

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究スタートアップ

研究期間：2008～2009

課題番号：20890226

研究課題名（和文）

ニワトリヒナ刻印付けにおける神経軸索ガイダンス因子の機能解析

研究課題名（英文）

The analyses of the function of the axon guidance molecules in the filial imprinting of chick

研究代表者

平 郁子 (TAIRA IKUKO)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：60453693

研究成果の概要（和文）：刻印付けが成立したニワトリヒナ脳を用いて Netrin-1 遺伝子発現解析を行ったところ、Intermediate Medial Hyperpallium Apicale (IMHA) と呼ばれる領域を新たな刻印付け関連領域として同定し、IMHA が刻印付けの成立過程に必須な脳領域であることを示した。また微小管結合タンパク質 (MAP2) 遺伝子を標的とした microRNA 発現ベクターを用いて、刻印付け関連領域で内在性の MAP2 タンパク質を減少させ、刻印付けの成立を阻害することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the gene-expression of Netrin-1 using the brain of newly hatched chick. As the result, we identified the Intermediate Medial Hyperpallium Apicale (IMHA) as the novel region related to filial imprinting.

When the vector for the expression of microRNA based on the sequence of microtubule-associated protein (MAP2) gene introduced to the region related to filial imprinting, endogenous MAP2 protein was decreased, and memory formation was inhibited during filial imprinting.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：①刻印付け ②神経軸索ガイダンス因子 ③大脳 ④*in vivo* 遺伝子導入
⑤ニワトリ ⑥遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

刻印付け（刷り込み）は、ニワトリなどの離巢性の鳥類で顕著に見られる現象で、孵化後間もないヒナ鳥が、初めて見た動くものを親と認識し追従する行動である。

申請者らはこれまでに、ニワトリヒナの刻印付けに関与する分子を単離する目的で、IMM領域で刻印付けによって発現量が変化する遺伝子を、cDNA マイクロアレイを用いて探索した。その結果、13000種類の遺伝子の中から、刻印付けに伴って発現が上昇する遺伝子 52 種を同定した (*Brain Res. Bull.* (2008), 76, 275-281)。発現が上昇する遺伝子には、神経軸索ガイダンス因子である Netrin-1 ならびに Ephrin-B2 が含まれていた。神経軸索ガイダンス因子は、神経軸索の伸展方向を決定し、神経回路を適切に形成するための実働分子である。したがってこの知見は、ヒナ大脳では神経回路が刻印付けに伴って再編成されることを示唆している。

一方申請者らは、ニワトリヒナ大脳の特定の領域へ神経細胞選択的に外来遺伝子を導入することに成功している (*Neuroreport* (2007) 18, 735-739)。この手法により、ヒナ個体を生かしたまま大脳内の遺伝子発現を局所的に任意に変化させ、行動解析とリンクした大脳内の分子の機能解析が可能となった。

以上の知見と実績に基づき、本研究は、ニワトリヒナ大脳への *in vivo* 遺伝子導入法を応用して、刻印付けにおける神経軸索ガイダンス因子の機能を分子生物学と行動科学の両面から明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

刻印付けにおける神経軸索ガイダンス因子の機能を明らかにするため、以下の内容を研究目標とした。

(1) 刻印付けが成立した個体において、神経軸索ガイダンス因子 Netrin-1 と Ephrin-B2 の発現解析を行う。刻印付けに伴う Netrin-1 と Ephrin-B2 の発現パターンの変化をもとに、その機能を類推する。

(2) ニワトリヒナ大脳への *in vivo* 遺伝子導入法を用いて、大脳内の特定の領域における Netrin-1 と Ephrin-B2、およびそれらの受容体分子の遺伝子発現を変化させ、それに伴って刻印付けに影響が現れるか行動科学的に解析する。また、遺伝子発現を改変した神経細胞を可視化して形態を観察し、遺伝子発現の変化が神経回路の形成に与える影響を検討する。これらの解析によって、刻印付けにおける Netrin-1 と Ephrin-B2 の重要性を明らかにする。

(3) Netrin-1 と Ephrin-B2 以外の神経軸索ガイダンス因子について、刻印付けに伴って大

脳内で発現が変化するかを調べ、刻印付けに関わるガイダンス因子をさらに同定する。刻印付けに関与すると判断できた因子に関しては、ヒナ個体を用いた機能解析を行う。これらの解析により、神経軸索ガイダンス因子の刻印付けにおける役割を体系的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 刻印付け成立個体における神経軸索ガイダンス因子 Netrin-1 と Ephrin-B2 の発現解析

ニワトリヒナに対して1時間の刻印付けトレーニングを2回行った後、Netrin-1 ならびに Ephrin-B2 の遺伝子発現変化を *in situ* hybridization 法により細胞レベルで解析した。さらに、これらの遺伝子が発現上昇する領域が刻印付けに関与するかどうかを知るために、蛍光標識ブドウ糖の取り込みを指標として神経活動が変化するか解析した。またイボテン酸を注入してこれらの領域の神経活動を阻害したヒナ個体を用いて、刻印付け成立に対する影響を解析した。

(2) ニワトリヒナ個体を用いた Netrin-1 ならびに Ephrin-B2 の刻印付けにおける機能解析

Netrin-1 と Ephrin-B2 の遺伝子発現改変個体の作出に関しては、大脳の左右両半球の IMM において遺伝子発現を改変できるかどうか、蛍光タンパク質の発現ベクターを用いて検討した。

また、大脳の IMM 領域に内在的に発現している遺伝子の発現を抑圧できるかどうか検討した。方法は、過去に行った発現解析によって刻印付けに関連することを示した、微小管結合タンパク質 (MAP2) 遺伝子を標的とした microRNA 発現ベクターを作成し、IMM 領域に導入した。

(3) 刻印付けに関わる神経軸索ガイダンス因子の探索

これまでに報告した cDNA マイクロアレイの結果 (*Brain Res. Bull.* (2008), 76, 275-281) は、刻印付けトレーニング3時間後のニワトリヒナ大脳において、遺伝子発現の変化を追跡したものであった。そこで、刻印付けのさらに初期過程に機能する遺伝子群に神経軸索ガイダンス因子が含まれているかを知るため、刻印付けトレーニング直後のニワトリヒナ大脳から mRNA を調製して cDNA マイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) 刻印付け成立個体における神経軸索ガイ

ダンス因子 Netrin-1 と Ephrin-B2 の発現解析

組織学的な遺伝子発現解析の結果、Intermediate and Medial Mesopallium (IMM) と海馬だけでなく hyperpallium にも、刻印付けに伴い Netrin-1 が発現上昇する細胞群が存在することがわかった。詳細な組織学的解析の結果、この領域は、Intermediate Medial Hyperpallium Apicale (IMHA) と呼ばれる限局された領域であった。さらに刻印付けトレーニングによって IMHA 領域のブドウ糖の取り込みが促進されること、IMHA の神経細胞をイボテン酸により活動停止させたヒナ個体で刻印付けが成立しないことも明らかとなり、IMHA が刻印付けの成立過程に必須な大脳領域であることが示された。

以上の結果から、Netrin-1 ならびに Ephrin-B2 の遺伝子発現の抑圧を行う標的領域としては、IMM 領域だけでなく IMHA 領域も含める必要があると考えられる。

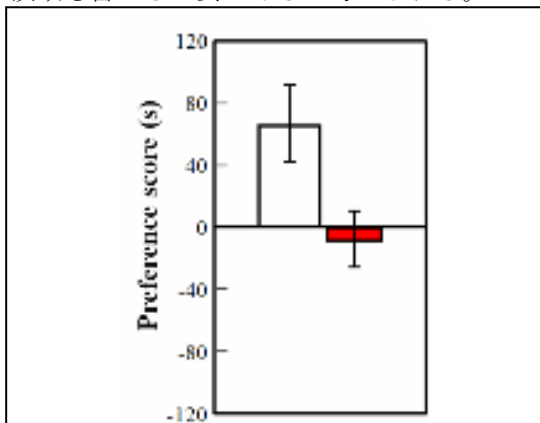


図1. IMHA領域の破壊による刻印付けの抑制

孵化直後のニワトリ雛のIMHA領域に、イボテン酸を注入して局所的に神経活動を抑制した。この個体に対して刻印付けトレーニングを行った後、刻印付けされたかどうかをテストしたところ、イボテン酸処理個体(赤)では、刻印付けが阻害された。一方、手術のみ行ってイボテン酸処理をしなかった個体(白)では、刻印付けに影響は見られなかった(Kruskal-Wallis検定、 $p < 0.05$)。

(2) ニワトリヒナ個体を用いた Netrin-1 ならびに Ephrin-B2 の刻印付けにおける機能解析

IMM の神経細胞に左右の脳半球でほぼ同程度に、蛍光タンパク質を発現させることに成功した。この方法を応用することで、刻印付けに伴って上昇する遺伝子の発現を大脳の左右でほぼ均等に抑圧することが可能となった。この手法を応用して、MAP2 遺伝子を標的とした microRNA 発現ベクターを左右脳半球の IMM 領域に導入したところ、ベク

ターが導入された神経細胞で、内在性の MAP2 タンパク質が減少した。さらに、この MAP2 遺伝子発現が抑圧された個体では刻印付けが成立しなかったことから、MAP2 が刻印付けに必須なことだけでなく、遺伝子発現と刻印付け行動の相関性を解析するにあたって、この microRNA 発現系が応用可能であることを示している。今後は IMM、IMHA の 2 領域において Netrin-1 ならびに Ephrin-B2 の遺伝子発現抑圧実験を行うことで、これらの遺伝子の刻印付けにおける機能が明らかになるものと期待できる。

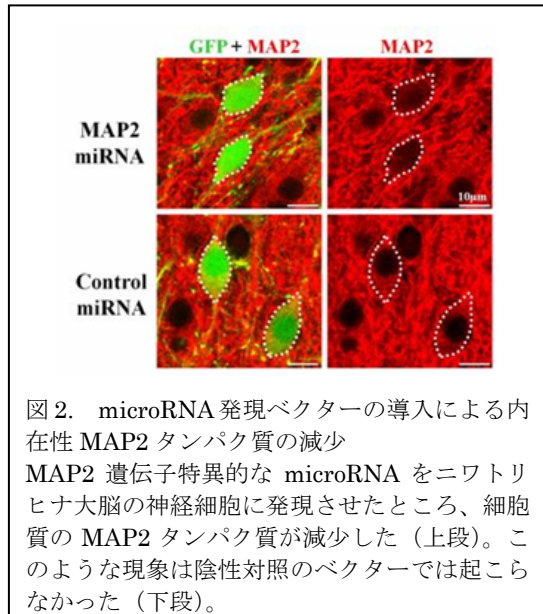


図2. microRNA 発現ベクターの導入による内在性 MAP2 タンパク質の減少
MAP2 遺伝子特異的な microRNA をニワトリヒナ大脳の神経細胞に発現させたところ、細胞質の MAP2 タンパク質が減少した(上段)。このような現象は陰性対照のベクターでは起こらなかった(下段)。

(3) 刻印付けに関わる神経軸索ガイダンス因子の探索

マイクロアレイ解析の結果、刻印付けに伴って発現上昇する遺伝子として brain derived neurotrophic factor を含む 13 種類の遺伝子を同定した。しかしこの遺伝子群には神経軸索ガイダンス因子は含まれていなかった。このことから、神経軸索ガイダンス因子群は、刻印付けの成立過程の中では比較的遅れて発現し、神経回路の改変において作業分子として働くものと考えられる。

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 4 件)

① Suppression of the ecdysteroid-triggered growth arrest by a novel *Drosophila* membrane steroid binding protein.

Fujii-Taira, I., Yamaguchi, S., Iijima, R., Natori, S., and Homma, K. J.

FEBS Lett. 583, 655-60 (2009)

査読：有

② Gene expression profile in cerebrum in the filial imprinting of domestic chicks (*Gallus gallus domesticus*).

Yamaguchi S., Fujii-Taira I., Katagiri S., Izawa E., Fujimoto Y., Takeuchi H., Takano T., Matsushima T., and Homma K. J.

Brain Res. Bull. 76, 275-281 (2008)

査読：有

③ Up-regulation of microtubule-associated protein 2 accompanying the filial imprinting of domestic chicks (*Gallus gallus domesticus*)

Yamaguchi S., Fujii-Taira I., Murakami A., Hirose N., Aoki N., Izawa E., Fujimoto Y., Takano T., Matsushima T., and Homma K. J.

Brain Res. Bull. 76, 282-288 (2008)

査読：有

④ The extracellular adenosine deaminase growth factor, ADGF/CECR1, plays a role in *Xenopus* embryogenesis via the adenosine/P1 receptor.

Iijima R., Kunieda T., Yamaguchi S., Kamigaki H., Fujii-Taira I., Sekimizu K., Kubo T., Nator, S. and Homma K. J.

J. Biol. Chem. 283., 2255-2264 (2008)

査読：有

[学会発表] (計3件)

①発表者：平 郁子、山口 真二、山田 マミ、神垣 ひろこ、黒川 竜紀、岡村 康司、本間 光一

発表標題：ニワトリ VSP はホスファターゼ活性の発現によって線維芽細胞の形態変化を引き起こす

学会名：第82回日本生化学会大会

発表年月日：2009.10.24

②発表者：片桐 幸子、山口 真二、平 郁子、本間 光一

発表標題：鳥類刻印付けの分子基盤の解明

学会名：日本薬学会 生物系薬学部会「ファーマ・バイオフィオーラム 2008」

発表年月日：2008.11.29

発表場所：日本薬学会長井記念ホール

③発表者：片桐幸子、広瀬直樹、山口真二、平郁子、藤本康之、高野達哉、松島俊也、本間光一

発表標題：RNAiによるニワトリヒナ脳での特異的遺伝子抑圧系の確立

学会名：日本薬学会 128 回大会

発表年月日：2008.03

[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

<http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/lab/byotai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平 郁子 (TAIRA IKUKO)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：60453693

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし