

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700379

研究課題名（和文） 交連軸索の腹側伸長を規定する真のネトリン1の機能の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the Mechanisms that Netrin-1 Guides Commissural Axons to the Ventral Midline

研究代表者

山内 健太（YAMAUCHI KENTA）

大阪大学・生命機能研究科・特任研究員

研究者番号：00513079

研究成果の概要（和文）：化学走性説は軸索誘導の基本原則であるが、その証明は未だなされていない。本研究では、軸索誘導分子ネトリン1が化学走性説に従い交連軸索を誘導するというモデルの検証を行い、交連軸索の腹側伸長を規定するネトリン1の真の機能を解明することを試みた。研究期間内において、①交連軸索の腹側伸長時におけるネトリン1 mRNA 並びにタンパクの発現分布の解明、②交連軸索の腹側伸長に必要な十分なネトリン1の発現分布を解明する実験系の確立という2つの成果を得た。

研究成果の概要（英文）：Chemotropism is a fundamental theory of axon guidance. However, this theory has not been rigorously tested. In this study, I studied whether netrin-1 guides commissural axons ventrally in a chemotrophic manner. Expression patterns of netrin-1 mRNA and protein during ventral migration of commissural axons were examined. Additionally, which netrin-1 expression is necessary and sufficient for ventrally directed extension of commissural axons was tested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：軸索誘導、交連軸索、ネトリン1、化学走性説

## 1. 研究開始当初の背景

化学走性説はRamón y Cajalにより提唱された軸索ガイダンスの基本原則である。化学走性説において軸索は標的（中間標的）由来の化学物質の濃度勾配の方向性を感知することにより標的へと到達する。化学走性説の証明は軸索誘導分子ネトリン1の同定により完

成されたと見なされており、交連軸索は中間標的である底板から拡散したネトリン1の濃度勾配の方向性を感知することで腹側正中線へと伸長すると考えられている。確かに、ネトリン1 mRNA は底板に発現し(Serafini et al., Cell, 87:1001)、ネトリン1タンパクの

濃度勾配は、培養下のアフリカツメガエルの脊髄神経軸索に対し誘引作用を示し(Ming et al., Neuron, 19:1211)、ネトリン1欠損マウスにおいて、交連軸索は底板まで伸長できずにその手前で停止する(Serafini et al., Cell, 87:1001)。しかしながら、これら一連の研究はネトリン1の中間標的での発現、神経軸索のネトリン1の濃度勾配に対する反応性、ネトリン1の発現自体の必要性を検証したものであるが、ネトリン1の化学走性説を証明したのではない。なぜならば、①ネトリン1の発現は底板に局限していないため、中間標的に由来しないネトリン1が交連軸索の腹側伸長へ寄与している可能性が否定できず、②ネトリン1タンパクの発現分布に変更を加えた個体において交連軸索の挙動を解析した研究が存在しないため、ネトリン1タンパクの濃度勾配が本当に交連軸索の腹側伸長に必要な十分であるという検証がされていないためである。一方で、近年になり、化学走性説に見直しを迫るような知見も報告されてきている。例えば、底板細胞の分化しないマウスにおいても、交連軸索は腹側正中線に到達し(Matise et al., Development, 126:3649)、ネトリン1タンパクの濃度勾配は交連軸索が底板に到達する以前の発生段階では検出されない(Kennedy et al., J Neurosci, 26:8866)。更には、元来分泌性タンパクであるネトリンを膜貫通型タンパクに改変したシヨウジョウバエにおいても交連軸索は正中線へと到達する(Brankatschk and Dickson, Nat Neurosci, 9:188)。これらの一連の結果は、交連軸索の腹側正中線への伸長にネトリン1を発現する中間標的、ネトリン1タンパクの濃度勾配、ネトリンタンパクの拡散は必要ではないことを示唆しており、化学走性説と合致しないように思える。

## 2. 研究の目的

本研究では、生体内におけるネトリン1の発現分布に変更を加えることでネトリン1の化学走性説の再検証を行い、交連軸索の腹側伸長を定める真のネトリン1の機能を明らかにすることを目的とした。研究期間内においては、以下の2項目を明らかにすることを目指した。

(1) 交連軸索の腹側伸長時におけるネトリン1 mRNA、ネトリン1タンパクの発現分布を調べ、それらが化学走性説に合致した分布を示しているかどうかを明らかにする。

(2) 交連軸索の腹側伸長に必要な十分なネトリン1 mRNA、ネトリン1タンパクの発現分布を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 交連軸索の腹側伸長時におけるネトリン1 mRNA、タンパク質の発現分布の解析

ネトリン1が化学走性説に従い交連軸索を腹側正中線へと誘引しているのであれば、ネトリン1 mRNAは底板に発現し、そのタンパク質は底板を頂点とする勾配状に発現分布するはずである。そこで*in situ* hybridization、免疫組織化学を行うことによって、交連軸索が伸長する際のネトリン1のmRNA、タンパク質の発現分布を解析し、それらが化学走性説に合致するかどうかを検証した。

(2) 交連軸索の腹側伸長に必要なネトリン1の発現分布の解析

交連軸索の腹側伸長に必要なネトリン1の発現分布の解明には、神経管の任意の領域でネトリン1の発現を欠損させる必要がある。そこでネトリン1コンディショナルノックアウトマウス、底板特異的にcreを発現するマウス、神経管の底板を除く領域においてcreを発現するマウスを作製し、そしてそれらを交配させることによって、底板特異的にネトリン1の発現を欠損するマウス、神経管の底板を

除く領域においてネトリン1の発現を欠損するマウスの作製を試みた。作製したマウスにおけるネトリン1 mRNAの発現を *in situ* hybridization法を用いて調べ、脊髄並びに後脳を走行する交連軸索の挙動を、交連神経特異的に発現するタンパク質であるRobo3に対する抗体を用いた免疫組織化学を行うことで解析した。

### (3) 交連軸索の腹側伸長に十分なネトリン1の発現分布の解析

交連軸索の腹側伸長に十分なネトリン1の発現分布を解明するため、ネトリン1 hypomorphicマウスの表現型回復実験を行った。ネトリン1 hypomorphicマウスは、ネトリン1 コンディショナルノックアウトマウスの作製過程において偶然生じたマウスである。このマウスでは、ネトリン1 ノックアウトマウス同様に、顕著な交連軸索の伸長異常が観察される。ネトリン1 hypomorphicマウスでは、その両端がFRT配列により挟まれたネオマイシン耐性遺伝子がネトリン1 遺伝子座に挿入されている。そしてこのネオマイシン耐性遺伝子の挿入が、ネトリン1 遺伝子の発現の阻害の原因となっている。このことは、ネトリン1 hypomorphicマウスと全身でFlpを発現するマウスとの交配により確認されている。以上のことから、ネトリン1 欠損マウスの表現型回復実験は、ネトリン1 hypomorphicマウスの神経管におけるFlp遺伝子の強制発現により可能になると期待される。本研究では、Flp発現ベクターの強制発現をエレクトロポレーション法により行った。その後、Flp発現ベクターが導入されたマウス胚を全胚培養した。培養後のネトリン1 mRNAの発現を *in situ* hybridization法を用いて調べ、更に交連軸索の挙動を、抗Robo3抗体を用いた免疫染色により解析することで、交連軸索の腹側伸長を可

能にするネトリン1の発現分布を明らかにすることを試みた。

## 4. 研究成果

(1) 交連軸索の腹側伸長時におけるネトリン1 mRNAの発現分布を明らかにした。

ネトリン1が化学走性説に従い、交連軸索を腹側正中線へと誘導しているのであるならば、ネトリン1 mRNAの底板での発現が観察されるはずである。そこで多くの交連神経がその軸索を腹側正中線へと伸長させる胎生9.5日目から11.5日目のマウス胚の脊髄におけるネトリン1 mRNAの発現を、*in situ* hybridization法を用いて解析した。その結果、いずれの時期においてもネトリン1 mRNAは底板に強く発現していた。加えて、ネトリン1 mRNAの発現は脳室帯にも確認された。脳室帯におけるネトリン1 mRNAの発現は、胎生9.5日目にはストライプ状で確認され、胎生10.5、11.5日目では、おおよそ腹側3分の2の領域で強く発現している様子が観察された。以上の結果より、交連軸索の腹側伸長に対するネトリン1の機能を検討する際において、底板由来のネトリン1タンパクだけではなく、脳室帯に由来するネトリン1タンパクの寄与も検討する必要があることが示された。

(2) 免疫組織化学に適用可能な抗ネトリン1抗体の作製に成功し、交連軸索の腹側伸長時におけるネトリン1タンパクの発現分布を明らかにした。

交連軸索の腹側伸長におけるネトリン1の真の機能を明らかにするには、そのタンパクの発現分布を知ることが必要不可欠となる。ネトリン1タンパクの発現分布を調べる最も有効な方法として、免疫組織化学法が挙げられる。しかしながら研究開始した時点において、免疫組織化学に適用可能かつ、その特異

性が厳密に証明された抗ネトリン1抗体は存在していなかった。そこで6種類のネトリン1ペプチドに対するウサギポリクローナル、モルモットポリクローナル、ウサギモノクローナル抗体を共同研究、研究受託により作製し、その特異性をネトリン1ノックアウトマウスの脊髄標本における免疫染色を行うことで確認した。その結果、一つのモルモットポリクローナル抗体において、染色像がネトリン1 mRNAの発現分布と合致し、その免疫反応がネトリン1ノックアウトマウスで消失することが確認できた。また、この抗体を用いて交連軸索の腹側伸長時におけるネトリン1タンパクの発現分布を調べたところ、ネトリン1タンパクが髄膜、交連軸索に蓄積するという化学走性説の準拠する拡散性濃度勾配の形成では説明しがたい発現分布が観察された。

(3) 交連軸索の腹側伸長に必要なネトリン1の発現分布を解析する実験系を確立した。

ネトリン1が化学走性説に従い、交連軸索を腹側正中線へと誘導しているのであるならば、底板におけるネトリン1の発現の欠損は、ネトリン1ノックアウトマウス同様の交連軸索の伸長異常を引き起こす一方で、脳室帯におけるネトリン1の発現の欠失は、交連軸索腹側伸長に影響を及ぼさないと考えられる。そこで、ネトリン1コンディショナルノックアウトマウス、底板特異的にcreを発現するマウス、神経管の底板を除く領域においてcreを発現する3種の遺伝子改変マウスを共同研究により作製した。そしてそれらのマウスを交配させることにより、底板でのネトリン1の発現を欠損するマウス、脳室帯のネトリン1の発現を欠損するマウスの作製を試みた。これらのマウスにおいて、想定通りにネトリン1の発現が欠損しているかを*in situ* hybridization法を用いて解析したところ、底板におけるネトリン1の発現を欠損するマウス

スでは、底板特異的にネトリン1 mRNAの発現が欠失している様子が観察された。一方で脳室帯のネトリン1の発現を欠損することが期待されるマウスでは、特定の発生段階から脳室帯のネトリン1 mRNAの発現が欠損していくことが確認された。現在、これらのマウスにおける交連軸索の発生並びにネトリン1タンパクの発現を解析しているところである。

(4) 交連軸索の腹側伸長に十分なネトリン1の発現分布を解析する実験系の確立。

ネトリン1が化学走性説に従い、交連軸索を腹側正中線へと誘導しているのであるならば、ネトリン1の発現が阻害されたネトリン1 hypomorphic マウスの交連軸索の伸長異常は、底板でのネトリン1の発現により回復することが想定される。一方で脳室帯でのネトリン1の発現は、ネトリン1 hypomorphic マウスの交連軸索の伸長異常の回復にほとんど寄与しないことが予想される。そこで、前述のようにネトリン1 hypomorphic マウス胚を取り出し、エレクトロポレーション法よりのFlp発現ベクターを神経管に導入し、遺伝子導入されたマウス胚を全胚培養することにより表現型回復実験を試みた。培養後にネトリン1 mRNAの発現が回復しているかを*in situ* hybridization法を用いて解析したところ、Flp発現ベクターが導入され、かつ元来ネトリン1 mRNAを発現している領域においてネトリン1 mRNAの発現が回復している様子を観察することができた。現在、これらのマウス胚における交連軸索の発生並びにネトリン1タンパクの発現を解析しているところである。

また、一連の研究により得られた研究資料を用いて、大脳皮質興奮性神経細胞の神経極性形成過程、中脳ドーパミン作動性ニューロンの同側性の軸索投射を維持する分子機構、

前脳におけるソニックヘッジホッグを発現する細胞の運命を明らかにすることに成功し、論文発表を行った。

#### 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 Torigoe M, Yamauchi K, Tamada A, Matsuda I, Aiba A, Castellani V, Murakami F. Role of neuropilin-2 in the ipsilateral growth of midbrain dopaminergic axons. *Eur J Neurosci*. 2013 37:1573-83, 査読有  
doi: 10.1111/ejn.12190.
- ② Hatanaka Y, Yamauchi K. Excitatory cortical neurons with multipolar shape establish neuronal polarity by forming a tangentially oriented axon in the intermediate zone. *Cereb Cortex*. 2013 23:105-13. 査読有  
doi: 10.1093/cercor/bhr383.
- ③ Wada Y, Yamauchi K, Murakami F, Tanabe Y. Temporally- and spatially regulated generation of distinct descendants by sonic hedgehog-expressing progenitors in the forebrain. *Dev Neurobiol*. 2012 72:1099-113. 査読有  
doi: 10.1002/dneu.20861.
- ④ Hatanaka Y, Yamauchi K, Murakami F. Formation of axon-dendrite polarity in situ: initiation of axons from polarized and non-polarized cells. *Dev Growth Differ*. 2012 54:398-407. 査読有  
doi:10.1111/j.1440-169X.2012.01344.x.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Torigoe M, Yamauchi K, Tamada A, Matsuda I, Aiba A, Castellani V, Murakami F. Role of neuropilin-2 signaling in the ipsilateral growth of midbrain dopaminergic axons. SfN' s 42nd annual meeting, 2012年10月17日, New Orleans, USA
  - ② Yamauchi K, Yamazaki M, Sakimura K, Umebayashi M, Murakami F. Netrin-1 Is a Determinant of Commissural Axon Growth within the CNS. 第 3 5 回日本神経科学大会、2012年09月18日、名古屋国際会議場
  - ③ Torigoe M, Yamauchi K, Tamada A, Matsuda I, Aiba A, Castellani V, Murakami F. Role of neuropilin-2 signaling in the ipsilateral growth of midbrain dopaminergic axons. 第 3 5 回日本神経科学大会、2012年09月18日、名古屋国際会議場
  - ④ Hatanaka Y, Yamauchi K, Namikawa T, Kawaguchi Y. Cortical excitatory neuron are divided into two distinct groups by their initial projection patterns. 第 3 5 回日本神経科学大会、2012年09月18日、名古屋国際会議場
  - ⑤ Hatanaka Y, Yamauchi K. Excitatory cortical neurons with multipolar shape establish neuronal polarity by forming a tangentially oriented axon in the intermediate zone. 第 3 4 回日本神経科学大会、2011年09月16日、パシフィコ横浜
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
山内 健太 (YAMAUCHI KENTA)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任  
研究員

研究者番号：00513079

(2)研究分担者  
なし

(3)連帯研究者  
なし