

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18680028

研究課題名（和文） 交連ニューロンのサブタイプ特異的な軸索ガイダンスの分子機構

研究課題名（英文） Molecular Mechanisms for Subtype-Specific Commissural Axon Guidance

研究代表者

白崎 竜一（SHIRASAKI RYUICHI）

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：40423149

研究成果の概要：本研究では、交連ニューロンのサブタイプ特異的な軸索ガイダンスを制御している分子機構の解明を目指している。今回の研究成果として我々は、交連ニューロンのサブタイプレベルでの研究を推進する上で戦略的に中核となるマウスの *in vivo* での遺伝子導入技術確立させ、交連ニューロンのサブタイプ特異的な軸索ガイダンスを担っている可能性がある転写調節因子を複数見出した。さらに、これらの転写調節因子がサブタイプ特異的な軸索ガイダンスを制御しているかどうかを今回確立した実験システムにより検討した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2007 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	20,600,000	6,180,000	26,780,000

研究分野：発生神経生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経回路網形成、軸索ガイダンス、運命決定、転写調節因子、交連ニューロン、フロアプレート、電気穿孔法

1. 研究開始当初の背景

神経系には多種多様な神経細胞が存在し、これらが特異的かつ多様なネットワークを確実に形成することで生物の基本的な行動様式から高次機能までを支えている。そのためこの精巧な神経回路網を生み出す分子機構の解明は、現代の生物学の重要な研究課題の一つとして位置づけられている。過去の研究から、この神経回路網の基盤は発生期において、個々の神経細胞の個性の決定とそれに続く一連の特異的な軸索伸長過程が相互

に関連しながら進行することで形成されることが示されてきた。すなわち、神経細胞が分化していく段階で、その神経細胞固有の遺伝プログラムが付与され個性（運命）が決定されると、その神経細胞はその固有の遺伝プログラムに基づき細胞自律的な挙動を示めようになり、その結果として最終標的への特異的な軸索伸長が達成されるようになる。最近の研究により、神経細胞の個性決定は特定の転写調節因子群の特異的な発現によって制御されていることが明らかとなり、こ

これらの特定の転写調節因子群が、特異的な軸索伸長路選択に関わる軸索ガイダンス分子のレセプターの発現を最終的には促すと考えられている (Shirasaki & Pfaff, *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 251-281, 2002)。特に、神経系での記憶や学習を成り立たせる細胞生物学的な基盤は、その生物がいかに多様な神経回路網を発達させているかによっており、またこの回路網の多様性はそれぞれの神経細胞のサブタイプ (サブクラス) に固有の軸索伸長過程の最終結果として形成されている。

一方で近年、数多くの軸索ガイダンス分子やそれらのレセプターが報告されてきているが、特定の神経細胞群全体に作用する分子の同定にしか至っておらず、神経細胞のサブタイプに特異的な軸索ガイダンスプログラムの理解に関しては、そのほとんどが端緒についたばかりであり (Shirasaki et al., *Neuron* 50, 841-853, 2006)、その多くが未だ推測の域を出ない。特に、神経管の背側に位置し中枢神経系全般に存在する主要な神経細胞群として知られ、左右の感覚情報を統合するのに重要な役割を担っている交連ニューロン (正中交差性ニューロン) の回路網の多様性を生み出すサブタイプ特異的な軸索ガイダンスの分子機構解明に至っては、そのほとんどが手つかずのままの状態である。

2. 研究の目的

本研究課題では、神経回路網の多様性形成の分子基盤の理解に迫るために、哺乳類 (マウス) 神経管の腹側正中中部フロアプレートで正中交差を形成する交連ニューロンの系に着目し、そのサブタイプ特異的な軸索ガイダンスプログラムの理解を、交連ニューロンのサブタイプレベルでの個性決定を担っている特異的な転写調節因子のカスケードから迫ることで、サブタイプ固有の軸索伸長パターン発現に至る分子メカニズムの糸口をつかむことを目指している。特に、交連ニューロンのサブタイプが生み出す回路網の多様性は、軸索が正中中部を交差した後でみられ、さらにその多様性が脊髄より吻側の後脳 (小脳レベルを含む) や中脳で顕著であることから、本研究では以下の項目に焦点を絞る。

(1) 後脳および中脳における正中中部フロアプレートを越えて伸長した後の交連ニューロン軸索のサブタイプに固有の軸索伸長パターンを網羅的、かつ体系的に把握して、個々のサブタイプに固有の軸索投射の表現型を明確にする。

(2) 交連ニューロンのサブタイプに特異的に発現している可能性のある転写調節因子の詳細な時空間発現パターンを解析し、交連ニューロンのサブタイプ固有の軸索ガイダ

ンスを制御している転写調節因子の候補を見出す。

(3) サブタイプ特異的な発現が確認された転写調節因子の役割をサブタイプ特異的な軸索ガイダンスプログラムのスイッチを入れる上流の制御分子という観点からその機能を検討する。特に、交連ニューロンの正中交差後にみられるサブタイプ特異的な軸索伸長パターン発現における役割について解析する。

3. 研究の方法

我々の今までのラット胎仔を用いた研究から、中脳ならびに後脳における交連ニューロンの腹側正中中部フロアプレートへの軸索伸長時期は調べられているので、それをベースに今回マウス胎仔において、正中中部通過後の軸索の挙動をまず脂溶性の蛍光色素トレーサーとして知られる DiI を用いて可視化し、サブタイプ固有の軸索投射パターンの基礎データを得た。また同時に、交連ニューロンのサブタイプ特異的な軸索投射パターンの詳細を解析するために、マウス胎仔への *in vivo* の電気穿孔法 (エレクトロポレーション法) により蛍光レポータータンパク質 (ZsGreen) の発現ベクターを、神経管背側の主要な交連ニューロンが発生する胎生 10.5 ~ 11.5 日目にマウスの脊髄、後脳、中脳の背側部に導入した。マウス胎仔を 2 日間、親マウスの子宮内で生存させた後に取り出し、神経管の 2 次元展開標本 (Shirasaki et al., *Neuron* 14, 961-972, 1995) を作成し、4% パラホルムアルデヒドで固定した。正中交差後の交連ニューロンの軸索伸長パターンは 2 次元展開標本に対して共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Olympus FluoView) を用いて解析した。また交連ニューロンのサブタイプレベルでの個性決定を担う可能性がある転写調節因子の時空間的な発現パターンは、マウス神経管の 2 次元展開標本に対してそれぞれの転写調節因子の特異的な抗体を用いた whole-mount 免疫組織化学染色法を適用することで解析した。さらに交連ニューロンの軸索伸長過程における候補転写調節因子の役割を明らかにするために、候補分子を本来発現しない交連ニューロンのサブタイプに電気穿孔法により異所的に導入した。ここでは候補転写調節因子の遺伝子をバイシストロン性の IRES-ZsGreen ベクターに組み込むことで、候補転写調節因子と蛍光レポーター蛋白質を確実に共発現させるシステムとした。候補転写調節因子と蛍光レポータータンパク質を共発現している交連ニューロンの正中中部交差後の軸索挙動は、2 次元展開標本作成後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 主要な研究成果

交連ニューロンのサブタイプに固有な軸索伸長パターンは、軸索が正中部フロアプレートを交差した後で明瞭となる。特に交連ニューロンのサブタイプの多様化は脊髄より吻側で顕著であることから、後脳および中脳における交連ニューロンの正中部フロアプレートを越えて伸長した後の交連ニューロン軸索の伸長パターンを網羅的かつ体系的に把握し、個々のサブタイプに特有の軸索投射の表現型を詳細に解析した。さらに今回、*in vivo* の電気穿孔法に関連した様々な実験上のパラメーターを詳細に検討することで脊髄、後脳、中脳のほとんどすべての交連ニューロンの軸索挙動の詳細な解析を可能とさせる *in vivo* 電気穿孔法の実験システムの確立に成功し、今までの実験技術では解析が困難であった様々な交連ニューロンのサブタイプレベルでの詳細な軸索伸長の挙動ならびに投射パターンの全貌を明らかにした。また、交連ニューロン軸索の正中部交差後の次の2つの経路選択が交連ニューロンの軸索伸長パターンの多様性を生み出していることがわかった。すなわち、①正中部フロアプレートを通過した後のどの地点で方向転換するのか、②方向転換後の前後軸に沿った軸索伸長では吻側（前側）に伸長するのかまたは尾側（後側）かの選択である。

次に、交連ニューロンのサブタイプの運命（個性）決定に関わっている可能性のある候補転写調節因子群の時空間的な発現パターンを、それぞれの交連ニューロンサブタイプの軸索伸長が開始される直前ならびに実際に進行している時期で詳細に解析し、それらの転写調節因子の発現と交連ニューロンサブタイプの細胞体の位置との相関を調べた。また候補転写調節因子は遺伝子情報などが既にデータベースとして公開されている既知分子の中から探索した。その結果、従来から知られていた転写調節因子の中に交連ニューロンのサブタイプ別の分類を可能とさせるような発現パターンを示す分子が実際に複数見出された。また、転写調節因子による運命決定過程では同時に発現している複数の転写調節因子の組み合わせが個性の多様化に貢献していることから、複数の候補分子の組み合わせ発現をも考慮した結果、組み合わせ遺伝子発現（遺伝子コード）としてサブタイプを規定できるような分子群も存在していることが明らかとなった。

そこでまず候補転写調節因子として見出された分子の一つである *Otx2* に着目し、*Otx2* が交連ニューロンのサブタイプレベルでの個性決定、すなわち正中部交差後のサブタイプ固有の軸索投射パターン形成に関わっ

ているかどうかを検討した。そのために本来 *Otx2* を発現しない交連ニューロンのサブタイプに *Otx2* 遺伝子 (*Otx2*-IRES-ZsGreen) 発現ベクターを *in vivo* 電気穿孔法により遺伝子導入し、サブタイプ特異的な軸索伸長パターンが形成されるかどうかを調べた。その結果、異所的に発現された *Otx2* の単独の作用では、サブタイプ特異的な軸索伸長パターンが引き起こされないことが示唆された。現在さらに、複数の候補分子の組み合わせ発現をも考慮した遺伝子導入実験を行い、今回見出した候補転写調節因子が交連ニューロンのサブタイプ特異的な軸索ガイダンスプログラムをトリガーする役割を担っているかどうかを検討している。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究課題では、神経回路網の多様性形成の分子基盤の理解というテーマを、神経細胞のサブタイプレベルでの個性決定プログラムとそれによって制御されている軸索ガイダンスという観点から捉えているが、国内外を問わず、近年極めて関心度が高く注目を集めている研究テーマの一つである。しかしながら、神経回路網の多様化が顕著な高等動物の脳においては脊髄レベル以上に、技術的な難易度と多くの実験生物学的な経験に根ざした知識と技量が必要になることから、その進展は遅々としているのが現状であった。実際、本研究課題の中心テーマである神経細胞のサブタイプに固有の軸索ガイダンスプログラムの理解一つを挙げても、未だそのほとんどが端緒についたばかりである。したがって、この分野の研究を大きく推進させるためには、研究のモデルとなる神経細胞クラス（タイプ）のサブタイプレベルにおいて、発生分化時の神経解剖学的ならびに遺伝学的な基礎データの網羅的な理解（データベースの構築）が不可欠であった。国内外をみても神経細胞のサブタイプレベルでの様々な個性のデータベースが体系的に構築されている例は少なかった。このことが本分野の理解の大きな進展を妨げてきた要因の一つとも言え、それを打開する方策の一つとしては革新的な実験技術の導入が挙げられる。本研究課題では、マウス胎仔中枢神経系への遺伝子導入技術の改良をはかることで、体系的かつ効果的にほとんどすべての交連ニューロンのサブタイプへの遺伝子導入が可能となる *in vivo* 電気穿孔法を確立させた。このことにより、従来からの技術では成し得なかった交連ニューロンのサブタイプレベルでのデータベース構築が可能となり、一つの神経細胞のタイプに着目した際の神経回路網形成の全貌をサブタイプレベルから明らかにすることに成功した。またこの実験技術の確立とそ

の導入により、神経細胞のサブタイプ固有の軸索ガイダンスプログラムを制御する決定因子（中核の転写調節因子）の制御過程を体系的に解析することもあわせて可能となった。以上により今後、この分野の理解を大きく推進させる実験系の基盤が本研究により構築されたと言える。

（3）今後の展望

現段階では候補転写調節因子の異所的な発現による gain of function によりその機能解析を進めているが、今後 shRNA ベクターなどを用いた RNAi によるノックダウン (loss of function) によっても候補遺伝子の機能を評価していくことが必要である。このような実験デザインの場合では、本来の候補遺伝子を発現するサブタイプ自身に shRNA ベクターを電気穿孔法により導入して、その後の交連ニューロンの正中部を越えてからのサブタイプ固有の軸索伸長パターン形成が阻害されるかに着目して、その候補遺伝子のサブタイプ特異的な軸索ガイダンスプログラム発現への役割を調べることが中心となる。また、本研究課題の中心テーマは交連ニューロンのサブタイプ特異的な軸索投射パターン形成が焦点であるが、この研究課題を格段に推進させるためには、ある特定のタイプの神経細胞分化を随時モニターできるような実験システムがより有用である。例えば、今回我々が着目している交連ニューロンの一つは、神経管背側の DI1 タイプニューロンと定義されているが、DI1 交連ニューロンを特異的にラベルするにあたり、DI1 交連ニューロンの前駆細胞に特異的に発現がみられる bHLH 型転写調節因子 Math1 に着目し、この分子の特異的な時空間発現を制御している非翻訳領域のエンハンサー配列を、遺伝子導入時に用いる発現ベクターに組み込み、蛍光レポータータンパク質の発現を Math1 エンハンサーで制御されるように設計された発現ベクターを利用することが考えられる。今後、このような特異的なエンハンサー配列を利用した次世代の実験システムが交連ニューロンのサブタイプ特異的な軸索ガイダンスプログラムの分子機構の解明に大きく貢献していくことが見込まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Shirasaki, R., Lewcock, J. W., Lettieri, K., & Pfaff, S. L. FGF as a target-derived chemoattractant for developing motor

axons genetically programmed by the LIM code. **Neuron** 50, 841-853 (2006). 査読(有)

② Song, M.R., Shirasaki, R., Cai, C.L., Ruiz, E. C., Evans, S. M., Lee, S.K., & Pfaff, S. L. T-Box transcription factor Tbx20 regulates a genetic program for cranial motor neuron cell body migration. **Development** 133, 4945-4955 (2006). 査読(有)

[学会発表] (計3件)

① Hong Zhao : Molecular mechanism that regulates medially oriented axonal growth of upper layer neurons. 日本神経科学学会 (第31回日本神経科学大会)、2008年7月10日、東京.

② Hong Zhao : Molecular mechanism that regulates medially oriented axonal growth of upper layer neurons in cortical development. 日本神経科学学会 (第30回日本神経科学大会)、2007年9月10日、横浜.

③ 白崎 竜一 : FGF as a Target-Derived Chemoattractant for Developing Motor Axons Programmed by the LIM Homeobox Gene Code. 日本神経科学学会 (第29回日本神経科学大会)、2006年7月19日、京都.

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/~neurobiol/shirasaki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白崎 竜一 (SHIRASAKI RYUICHI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授
研究者番号：40423149

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし