

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500284

研究課題名（和文） 突然変異マウスを用いた運動神経軸索ガイダンス機構の解析

研究課題名（英文） Studies on motor axon guidance in a spontaneous mutant mouse

## 研究代表者

榎 和子 (KEINO-MASU KAZUKO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50344883

研究成果の概要（和文）：脊髄運動神経軸索を特定の筋肉へ誘導する分子機構は不明である。本研究は、総腓骨神経の走行異常を持つ自然発生変異マウスを用いて、運動軸索ガイダンスの分子機構を明らかにすることを目指した。候補領域の遺伝子配列を調べたが、エクソン及びその周辺には多型と思われる変異しか存在しなかった。遺伝子発現を調べたところ、候補領域に存在する遺伝子を含む複数の遺伝子の発現に変化が見られ、遺伝子発現調節異常の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanisms that regulate guidance of spinal motor axons to their target muscles are not known. In this study, we tried to elucidate it using a spontaneous mutant mouse that shows abnormalities in a particular motor trajectory. We examined the sequences of the genes in the critical region but failed to find any mutation responsible for the mutant phenotype. However, we found that the expression levels of several genes present in the critical region are changed in the mutant mice, suggesting the abnormalities in gene regulation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：脳・神経、遺伝子、発生・分化、神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 脊髄運動ニューロンは特定の筋を支配し運動を制御する。この特異的な神経投射は、他のニューロンと同様、発生期に周囲の様々な誘引性分子と反発性分子の相互作用によって制御される。Landmesserらのニワトリ胚移植実験を用いた先駆的研究により、標的

である筋肉（近傍）に運動ニューロンの軸索を誘導する手がかりがあることが示唆されたが、その分子の実体は未だ不明である。一方、Jessellらは、体軸筋を支配する運動ニューロンと四肢筋を支配する運動ニューロンの分化が、時空間的発現パターン異なる複数の転写因子の組み合わせにより決定され

ることを示している。また、Charnay、Kaniaらは、Ephrin-Eph シグナルが後肢領域の運動ニューロン軸索ガイダンスを、白崎らはFGF シグナルが内側運動ニューロンのガイダンスを制御することを報告した。しかしながら、脊椎動物において運動ニューロン軸索を特定の筋肉へ誘導する分子機構については未だ不明な点が多い。

(2) 私は、腓骨筋萎縮マウス (peroneal muscular atrophy: pma) を用いて運動神経軸索ガイダンス機構を研究している。pma マウスは、1981年に報告された突然変異マウスであり、後肢(下肢)前方筋である腓骨筋に先天的な萎縮を持つ。その原因は、発生期に総腓骨神経が腓骨筋に投射しないためであり、その原因遺伝子を同定すれば、運動神経の軸索ガイダンスの分子機構を解明することにつながる可能性が高い。これまでに、pma マウスの連鎖解析を行い、候補領域を約 1.1 Mb まで絞り込んだ。この領域には 20 個の遺伝子が存在するが、運動ニューロンの分化や軸索ガイダンスに関わることが知られている遺伝子は存在しない。BAC クローンを収集し、候補領域全体をカバーする contig を完成した。この領域に存在する 20 個の遺伝子について、全てのエクソンとその周辺の塩基配列を決定し、コントロールのゲノム配列と比較を行った。計 235 エクソンを調べた結果、アミノ酸翻訳領域での 1 塩基置換が 47 カ所見つかつたが、フレームシフト変異、ノンセンス変異、スプライシング部位での変異など、遺伝子機能の喪失に直結する異常は見つからなかった。アミノ酸の置換を生じる変異が計 21 カ所見つかつたが、これらは SNP であると考えられた。

(3) pma マウスでは総腓骨神経が欠損しており、神経原性の腓骨筋萎縮が観察される。総腓骨神経が腓骨筋に到達しないことは分かっているが、総腓骨神経が存在するか、異所的に別の筋肉へ投射するのか、標的筋に到達できず細胞死するのかわかり不明であった。そこで、私は、HB9 遺伝子のプロモーター下流に EGFP を持つコンストラクトを遺伝子導入した、トランスジェニック pma マウスを作成した。このマウスを用いて pma マウスにおける運動神経走行の異常を観察したところ、胎生 12 日に運動神経の走行に異常があることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

(1) 候補領域内遺伝子の発現異常の検討  
候補領域に存在する 20 個の遺伝子についてゲノム配列を既に決定したが、フレームシフト変異、ノンセンス変異、スプライシング部位での変異など遺伝子機能の喪失に繋がる異常はみつからなかった。そこで、イントロンやプロモーター部位を含む領域の変異で起こる可能性がある、スプライシング異常や発現異常がないかを調べる。これらの解析により、表現型出現の原因となる遺伝子異常を同定する。

### (2) 異常投射運動神経軸索の解析

HB9-EGFP 遺伝子を導入したトランスジェニック pma マウスを用いて、胎児期に腓骨神経の走行に異常が生じることを見出している。そこで、ホールマウントまたは切片を用いて、この異常な神経線維の起源を明らかにする。これにより、腓骨神経の軸索ガイダンス異常が、何時どのように生じるかを明らかにし、原因遺伝子との関連を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) pma マウスと野生型マウスの胎生 12.5 日胚からトータル RNA を抽出し、定法に従ってリアルタイム PCR を行う。また、cDNA を合成して、遺伝子毎に設計したプライマーを用いて PCR を行い、異常なスプライシングなどがないかを調べる。

(2) HB9-EGFP トランスジェニックマウスを用いて、胎生 11.5 日、12.5 日、13.5 日に背側へ異常に投射している運動神経軸索を詳細に観察する。EGFP の蛍光をホールマウントで蛍光顕微鏡を用いて観察する、または、胎児をパラホルムアルデヒドで固定した後、抗 GFP 抗体で染色し、顕微鏡で観察する。胎児が大きくなった場合は蛍光観察ならびにホールマウント免疫染色が難しくなるので、連続凍結切片を作成して免疫染色を行い、顕微鏡画像を取得した後、Imaris ソフトウェアを用いて三次元画像に変換し、繊維の走行を観察する。

## 4. 研究成果

(1) HB9-EGFP トランスジェニックマウス蛍光実体顕微鏡で観察した結果、後肢の肢芽に向けて運動神経が伸長しつつある胎生 12.5 日に、Pma マウスでは本来の場所に腓骨神経の走行が見られず、代わりに座骨神経から背

側へ向かって伸長する異常な神経線維走行が見られた。胎生 13.5 日以降は、胎児のホールマウント観察では EGFP の蛍光が十分でなく観察が困難であった。そこで、細部に渡る観察も行うことを目的として、連続切片を作成し、抗 GFP 抗体で免疫染色した後、顕微鏡写真を撮影し、それらを三次元構成した。その結果、胎生 12.5 日から神経投射の異常が観察され、その神経線維は少なくとも胎生 14.5 日まで存在していることが明らかとなった。またその神経線維群は、正常マウスにおいては比較的細い臀部神経の投射と似た方向へ伸長しているように見えた。

(2) イントロン内の変異がスプライシング異常を引き起こす可能性を考え、pma マウス胎児から抽出した mRNA をもとに cDNA を合成して、その配列を決定した。しかしながら、これまで調べた範囲内では、野性型と異なる配列は検出されなかった。

(3) pma マウスと野性型マウスの 12.5 日胎児の遺伝子発現を調べたところ、候補領域に存在する遺伝子を含む複数の遺伝子の発現量に変化が見られた。従って、遺伝子プロモーター、エンハンサー、あるいは染色体構造変化などを含めた遺伝子発現調節に何らかの異常が生じている可能性もあると考えられる。

## 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 9 件)

(1) 梶和子, 梶正幸. ヘパラン硫酸微細構造の組織特異性とその決定機構. 医学のあゆみ 245 (7), 600-602, 2013. 査読有

(2) Wang, R., Iwakura, Y., Araki, K., Keino-Masu, K., Masu, M., Wang, X., Takei, N., Higashiyama, S. and Nawa, H. ErbB2 Dephosphorylation and Anti-Proliferative Effects of Neuregulin-1 in ErbB2-Overexpressing Cell Lines; Potential Contribution of Their Low-Affinity Interaction. Scientific reports 3, 1402, 2013. 査読有

(3) Nagamine, S., Tamba, M., Ishimine, H., Araki, K., Shiomi, K., Okada, T., Ohto, T., Kunita, S., Takahashi, S., Wismans, R.G.P., van Kuppevelt, T.H., Masu, M., and Keino-Masu, K. Organ-Specific Sulfation Patterns of Heparan Sulfate Generated by Extracellular Sulfatases

Sulf1 and Sulf2 in Mice. Journal of Biological Chemistry 287, 9579-9590, 2012. 査読有

(4) Terawaki, S., Yano, K., Katsutani, T., Shiomi, K., Keino-Masu, K., Masu, M., Shomura, Y., Komori, H., Shibata, N., and Higuchi, Y. Crystallographic characterization of the DIX domain of the Wnt signalling positive regulator Ccd1. Acta Crystallographica F67, 758-761, 2011. 査読有

(5) Koike, S., Yutoh, Y., Keino-Masu, K., Noji, S., Masu, M., and Ohuchi, H. Autotaxin is required for the cranial neural tube closure and establishment of the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. Developmental Dynamics 240, 413-421, 2011. 査読有

(6) Syu, A., Ishiguro, H., Inada, T., Horiuchi, Y., Tanaka, S., Ishikawa, M., Arai, M., Itokawa, M., Niizato, K., Iritani, S., Ozaki, N., Takahashi, M., Kakita, A., Takahashi, H., Nawa, H., Keino-Masu, K., Arikawa-Hirasawa, E., and Arinami, T. Association of the HSPG2 Gene with Neuroleptic-Induced Tardive Dyskinesia. Neuropsychopharmacology 35, 1155-1164, 2010. 査読有

(7) Yamazoe, H., Keino-Masu, K., and Masu, M. Combining the Cell Encapsulation Technique and Axon Guidance for Cell Transplantation Therapy. Journal Biomaterial Science, 21, 1815-1826, 2010. 査読有

(8) Koike, S., Keino-Masu, K., and Masu, M. Deficiency of autotaxin/lysophospholipase D results in head cavity formation in mouse embryos through the LPA receptor-Rho-ROCK pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications. 400, 66-71, 2010. 査読有

(9) Nagamine, S., Keino-Masu, K., Shiomi, K., and Masu, M. Proteolytic cleavage of the rat heparan sulfate 6-O-endosulfatase SulfFP2 by furin-type proprotein convertases. Biochemical and Biophysical Research Communications. 391, 107-112, 2010. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

(1) Takashima, Y., Yamashita, H., Sakamoto, K., Hara, S., Kobayashi, N., Ueno, T., Keino-Masu, K., Masu, M., and Nagata, M. Role of podocyte extracellular sulfatase in regulation of glomerular permeability. Kidney week 2012

2012/10/30-11/4, San Diego Convention Center, San Diego, 米国

(2) Masu, M., Okada, T., Nagamine, S., Ohto, T., Kametani, F., Hasegawa, M., Kunita, S., Takahashi, S., and Keino-Masu, K. Heparan Sulfate Modification by Endosulfatases is Required for Cortical Axon Guidance. 1<sup>st</sup> international symposium/ 59<sup>th</sup> NIBB conferences “Neocortical organization” 2012/3/10-13, 岡崎カンファレンスセンター、岡崎

(3) 榎正幸、岡田拓也、長嶺聖史、大戸達之、亀谷富由樹、長谷川成人、國田智、高橋智、榎和子、へパラン硫酸糖鎖による軸索ガイダンス制御機構（シンポジウム、オーガナイザー）第 34 回日本神経科学学会大会 2011/9/14-17、パシフィコ横浜、横浜

(4) Masu, M. Roles of heparan sulfate endosulfatases in neural development. The 3rd Workshop between University of Tsukuba and University of Edinburgh. 2011/6/13, University of Edinburgh, Edinburgh, 英国

(5) Tagiuchi, E., Koike, S., Yutoh, Y., Keino-Masu, K., Noji, S., Masu, M., Ohuchi, H. Autotaxin is required for anterior neural ridge formation, midbrain-hindbrain boundary patterning, and cranial neural tube closure. (ポスター発表) 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010/12/7-10、神戸国際会議場、神戸

(6) 寺脇慎一、塩見健輔、榎正幸、柴田直樹、樋口芳樹、Wnt シグナル伝達で機能する CCD1 DIX ドメインの X 線結晶構造解析（ポスター発表）第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010/12/7-10、神戸国際会議場、神戸

(7) Okada, T., Keino-Masu, K., Nagamine, S., Kunita, S., Takahashi, S., and Masu, M. Heparan sulfate 6-Oendosulfatases are required for neural network formation. (ポスター発表) The 40th Annual meeting of the Society for Neuroscience. 2010/11/13-17, San Diego, convention center, San Diego, 米国

(8) 榎正幸 The roles of heparan sulfate in axon guidance (招待講演) International Graduate Schools International Conference, 2010/11/1、つくば国際会議場、つくば

(9) 寺脇慎一、塩見健輔、榎正幸、柴田直樹、樋口芳樹、Wnt シグナル伝達で機能する CCD1 オリゴマー形成機構に関する構造学的

研究 (ポスター発表) 日本結晶学会 2010 年年会 2010/12/3-5、大阪大学コンベンションセンター、大阪

(10) 岡田拓也、榎和子、長嶺聖史、國田智、高橋智、Arie Oosterhof, Toin Kuppevelt、榎正幸、マウス胎児脳におけるへパラン硫酸多様性の検出 (ポスター発表) 第 33 回日本神経科学学会大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 2010/9/2-4、神戸コンベンションセンター、神戸

(11) 寺脇慎一、塩見健輔、榎正幸、柴田直樹、樋口芳樹、Wnt シグナル伝達機構ではたらく CCD1 の構造化学的研究 (ポスター発表) 第 10 回日本蛋白質科学会年会、2010/6/16-18、札幌コンベンションセンター、札幌

〔図書〕 (計 1 件)

(1) Masu, M., Koike, S., Okada, T., and Keino-Masu, K., Studies on autotaxin signaling in endocytic vesicle biogenesis and embryonic development using whole embryo culture and electroporation. In: Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry. (Ed. by J. Chun et al.), John Wiley & Son Inc. Hoboken, NJ, USA.

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榎 和子 (KEINO-MASU KAZUKO)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：50344883

### (2) 研究分担者

榎 正幸 (MASU MASAYUKI)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：20243032

### (3) 連携研究者

有波 忠雄 (ARINAMI TADAO)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：10212648