、他の下流因子の発現を制御することで Mi1 の形態を制御していると考えられる。我々は幼虫期メダラ前駆体の Hth および Bsh の発現ドメインにおいて細胞接着因子である N-cadherin(Ncad)の発現が上昇していることを見出した(論文 1,2)。 *hth* 変異体では Ncad の発現が減少し、逆に Hth 過剰発現によって Ncad 発現が誘導された。 Bsh 過剰発現によっても Ncad が誘導されたが、 *bsh* 変異体においては Ncad 発現の減少は見られなかった。 *bsh* 変異体において Hth 発現が残存するためと考えられる。 Mi1 は軸索を投射する過程で Ncad 発現の強い領域に仮足を伸長させるが、 *Ncad* 変異体の Mi1 ではそのような仮足の形成が失われ、最終的な Mi1 の形態に異常をきたすことが分かった。このことから、 Hth と Bsh の協調作用によって Ncad の発現が制御され、これによって Mi1 の形態形成の一部が制御されていると考えられる(論文 1,2)。

図5 HthとBshによるMi1の運命決定



### 3. 今後の展開

Mi1(Hth/Bsh 陽性)は光の ON センサーとして働く L1 神経の入力を受け、動体認識において重要な役割を果たすことが知られている。また、 *Lawf2*(*Lim1* 陽性)の樹状突起は Mi1 の軸索終末と同じ層において形成されるため、 *Lawf2* は Mi1 からの入力を受けていると考えられる(図 1c)。さらに *Lawf2* は複数カラムをカバーする幅広い樹状突起を持つことから、隣り合うカラムに入力された情報を比較し演算処理している可能性が考えられる。これら神経細胞の動体認識における働きを解析することで、神経回路の発生と機能を包括的に理解できるよう研究を進めていきたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

研究期間内の研究によって、ハエ視覚中枢のメダラ神経細胞において神経細胞の多様性を産み出すメカニズムを明らかにした。中でも Mi1 と呼ばれる神経細胞に関しては、神経幹細胞から初期に産み出された神経細胞が Mi1 に分化し、 Bsh と Hth の協調作用によって Mi1 の運命が決めること、この時 Bsh/Hth の制御下で細胞接着因子である Ncad が発現し Mi1 の樹状突起形成を制御していることを明らかにした。 Mi1 は動体認識に関与することが強く示唆されるので、この一連の研究によって神経回路の発生と機能を一貫して解析するという本研究のねらいを達成したと言えるだろう。

しかし、 Mi1 の機能解析自体はまだ十分な結果が出ていない。視覚行動実験・カルシウムイメージングのための装置をセットアップし、データが取れる段階まで来ているので、近いうちに Mi1 および Mi1 と関連する他の神経細胞の機能を明らかにしたいと考えている。

#### (2) 研究総括評価

昆虫脳で重要な視覚情報処理が行われるメダラ神経節は精妙な層構造と直行するカラム構造を有しており、その形成メカニズムと神経回路構築におけるその意義を解明できれば、脊椎動物脳神経回路形成機構の理解にも大きな手掛かりが得られる予想される。本研究ではまずショウジョウバエのメダラ前駆体神経上皮における発現パターンとその経時変化から転写制御因子を絞り込んだ。そして、実際に Hth を始めとする一群の転写制御因子の働きによりまず同心円状の区画化と神経細胞タイプの運命決定が起こること、そしてストライプ状に神経前駆細胞で発現する転写制御因子を5個同定してこれらの間の作用によって特定の神経細胞種例えば Mi1 神経細胞が誘導されることを示した。さらに特定の転写制御因子のもとに細胞接着因子 N-cadherin が発現して Mi1 に特徴的な神経突起の敷設が起こることも示した。これらは特に重要な発見であり、すでに論文発表を行なっている。今後、このような解析を異なる細胞系譜についても展開して原理の普遍性を確立し、また敷設途上の神経突起を介する神経細胞間のクロストークの解析も推進できれば、脊椎動物脳の神経回路構築の理解にも大きい先導的インパクトを与えるものと十分に期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. Hasegawa, E., Kitada, Y., Kaido, M., Takayama, R., Awasaki, T., Tabata, T. and Sato, M. Concentric zones, cell migration and neuronal circuits in the <i>Drosophila</i> visual center. <i>Development</i> 138, 983-993, 2011. |
| 2. Hasegawa, E., Kaido, M., Takayama, R. and Sato, M. Brain-specific-homeobox is required for the specification of neuronal types in the <i>Drosophila</i> optic lobe. <i>Developmental Biology</i> 377, 90-99, 2013.            |
| 3. Sato, M., Suzuki, T. and Nakai, T. Waves of differentiation in the fly visual system. <i>Developmental Biology</i> 380, 1-11, 2013.   |
| 4. Suzuki, T., Kaido, M., Takayama, R. and Sato, M. A temporal mechanism that produces neuronal diversity in the <i>Drosophila</i> visual center. <i>Developmental Biology</i> 380, 12-24, 2013.                                 |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

平成24年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞 受賞

# 研究報告書

## 「脳の左右非対称性形成機構とその生理学的意義の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 竹林 浩秀

### 1. 研究のねらい

脳の機能に左右差（ラテラルティイー）があることが知られている。例えば、ほとんどのヒトの利き手は右手であり、さらに、言語を司る領域（ブローカ野やウエルニッケ野）が脳の左半球に存在する。脳の左右非対称性について、最も詳細に調べられているのは、ゼブラフィッシュを用いた間脳背側の手綱核の非対称性の形成機構である。しかし、ほ乳動物における脳左右非対称性とその形成メカニズムについては、あまり良く知られていない。本研究は、新規の脳左右差を可視化する遺伝子改変マウスや、マウス利き手テストなどの脳左右差検出法を用いて、脳左右差形成メカニズムや、その意義について明らかにする事を目指している。

### 2. 研究成果

研究の具体的成果について、概要と詳細に分けて2～3ページ程度でまとめてください。図、表、写真等を含めても構いません。「5. 主な研究成果リスト」を参照してください。公開項目です。

#### (1) 概要

本研究では、我々が作製した新規の脳左右差を可視化する遺伝子改変マウス（Tg144 トランスジェニックマウス）とマウス利き手テストを用いて、脳の左右非対称性の形成機構について研究を行った。まず、脳左右差可視化マウスの組織学的、そして、挿入遺伝子座の解析を行った。これらの解析により、トランスジーンの左右非対称性発現が左右ランダムに起こる事、挿入遺伝子座の近傍配列の同定、トランスジーン発現制御において DNA メチル化がプロモーター活性の抑制に関わることを明らかにした。また、マウスの掛け合わせによる遺伝学的な実験やマウス利き手テストにより、体の左右軸形成やマウス利き手と Tg144 マウスのトランスジーン脳左右非対称性発現は、異なるメカニズムによるものであることが明らかとなった。Tg144 トランスジーン発現は、これまで知られている海馬シナプスにおける脳左右差とも異なり、新たな脳左右差を可視化していると考えられる。

#### (2) 詳細

### 1) 脳の左右差を検出する新たな Tg144 トランスジェニックマウス

我々は、Cre 組換え酵素による DNA 組換えを検出するレポーターマウスを作製する過程で、トランスジーンより *lacZ* 遺伝子を脳の左右非対称に発現するマウス (Tg144 マウス) を見出した。Tg144 マウスの脳における左右非対称性発現は、海馬を始め、大脳皮質、視床など、脳のさまざまな部位で左右差発現が観察される (図 1)。Tg144 のトランスジーン発現は、X-gal 染色で簡便に検出することが可能である。この Tg144 トランスジーンは、本来、全身の細胞で発現するプロモーターを使用しており、挿入された遺伝子座のポジショナル効果により、この左右非対称性発現が起こっていることが考えられる。興味深いことに、この Tg144 マウスでは、左脳に強い発現の見られる左脳優位型個体と右脳に強い発現の見られる右脳優位型個体がおよそ 1 対 1 の確率で出現した。この左右非対称性発現は、同じ親由来のトランスジーンをもつマウスにおいて調べてみると、やはり、左脳優位マウス、右脳優位マウスが観察された。この結果より、トランスジーン発現が、エピジェネティックな影響を受けていることが考えられる。実際、脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) を妊娠マウスに投与して、出生直後のマウスで X-gal 陽性細胞を組織学的に観察すると、脱メチル化剤投与により出現する X-gal 強陽性の細胞が脳内に散在することが確認され、メチル化によりトランスジーン発現が抑制されていることが示唆された。トランスジーン挿入部位を FISH 法により調べると、マウス 17 番染色体に挿入されていることがわかった。さらに、inverse PCR 法によりトランスジーン挿入部位の 5' -, 3' -flanking 領域の DNA 配列を同定し、正確な挿入ゲノム遺伝子座の同定を行うことができた。

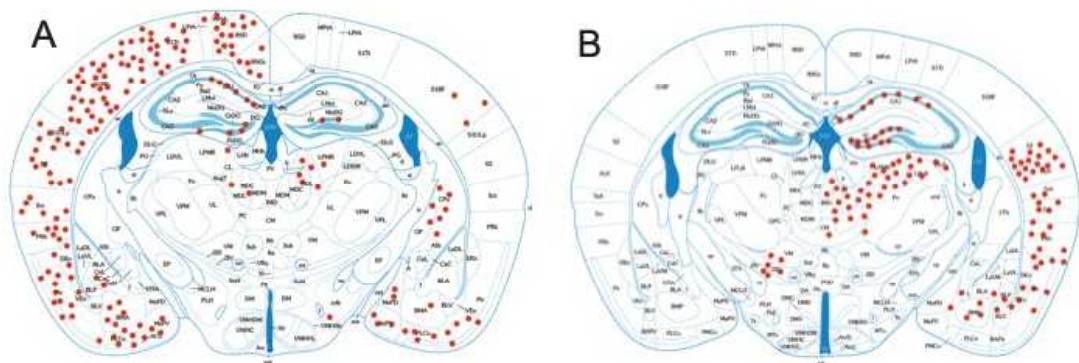


図1 Tg144トランスジェニックマウス脳の前額断切片における X-gal 染色像  
右脳優位タイプ(A)、左脳優位タイプ(B)のトランスジーン発現パターンを示す個体例。海馬、大脳皮質などで左右非対称な X-gal 染色(赤いドットで表示)が見られる。

### 2) マウスの利き手と脳左右非対称性

マウスには、利き手があり、右利きマウスと左利きマウスがおよそ 1 対 1 の確率で出現することが知られている。マウスの利き手テストである Collins test にて、利き手と Tg144 トランスジーン発現を比較した。現在までに、Tg144 トランスジーン発現の左右非対称性発現とマウス利き手の間には、明らかな相関がみられていない。大脳の交連線

維（脳梁、前交連）に異常のある *Draxin* ノックアウトマウスで利き手テストを行ったところ、*Draxin* ノックアウトマウスは、右利きマウスの割合が増加していることがわかった。本実験結果は、脳梁や前交連などの大脳の交連線維が、利き手形成に関わることを示唆する。

### 3) 神経活動を検出する活動依存性 *in situ* hybridization プローブの作製

Tg144 マウスのトランスジーン発現と神経活動の関連を調べるために、神経活動を組織学的に検出する *in situ* hybridization プローブ・セットを作製した。匂い刺激により神経活動依存性に一過性に発現誘導され、コントロールとの差を検出できる約 10 個の遺伝子プローブを同定することができた。これらの中には、*c-fos*, *Arc*, *Npas4* などの最初期遺伝子群 (immediate early genes) が含まれており、刺激終了後 1 時間経過するとベースラインレベルまで発現量が減少する。光遺伝学 (オプトジェネティクス) の手法を用いて、線条体の中型有棘神経細胞 (Medium Spiny Neuron) を光刺激し神経活動を検出する場合には、*Npas4* が最も優れているプローブであることも見いだした。活動した神経細胞を組織学的に検出するために適したプローブ・セットを作製できた。これらの神経活動依存性 *in situ* hybridization プローブを用いて、利き手テストの際に、左右非対称的に活動している部位を検索し、その候補部位を同定することができた。

### 4) 体の左右軸と脳の非対称性

iv マウスは、モータータンパクをコードするダイニン遺伝子 (*Dnah5*) の遺伝子変異をもつミュータントマウスで、iv ホモマウスでは繊毛の異常があり、体の左右軸がランダム化して約半数の個体で内臓逆位が起こることが知られている。しかも、iv ホモマウスの脳では、海馬 CA1 錐体細胞シナプスにおける NMDA 受容体サブユニット NR2B の左右非対称分布が両方とも右脳タイプになることが報告されている。そこで、iv マウスと Tg144 マウス掛け合わせてトランスジーンの左右差発現の解析を行った。その結果、iv ホモマウスにおいても Tg144 トランスジーンの左右差発現は観察された。つまり、海馬シナプスの左右非対称性の結果と比べると、脳には複数のタイプの左右差が存在すること、そして、Tg144 トランスジーンの左右非対称発現は内臓の正位、逆位に関わらないことが判明した。

## 3. 今後の展開

Tg144 トランスジェニックマウスの発見と確立により、脳の左右非対称性を組織学的に簡便に検出することが可能となった。さらに、これまで報告されていたマウス脳における海馬 CA1 錐体細胞シナプスの左右非対称に加えて、個体によって左右のばらつきのある、新たな左右非対称性があること明らかとなった。最近では、ゼブラフィッシュ嗅覚系の神経回路の左右非対称性についても報告されており、本プロジェクトと同様に遺伝子発現をマーカーとして脳の左右差を調べるアプローチが用いられている。Tg144 マウスの解析を追究することでこの新たな脳左右差の形成機構と存在の意義が明らかになると考えられる。脳左右差の異常は、自閉症や統合失調症などの精神疾患に関わる可能性があることが示唆されており、さまざまなアプローチによる脳左右差研究を通じて、

脳の動作原理の理解とその異常による病態の理解と治療法開発へとつなげたいと考えている。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者) さきがけ研究期間で得られた研究成果が、研究のねらいに対してどのように位置づけられるか、研究者自身の評価を簡潔にまとめてください。公開項目です。

本研究課題を進めるに従って、Tg144 マウスのトランスジーン発現の脳非対称発現は、体の左右軸形成や利き手とは独立の現象であり、当初想定していたよりは、複雑なものであることが明らかとなった。脳の左右差の機能的な意義を理解するためには、マウスに加えて他の動物種の脳も対象として調べる必要があり、本研究プロジェクトは現在も発展段階にある。本研究課題の研究期間内に、熊本大学から新潟大学に異動して新たな環境で研究を推進する事になったが、マウス脳の左右差の解析に必要な研究ツールを開発し、多くの研究シーズを得る事ができたと考えている。

##### (2) 研究総括評価

本研究は竹林研究者が先に偶然発見した左右非対称にトランスジーンを発現する Tg144 トランスジェニックマウスを解析することにより、脳左右差の未知の側面を抉り出そうとしたものである。脳組織学的解析ではトランスジーン発現が左右ランダムに起こり脱メチル化剤の影響を受けることなどを示した。さらに挿入遺伝子座の解析を完成させ、また利き手テストによる行動解析ならびに体左右軸に関わる iv 変異との関係解析も行い、Tg144 左右非対称発現はこれらとは独立の現象であることを明らかにした。本研究で開発した活動依存性ハイブリッドプロンプトにより今後この発現左右差の機能的意義に手掛かりが得られることが望まれる。長期的な視点でこの不思議な現象に取り組み、その意義が急転解明される時が来ると期待されるが、そのためにもこれまでの知見を記載報告し、またリソースを公共化することが望ましい。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Bepari AK, Watanabe K, Yamaguchi M, Tamamaki N, Takebayashi H. Visualization of odor-induced neuronal activity by immediate early gene expression. *BMC Neuroscience* 13: 140, 2012.
2. Bepari AK, Sano H, Tamamaki N, Nambu A, Tanaka KF, Takebayashi H. Identification of optogenetically activated striatal medium spiny neurons by Npas4 expression. *PLoS ONE* 7: e52783, 2012.
3. Watanabe K, Takebayashi H, Bepari AK, Esumi S, Yanagawa Y, Tamamaki N. Dpy19l1, a multi-transmembrane protein, regulates radial migration of glutamatergic neurons in the developing cerebral cortex. *Development* 138: 4979-4990, 2011.



(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な学会発表

活動依存的遺伝子群の in situ hybridization プローブの作製と脳の左右非対称性研究への応用

竹林浩秀

第89回日本生理学会大会 2012年3月31日

胎児期脳発生と生後脳発達について

竹林浩秀

第42回 新潟神経科学 夏期セミナー 2012年8月3-5日

Npas4 mRNA expression can trace photoactivation of striatal medium spiny neurons at the cellular level

竹林浩秀、ベパリ アシム、佐野裕美、玉巻伸章、南部篤、田中謙二

第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 香川 2013年3月30日

受賞

平成23年2月21日 熊本医学会奨励賞

平成23年5月30日 熊本大学 研究活動表彰

# 研究報告書

## 「リン酸化による大脳辺縁系情動回路修飾機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

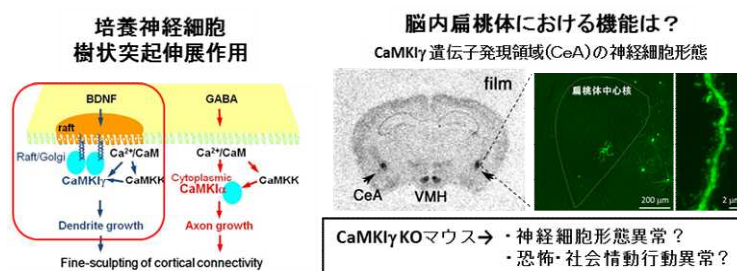
研究者: 竹本-木村 さやか

### 1. 研究のねらい

神経細胞内  $Ca^{2+}$  上昇によって活性化される、 $Ca^{2+}$  依存性タンパク質リン酸化酵素 CaMK は、標的基質のリン酸化を介して神経機能修飾に寄与すると推測される。我々は、新規に同定した膜挿入型 CaMK $\gamma$  が、培養神経細胞において樹状突起伸展作用を有することを報告したが、その脳内における生理

機能は長年不明である(Takemoto-Kimura et al. J Biol Chem. 2003, Takemoto-Kimura et al. Neuron 2007, Takemoto-Kimura et al. European Journal of Neurosci. 2010)。興味深いことに、その手掛かりとして、本酵素が、成体マウス脳内で情動制御に関わる、扁桃体中心核や分界条床核など、大脳辺縁系に属する特定の神経核に非常に多く存在することを見出している。

本酵素は、これらの情動回路を構成する神経細胞内において、神経活動や様々なリガンドによって誘導される  $Ca^{2+}$  上昇によって活性化され、神経形態制御を介して情動制御に寄与するのか？また、その場合、どのような分子基盤を介するのか？これらの疑問に対し、酵素、細胞、マウス個体といった多階層にわたる研究を推進し、リン酸化による大脳辺縁系情動回路修飾機構の一端解明を目指した。



(図 1) 本研究のねらい: 培養神経細胞の樹状突起伸展作用を有する  $Ca^{2+}$  依存性リン酸化酵素 CaMK $\gamma$  は、CeA や BNST などの特定の神経核に発現する。これらの領域における機能解明とその細胞・分子基盤の解明を目指す。(Takemoto-Kimura et al. J. Biol. Chem. (2003); Takemoto-Kimura et al. Neuron (2007))

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、上述の、Q1 情動制御に寄与する神経回路修飾における機能解明、Q2 その分子基盤に対し、第1に、①遺伝子欠損マウス (*Camk1g*<sup>-/-</sup>) を用いた、恐怖記憶・社会情動行動の検討、第2に、②分子局在の解明ならびに扁桃体中心核の細胞形態異常について検討を行った。更に③分子基盤を理解するため、CaMK $\gamma$  の酵素特性とシグナリングネットワークの解明を推進した。④同時に、今後の研究に不可欠である *Camk1g* 発現神経細胞種選択的に遺伝子発現が可能となる遺伝子改変動物の評価を行い方法論の確立を行った。

#### (2) 詳細

##### ①遺伝子欠損マウスを用いた恐怖記憶・社会情動行動異常の探索と神経活動異常

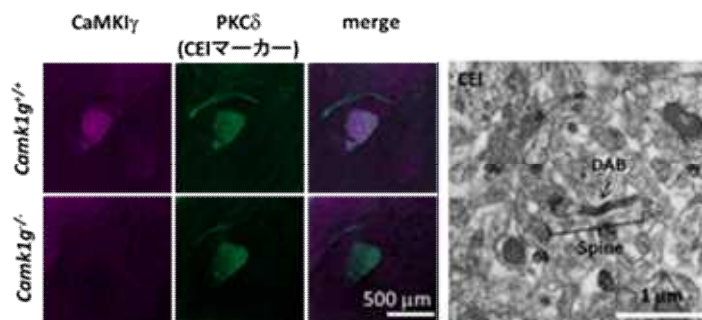
本酵素の遺伝子欠損マウスは、通常に発達し、脳内組織構築においても異常がないことを確認したうえで、行動解析を推進した。まず、扁桃体や分界上床核における発現パターンに

合致し、恐怖記憶が減弱することを明らかにした。また、1対1の社会行動(筑波大学・小川研究室、仲田先生)や、集団における社会行動(東京大学・遠山研究室、掛山先生、遠藤先生)において、異常をきたすことを見出した(Takemoto-Kimura, Nakata, Endo et al. 未発表)。

扁桃体中心核の社会情動行動制御における役割についての報告は限られているため、これらの行動時に、活動の認められる領域を IEG 誘導(c-fos の免疫染色)により検討したところ、社会的な刺激存在下で、恐怖行動に寄与する扁桃体 BLA-CeA 回路が活性化することを支持する結果を得た。更に、集団における社会行動時には、遺伝子欠損マウス(*Camk1g<sup>-/-</sup>*)において、扁桃体の IEG 誘導が亢進していることが分かった。

## ②分子局在の解明ならびに扁桃体中心核の細胞形態異常

遺伝子欠損マウス(*Camk1g<sup>-/-</sup>*)における、恐怖記憶・社会情動行動異常の細胞メカニズムを明らかにするため、まず、分子局在の詳細解明を行った。マウス成体脳抽出サンプルを用いて生化学的な脳組織分画法による検討を行ったところ、CaMKI $\gamma$ は粗シ



(図2) 特異的 CaMKI $\gamma$ 抗体を用いた免疫蛍光染色像(左)と免疫電顕像(右)。棘突起のネックや PSD に強い免疫原性(DAB)を認める。

ナプトソーム画分(crude synaptosomal fraction)に濃縮されることを見出し、本酵素のシナプス局在が示唆された。そこで、CaMKI $\gamma$ の神経細胞内局在の詳細解明のために至適な染色条件を見出し、免疫電顕での検討を行ったところ、本酵素が扁桃体中心核において、棘突起に局在することが明らかとなり、棘突起における役割が示唆された。

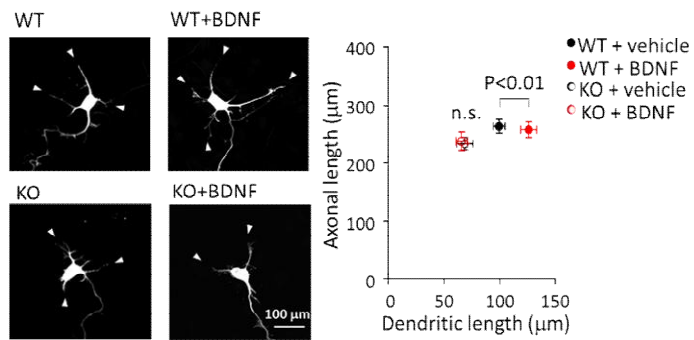
本酵素は培養系において神経細胞樹状突起形態を変化させる作用を有するため、扁桃体中心核(CeA)における樹状突起・棘突起形態変化を検討する目的で、海馬や大脳皮質などへのマウス個体 *in vivo* への AAV 導入法(文献1)を応用し、扁桃体 CeA 細胞をスパースに蛍光標識する方法を開発した。この方法により初めて、個々の CeA 神経細胞の形態検討が可能となり、*Camk1g<sup>-/-</sup>* の CeA 神経細胞棘突起の形態計測を行ったところ、分子局在と合致し棘突起の形態異常を見出した。

成果①②と、現在実施中の、遺伝子欠損マウスにおける、領域・細胞種選択的な遺伝子欠損を補うレスキュー実験や、領域選択的コンディショナルノックアウトマウスを用いた行動実験結果を合わせ(詳細は④に記述)、論文報告する計画である。

## ③CaMKI $\gamma$ の酵素特性とシグナリングネットワークの解明

上流のリガンド候補として注目される神経栄養因子 BDNF による樹状突起伸展作用における本酵素の寄与を、遺伝子欠損マウス由来初代培養系において検討した。BDNF による樹状突起伸展作用がノックアウト細胞では消失し、同条件下において樹状突起内で BDNF 依存的な Ca<sup>2+</sup>変動が計測されることを見出した。

BDNF による  $Ca^{2+}$  変動は、神経活動の際に流入する  $Ca^{2+}$  に比べ少ないことが推測される。どのような  $Ca^{2+}$  変動によって、本酵素が活性化されるのか明らかにするため、精製した酵素を用いて、キナーゼ活性化機構ならびに最適基質配列の検討を行い基質候補の同定を行った。同定ペプチドならびに基質候補を用いて、カルシウム感受性を計測したところ、予想外にも従来型 CaMKI とは異なり低カルシウムにおいてもリン酸化酵素活性を有し、 $Ca^{2+}$  濃度の上昇に従い更に活性が亢進するという特性を見出した。また、BDNF 刺激によって、細胞内で本酵素の活性化に必要なリン酸化が増加することを確認し、BDNF  $\rightarrow Ca^{2+} \rightarrow CaMKI\gamma \rightarrow$  樹状突起伸展という経路が培養神経細胞において存在することが示された (Suzuki, Takemoto-Kimura et al. 投稿準備中)。



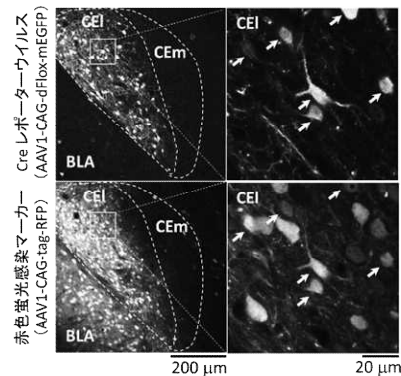
(図3) *Camk1g*<sup>-/-</sup>由来培養神経細胞 (KO) における BDNF 作用の消失 (Suzuki, Takemoto-Kimura et al. 投稿準備中)。

μ感受性を計測したところ、予想外にも従来型 CaMKI とは異なり低カルシウムにおいてもリン酸化酵素活性を有し、 $Ca^{2+}$  濃度の上昇に従い更に活性が亢進するという特性を見出した。また、BDNF 刺激によって、細胞内で本酵素の活性化に必要なリン酸化が増加することを確認し、BDNF  $\rightarrow Ca^{2+} \rightarrow CaMKI\gamma \rightarrow$  樹状突起伸展という経路が培養神経細胞において存在することが示された (Suzuki, Takemoto-Kimura et al. 投稿準備中)。

#### ④脳領域・細胞種選択的な遺伝子操作を目指した遺伝子改変動物の作出と評価

##### ④-1 *Camk1g*<sup>+/-</sup> (*Camk1g*-CrePR 系統) の評価

本研究で用いた *Camk1g* 欠損マウスはプロモーター制御下に誘導型 Cre リコンビナーゼ (CrePR) をノックインしており、Cre ドライバー系統としての活用が同時に期待される。CeA の *Camk1g* 発現細胞特異的な遺伝子操作法開発の第一段階として、*Camk1g*<sup>+/-</sup> を用いた細胞種選択的な遺伝子発現について AAV ウイルスをレポーターとして検討したところ、確かに扁桃体中心核の特定細胞における選択的な遺伝子発現が可能であることが分かった。本系統の活用により、*Camk1g* 発現細胞選択的な様々な検討 (遺伝子欠損を補うレスキュー実験、神経活動の操作や計測、細胞形態の標識、神経回路のトレーシングなど) が可能となり、今後の解析において有効な手段を得たと考える。



(図4) *Camk1g*<sup>+/-</sup> の Cre リポーター活性。Cre レポーター (上段) は、感染マーカー (下段) と対照的に CEI 特定細胞に選択的な発現を示す (矢印)。

本系統 (*Camk1g*<sup>+/-</sup>) を用いて、*Camk1g* 発現細胞選択的に扁桃体において AAV ウイルスにより CaMKI $\gamma$  の発現を補った際に、行動異常のレスキューが可能か、現在検討中である。

##### ④-2 *Camk1g*<sup>flx/flx</sup> 系統の樹立

一方、遺伝子欠損を脳領域選択的に行うため、*Camk1g*<sup>flx/flx</sup> 系統の樹立を、新潟大学・崎村研究室と共同で行い、標的遺伝子の正常な発現確認と AAV-cre 発現による遺伝子欠損などの基礎検討を完了した。現在、扁桃体選択的遺伝子欠損マウスを作出し、情動行動に焦点を当てた行動異常の検討中である。

### 3. 今後の展開

本研究で明らかとなったリン酸化経路と発現回路に焦点をあて、脳領域・細胞種選択的な遺伝子操作を駆使した研究を更に推進することで、新たな扁桃体情動制御における分子・回路メカニズムが明らかになる。自閉症患者脳やモルヒネ中毒モデルマウス、BDNF 欠損マウスなど病的・病態モデル状況下において脳内の CaMKI $\gamma$  の発現が変化するとの報告がされており、生理機能のみでなく、病理機能も注目される。カルシウム依存性リン酸化経路は様々な細胞外情報が収束する細胞内シグナリングとして機能する可能性を有しており、本酵素を中心としたシグナリングネットワークの解明を推進することで特定情動回路の調整破綻に起因した疾患に対し分子的側面からの基礎的知見提示へと繋がるのが期待される。また、本研究により、見出された、*Camk1g*<sup>+/-</sup> (*Camk1g-CrePR* 系統) の cre ドライバーとしての活用は、神経活動操作を用いた神経ネットワークの研究にも応用可能であり、これらの神経ネットワークが寄与する新規機能の解明につながる事が期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

本さきがけ研究では、自身で同定・クローニングしその細胞機能を明らかとしてきた CaMK について、脳神経機能解明をめざし遺伝子欠損マウスの行動解析ならびに細胞形態変化についての検討を行った。更に、精製酵素、培養細胞を対象として分子特性、シグナリング解明をより一層進めるとともに、神経回路そのものの理解に不可欠である *Camk1g* 発現神経細胞選択的に任意の遺伝子発現が可能になる方法論の確立を行った。

本研究により、新たな実験手法の導入を行うことで、研究を効率的に推進することで成果を得た。具体的には、行動異常のメカニズムを解明するために、所属研究室において行動解析系を導入し、IEG mapping による神経回路同定を実施する体制を整え、さらに、*in vivo* において、これまで技術的に困難であった扁桃体 CeA 神経細胞の形態を詳細に検討する手法をセットアップが可能となった。これらにより、作業仮説を支持する結果を得ることに成功した(上記①②)。同じキナーゼファミリーに属し、神経可塑性との研究が著しく進む CaMKII や CaMKIV とは対照的に、CaMKI の個体における脳神経機能は全く未解明で、CaMKI ノックアウトマウスの行動・細胞形態異常は世界に先駆けた発見であり、取得中の追加データを加えて投稿を進める計画である。

また、CaMKI $\gamma$  リコンビナント酵素を用いた結果(上記③)について、リン酸化酵素がその活性を発揮する条件を知ることは、脳神経機能を解明するうえで大変重要であり、意外にも低  $Ca^{2+}$  によっても活性化され、 $Ca^{2+}$  濃度上昇により徐々に活性が亢進するという、CaMKI の新たな活性化様式の発見につながった(Suzuki, Takemoto-Kimura et al. 投稿準備中)。今後は、見出した生化学的な特性、即ち、BDNF による活性化および低  $Ca^{2+}$  による活性化が、神経細胞内で保たれることを、神経刺激にตอบสนองして CaMK の活性を計測する新たな手法(文献2)により計測する計画を推進している。

遺伝子欠損マウスの表現型が明らかになり、病態との関連も示唆されるなか、培養神経細胞モデルに加え、*Camk1g* 発現細胞種における *in vivo* シグナリングネットワークの解明が喫緊の課題と考える。この課題に取り組むために、*Camk1g* 発現細胞種に選択的な遺伝子導入が有効な手段であり、実施可能であることを実証できた点(上記④-1)は、大きな第一歩と考え

る。

## (2) 研究総括評価

竹本研究者は先にプロテインキナーゼ CaMKI $\alpha$ を同定クローニングし、この酵素が情動に関わる扁桃体などに特徴的な分布をなすこと、また培養神経細胞の突起伸展に関わることを明らかにした。本研究では CaMKI $\alpha$ の情動神経回路における役割を、その組織学的局在、酵素学的解析、BDNF から Ca を介するシグナル系の解析、さらに遺伝子改変マウスを用いた行動解析によって明らかにしようとしたものである。この間の研究により CaMKI $\alpha$ が扁桃体中心核神経細胞の棘突起に局在し生化学的分析結果と対応すること、他の CaMK とは異なり低 Ca でベーサルな酵素活性を示すこと、その欠損細胞で BDNF の神経突起伸展作用が消失すること、さらにその欠損マウスでは社会行動の異常を示すことを見出しており、これらは重要な成果である。また扁桃体においてより精密な遺伝子制御実験を可能にするためのツール開発も進めている。近く行動実験の成果を含め大きく纏まった成果が十分に期待できる。今後遺伝子欠損マウスでのレスキュー実験が成功し、in vitro での実験結果と生体での知見との関係をより明確にすることができれば、自閉症やモルヒネ中毒など扁桃体に関わる神経疾患の病理と対処法に手掛かりが得られることも期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Kawashima T, Kitamura K, Suzuki K, Nonaka M, Kamiyo S, **Takemoto-Kimura S**, Kano M, Okuno H, Ohki K, Bito H. Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity-dependent promoter E-SARE. **Nat Methods**. 10:889-95 (2013)
2. Fujii H, Inoue M, Okuno H, Sano Y, **Takemoto-Kimura S**, Kitamura K, Kano M, Bito H. Nonlinear decoding and asymmetric representation of neuronal input information by CaMKII $\alpha$  and calcineurin. **Cell Rep**. 3:978-87 (2013)
3. Okuno H, Akashi K, Ishii Y, Yagishita-Kyo N, Suzuki K, Nonaka M, Kawashima T, Fujii H, **Takemoto-Kimura S**, Abe M, Natsume R, Chowdhury S, Sakimura K, Worley PF, Bito H. Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII $\beta$ . **Cell**. 149:886-98 (2012)

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

## 総説

1. **Takemoto-Kimura S**, Suzuki K, Kamiyo S, Ageta-Ishihara N, Fujii H, Okuno H and Bito H. Differential roles for CaM kinases in mediating excitation–morphogenesis

coupling during formation and maturation of neuronal circuits.

**European Journal of Neurosci.** 32: 224–230 (2010)

2. 竹本一木村さやか

CaMKK-CaMKI 経路による神経突起伸展の制御と大脳皮質構築。

神経化学 51(3), 65~70 (2012)

**受賞**

第 13 回日本神経化学会奨励賞受賞(2012)

**学会発表**

1. Takemoto-Kimura S, Horigane S, Suzuki S, Bito H.

Control of neuritogenesis and cortical circuit formation via CaMKK-CaMKI cascades. 第 86 回日本生化学会大会シンポジウム発表 (2013)

2. Inoue M, Fujii H, Okuno H, Takemoto-Kimura S, Bito H. Resolving CaMKK-CaMKIV signal transfer from synapse to nucleus. 第 36 回日本神経科学学会口頭発表(2013)

3. Takemoto-Kimura S, Horigane S, Adachi-Morishima A, Bito H. Differential roles for CaM kinases in mediating excitation morphogenesis coupling during formation and maturation of neuronal circuits. International Conference of Physiological Sciences. シンポジウム発表 (2012)

4. Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Kamijo S, Horigane S, Adachi-Morishima A, Nonaka M, Okuno H, Bito H. Novel functions of Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation cascades in neuritogenesis and emotional behavior. 第 35 回日本神経科学大会シンポジウム発表 (2012)

5. Suzuki K, Takemoto-Kimura S, Kamijo S, Inoue M, Fujii H, Ageta-Ishihara N, Okuno H, Bito H. 発達期大脳皮質神経細胞の樹状突起伸展を制御するカルシウム/カルモジュリン依存性タンパクリン酸化酵素 Igamma の生化学的特徴。第 85 回日本生化学会年会口頭発表 (2012)

6. Takemoto-Kimura S, Horigane S, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Nonaka M, Okuno H, Bito H. Novel roles of CaMKK-CaMKI cascades in neuritogenesis and circuit formation. 第 34 回日本分子生物学会年会シンポジウム発表 (2011)

7. Suzuki K, Takemoto-Kimura S, Horigane S, Kamijo S, Inoue M, Fujii H, Okuno H, Bito H. Activity-dependent regulation of dendritogenesis via CLICK-III/CaMKI $\gamma$  in developing cortical neurons. Neurosci. Abs. 230.04, 2011. 第 41 回北米神経科学学会年会ポスター発表, Washington DC, USA. (2011)

8. Suzuki K, Takemoto-Kimura S, Kamijo S, Inoue M, Fujii H, Ageta-Ishihara N, Okuno H, Bito H. Molecular basis of CLICK-III/CaMKI $\gamma$  -mediated dendritogenesis in developing cortical neurons. 第 34 回日本神経科学大会口頭発表 (2011)

# 研究報告書

## 「脳の内的環境を制御する神経伝達機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 田中 暢明

### 1. 研究のねらい

動物の脳は、個体の気分や体調などに応じて、たとえ同じ刺激入力が入っても、異なる感覚、行動や情動を引き起こす。そうした個体の気分などには、モノアミンやペプチド、ホルモンなどの神経伝達調節物質の出力の関与が示されている。ショウジョウバエの遺伝学的手法を駆使して、こうした伝達物質の感覚情報処理における役割を明らかにし、曖昧に「気分」とくられてきた脳の内的環境がどのように生み出されているのかを調べることを目標にして研究を行っている。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

動物は、個体のコンディションに応じて、それに適した行動をとることができる。たとえば、空腹条件下のショウジョウバエが、餌を充分にあたえられていた個体よりも、より早く餌場に到達したり、また、ショウジョウバエの雌が、産卵活動をしている期間は、雄の求愛を受け入れないことが知られている。こうした、コンディションに応じた行動の可塑的変化の表出には、モノアミンやペプチド、ホルモンの関与が報告されてきた。しかしながら、様々なモノアミンやペプチドなどが協調的に働いて、感覚入力に対して応答するかしないかを決定する機構、言い替えると、応答の閾値の制御機構に関してはまだわかっていないことが多い。ショウジョウバエの嗅覚系をモデルにして、その神経機構を探るべく、まず、様々な嗅覚系の神経細胞に遺伝子発現を誘導できる GAL4 エンハンサートラップシステムを同定した(論文 2)。そして、色素注入実験や、GAL4 系統を用いて、嗅覚系神経回路の解剖学的研究を行い(論文 2,3)、さらに同定した神経間にシナプス連絡があるか電子顕微鏡で観察する技術を確立した(論文 1)。その上で、本研究では、コンディションごとの匂い応答の閾値の変化について、2 点に着目して研究を行った。研究テーマ A としては、交尾前後の雌のフェロモン応答の閾値の変化、研究テーマ B としては、刺激応答閾値に関して、生理実験とカップリングできる行動実験系の確立を行った。

#### (2) 詳細



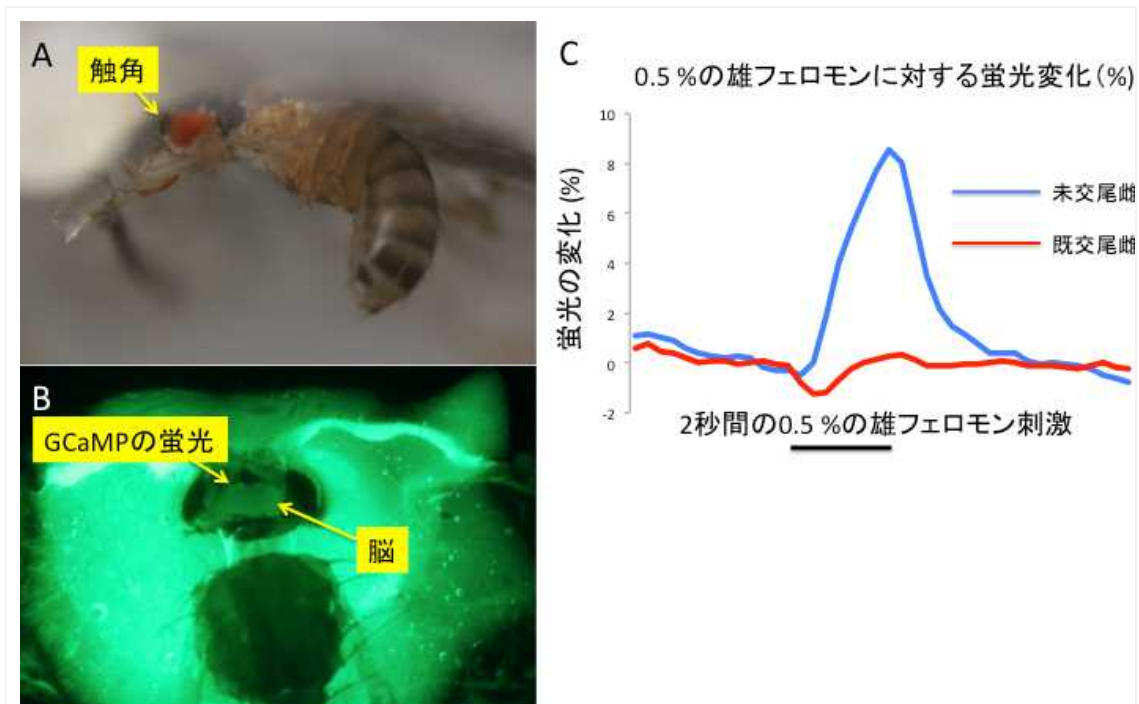
(1) 研究テーマ A 「交尾前後の雌のフェロモン応答の閾値の変化」

ショウジョウバエの雌は交尾後、産卵活動を開始して、雄の求愛を受け入れなくなる。交尾後のこうした行動変化は、雄が交尾中に精子とともに雌に移入するsex peptideと呼ばれるペプチドが感覚神経に作用することによって誘発されることが報告されている。

では、交尾後の雌が雄からの求愛を拒否している時、昆虫の求愛に極めて重要な役割を果たす雄フェロモン (*cis*-vaccenyl acetate) に対する神経応答はどうなっているのだろうか？それを調べるために、未交尾雌と、交尾してから24時間後の既交尾雌とで、雄フェロモンに対する神経応答を比較した。方法としては、雄フェロモンを検出するOr67d嗅覚受容体を発現する嗅細胞に、カルシウム蛍光指示タンパク質のGCaMP遺伝子を特異的に発現させ、低濃度から高濃度のフェロモンで触角を刺激した際のシナプス終末における蛍光変化を定量した(図A, B)。まず、未交尾雌では、雄臭と0.1% cVAに対しては同程度の蛍光量変化が観察され、cVAの濃度を上げるとその応答が濃度に応じて大きくなった。一方、既交尾雌は、0.5% cVAですら応答が観察できず、未交尾雌と比較して雄フェロモンに対する刺激応答の閾値が大きくなることが明らかになった(図C)。

一方、交尾後の雌は産卵活動に入るわけなのだが、産卵する餌場の匂いに対する感受性に、未交尾雌と既交尾雌とで違いはあるのだろうか？先述の実験と同様に、Ir64a 嗅覚受容体を発現する Ir64a 嗅細胞で、食べ物に含まれる phenylacetaldehyde に対する応答を記録すると、未交尾雌と既交尾雌で、刺激応答の閾値に違いは検出できなかった。

このようなフェロモン応答の閾値の変化は何に誘発されるのだろうか？交尾後の行動変化を誘発するsex peptideが感覚応答まで変化させうるか調べる目的で、sex peptideを持たない突然変異体の雄と交尾した雌の雄フェロモンに対する応答の閾値を調べた。その結果は、野生型の雄と交尾した雌のフェロモン応答の閾値と同じであった。つまり、交尾後の雌の雄フェロモンに対する神経応答の変化はsex peptideに依存しないことが明らかになった。



(2) 研究テーマ B 「刺激応答閾値に関して、生理実験とカップリングできる行動実験系の確立」

これまで、異なる濃度の匂いに対する神経応答を生理実験で記録してきた。匂いの濃度依存的な神経活動と行動との相関を調べるためには、生理実験で用いた匂い刺激に限りなく近い条件で、行動実験を行う必要がある。そこで、ショウジョウバエでは学習・記憶のテストにつかう T maze の器械を少し改変して、ショウジョウバエが様々な濃度の匂いに対して、その匂いを選択して向かうかテストできるようにした。これまでの生得的な匂いの選択の研究では、慢性的に匂いを嗅げるような条件で行った実験が主で、比較的短い時間で選択させるような実験はほとんどなかった。様々な匂いを試した結果、グレープジュースで濃度依存的な選択的行動が最も効果的に観察された。また、その選択的行動は、ショウジョウバエの空腹条件に依存し、空腹にすればより低濃度の匂いに誘引される結果となった。

3. 今後の展開

研究テーマ A に関しては、交尾後の匂い応答の閾値の変化が sex peptide に依存しなかったことから、どういった因子が変化を誘導しているのか検討する必要がある。交尾後、雌は卵を大量に作りはじめることから、卵の増産に関与するホルモンに着目して、交尾後体内で量に変化するホルモンを探索し、そのホルモンによって匂い応答の変化が生じるかテストする。

研究テーマ B に関しては、テーマ A とカップリングできるようにするには、まだ微調整が必要ではあるが、この系を用いることで、コンディションに応じた匂い選択機構を生理学的・行動学的に明らかにすることができるようになった。特に様々な空腹条件下における匂いの選択と、同じ条件下での匂いに対する神経応答を比較し、相関のあるものを探することで、コンディションに応じて匂いを選択する機構、さらには、匂いを選択して匂い源

にむかわせる脳内機構について末梢から高次の嗅覚野に連絡する神経の応答を調べていきたい。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

本研究の最終的な目標は、脳が気分や体調に応じて感覚情報処理を変化させる機構を明らかにすることである。これまでに、コンディションによる匂い応答の閾値の変化を生理学的・行動学的手法で明らかにし、その解析を行うための GAL4 エンハンサートラップシステムの同定を終えたという点で、一定の成果をあげ、また、今後研究を発展させる基盤を整えることができたと言える。しかしながら、まだまだ道半ばである。今後はこれまでに同定してきた GAL4 エンハンサートラップシステムをもちいて、様々な神経細胞、特に、モノアミンやホルモン、ペプチドなどを持つ神経の神経活動パターンを記録し、その出力が周辺の神経細胞の匂い応答にどのように作用しうるのか、また、そうした伝達物質を持つ神経細胞間が相互作用して、脳全体のバランスを制御し、感覚情報処理を変化させる機構を調べていく必要がある。

##### (2) 研究総括評価

動物行動の基本パターンは対応する神経回路により定式化されているものの、個体の置かれた状況により行動表出を適切に修飾する神経回路が介在し、モノアミン、ペプチドホルモンなどの神経伝達/修飾物質が後者に関わると考えられるが、そのような機能的回路の実体と機能様式は未だ不明な部分が多い。本研究では遺伝学的な実験操作が容易かつ豊富なショウジョウバエを用い、嗅覚応答行動、具体的には性フェロモン応答・産卵行動や求餌行動などに着目し、行動表出修飾の有力なメカニズムとなる応答閾値調節に関して神経回路の観点からアプローチしたものである。交尾に伴い雌バエに移入する特定のペプチドホルモンが、雄フェロモンを感知する特定の嗅覚神経細胞のカルシウム応答の閾値を引き上げること、他方でこのペプチドは雌の産卵環境への嗅覚的誘因物質フェニルアセトアルデヒドに対する応答閾値は変化させないことを見出したことは興味深い成果である。また個体行動レベルでの解析を進めるための実験装置の開発を進めており、空腹と選択行動について予備的成果が得られている。今後得意とする蛍光顕微鏡による神経線維連絡解析と併せて特定行動を調節修飾する回路のメカニズムの解明が進むことが期待される。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Tanaka NK, Dye L, Stopfer M. (2011) Dual-labeling method for electron microscopy to characterize synaptic connectivity using genetically encoded fluorescent reporters in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience Methods* 194:312-315.
2. Tanaka NK, Endo K, Ito K. (2012) The organization of antennal lobe-associated neurons in the adult *Drosophila melanogaster* brain. *J Comp Neurol* 520:4067-4130.

3. Tanaka NK, Suzuki E, Dye L, Ejima A, Stopfer M. (2012) Dye-fills reveal additional olfactory tracts in the protocerebrum of wild-type *Drosophila*. *J Comp Neurol* 520:4131-4140.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Tanaka N, Ejima A. (2010) Olfactory neuronal circuit for reproductive behaviors in *Drosophila*. Annual meeting for society for neuroscience. San Diego, CA, USA. (ポスター発表)

Tanaka N, Stopfer M. (2011) Dual-labeling Method for Electron Microscopy to Characterize Synaptic Connectivity Using Genetically Encoded Fluorescent Reporters in *Drosophila*. 1<sup>st</sup> Asia Pacific *Drosophila* Research Conference, Taipei, Taiwan. (ポスター発表)

Tanaka N, Ejima A. (2011) Multiple antennal lobe-protocerebral tracts in *Drosophila*. European Symposium on Insect Olfaction and Taste, Saint Petersburg, Russia. (ポスター発表)

Tanaka N, Ito K, Stopfer M. (2011) Olfactory Neuronal Circuit in a *Drosophila* Brain. 日本味と匂学会 (招待講演)

Tanaka N, Ejima A. (2013) Pheromone processing pathways in *Drosophila*. Asia Pacific *Drosophila* Research Conference, Seoul, Korea. (口頭発表)

八木亮輔、田中暢明. (2013) Convergence of multimodal sensory input to the mushroom body calyx in *Drosophila*. 日本動物学会大会 (口頭発表)

Tanaka N. (2014) The olfactory system in *Drosophila*. International Workshop on Animal Instinctive and Intelligent Behaviors, Sapporo, Japan. (口頭発表)

# 研究報告書

## 「神経軸索ガイダンスを制御する普遍的シグナル伝達の時空間解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 戸島 拓郎

### 1. 研究のねらい

複雑かつ精緻な神経回路網を形成するために、発生中の神経軸索先端部に現れる成長円錐は、細胞外環境に呈示される多種多様な軸索ガイダンス因子を感知し、それに応じて自身の進行方向を転換(誘引/反発)することで遠隔の標的までの経路を正しく選択する。ガイダンス因子の濃度勾配に遭遇した成長円錐内部では、空間的非対称性を持った  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が観察される。この  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルは、軸索ガイダンス因子の作用が誘引の場合も反発の場合も同様の空間分布(ガイダンス因子濃度の高い側で高濃度)をとり、この非対称性  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが誘引/反発を引き起こすための必要十分条件であることが良く知られていた。一般に、細胞質中の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は細胞外からの「 $\text{Ca}^{2+}$ 流入」と小胞体からの「 $\text{Ca}^{2+}$ 放出」により上昇するが、過去の報告において我々は、成長円錐の誘引を引き起こす  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルには、小胞体膜  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルであるリアノジン受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 放出(CICR)が含まれる一方、反発性  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの構成要素は細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 流入のみ(CICR を含まない)であることを明らかにした(Tojima et al, J Neurosci 29: 7886-7897, 2009)。さらに我々は、非対称性  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルによって誘発される成長円錐の方向転換を駆動する分子メカニズムとして膜トラフィッキングに着目し、VAMP2 依存性エクソサイトーシスが誘引を駆動すること、その一方でクラスリン依存性エンドサイトーシスが反発を駆動することを明らかにしてきた。(Tojima et al, Nat Neurosci 10: 58-66, 2007; Tojima et al, Neuron 66: 370-377, 2010)。

これらの結果に基づいて本課題では、(A)非対称性  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルから膜トラフィッキングに至るシグナル伝達経路、(B)非対称性環状ヌクレオチドシグナルによる軸索ガイダンス駆動機構、(C)複数の軸索ガイダンス因子による成長円錐の方向転換制御機構、の3点について研究を進めた。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

発生中の神経軸索先端部に現れる成長円錐は、細胞外環境に呈示される多種多様な軸索ガイダンス因子に導かれて移動し遠隔の標的に正しく投射する。本課題では、成長円錐がガイダンス因子の濃度勾配を読み取り自らの運動性へ変換するための細胞内シグナル伝達経路を解析した。ガイダンス因子受容時に成長円錐内で空間非対称的に発生する  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの下流においては、カルシニューリン、CaM キナーゼ II、Cdk5、PIP キナーゼ  $\text{I}\gamma 90$  等のシグナル分子を介してクラスリン依存性エンドサイトーシスと VAMP2 依存性エクソサイトーシスのバランスが不均衡化され、その結果成長円錐が方向転換することが示された。一方、非対称性環状ヌクレオチド(cAMP、cGMP)シグナルの下流においては、微小

管動態と VAMP7 依存性エクソサイトーシスが方向転換に寄与していた。さらに、複数のガイダンス因子の呈示に対して成長円錐が正確な経路選択を行う機構についても解析した。これらにより、ガイダンス因子受容から成長円錐の運動制御に至る普遍的シグナル伝達ネットワークの全貌が明らかになりつつある。

## (2) 詳細

### **研究テーマ A 「非対称性 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルから膜トラフィッキングに至るシグナル伝達経路」**

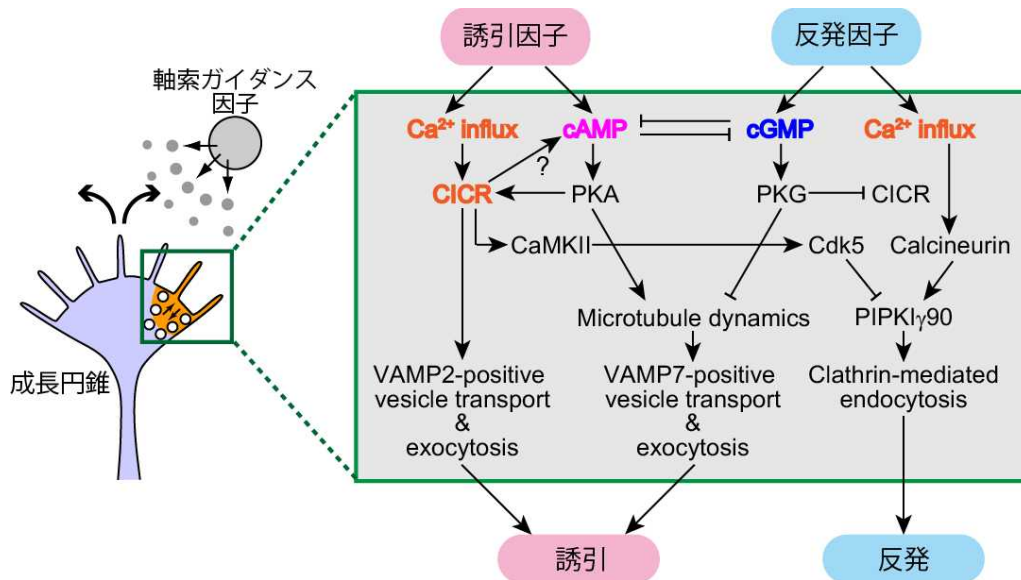
本項目では、誘引性  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル( $\text{Ca}^{2+}$ 流入と CICR)および反発性  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル( $\text{Ca}^{2+}$ 流入のみ)の下流においてクラスリン依存性エンドサイトーシスを調節するシグナル伝達経路について解析した。過去のプレシナプスでの研究から、エンドサイトーシス調節因子群の形質膜局在に必要な  $\text{PIP}_2$  の合成酵素である PIP キナーゼ  $\text{I}\gamma 90$  がシナプス小胞のエンドサイトーシスに寄与することが示されていた。また、PIP キナーゼ  $\text{I}\gamma 90$  の活性はカルシニューリンによる脱リン酸化により上昇し、Cdk5 によるリン酸化で抑制されることが知られている。これらの知見に基づいて我々は、軸索ガイダンスにおける PIP キナーゼ  $\text{I}\gamma 90$ 、カルシニューリンおよび Cdk5 の寄与を検証した。その結果、反発性  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの下流におけるエンドサイトーシス促進には PIP キナーゼ  $\text{I}\gamma 90$  とカルシニューリンの活性が必要であることが判明した。その一方で、誘引性  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの下流においては CaM キナーゼ II を介して Cdk5 がエンドサイトーシス抑制に働いていた。重要なことに、Cdk5 阻害剤または CaM キナーゼ II 阻害剤の存在下では、誘引性  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルに応じてエクソサイトーシスとエンドサイトーシスの両者が成長円錐の片側( $\text{Ca}^{2+}$ シグナル側)で活性化しており、この時成長円錐は方向転換できずに直進した。この直進は、エンドサイトーシス阻害剤 MDC の追加投与により誘引に、エクソサイトーシス阻害剤 TeNT の追加投与により反発に転換した。以上の結果により、異なる二つの  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性経路によってエンドサイトーシスが拮抗的制御を受けること、さらには、成長円錐の進行方向は成長円錐の片側でのエクソサイトーシスとエンドサイトーシスのバランス制御により決定されることが明らかになった(J Neurosci 誌に原著論文投稿中)。

### **研究テーマ B 「非対称性環状ヌクレオチドシグナルによる軸索ガイダンス駆動機構」**

細胞外環境に存在する軸索ガイダンス因子の空間情報を感知して成長円錐が方向転換(誘引/反発)するためには、成長円錐内部で何らかのシグナル分子が非対称化する必要があるが、上述のように、これまでは空間情報をコードするセカンドメッセンジャーとして  $\text{Ca}^{2+}$ のみが同定されていた。一方で、環状ヌクレオチド(cAMP、cGMP)は同一のガイダンス因子に対する成長円錐の応答性の切替え(誘引 $\rightleftharpoons$ 反発)に重要なセカンドメッセンジャーとして知られてきたが、その成長円錐内での空間分布は不明であった。そこで本項目では、成長円錐内における環状ヌクレオチドの空間分布の重要性を解析した。成長円錐の片側でケージド cAMP またはケージド cGMP を光解離したところ、成長円錐はそれぞれ誘引または反発を呈した。すなわち、非対称的な空間分布を持った cAMP/cGMP シグナルが方向転換の十分条件になりうるということが判明した。そこで、これら環状ヌクレオチド下流で成長円錐の方向転換を駆動する分子メカニズムについて解析を進めた。ケージド cAMP/cGMP 光解離に応じた微小管動態の変化を観察したところ、cAMP/cGMP 上昇に応じて成長円錐周辺部への微小管の侵入が促進/抑制された。またそれに伴って、成長円錐周辺部への VAMP7 陽性小胞の微小

管依存性順行輸送の頻度が増加／減少した。さらに、VAMP7 依存性エクソサイトーシスの阻害により、cAMP/cGMP 依存的な成長円錐の誘引／反発は阻害された。その一方で、非対称性 Ca<sup>2+</sup>シグナルの下流では微小管動態およびVAMP7の寄与は無かった。過去の我々の報告では、Ca<sup>2+</sup>シグナル下流では VAMP2 依存性エクソサイトーシスが機能することが明らかになっていることから、cAMP/cGMPはCa<sup>2+</sup>とは異なる膜トラフィッキング機構を用いて方向転換を誘発することが明らかになった。

研究テーマAの結果と併せて考えると、ガイダンス因子受容時の成長円錐内では Ca<sup>2+</sup>と環状ヌクレオチドの両方が非対称化しており、そのそれぞれが異なる膜トラフィッキング機構を活性化していることが強く示唆される(図1)。これら複数のシグナル経路の共存は、成長円錐の運動の正確性を補償すると推察される。また、Ca<sup>2+</sup>と環状ヌクレオチドの相互作用(ポジティブフィードバック、側方抑制)により、細胞外で緩やかな濃度勾配分布を示すガイダンス因子の空間情報が成長円錐内で急峻化される効果も考えられる。



**図1. 成長円錐の誘引と反発を制御するシグナル伝達ネットワーク**  
成長円錐の片側でこれらのシグナル伝達ネットワークが活性化し、エクソサイトーシスとエンドサイトーシスのバランスが不均衡化されることで成長円錐は進行方向を転換する。

### 研究テーマC 「複数の軸索ガイダンス因子による成長円錐の方向転換」

上述のように、培養系を用いた研究により、一つの成長円錐が一つのガイダンス因子に対して応答する「一対一対応」の細胞内メカニズムの概要が明らかになってきた。しかし一方で、生体組織内での軸索ガイダンスを司る細胞内シグナル伝達の研究は立ち遅れている。興味深いことに、組織内においては複数のガイダンス因子が相補的な空間プロファイルを持って発現している領域が多く見られる。代表的な例は、発生の脊椎底板の頭尾軸方向に形成される誘引因子 Wnt4 と反発因子 Shh の相補的な濃度勾配であり(頭側で Wnt4、尾側で Shh が高濃度)、正中交差後の脊椎交連神経の軸索成長円錐はこれに誘導されて頭方向へ方向転換する。このことから、一つの成長円錐が複数の因子の異なる空間情報を同時に読み取ることが、組織内での経路選択の正確性に重要であると考えられる。そこで本項目では、一つ

の成長円錐が同時に二つのガイダンス因子に遭遇した際の、「多対一対応」の制御メカニズムについて研究を行った。まず培養実験系において、誘引因子 PACAP と反発因子 Sema3A の相補的濃度勾配に対する成長円錐の応答性を解析した。その結果、PACAP または Sema3A の単独投与では成長円錐が反応出来ない濃度条件においても、両者が共存することにより成長円錐が方向転換できるようになることが明らかになった。続いて、成長円錐内での環状ヌクレオチドを可視化解析したところ、PACAP と Sema3A の相補的濃度勾配存在下では、環状ヌクレオチドの非対称的分布が見られた。以上の結果により、複数のガイダンス因子の情報が成長円錐内でセカンドメッセンジャーにより統合・増幅されることでより正確な軸索投射が達成される可能性が示された。

### 3. 今後の展開

今後は、組織内を走行する成長円錐内でのセカンドメッセンジャー動態を可視化解析してゆく。現在までに我々は、in ovo 電気穿孔法を用いてニワトリ胚脊髄交連神経細胞に各種蛍光タンパク質センサーを導入し卵内で発生させた後、脊髄オープンブック標本を作製し多光子励起レーザー顕微鏡により観察する実験系を確立した。この系によって、組織内で複数のガイダンス因子に遭遇して方向転換を行っている最中の成長円錐内の環状ヌクレオチドおよび  $Ca^{2+}$  動態を観察してゆく予定である。これにより、今まで主に培養細胞のみを用いて研究されてきた軸索ガイダンスの細胞内メカニズムの知見が生体内においても機能しているのかどうかを確認し、普遍的な神経回路形成機構の包括的解明へと繋げて行きたい。さらに、これらの知見を応用することで、脳脊髄損傷後の再生軸索成長円錐を本来の正しい標的へ誘導するための再生医療技術開発に貢献したい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

本課題では、神経回路形成を担う極めて重要な素過程の一つである神経軸索ガイダンスを制御する細胞内シグナル伝達メカニズムについて研究を進めた。分散培養系を用いて行った研究では非常に多くの知見を得ることができ、その成果の一部をまとめた原著論文を現在投稿中である。またこれらの知見により、多種多彩な軸索ガイダンス因子に反応して成長円錐が臨機応変に自らの移動方向を選択するための普遍的な原理を提唱することが出来たと考えている (Tojima et al, Nat Rev Neurosci 12: 191-203, 2011)。一方で、本課題の最終目標であった、生体組織内を走行する成長円錐における解析は、その実験系の確立までに留まった。今後はこの実験系を用いて、より複雑な生体内における軸索ガイダンス機構を解明して行きたい。組織内での成長円錐内ライブイメージングは非常に困難でチャレンジングな課題であったが、さきがけの手厚いサポートを頂いたおかげで、今後の研究の発展につながる重要な基礎を築くことが出来た。総括の村上富士夫先生をはじめ、アドバイザーの先生方、さきがけ研究者の皆様、JST関係者の皆様に心より感謝を申し上げたい。

#### (2) 研究総括評価

神経軸索が正しい標的に誘導されるメカニズムについては古くから研究がなされて、軸索



ガイダンス因子に関する研究は大きく進んだ。それを受容する成長円錐における細胞内メカニズムについてはその研究が遅れていたが、先の戸島研究者らによる小胞体からのCa放出および膜トラフィッキングの意義に関する先導的発見により大きく展開した。本研究では、Caシグナルから膜トラフィッキングへのシグナル系、および環状ヌクレオチド(cAMP, cGMP)シグナルなどについて解析を展開し、プロテインキナーゼ/フォスファターゼ群の関与によるエクソ/エンドサイトーシスの制御、および両環状ヌクレオチド濃度の軸索先端部における空間分布などを見出し、成長円錐の方向転換を制御するメカニズムの機構の理解を大きく進展させたものであり、その意義は非常に大きい。こうして浮き彫りにされてきた軸索ガイダンスの精妙複雑な分子メカニズムに基づき、生体内での複数のガイダンス因子シグナルの統合・増幅を理解できる視界が開け、またこの重要な生理プロセスの正確性を保証するロバストネスが得心できるようになった。今後は、準備を進めている生体組織内での解析においてこれらの発見が確認・拡張され、さらに他の細胞種との関係を含め in vivo 特有の現象の解析が進展して、例えば脊髄損傷などの臨床的課題において単なる軸索再生のみでなく機能的再生へと誘導できる手掛かりが得られることが期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Kuboyama T, Luo X, Park K, Blackmore MG, **Tojima T**, Tohda C, Bixby JL, Lemmon VP, Kamiguchi H. Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration. *Experimental Neurology* 248: 157-169, 2013.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 主要な学会発表(シンポジウム、招待講演のみ)

1. **Takuro Tojima**. Signaling mechanisms of neuronal growth cone guidance induced by chondroitin sulfate. International Symposium on Glyco-Neuroscience, Awaji, 2014年1月9日
2. **Takuro Tojima**. Signaling and driving mechanisms underlying bidirectional axon guidance. NIG Symposium 2013 "Frontiers of Genetics in NIG", Mishima, 2013年9月23日
3. **戸島拓郎**. 神経軸索ガイダンスを制御するシグナル伝達クロストーク. 第86回日本生化学会大会、横浜、2013年9月13日
4. **戸島拓郎**. 軸索ガイダンスを制御する糖鎖受容機構の解明. 平成25年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ、名古屋、2013年9月1日
5. **Takuro Tojima**. Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of membrane trafficking controls

- neuronal growth cone guidance. 熊本大学発生医学研究所 平成 24 年度リエゾンラボ研究会、熊本、2013 年 3 月 6 日
6. **戸島拓郎**. 神経成長円錐ガイダンスを駆動するシグナル伝達機構. 生理学研究所 所長招聘セミナー、岡崎、2013 年 2 月 1 日
  7. **戸島拓郎**. 神経成長円錐の応答性を指標とした糖鎖機能ドメインの解析. 平成 24 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ、仙台、2012 年 7 月 25 日
  8. **Takuro Tojima**, Rurika Itofusa, Hiroyuki Kamiguchi. Ca<sup>2+</sup> signaling and membrane trafficking mediate neuronal growth cone guidance. Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Kobe, 2012 年 5 月 30 日

#### 受賞

1. 理研研究奨励賞、2011 年 3 月 10 日
2. 日本神経科学学会奨励賞、2011 年 9 月 15 日

#### 総説論文

1. **Tojima T**. Intracellular signaling and membrane trafficking control bidirectional growth cone guidance. *Neuroscience Research* 73: 269-74, 2012.
2. 秋山博紀, **戸島拓郎**, 上口裕之. 神経軸索突起の進路決定メカニズム. *生化学* 84: 848-853, 2012.
3. **Tojima T**, Hines JH, Henley JR, Kamiguchi H. Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nature Reviews Neuroscience* 12: 191-203, 2011.
4. **戸島拓郎**, 秋山博紀, 上口裕之. 神経軸索突起をターゲットへ導く細胞内メカニズム. *生物物理* 51: 214-217, 2011.

#### 著作物等

1. **戸島拓郎**, 上口裕之. サイクリック AMP. *脳科学辞典* <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/サイクリックAMP>
2. **Tojima T**, Kamiguchi H. The driving machinery for growth cone navigation. *Cytoskeleton of the Nervous System, Advances in Neurobiology* (Springer, New York), R.A. Nixon, A. Yuan (eds.) vol. 3, pp. 447-454, 2011.

# 研究報告書

## 「自発行動リズムを制御する体内時計神経回路基盤の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 中村 渉

### 1. 研究のねらい

神経機能は周期性をもって変動することにより、生体が暴露される環境イベントに対して効率よく適応することを可能にする。とりわけ、一日周期で昼夜が訪れる地球上では、光環境や温度環境が24時間周期で変動し、生物は生命活動を維持するため約一日(サーカディアン)周期の体内時計機能を内在している。哺乳類において、視床下部・視交叉上核を実験的に破壊すると、生体におけるあらゆる生理機能や睡眠覚醒サイクルに認められるサーカディアンリズムが消失することから、視交叉上核はサーカディアンペースメーカーであると考えられる。視交叉上核は単一神経細胞内に概日リズムを刻む分子機構を内在した概日時計神経細胞の集合体であり、環境の周期的入力によって同調し、安定した時間情報を出力する。一方、雌性げっ歯類にみられる数日周期の性周期はサーカディアンペースメーカー視交叉上核破壊によって消失し、数時間周期のウルトラディアンリズムはサーカディアンリズムの消失に伴い顕在化する。すなわち、約一日周期のサーカディアンリズムと、その他の長周期性、短周期性リズムの間には相互作用が存在し、相互依存的に機能することが想定される。本研究では明瞭なサーカディアンリズムと共にさまざまな周期性が表出する自発行動に着目し、自発行動リズムを制御する神経回路の動作原理を明らかにすることを目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

マウス自発行動に表出される周期性を指標に、行動リズムとそれに対応して変動を示す生理機能リズムを制御する神経回路を明らかにするため、以下のテーマについて研究を行った。

研究テーマA「摂食タイミング予知行動のサーカディアン制御機構」

研究テーマB「視交叉上核細胞間カップリングに作用する因子の探索」

研究テーマC「視交叉上核の加齢変化と生理機能制御」

これらの課題に対して自発行動リズムを測定することで体内時計神経回路の特性を推測するアプローチ法が採られてきたが、本研究では、個体行動と共に周期的神経出力を長期間測定する技術を用い、行動リズムと神経活動動態を直接対比することで神経制御機構を明らかにすることを試みた。

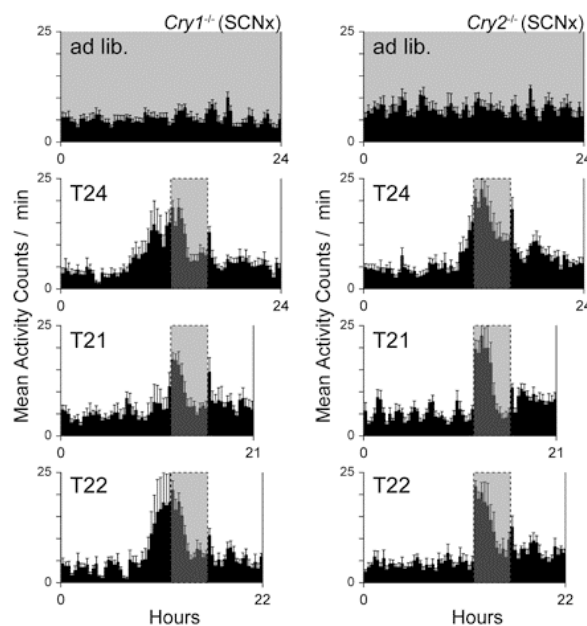
#### (2) 詳細

研究テーマA「摂食タイミング予知行動のサーカディアン制御機構」

一日の摂食タイミングは視交叉上核が規定しており、マウスは行動が活発になる夜間の直前に目をさまし摂食・飲水を行うことで活動期に備えている様子が観察される。一方、摂食可能な時間帯を一日のうち昼間の定刻一定時間に制限すると、本来活動休止期であるにもかかわらず、給餌時刻の数時間前に目をさまし活動を始める「摂食予知行動」を示す。予知行

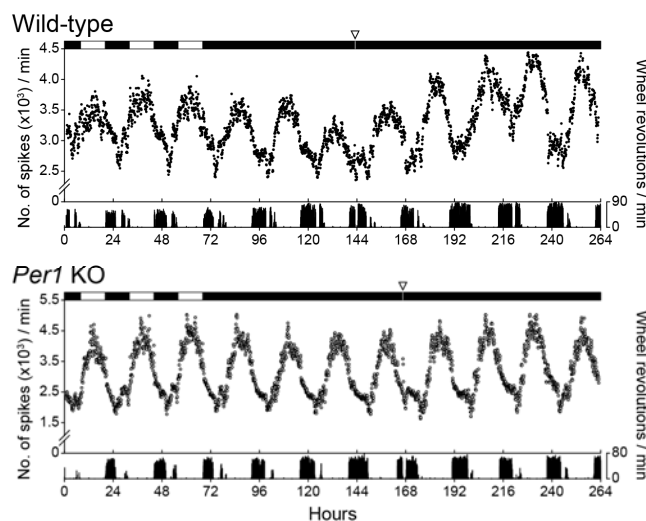
動は給餌の有無にかかわらず概日周期で生じることから、概日ペースメーカーに制御される行動リズムであると考えられてきた。さらに、視交叉上核破壊動物でも摂食予知行動リズムが生じることから、視交叉上核非依存的に制御するペースメーカーの存在が想定されている。一方、全身的に時計遺伝子の必須要素を欠損させたKOマウスでも、この行動リズムが出現することが報告され (Mistlberger et al. Science 2008, Storch et al. PNAS 2009)、摂食予知行動を制御するメカニズムは明らかでなかった。

我々は摂食予知行動リズムに関する時計遺伝子の関与を明らかにするため、22.5時間の短周期を示す *Cry1* KO マウスと24.5時間の長周期を示す *Cry2* KO マウスを用い、周期的時間制限給餌を行った。摂食予知行動を示す時間制限給餌の周期(時間間隔)は1日に近い範囲に規約されており、*Cry1* KO マウスの方がより短時間周期に反応し、摂食予知行動リズムの周期決定には時計遺伝子 *Cry* が関与することが明らかになった。一方、サーカディアンリズムを示さない *Bmal1* KO マウスではサーカディアンリズムの範疇を超えた15時間周期の時間制限給餌に対して摂食予知行動を示した。すなわち、*Bmal1* KO マウスが示す給餌前行動はサーカディアンリズムに規約されておらず、時間間隔の学習等、リズム振動とは別のメカニズムに拠るものと考えられる。以上より、摂食予知行動のリズム形成には既知の時計遺伝子群が関与していると結論した(論文2)。



#### 研究テーマB「視交叉上核細胞間カップリングに作用する因子の探索」

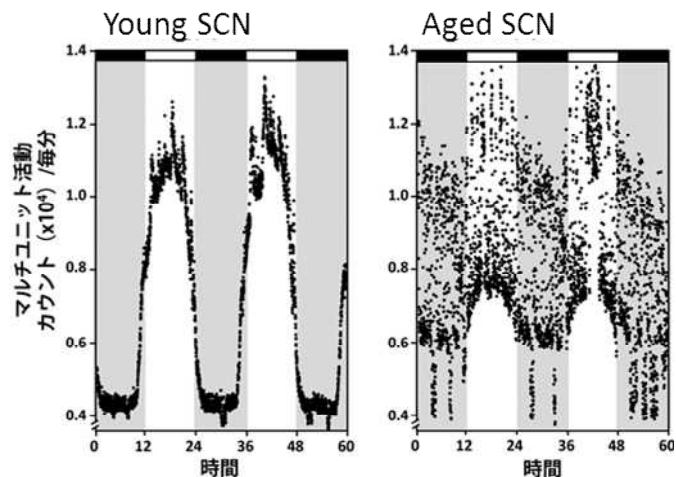
視交叉上核は片側で約 8000 個の神経細胞が緊密に集めた神経核であり、個々の神経細胞内にサーカディアンリズム機構を内在している。8000 個の視交叉上核細胞が独自の周期でリズムを刻むと、全体としてのリズムは減衰することが予想され、神経核回路として機能するためには神経細胞間リズム同期が必須である。我々は細胞間リズム同期因子の検討のため、*Per1* KO マウスをモデルとして用いた。*Per1* KO 視交叉上核組織切片を ex vivo 環境下で観察すると、個々の細胞レベルでサーカディアンリズムが認



められるが、まさに細胞間リズム同期が失われ、各々が独自の周期を刻むために総体としてのサーカディアンリズム発振は減弱する(Pendergast et al. J Neurosci. 2009)。in vivo 多神経活動記録法により輪回し行動リズムと視交叉上核神経活動リズムの同時測定を行ったところ、in vivo Per1 KO 視交叉上核リズムは野生型と遜色なく、頑強なサーカディアンリズムを示した。この結果は ex vivo では生じない細胞間リズム同期が in vivo では何らかの要素を介して達成されていることを示す(論文1)。

#### 研究テーマC「視交叉上核の加齢変化と生理機能制御」

行動リズムには加齢変化があり、加齢に伴う活動期・休止期のメリハリが低下すること、活動開始・終了時刻の不整・不明瞭化、さらにリズム周期の変化が知られている。これらの加齢変化は体内時計中枢・視交叉上核のサーカディアンリズム出力の低下に起因するとの仮説があったが、実際、時計遺伝子発現を指標とする報告では明瞭な加齢変化は検出できなかつた。我々は in vivo 多神経活動記録法を加齢マウスに適用し、視交叉上核の加齢変化検出を試みた。時計遺伝子産物 PER2 の発現量変動を指標とした場合、視交叉上核のリズム発振に差は認められなかつたのに対し、in vivo 神経活動リズムでは顕著な加齢変化を検出し、活動期と休止期のメリハリが低下しており結果としてリズム出力の振幅が低下していた(論文3, 4)。



### 3. 今後の展開

マウス個体行動に表出する周期性(リズム)の観点から 24 時間のサーカディアンリズムに軸足を置き全身を制御する神経回路機構にアプローチした。今後は、摂食タイミングを制御するサーカディアン振動体の同定、サーカディアン振動体細胞間カップリングに作用する因子の同定、体内時計の加齢変化を生じる分子機構と生理機能制御に作用する加齢変化を明らかにする。動物個体レベルの生体制御を考える場合、一細胞内における分子の動態から、注目する特定の機能に直接作用する神経回路、さらには二次的に関連する神経回路との相互作用を考慮する必要性が改めて浮き彫りになった。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

マウス個体レベルのサーカディアン行動リズムは多様な機能神経回路が統合された最終出力系の一つであり、研究テーマに据えた3つの系について研究成果を挙げることができた。さきがけ研究期間中に最終年度を迎えた若手研究者独立支援テニュアトラックプログラムにて、所属機関および国内外の外部評価者の審査をクリアし、独立研究室を主宰するテニュア准教

授として昇任したことは、さきがけ神経回路領域の研究支援体制の賜物である。定期領域会議の場で多様な研究テーマの関連性が不明瞭になったこと、また基幹となる研究到達目標であるウルトラディアンリズム発振領域の同定に至らなかったことは反省点である。しかしながら、それぞれの研究テーマにおいて発表論文に加え新たなデータの蓄積ができたことは、今後の発展性が期待できる。

## (2) 研究総括評価

哺乳類概日リズムのマスタークロックとされる視交叉上核内の機能回路およびそこから周期的行動に至る神経回路についてはなお多くが不明である。本研究では3つの角度からマウス視交叉上核の機能に解析を加え、時計遺伝子 *Per1* の欠損下でも視交叉上核には電気活動の概日リズムが保たれること、給餌時間制限下の摂食時間予知行動を *Cry1* 等3個の時計遺伝子ノックアウトマウスにおいて解析して本行動リズムにこれらの遺伝子群が関与すること、また視交叉上核内の多神経活動記録法により加齢動物では顕著なリズムの乱れがあることを明らかにできたことは興味深い成果である。今後は3つの角度から得られた知見の統合的な理解が進めば、このような視交叉上核の機能リズムにおけるウルトラディアンリズムの関与、およびこのような現象に関わる神経伝達物質等機能分子やリズム形成の機構の解析が進展し、長期的には概日リズムの変調と各種疾患の関係が明らかになることが期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Takasu NN, Pendergast JS, Olivas CS, Yamazaki S, Nakamura W.\* In vivo monitoring of multi-unit neural activity in the suprachiasmatic nucleus reveals robust circadian rhythms in period1<sup>-/-</sup> mice. *PLoS ONE* (2013) 8:e64333.
2. Takasu NN, Kurosawa G, Tokuda IT, Mochizuki A, Todo T, Nakamura W.\* Circadian regulation of food-anticipatory activity in molecular clock-deficient mice. *PLoS ONE*. (2012) 7: e48892.
3. Tanaka M, Yamaguchi E, Takahashi M, Hashimura K, Shibata T, Nakamura W, Nakamura TJ. Effects of age-related dopaminergic neuron loss in the substantia nigra on the circadian rhythms of locomotor activity in mice. *Neurosci Res* (2012) 74: 210-215.
4. Nakamura TJ, Nakamura W, Yamazaki S, Kudo T, Cutler T, Colwell CS, Block GD. Age-Related Decline in Circadian Output. *J Neurosci* (2011) 31: 10201-10205.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表)

1. 中村 渉: 摂食タイミングのサーカディアン制御, 第91回日本生理学会大会シンポジウム『生理機能と時間』(2014年3月17日, 鹿児島)
2. 中村 渉: 明日への履歴, 第20回日本時間生物学会学術大会シンポジウム『時間生物学のこれまでと今後』(2013年11月10日, 東大阪)

3. 中村 渉： 体内時計中枢・視交叉上核の機能的入出力と概日行動リズム制御機構，第 117 回日本解剖学会シンポジウム（2012 年 3 月 26 日，山梨）
4. 中村 渉： げっ歯類の食事サイクル同調の特徴と性質，第 19 回日本時間生物学会シンポジウム『末梢臓器振動体の臓器特異性、同調、相互作用』(2012 年 9 月 15 日，北海道)
5. 中村 渉： 食事前行動のサーカディアンリズム制御機構，第 64 回日本自律神経学会総会ワークショップ（2011 年 10 月 27 日，秋田）

# 研究報告書

## 「光遺伝学を用いた前頭前野シナプスと個体レベル行動との関連解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 9 月～平成 26 年 3 月

研究者: 林 朗子(高木 朗子)

### 1. 研究のねらい

シナプスは脳回路の最小単位であり、その適切な形成および可塑性が正常な神経回路の基盤である。様々な精神疾患に大脳皮質のグルタミン酸作動性シナプスの関与が示唆されるものの、生体脳でどのような病態がシナプスレベルで進行していくのかは未解明である。グルタミン酸作動性シナプスの約 7 割は、樹状突起上にマッシュルーム様構造(スパイン)を形成する。スパインの特徴の一つに、その形態と機能に著しい相関があること、即ち、形態をイメージングするだけでそのシナプス機能を精度良く推測できるという方法論的な大きな利点がある。さらに 2 光子顕微鏡によりスパインを *in vivo* で繰り返しイメージングすること、Optogenetics によってスパイン形態を人為的に操作する新しいプローブの作成、これらの操作動物に行動解析を併用することが可能になった。本研究は、この Synaptic optogenetics とも表現できる新技法によりスパインと行動との因果律に挑戦した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

脳内の数百億もの神経細胞はシナプスを介して連絡しており、大脳皮質のグルタミン酸作動性シナプスの約 7 割は樹状突起スパインという小突起構造上に形成される。スパインは学習・経験に応じてその形態・サイズが劇的に変化し、それに伴い電氣的伝達効率が変化する。それ故に、スパインは脳機能の記憶素子と考えられ、多くの精神疾患やそのモデル動物で前頭前野領域におけるスパイン形態・密度異常が繰り返し報告されてきた。前頭前野は高次脳機能の中核であり、様々な精神疾患の責任部位と考えられている。しかし、その神経回路の発達・動作メカニズムを調べるための強力なげっ歯類モデル、例えば視覚野における単眼遮蔽などがなく、分子細胞回路レベルでの調査が遅れている。そこで本研究では、急激な進歩を遂げている光イメージング・光制御法を前頭前野研究に活用し、そのシナプス基盤の解明を進める。スパインの特徴として、その形態と電気生理学的特性が非常に良い相関を示すことが知られており、すなわち形態を観察するだけで、そのシナプス機能を精度良く推測することができる。そこで精神疾患モデルマウスの前頭前野の *in vivo* イメージングを縦断的に行いながら行動解析を併用することで、スパイン形態と行動異常とに如何なる関連があるか模索する。さらにスパイン形態とその機能に強い相関があることを利用し、スパイン形態を人為的に操作する新規の光プローブの作成を試みた。この新規光プローブは、24 時間以内に蛋白合成依存的な頭部増大を呈したスパインに極めて特異的に集積し、さらに青色光照射で同スパイン群だけを収縮させることが可能であることが明らかになった。すなわち新規学習にともない増大したスパインを可視化、さらには収縮操作することができ、実際に新規学習は青色光で消去されることが分かった。本研究は、この Synaptic optogenetics とも表現できる新技法に



よりスパインと行動との因果律に挑戦した。

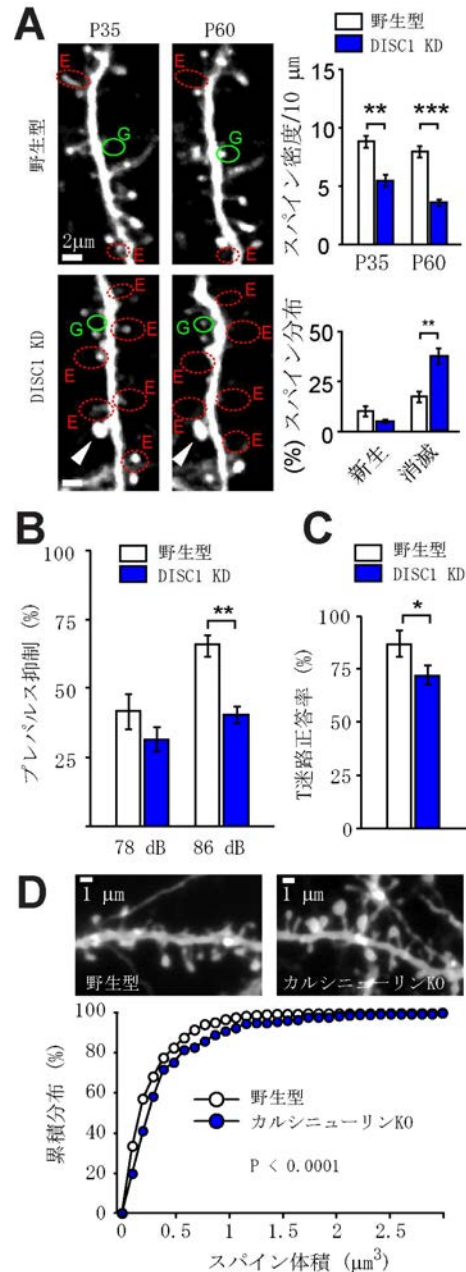
(2) 詳細

**(研究項目1)統合失調症(SZ)モデルマウスのin vivoスパインイメージング**

前頭野スパインと行動との関連や、新規治療薬の効果を測定出来る実験系を確立するために、表面的・構成的・予測的妥当性を満たす有力な疾患モデルの異常行動発症前後の縦断的 in vivo 2光子顕微鏡イメージングと疾患関連行動解析を行った。SZ モデルマウスとして前頭前野特異的な DISC1 ノックダウンモデルや Calcineurin ノックダウンモデルの解析を行い、野生型と有意に異なるスパイン特性(スパイン密度が低下し、その中で際立って巨大なスパインが分布)を見出した。さらに行動解析によりこれらの動物が統合失調症モデルとして矛盾しない行動異常を呈することを見出してきた(図 1、Hayashi-Takagi A, PNAS, In press)。DISC1 と Calcineurin という2つの異なる SZ モデルマウスで、前頭前野での“際立って巨大なスパインの分布”という共通するシナプス特性が見出されたことは興味深く、両マウスともに前頭前野認知機能を反映するワーキングメモリー(作業記憶)の障害が認められた(図 1)。

**(研究項目2)新規光感受性シナプスプローブによる“Synaptic Optogenetics”の創出**

ChR2 など従来の Optogenetics は、神経細胞全体の発火を制御する強力なツールである。しかし、神経細胞では文脈依存的に異なるシナプス群が活性化され、異なる神経回路が賦活されるため、神経細胞全体ではなくシナプスレベルでの制御、即ち Synaptic Optogenetics の開発が有用である。そこで、スパイン形態を強力に制御する Rac1 に注目した。



**図 1：統合失調症モデルマウス (C57BL6) の樹状突起スパインと行動解析**  
 (A) DISC1 ノックダウン (KD) の生後 35 日 (P35) から 60 日の縦断的スパインイメージング。KD マウスでは過剰なシナプス消失が発達期に起こり、際立って大きなスパインが形成される(矢頭)。E: 消失 (elimination) スパイン。G: 新生スパイン (generation)。(B, C) 同マウスは PPI (B)、T 迷路 (C) とともに障害を呈する。(D) カルシニューリン KO においても際立って大きなスパインが多い。

Rac1 に LOV ドメインを融合させた不活化 Rac1 であり、LOV による Rac1 の不活化は光依存的に一過性解除されるため、Rac1 活性を光で時空間的に精密制御できる(図 2A)。われわれは、シナプス後肥厚部(PSD)局在タグを融合した PaRac1 を神経活動依存的プロモーター下に挿入し、さらに神経入力が入った樹状突起領域にこの mRNA が輸送されることを期待し DTE (Dendritic transport element) を付加した PaRac1 を作成した(記憶プローブ)(図 2B)。この記憶プローブは、ごく一部のスパインにのみ発現する(図 2C、左上段、矢頭)。SEP-GluR1 は長期増強の生じたスパインに挿入されるため、SEP-GluR1 と記憶プローブとの分布を

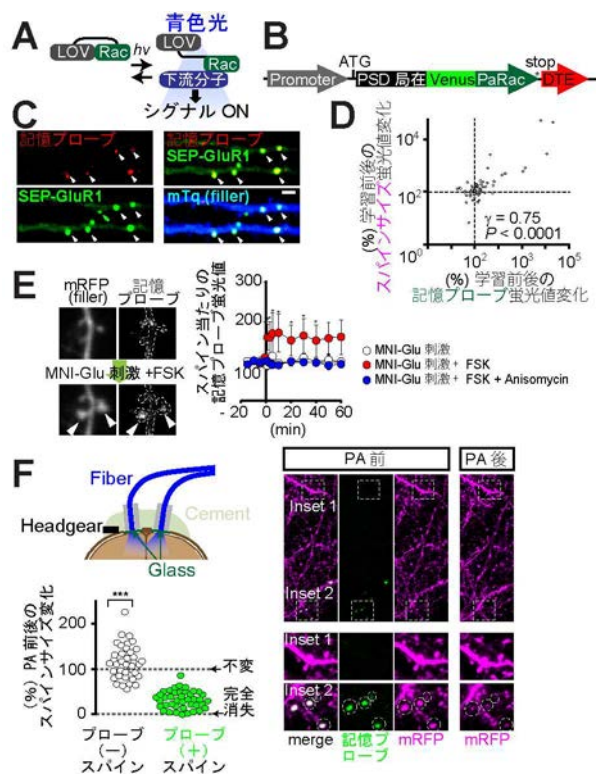


図 2：記憶プローブの特性

比較したところ、両者は有意に共局在した(図 2C)。さらに、AS プローブを発現していないスパインに単一スパイン長期増強刺激を行うと、刺激スパイン特異的に AS プローブが集積し、この AS プローブの集積は蛋白合成依存性であった(図 2E)。in vivo の学習時における AS プローブの集積を確認するために、新規運動学習の前後で同一個体のスパイン体積と AS プローブの蛍光値を比較した。すると学習後にスパイン頭部増大の程度と AS プローブの蛍光値の増加には強い相関があることが明らかになった(図 2D)。これらの知見より AS プローブはあらゆるスパインに均一に分布するのではなく、記憶・学習などにより長期増強が誘導されたスパインを選択的に標識することが示され、即ちこの新規プローブを利用し学習に必要なシナプス可塑性の法則を解析することが可能になる。さらに光刺激の最適化により、AS プローブを発現するスパインだけを特異的に収縮させる技術にも成功し(図 2F)、この操作により通常の運動には影響を与えることなく既得学習だけを消失させることが可能になった(図 3)。これは、記憶・学習に必要とされたスパインを可視化するのみでなく、記憶の本体を操作する synaptic optogenetics を初めて実現したことを意味し、今後の脳科学研究に有効なツールの一つとなると思われる。

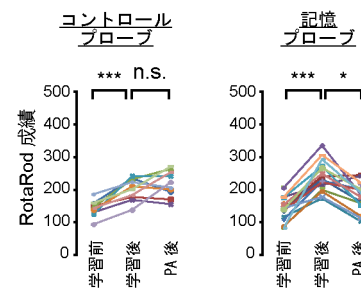


図 3：記憶プローブで標識されたスパインを消失させると、既得学習が消失する。

### 3. 今後の展開

(研究項目1)ワーキングメモリーの障害は、認知機能の中でも特に健常者との差が大きく、転帰

とも関連が大きく、患者の社会機能予後に直結すると言っても過言ではない。ワーキングメモリ一課題実行中には前頭前野のグルタミン酸作動性錐体細胞が同期的発火し、同期発火の程度と課題実行能力には相関があることが知られている。しかしながら、シナプス異常がどのようなメカニズムで神経回路障害や、その結果としての前頭前野機能異常を誘発するのかは未解明な部分が多い。そこで今後は、2光子励起顕微鏡や電気生理学を用いた前頭前野シナプス特性の実験データを基に、SZモデル動物の前頭前野神経回路障害の数理モデルの確立を試みる(上智大学、田中昌司先生との共同研究)。これらのシミュレーションにより、情報処理の基盤となる前頭前野神経回路のダイナミクスや安定性が、SZモデルマウスにおいてどのように野生型マウスと異なるか、どのパラメーターが回路異常への寄与が大きいかを検証する。さらに神経回路における個々のスパインの寄与についても解析を進める。スパインは活動電位の発生にたいして非線形的に大きな効果を有し、とりわけ大きなスパインではこの非線形効果が顕著であることが明らかになりつつある。DISC1とCalcineurinという2つの異なるSZモデルマウスで、前頭前野での“際立って巨大なスパインの分布”という共通するシナプス特性が既にあきらかであるため、このようなモデルマウスにおける樹状突起の非線形性をモデル化し、回路シミュレーションを行う。これにより、実験で予想される発火頻度や発火パターンの変化をどの程度シミュレーションによって説明されるかということを検討し、SZモデルマウス機能不全に寄与する要因が樹状突起の演算機能なのか、レセプターのパラメーターにあるのか、あるいは回路ダイナミクスにあるのかを検証する。

(研究項目2)記憶プローブを改良し、脳の幾つかの領域の学習記憶現象に応用し、各脳領域の学習記憶を可視化定量化し操作する方法を確立する。遺伝子改変動物やアデノ随伴ウイルス(AAV)を利用することで、複数の脳領域に遺伝子導入する。こうして、記憶形成に関係した興奮性回路のできるだけ多くの部分をシナプスレベルで標識するとともに、軸索およびシナプス前終末まで標識する。これを透明化した全脳標本で観察して、各種学習課題について、広い脳領域で調査する。こうして、これまでは主として細胞単位で行われてきた記憶の研究を記憶の単位であるシナプスレベルで調査する。

#### 4. 評価

##### (1)自己評価

(研究項目1)前頭前野特異的DISC1ノックダウンマウスにおける神経発達後期の縦断的スパインとプレパルス抑制試験(PPI)を行い精神病様行動異常の評価を行った。DISC1ノックダウンマウスでは発達期に伴うスパインの減少が過剰に生じていること、そして新規の低分子化合物であるPAK阻害剤が過剰なスパイン減少やPPI低下を予防出来ることを見出した(5.の原著論文番号1: Hayashi-Takagi, PNAS, In press)。統合失調症モデルマウスの縦断的スパインイメージングは世界初の試みであり、また新規の化合物を創薬標的として提唱出来たことは申請目標を達成できたと考ええる。

(研究項目2)新規の光プローブによる新規光刺激法 Synaptic optogenetics の確立を試みた。プローブ作成・最適化に相当な時間を費やしたものの、当初の予想を遥かに超える精度のプローブが作成できたと自負している(特許出願準備中)。未だ論文発表には至っていないものの、本プローブ、もしくはその改良型がシナプス可塑性研究に有用なツールになる可能性

は高いと考えるため、今後、これらを最大限に活用し、シナプスと神経回路、そしてその破綻としての精神疾患研究を推進していきたいと考える。

## (2) 研究総括評価

統合失調症では最近の研究により脳のグルタミン酸作動性シナプス機能の異常が特に注目されている。本研究では生体脳で個々のスパインを可視化・経時観察する技術を、DISC1 ノックダウンや Calcineurin ノックダウンなどの統合失調症モデルマウスの前頭前野に適用してスパインの形態変化の動態を計測し、作業記憶の障害に対応づけることができた。さらに、スパイン形態に強く関わる Rac1 に着目し、その活性を光により精密に時空間制御できるコンストラクトに軸索輸送と後シナプス局在機能を仕組んだ“記憶プローブ”を作出して、実際にこれが長期増強スパインに集積することを示した。これは学習にともなうシナプスレベルの変化を可視化できるもので高く評価できる。さらにこのレポータープローブを改変し、シナプス単位でその形態・機能を操作することにも成功しており、シナプス生理学に新しい境地を開く成果である。今後は、このような技術を駆使して統合失調症の遺伝的要因だけでなく環境要因の解析も展開することができれば、社会的にもきわめて大きいインパクトを与えることになるであろう。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Hayashi-Takagi, A., Araki, Y., Nakamura, M., Vollrath, B., Duron, S., Yan, Z., Kasai, H., Huganir, R. L., Campbell, D. & Sawa, A. PAKs inhibitors ameliorate schizophrenia-associated dendritic spine deterioration in vitro and in vivo during late adolescence.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (In press).
2. Hayashi-Takagi, A. (CA), Vawter, M. P. & Iwamoto, K. Peripheral Biomarkers Revisited: Integrative Profiling of Peripheral Samples for Psychiatric Research.  
*Biol Psychiatry* (2014).
3. Wei, J., (5名略) Hayashi-Takagi, A., (3名略) Yan, Z. Regulation of N-Methyl-D-Aspartate Receptors by Disrupted-in-Schizophrenia-1.  
*Biol Psychiatry* 75, 414-424 (2014).
4. Hayama, T., (3名略) Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G. C., Matsuzaki, M. & Kasai, H. GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca<sup>2+</sup> signaling.  
*Nature Neurosci.* 16, 1409-1416 (2013).
5. Wang, Q., (12名略) Hayashi-Takagi, A., (9名略) Brandon, N. J. The psychiatric disease risk factors DISC1 and TNIK interact to regulate synapse composition and function.  
*Mol Psychiatry* 16, 1006-1023 (2011).
6. Hayashi-Takagi, A., Barker, P. B. & Sawa, A. Readdressing synaptic pruning theory for schizophrenia: Combination of brain imaging and cell biology.  
*Commun Integr Biol* 4, 211-212 (2011).
7. Kato, T., Hayashi-Takagi, A., Toyota, T., Yoshikawa, T. & Iwamoto, K. Gene

expression analysis in lymphoblastoid cells as a potential biomarker of bipolar disorder.

*J Hum Genet* 56, 779-783 (2011).

8. Koga, M., Serritella, A. V., Messmer, M. M., Hayashi-Takagi, A., (9名略) Sedlak, T. W. Glutathione is a physiologic reservoir of neuronal glutamate. *Biochem Biophys Res Commun* 409, 596-602 (2011).

9. Hayashi-Takagi, A. (CA) & Sawa, A. Disturbed synaptic connectivity in schizophrenia: convergence of genetic risk factors during neurodevelopment. *Brain Res Bull* 83, 140-146 (2010).

10. Hayashi-Takagi, A., (17名略) Sawa, A. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nature Neurosci* 13, 327-332 (2010).

11. Seshadri, S., Kamiya, A., Yokota, Y., Prikulis, I., Kano, S., Hayashi-Takagi, A., (7名略) Sawa, A. Disrupted-in-Schizophrenia-1 expression is regulated by beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme-1-neuregulin cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 5622-5627 (2010).

## (2) 特許出願

研究期間累積件数：0件

## (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### 著作物等

1. 河西春郎、(5名略)、林(高木) 朗子、「樹状突起スパイン異常と精神疾患」  
*生体の科学*、65巻(1)、7-11、2014
2. 林(高木) 朗子、「グルタミン酸作動性シナプスと統合失調症」  
*神経化学*、52巻(1)、5-12、2013
3. 林(高木) 朗子、河西春郎、「光遺伝学」  
*分子精神医学*、11巻(4)、41-45、2011

### 主要な学会発表

1. Hayashi-Takagi A. Delineation of the Learning Engram by a Novel Synaptic Optogenetic Tool "Activated Synapse targeting PhotoActivatable Rac1 (AS-PaRac1)". *The sixth international neural microcircuit conference* (2013, July, Okazaki)
2. Hayashi-Takagi A. "AS-PA (Activated Synapse targeting PhotoActivatable) probe: a novel synaptic probe for Synaptic Optogenetics"  
*Neuro2013*, Symposium "Optical control of neuronal function" (2013, July, Kyoto)
3. 林(高木) 朗子、「グルタミン酸シグナルと synaptic protection」、  
**第42回日本神経精神薬理学会**、スタディグループ「精神疾患の治療開発～今、見逃せない新たな取り組み」(2012年10月、宇都宮)
4. 林(高木) 朗子、「Neural DISConnectivity by Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1)」  
**第33回日本生物学的精神医学会**、シンポジウム「統合失調症の病態研究から創薬への展開」、(2011年5月、東京)
5. Hayashi-Takagi A. "Disrupted in synapse by Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1): A dendritic spine as a pathogenesis of schizophrenia".  
*Neuroscience 2010*, Minisymposium "Dendritic Spine Dysfunction in Mental Disorders" (2010, Nov, San Diego)

受賞

第 18 回日本生物学的精神医学会学術賞 (2010 年 10 月 8 日受賞)

# 研究報告書

## 「大脳皮質細胞構築における血管発生制御機構の意義」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究者: 水谷 健一

### 1. 研究のねらい

高度で複雑な思考や行動様式を担う大脳皮質は、発生過程において適切な種類の神経細胞を正しい位置に配置し、極めて規則的な細胞構築を完了することで多様な機能の発現を可能にしている。

近年、大脳皮質細胞構築を制御する分子機構を明らかにするために、神経前駆細胞の時間特性・領域特性を決定付ける分子機構の解析が飛躍的に進歩する一方で、発生過程の大脳皮質に存在する「もう一つの幹細胞、血管内皮前駆細胞」の役割については注目されていない。つまり、発生期の大脳皮質発生過程では、神経発生と呼応して、微小血管が定められた場所に、定められた時期に配置されることから、神経前駆細胞-血管内皮前駆細胞間(あるいは分化した内皮細胞)の相互作用、および血管由来の種々の調節因子(供給される酸素や液性因子等)が重要な意義を持つと考えられる。

本研究提案では、神経発生と血管発生のクロストークの可能性に焦点を当て、大脳皮質を構成する神経細胞の分化制御における血管発生、およびこれによって構築される酸素環境の役割を追求することを目的として、次の3つの研究テーマを中心に研究を展開した。

**研究テーマ1 「発生期大脳皮質における血管リポーターマウスの解析」**

**研究テーマ2 「血管発生によって調節される発生期大脳皮質の酸素環境の解析」**

**研究テーマ3 「PRドメインタンパク質 Prdm8 の解析」**

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究課題では、中枢神経系の血管は、単に成長する神経集団からの酸素や栄養の要求に応答するために受動的に発生するのではなく、時間特性・領域特性を付与された内皮細胞が決まった場所に、決まったタイミングで極めて綿密な分子機構の元にネットワークを構築し、これが様々な神経分化過程の様々な分子機構を制御することで、大脳皮質細胞構築、および回路構築を可能にするとの仮説を元に、研究を展開した。特に、発生過程の大脳皮質実質に形成される“periventricular vessels”のネットワークについては、極めて情報が限られていることから、まず発生期大脳皮質に形成される血管発生を詳細に観察し、これによって見出された分子機構の詳細を追求することで、研究を展開した。

#### (2) 詳細

### 研究テーマ1 「発生期大脳皮質における血管リポーターマウスの解析」

哺乳類大脳皮質の実質に形成される微小血管の発生様式に関する知見が極めて乏しいことに着目し、まず、血管リポーターマウス (Flt1-tdsRed BAC tg) を用いて、いつ、どこに大脳皮質実質の血管が形成されるかについて、前後軸・内外側軸に沿った詳細なマッピングを行った (図1)。その結果、①発生期大脳皮質に形成される血管は、解剖学的・発生学的に”pial vessels”と”periventricular vessels”の2種類に分類されるが、前者は軟膜周囲に一様に形成され、マウスでは胎齢9.0日 (E9.0) 前後に既に発生が完了するが、後者はE10.0前後から徐々に腹側から順次、背側に形成され、グラジエントを持った発生様式が観察され、極めて規則的に前後軸・内外側軸に沿って構築されることが確認された。この際、periventricular vessels は極めて規則的に発生し、中間帯 (intermediate zone; IZ) 近傍にまず血管が侵入し、IZ を起点として脳室側へと expand する結果、脳室下帯 (subventricular zone; SVZ) や脳室帯 (ventricular zone; VZ) に血管が構築される一方で、将来の大脳皮質となる皮質板 (cortical plate; CP) への血管は IZ を起点として CP へ expand する血管に加えて、pial vessels から CP へと expand する血管によって、大脳皮質実質の血管構築が極めて規則的に進行することが明らかとなった。②血管リポーターマウスにおけるDsRedの蛍光を指標として、VZ、SVZ、IZ、CPにおけるperiventricular vesselsの密度、方向性、その特徴を詳細に調べたところ、発生期大脳皮質に形成される血管は極めて秩序だった様式によって発生が進行することが見出された (詳細は省略)。これらの発生期大脳皮質における血管発生に関する基礎的知見は、血管発生が神経組織の構築における特徴に対応して極めて規則的に発生することを示唆している (未発表)。

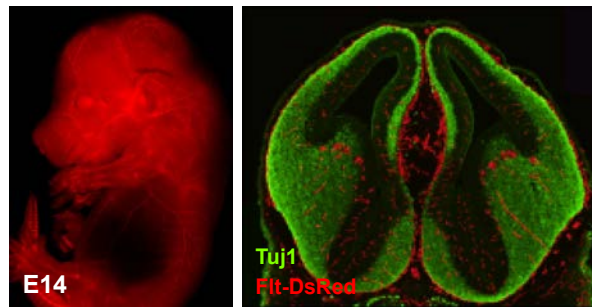


図1 血管リポーターマウスの解析

E14のFlt1-tdsRed BAC tgマウスの蛍光像 (左図) および終脳切片 (右図) の免疫染色画像 (緑色蛍光はTuj1)。腹側から背側へ血管発生が進行し、最初に血管が侵入していく場所はIZ近傍であることが観察される。

### 研究テーマ2 「血管発生によって調節される発生期大脳皮質の酸素環境の解析」

血管からの拡散により、酸素は組織へと供給されるため、発生期大脳皮質における血管発生の密度や方向性についての規則性は、組織内の酸素濃度や代謝環境に密接に影響を及ぼしていると考えた。まず①マイクロ酸素センサーを用いて、発生期終脳における酸素濃度を定量したところ、大脳皮質組織が5%以下の生理的な低酸素環境に置かれていることを見出した (詳細は省略)。②免疫組織学的な手法を用いて、発生期大脳皮質における低酸素領域を調べたところ、VZの近傍とIZの上部が周囲と比較して血管発生が疎であり、低い酸素濃度環境にあることが確認された。③Hes1プロモーターおよびNeurogenin2プロモーター制御下でルシフェラーゼを発現するベクターを初代神経前駆



細胞に遺伝子導入し、生理的な低酸素環境下で細胞を維持したところ、低酸素環境によって Hes1 の転写活性が亢進する一方で、Neurogenin2 の転写活性が抑制されることが確認された。加えて、④低酸素環境に応答して、神経前駆細胞は活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）の産生を促すことが確認され、分化と共に細胞内の ROS 量が変化することが見出された（詳細は省略）。このように、神経組織で構築される血管発生の特徴に依存して、低酸素領域が形成され、この低酸素領域で促される細胞内の ROS 量が分化運命の決定に重要な役割を果たす可能性が示された（未発表）。

### 研究テーマ3 「PRドメインタンパク質 Prdm8 の解析」

血管発生が疎になり、比較的的低酸素に保たれている場として観察された「IZ 上部」で優位に発現する分子の一つとして、PRドメインタンパク質の一種である Prdm8 に着目し、機能解析を行った。①Prdm8 リポーターマウス（Prdm8-mVenus）を作製し、その発現様式を詳細に調べた結果、Prdm8 の発現は IZ 上部で特異的に発現することが確認され、多極性形態の後期および多極性から双極性細胞へと形態変化する時期に優位に発現することが確認された。そこで、②*in utero* エレクトロポレーション法を用いて機能解析を行ったところ、Prdm8 の過剰発現は多極性細胞の維持に働き、ノックダウンによって多極性から双極性への形態変化が促されることが見出された（図2）。また、③Prdm8 を発現抑制した細胞は下層ニューロンへと優先的に分化することが明らかとなり、発生期 IZ における形態変化のタイミングが、大脳皮質の層形成に影響を及ぼしうることが見出された。④Prdm8 が大脳皮質の発生機構に及ぼす影響を直接的に調べるために、Cre-loxP システムを利用して Prdm8-null の遺伝子座を持つ ES 細胞を樹立し、ノックアウトマウスを作製した。その結果、Prdm8 ノックアウトマウスでは同様に多極性から双極性への形態変化の異常が観察された (Inoue et al., *PLoS ONE* 2014)。更には、⑤ChIP-シーケンスによるゲノムワイドな結合能力の評価により、Prdm8 が上層ニューロン特異的に発現する Satb2、Cux1、Unc5d などの遺伝子座と結合しうることが明らかとなった。加えて、⑥Prdm8-mVenus マウスを用いたマイクロアレイ解析によって、ターゲット遺伝子を解析したところ、セマフォリン、ネトリン、エフリンなどのガイダンス分子が Prdm8 によって発現制御されていることが見出された。こ

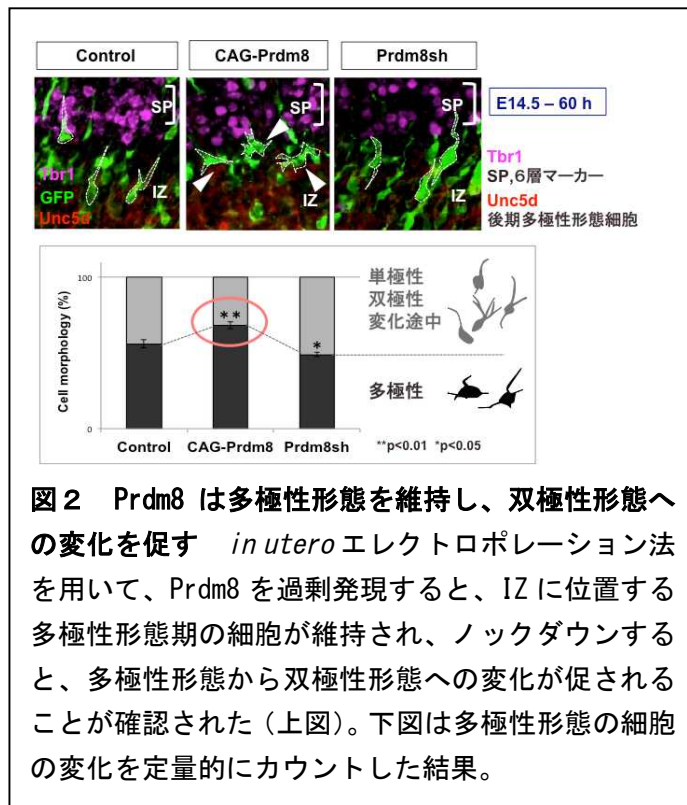


図2 Prdm8 は多極性形態を維持し、双極性形態への変化を促す *in utero* エレクトロポレーション法を用いて、Prdm8 を過剰発現すると、IZ に位置する多極性形態期の細胞が維持され、ノックダウンすると、多極性形態から双極性形態への変化が促されることが確認された（上図）。下図は多極性形態の細胞の変化を定量的にカウントした結果。

て機能解析を行ったところ、Prdm8 の過剰発現は多極性細胞の維持に働き、ノックダウンによって多極性から双極性への形態変化が促されることが見出された（図2）。また、③Prdm8 を発現抑制した細胞は下層ニューロンへと優先的に分化することが明らかとなり、発生期 IZ における形態変化のタイミングが、大脳皮質の層形成に影響を及ぼしうることが見出された。④Prdm8 が大脳皮質の発生機構に及ぼす影響を直接的に調べるために、Cre-loxP システムを利用して Prdm8-null の遺伝子座を持つ ES 細胞を樹立し、ノックアウトマウスを作製した。その結果、Prdm8 ノックアウトマウスでは同様に多極性から双極性への形態変化の異常が観察された (Inoue et al., *PLoS ONE* 2014)。更には、⑤ChIP-シーケンスによるゲノムワイドな結合能力の評価により、Prdm8 が上層ニューロン特異的に発現する Satb2、Cux1、Unc5d などの遺伝子座と結合しうることが明らかとなった。加えて、⑥Prdm8-mVenus マウスを用いたマイクロアレイ解析によって、ターゲット遺伝子を解析したところ、セマフォリン、ネトリン、エフリンなどのガイダンス分子が Prdm8 によって発現制御されていることが見出された。こ

これらのガイダンス分子は、神経系の軸索伸長、形態変化、細胞移動と密接に関与する一方で、血管系の発生にも密接に関与することが報告されている(Melani and Weinstein, *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010)。実際、⑦Prdm8 ノックアウトマウスの血管発生を観察したところ、顕著な発生異常が観察されたことから(未発表)、発生期大脳皮質における神経系と血管系の相互依存的な関連性が、大脳皮質の細胞構築に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

### 3. 今後の展開

大脳皮質における血管発生の規則性と、これによって構築される低酸素領域および ROS の役割の一端が本研究によって明らかとなった。今後、血管発生における規則性が、如何なる分子機序を介して構築され、これが如何なる生理的な意義を果たすのかについて、更に追求していきたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

大脳皮質を構成するニューロンは、発生過程の脳室帯に存在する神経前駆細胞によって生み出され、生み出された細胞集団の多くは中間帯で一過的に多極性形態を獲得し、その後双極性形態へと再び形態変化して脳表面に向かって移動した後、皮質板の内部で最終分化を遂げる。このように、必要な数のニューロンが生み出された後、それらの細胞が正しい分化・移動過程を経て、機能を発揮すべき最終目的地に到達することは、正常な脳の構築・機能発現において最も基盤となる細胞挙動と考えられている。実際、中間帯における多極性形態細胞の分化過程の異常が、様々な神経変性疾患の発症と深くかかわることが明らかとなり、大脳皮質の細胞構築における中間帯の役割が注目されている。本研究によって、多極性形態期を制御する分子機序の一端が明らかとなり、これが血管発生の特徴やこれによって形成される酸素環境によって調節されている可能性が示され、今後さらに神経系と血管系の発生を取り次ぐ分子機序の詳細が解明されることが期待される。

#### (2) 研究総括評価

発生初期の神経組織における血管内皮(前駆)細胞と神経細胞の分化・移動との関係は重要であるが研究が進んでいない分野である。本研究では発生期のマウス大脳皮質を材料とし局所の酸素環境に着目して解析を進めたものである。大脳皮質組織への血管の侵入を血管レポーターマウスを用いて詳細に調べたところ、その中間層が血管網形成の一つの要となっていることを見出したことは興味深い。さらにマイクロ酸素センサーや免疫組織学的方法による解析を経て、中間層の上部が比較的低酸素環境にあると考え、また神経前駆細胞における活性酸素種(ROS)が鍵を握っていると想定しているが、そこから神経細胞の移動等神経回路構築への関係については今後の解析が待たれる。一方、発生期の大脳皮質中間層の神経細胞で発現する転写因子 Prdm8 が遊走途上の神経細胞の形態を制御していることを明らかにした研究は論文発表した。今後、血管からのシグナルは酸素濃度だけで説明できるかなどを含めて血管系が神経発生に果たす役割がより明確になることが期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Mayuko Inoue, Takao Kuroda, Aya Honda, Mariko Suzuki-Komabayashi, Tae Komai, Yoichi Shinkai, and Ken-ichi Mizutani. Prdm8 regulates the morphological transition at multipolar phase during neocortical development. PLoS ONE. 2014, 9, e86356.

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- [1] 井上 真悠子、黒田 貴雄、加藤 雅紀、眞貝 洋一、水谷 健一「神経特異的 PR ドメインタンパク質 Prdm8 は大脳皮質神経発生を調節する」、日本神経科学会、2013 年 6 月 20 日、京都
- [2] 井上 真悠子、黒田 貴雄、加藤 雅紀、駒井 妙、眞貝 洋一、水谷 健一「Prdm8 は発生期大脳皮質において多極性形態期を調節する」、日本分子生物学会、2013 年 12 月 4 日、神戸
- [3] Mayuko Inoue, Yoichi Shinkai, Ken-ichi Mizutani「Role of PR domain protein Prdm8 in neocortical development」、Neuroscience 2013、2013 年 11 月 13 日、アメリカ サンディエゴ
- [4] Ken-ichi Mizutani, Mayuko Inoue, Yoichi Shinkai「Prdm16 contributes critically to the fate of neural progenitors by regulating the multipolar phase」、Neuroscience 2013、2013 年 11 月 13 日、アメリカ サンディエゴ