

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700355

研究課題名(和文) レンチウイルスベクターを用いた成体時における嗅球神経回路形成機構の解析

研究課題名(英文) Olfactory bulb neural circuit formation by lentiviral vector

研究代表者 吉原 誠一 (SEIICHI YOSHIHARA)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90360669

研究成果の概要(和文)：新生仔マウスの脳室に、GFP 遺伝子を搭載したレンチウイルスを感染させることにより新生嗅球介在ニューロンを可視化した。また、神経活動依存的に発現が誘導される 5T4 を、レンチウイルスを用いて新生嗅球介在ニューロンで過剰発現させ、その形態を解析した。解析の結果、片鼻を閉じて神経活動を低下させた側の嗅球では、新生介在ニューロンの樹状突起の伸展とスパイン密度が、鼻の空いた側の嗅球に比べて低下していた。このことは、嗅球介在ニューロンの樹状突起の発達とスパイン形成には神経活動が必要であることを示している。また、5T4 を嗅球介在ニューロンで過剰発現させると、樹状突起の枝別れがそれぞれ促進された。さらに解析の結果、樹状突起の枝別れの促進には 5T4 の細胞内ドメインが必要十分であり、細胞外は必要ないことが明らかになった。これらの解析から、5T4 は、嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な樹状突起の発達を制御していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, by using the lentiviral system, we have analyzed the odorant-induced activity dependent developmental process of OB interneurons. We injected the lentivirus (CMV promoter gapEYFP gene) into the lateral ventricle at neonatal stage, followed by naris occlusion. Newborn interneurons have smaller and less branched dendrites, and the reduced spine density in the dendrites. We have found that transmembrane protein 5T4 is expressed in an activity-dependent manner in the specific subset of OB interneurons. When 5T4 gene is forced-expressed ectopically in the OB interneurons by lentivirus, 5T4 forced-expressing interneurons have highly branched dendrites than control interneurons. On the other hand, 5T4 loss of function experiment causes the reduction of dendrite arborization in OB interneurons. These results suggest that 5T4 protein regulates the dendrite arborization of OB interneurons in odorants induced activity dependent manner and has an important role for OB neural circuit formation during adulthood.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計

2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：発生・分化、嗅球、介在神経細胞

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質の視覚野や海馬で明らかにされているように、ニューロンは神経活動に応じて樹状突起の発達やシナプス形成を行うことで、より洗練された神経回路へと成熟していく。しかしながら、このような神経活動依存性の回路形成機構については不明な点が多い。嗅球介在ニューロンは胎生期のみならず、成体期においても新生され続け新たな神経回路を形成している。嗅球の神経回路は成体においても常に新たな回路を作り続けている動的なものであり、これは他の神経系では見られない極めてユニークな特徴である。さらに、この嗅球神経回路形成は神経活動によって、その回路の精密化が行われていると考えられているがその機構は明らかになっていない。申請者はこれまでの解析により、神経活動依存的に発現する膜タンパク質や転写因子が嗅球介在ニューロンの樹状突起の発達やシナプス形成を制御していることを明らかにした。

2. 研究の目的

嗅球介在ニューロンは胎生期のみならず、成体期においても新生され続け新たな神経回路を形成している。これは他の神経系では見られない極めてユニークな特徴である。さらに、この嗅球神経回路形成は神経活動によって、その回路の精密化が行われていると考えられているがその機構は明らかになっていない。申請者はこれまでの解析により、神経活動依存的に発現する膜タンパク質や転写因子が嗅球介在ニューロンの樹状突起の発達やシナプス形成を制御していることを

明らかにした。そこで本研究では、嗅球介在ニューロンをモデルとして、神経活動依存的な神経回路の精密化の分子機構の解明を目指す。また本研究は、統合失調症や自閉症等の精神疾患に関する原因解明や、損傷された脳内神経回路の修復等の再生医学への応用にも繋がると期待される。

3. 研究の方法

DNA マイクロアレイの解析によって明らかになった神経活動依存的な発現を示す遺伝子群 (**ST4**, **NPAS4** 遺伝子) について、レンチウイルスによる強制発現及び **RNAi** による機能阻害実験を用いて嗅球介在ニューロンの発達における機能を明らかにする。

さらにこれらの神経活動依存的なニューロンの発達を制御する分子と相互作用する分子の探索を **yeast two hybrid** 法や免疫クロマチン沈降法を用いて行う。以上の解析を多面的に行うことで嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な発達機構を明らかにすることを旨とする。

4. 研究成果

嗅球介在ニューロンは胎生期のみならず成体期においても常に新生され続け、新たな神経回路を形成し続けるというユニークな

特徴を持っている。この嗅球における神経回路形成は、神経活動によって回路の精密化が行われていると考えられているが、その機構は明らかにされていない。本研究では、嗅球介在ニューロンにおいて、神経活動依存的に発現が誘導される 5T4 (膜蛋白質) の機能を解明することを目的としている。

新生仔マウスの脳室に、GFP 遺伝子を搭載したレンチウイルスを感染させることにより新生嗅球介在ニューロンを可視化した。また、神経活動依存的に発現が誘導される 5T4 を、レンチウイルスを用いて新生嗅球介在ニューロンで過剰発現させ、その形態を解析した。

解析の結果、片鼻を閉じて神経活動を低下させた側の嗅球では、新生介在ニューロンの樹状突起の伸展とスパイン密度が、鼻の空いた側の嗅球に比べて低下していた。このことは、嗅球介在ニューロンの樹状突起の発達とスパイン形成には神経活動が必要であることを示している。また、5T4 を嗅球介在ニューロンで過剰発現させると、樹状突起の枝別れがそれぞれ促進された。さらに解析の結果、樹状突起の枝別れの促進には 5T4 の細胞内ドメインが必要十分であり、細胞外は必要ないことが明らかになった。これらの解析から、5T4 は、嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な樹状突起の発達を制御していると考えられる。

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 1 件)

1. Takahashi H, Yoshihara S, Nishizumi H, and Tsuboi A. Neuropilin-2 is required for the proper targeting of ventral glomeruli in the mouse olfactory bulb. *Molecular and Cellular Neuroscience* 44, 233-245. (2010).

[学会発表] (計 6 件)

1. Yoshihara S, Takahashi H, Mori K and Tsuboi A. Activity-dependent development of olfactory bulb interneurons upon neural circuit formation. 第 43 回日本味と匂学会大会、2009 年 9 月、旭川。
2. 吉原誠一、高橋弘雄、森憲作、坪井昭夫 嗅球介在神経細胞の神経活動依存的な発達機構の解析 第32回日本神経科学学会大会、2009年9月、名古屋。
3. Yoshihara S, Takahashi H, Mori K and Tsuboi A Activity-dependent development of olfactory bulb interneurons upon the neural circuit formation. Cold Spring Harbor Asia Conference: 1st Francis Crick Neuroscience Symposium、2010 年 4 月、中国 蘇州。
4. 吉原誠一、西村信城、高橋弘雄、森憲作、坪井昭夫 Activity-dependent development of olfactory bulb interneurons upon the neural circuit formation. 2010年9月、神戸。
5. 吉原誠一、西村信城、高橋弘雄、森憲作、坪井昭夫 The dendrite arborization of olfactory bulb interneurons in an odor-evoked activity-dependent process. 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月、神戸。
6. Yoshihara S, Nishimura N, Takahashi H, Mori

K and Tsuboi A. The dendrite arborization of olfactory bulb interneurons in an odor-evoked activity-dependent process. Keystone Symposia: Adult Neurogenesis、2011年1月、アメリカ、ニューメキシコ。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉原 誠一 (SEIICHI YOSHIHARA)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 90360669

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :