

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14889

研究課題名(和文)モザイク解析が可能な新規マウスの開発

研究課題名(英文)Morphological analyses in sparse labeled neurons

研究代表者

香取 将太 (Katori, Shota)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・特任研究員

研究者番号：50562394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：セロトニン神経は摂食行動、攻撃性、情動、学習記憶など多様な脳機能に關与する神経である。セロトニン神経は脳幹の正中領域から脳全体に軸索を投射し、脳の各領域でセロトニンを放出する。セロトニン神経の軸索密度は局所的には均一であるが、どのようにして軸索密度を均一にしているのかは不明であった。本研究では、14種からなるプロトカドヘリン(Pcdh)という同種間で特異的な接着活性を示す膜貫通タンパク質群に着目した。Pcdhの種類を削減したマウスを作製し、単一軸索レベルの解析を行うことで、Pcdhファミリーの1種(C2)がセロトニン神経の軸索同士が過剰に密集するのを防いでいることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Serotonergic system is involved in many brain functions (circadian rhythm, aggression, feeding behavior, sexual behavior, and so on). Serotonergic neurons project their axons to a whole brain. Although the density of serotonergic axons is locally uniform, how the axonal density is regulated is almost unknown. In the present study, we focused on the protocadherin-alpha (Pcdha) family, which consist of 14 transmembrane proteins and homophilically interact with each other. Here, we generated Pcdha mutant mice, in which members of Pcdha family were reduced, and analyzed them. We found that PcdhaC2, a member of Pcdha family, is essential for normal serotonergic-axon density.

研究分野：神経生物学

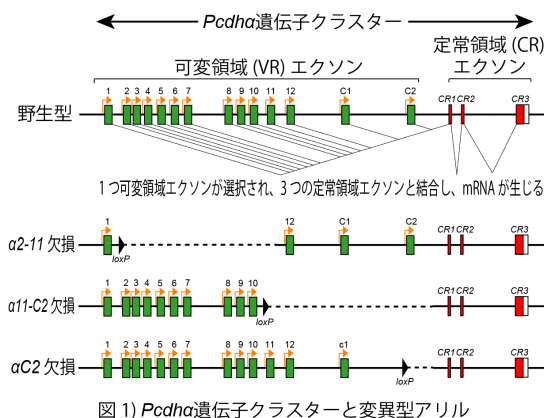
キーワード：神経回路形成 遺伝子改変マウス セロトニン神経

### 1. 研究開始当初の背景

セロトニン神経は、多様な脳機能（摂食行動、攻撃性、睡眠、情動、性行動、学習記憶など）に関与する重要な神経である。セロトニン神経は脳幹の正中領域に細胞体があり、そこから脳と脊髄全体に軸索を投射する。セロトニン神経の軸索は、投射の最終標的領域では分岐し、局所的には均一な密度で分布している。しかし、どのようなメカニズムでセロトニン神経の軸索密度が制御されているのかは不明であった。

本研究では、14種類の膜貫通タンパク質をコードするマウスのプロトカドヘリン (*Pcdha*) 遺伝子群に着目した。この遺伝子は、ゲノム上で直列に14種類の遺伝子が配置されて遺伝子クラスターを形成する(図1)。個々の神経細胞(小脳プルキンエ細胞など)では一部の *Pcdha* 遺伝子のみが確率的に選択されて発現している。*Pcdha* 遺伝子クラスターの下流には、*Pcdhβ* 遺伝子クラスター(22種類)、*Pcdhγ* 遺伝子クラスター(22種類)が位置し、これらも各遺伝子クラスターから一部の遺伝子のみが選択的に発現している。これらのプロトカドヘリンは、まとめてクラスター型プロトカドヘリン(cPcdh)と呼ばれ、その特殊な発現様式から任意の2つの神経細胞で同じ組み合わせのcPcdhを発現する可能性は極めて低い。また、各cPcdhタンパク質は*in vitro*で同種特異的な接着活性を示す。このような特殊な性質を持つcPcdhは神経回路形成において特殊な役割を持つと考えられ、注目されてきた。

これまでに代表者は、*Pcdha* 遺伝子の強い発現が見られる脳領域の一つがセロトニン神経であり、*Pcdha* 全遺伝子欠損マウスはセロトニン神経軸索の分布異常(過密と過疎)が海馬など様々な脳領域で見られることを報告していた(Katori et al., 2009 *J Neurosci*)。この報告により、*Pcdha* がセロトニン神経の軸索の分布の制御に関与することが明らかになったが、*Pcdha* 遺伝子の多様性意義の解析や単一軸索レベルの解析は行われていなかった。



### 2. 研究の目的

セロトニン神経の単一軸索レベルでの解析と *Pcdha* 遺伝子の多様性の意義を明らかにする解析により、セロトニン神経における *Pcdha* の役割をより詳細に明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

セロトニン神経軸索全体を可視化するためにセロトニントランスポーターに対する抗体を用いて免疫染色を行なった。セロトニン神経軸索の軸索密度の定量的解析は主に海馬で行なった。

*Pcdha* 遺伝子群は上流から *Pcdha1*, *a2*, *a3...a12*, *aC1*, *aC2* と名前がつけられている。*a2* から *a11* の10種類を欠損した *a2-11* 欠損アリル、*a11* から *aC2* の4種を欠損した *a11-C2* 欠損アリルを持つマウス(Noguchi et al., 2007 *J Biol Chem*)を作製し(図1)、海馬でセロトニン神経軸索の分布を定量的に解析した。さらに、*aC2* のみを欠損させた *aC2* 欠損マウスを作製し、解析に使用した(図1)。

セロトニン神経特異的に Cre 組換え酵素を発現する *Pet-Cre* 系統あるいは終脳特異的に Cre を発現する *Emx1-Cre* 系統を利用して、セロトニン神経特異的 *aC2* 欠損マウス及び終脳特異的 *Pcdha* 欠損マウスを作製し、海馬でセロトニン神経軸索の分布を定量的に解析した。

セロトニン神経軸索を単一軸索レベルで解析するために、セロトニン神経特異的に Cre 組換え酵素を発現する *Pet-Cre* マウスのセロトニン神経(縫線核)に、Cre 依存的に赤色蛍光タンパク質 RFP を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)を感染させた。海馬に投射する RFP 陽性セロトニン神経軸索をトレースし、軸索の走行や分岐、軸索終末の頻度を解析した。本研究では少数の神経細胞を遺伝的に標識したマウス(モザイク解析が可能なマウス)を作製し、それを利用してセロトニン神経における *Pcdha* の役割を解析する予定であったが、本報告ではそれとは異なる方法で解析を行った。

### 4. 研究成果

セロトニン神経における *Pcdha* 遺伝子群の多様性の意義を明らかにするために *a2-11* 欠損マウス及び *a11-C2* 欠損マウスにおいて、海馬に投射するセロトニン神経軸索を定量的に解析した。*a11-C2* 欠損マウスは *Pcdha* 全遺伝子欠損マウスと同様な軸索分布の異常が見られた(網状分子層で過密化、多形層層と歯状回で過疎化、図2)。一方、*a2-11* 欠損マウスでは異常が見られなかった(図2)。この結果は、*Pcdha* の14遺伝子全てが必要というわけではないこと意味し、さらに、*a11-C2* 欠損マウスで欠損した *a11*, *a12*, *aC1*, *aC2* の4遺伝子の中に正常なセロトニン神経投射に必須の遺伝子が含まれていることを意味し

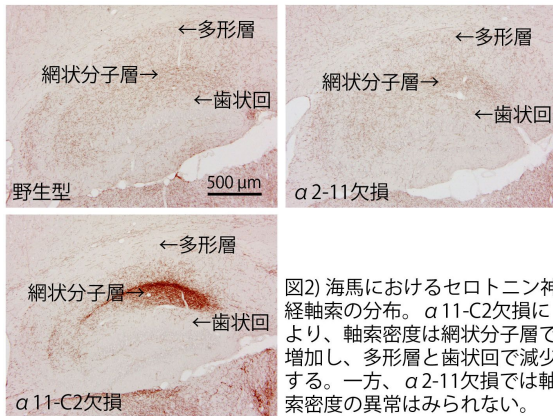


図2) 海馬におけるセロトニン神経軸索の分布。α11-C2欠損により、軸索密度は網状分子層で増加し、多形層と歯状回で減少する。一方、α2-11欠損では軸索密度の異常はみられない。

ている。そこで、セロトニン神経におけるこの4遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションによって解析したところ、αC2の強いシグナルとαC1の弱いシグナルを検出した。一方、α11とα12の明瞭なシグナルは検出できなかった。そこでαC2を欠損させたマウスを作製した。αC2欠損マウスのセロトニン神経の軸索分布を解析したところ、Pcdha全遺伝子欠損マウスと似た異常を示した。つまり、αC2遺伝子がセロトニン神経の正常な軸索分布に必要であることが明らかになった。

次にセロトニン神経におけるαC2の発現がセロトニン神経軸索の正常な投射に必須であるのかを明らかにするために、セロトニン神経特異的αC2欠損マウスを作製した。このマウスはセロトニン神経軸索の分布異常を示した。一方、Pcdha遺伝子はセロトニン神経だけでなく投射先にも発現することから、投射先のPcdhaもセロトニン神経軸索の投射に関与している可能性が考えられた。そこで、海馬を含む終脳特異的Pcdha全遺伝子欠損マウスを作製し、海馬で解析を行ったところ、セロトニン神経軸索の分布異常は検出できなかった。これらの結果は、投射先のPcdhaではなく、セロトニン神経自身が発現するαC2がセロトニン神経の正常な軸索分布に必須であることを示している。

次にセロトニン神経軸索を単一軸索レベルで解析するためにAAVを用いて、一部のセロトニン神経のみを蛍光タンパク質RFPで標識した。海馬の網状分子層と放線層の境界にあるセロトニン神経軸索を解析したところ、この境界を通過するセロトニン神経軸索がαC2欠損マウスで有意に減少していることが明らかになった。また、αC2欠損マウスにおける軸索分岐の頻度や軸索の終末が出現する頻度には有意な差が見られなかった。以上の結果から、αC2はセロトニン神経軸索の過密化を抑制し、軸索間距離を広げるために必要であることが明らかになった。αC2の細胞外領域は *in vitro* 解析において同種特異的な接着活性を持つ。この特性から、αC2はセロトニン神経の軸索同士が接触すると活性化し、軸索の伸長を抑制することで、軸索の局所的な過密化を抑制していると考えられる。

cPcdhの役割は、その確率的な発現様式を利用して神経細胞の樹状突起が自己と非自

己を区別し、狭い範囲で自己の樹状突起同士が接触することを防ぐことであるという報告が近年なされている。一方、cPcdhには特殊な発現様式を利用しない場合があり、セロトニン神経軸索という集団間の接触を広い範囲で抑制する役割があることを本研究で明らかにした(Katori et al., 2017 *Sci Rep*)。

セロトニン神経はある神経細胞集団に均等にセロトニンを放出することで、それらの細胞の発火をバランスよく制御していると考えられる。これまでに、Pcdha欠損マウスでは自傷行為(原因はおそらく過剰なグルーミング)が見られることを報告している(Katori et al., 2009 *J Neurosci*)。このような異常行動が、セロトニンの分布異常によって神経疾患を引き起こされる可能性は十分考えられる。今後、本研究で得られた知見が新たな側面からヒトの精神疾患の理解に繋がることが期待される。

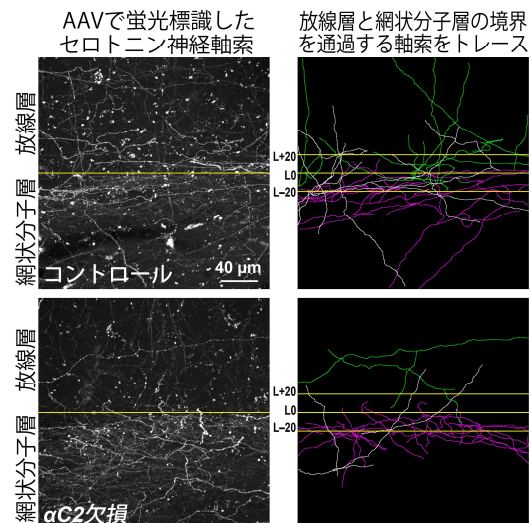


図3) αC2によるセロトニン神経軸索の分散の促進

網状分子層のライン(L-20)を通過する軸索をピンク色の線、放線層のライン(L+20)を通過する軸索を緑色の線、両方のラインを通過する軸索を白線で示した。αC2欠損マウスでは網状分子層と放線層の境界を超えて広がる軸索がコントロールに比べて減少していた。

#### < 引用文献 >

- 1) Katori S, Hamada S, Noguchi Y, Fukuda E, Yamamoto T, Yamamoto H, Hasegawa S, Yagi T. Protocadherin-alpha family is required for serotonergic projections to appropriately innervate target brain areas. *J Neurosci*. 2009, 29(29):9137-47
- 2) Noguchi Y, Hirabayashi T, Katori S, Kawamura Y, Sanbo M, Hirabayashi M, Kiyonari H, Nakao K, Uchimura A, Yagi T. Total expression and dual gene-regulatory mechanisms maintained in deletions and duplications of the Pcdha cluster. *J Biol Chem*. 2009, 284(46):32002-14

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) 香取将太, 岩里琢治, 「神経回路形成における RacGAP $\alpha$  キメリンの役割」 *CLINICAL NEUROSCIENCE*, 2018, 36(4): 501-503. 査読無
- 2) Katori S, Noguchi-Katori Y, Okayama A, Kawamura Y, Luo W, Sakimura K, Hirabayashi T, Iwasato T, Yagi T. Protocadherin- $\alpha$ C2 is required for diffuse projections of serotonergic axons. *Scientific Reports*. 2017, 7(1): 15908. 査読有 DOI: 10.1038/s41598-017-16120-y
- 3) Katori S, Noguchi-Katori Y, Itohara S, Iwasato T. Spinal RacGAP  $\alpha$ -chimaerin is required to establish the midline barrier for proper corticospinal axon guidance. *The Journal of Neuroscience*. 2017, 37(32): 7682-7699. 査読有 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3123-16.2017

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) Katori S, Noguchi-Katori Y, Itohara S, Iwasato T. Midline barrier for axon guidance is protected by EphA4- $\alpha$ -chimaerin signaling in the spinal cord. 日本神経科学大会及び若手研究者国際交流会 (2017).
- 2) Katori S, Itohara S, Iwasato T. RacGAP  $\alpha$ -chimaerin is required to establish spinal midline barrier for proper corticospinal projection. Society for Neuroscience (2016).
- 3) 香取将太, 岩里琢治, 「左右の神経回路の混線を防ぐ『正中線バリア』の形成メカニズム」 「認識と形成」研究会 (2016).
- 4) Katori S, Itohara S, Iwasato T. RacGAP  $\alpha$ -chimaerin is required to establish spinal midline barrier for proper corticospinal projection. Circuit Construction in the Mammalian Brain (2016).
- 5) Katori S. How is the midline barrier regulating midline axon guidance formed? KOKORO-Biology symposium (2016).
- 6) Katori S, Itohara S, Iwasato T. Spinal RacGAP  $\alpha$ -chimaerin is required to establish midline barrier for proper corticospinal projection. 日本神経科学大会 (2016).
- 7) Katori S, Itohara S, Iwasato T. Spinal RacGAP  $\alpha$ -chimaerin is required to establish midline barrier for proper corticospinal projection. 神経発生討論会 (2016).
- 8) 香取将太, 岩里琢治, 「哺乳類中枢神経系における神経回路形成の遺伝学的解析～神経回路形成における RacGAP $\alpha$  キメリンの新たな役割～」 脳研究所共同利用共同研究合同セミナー (2016).
- 9) Katori S, Itohara S, Iwasato T. Spinal cord

RacGAP  $\alpha$ -chimaerin is critical to maintain midline barrier for proper axon guidance. 包括脳ネットワーク冬のシンポジウム (2015).

- 10) Katori S, Itohara S, Iwasato T. Cell autonomous and non-autonomous functions of RacGAP  $\alpha$ -chimaerin in axon guidance at the midline choice point. Society for Neuroscience (2015).
- 11) Katori S, Itohara S, Iwasato T. Cell autonomous and non-autonomous functions of RacGAP  $\alpha$ -chimaerin in midline axonal guidance. 日本神経科学大会 (2015).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

1) 「左右の神経の混線を防ぐ“正中線の関所”を守る仕組み」

[https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2017/07/research-highlights\\_ja/20170726.html](https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2017/07/research-highlights_ja/20170726.html)

2) 「脳全体にセロトニン神経軸索を分散させるしくみ」

[https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2017/12/research-highlights\\_ja/20171124.html](https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2017/12/research-highlights_ja/20171124.html)

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

香取 将太 (KATORI, Shota)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・特任研究員

研究者番号：50562394