

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 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 23 年度～平成 24 年度

課題番号：23700386

研究課題名（和文） 成体嗅球介在ニューロンの神経活動依存的発達機構の解析

研究課題名（英文） Activity dependent development of newborn olfactory bulb interneurons

研究代表者

吉原誠一（Yoshihara Seiichi）

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）：

感覚入力は網膜、大脳皮質及び嗅球などの脳の様々な神経回路形成に必要であることが報告されてきているがその分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究では成体においても常に新生され新たな神経回路を形成し続けている嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な発達の分子機構について解析を行った。

片鼻を閉じて匂い刺激を遮断すると嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれの長さが短くなり、枝分かれの数が減少することが明らかになった。さらに、DNA マイクロアレイ及び *in situ hybridization* による解析の結果、ロイシンリッチリピートを持った膜タンパク質である 5T4 の発現が嗅球介在ニューロンにおいて神経活動依存的に制御されていることが明らかになった。レンチウイルスを用いて 5T4 を嗅球介在ニューロンにおいて強制発現すると嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれが促進された。また、5T4 ノックアウトマウスにおいては嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれが野生型に比べて減少していた。これらの結果から 5T4 分子は嗅球介在ニューロンにおいて神経活動依存的に樹状突起の枝分かれを制御する分子であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Sensory input has been shown to regulate development in a variety of species and in various structures, including the retina, cortex and olfactory bulb (OB). Within the mammalian OB specifically, the development of dendrites in mitral/tufted cells is well known to be odor-evoked activity-dependent. However, little is known about the developmental role of sensory input in the other major OB population of the GABAergic interneurons, such as granule cells and periglomerular cells. Here, we identified, with DNA microarray and *in situ* hybridization screenings, a glycoprotein gene 5T4 whose expression in the OB interneurons is dependent on sensory input.

5T4 is a type I transmembrane protein, whose extracellular domain contains seven leucine-rich repeats, and a short cytoplasmic domain. 5T4 overexpression in the newborn OB granule cells facilitated their dendritic branching even under the sensory input-deprived condition. By contrast, both 5T4 knockdown with RNAi and 5T4 knockout with mice resulted in a significant reduction in the dendritic branching of OB granule cells. Further, we identified the amino-acid sequence in the 5T4 cytoplasmic domain that is necessary and sufficient for the sensory input-dependent dendritic shaping of specific neuronal subtypes in the OB (Yoshihara *et al.*, *J. Neurosci.* 32, 2217, 2012).

Thus, these results demonstrate that 5T4 contribute to regulate the activity-dependent dendritic development of interneurons and the formation of functional neural circuitry in the OB.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成 24 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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：神経科学・神経科学一般

キーワード：発生・発達・再生神経科学

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的な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。

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。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに成体期においても新生され続けるという興味深い特徴をもった嗅球介在ニューロンに注目して、そのニューロンの発達機構の解析を行ってきた。この解析を行うに当たり、遺伝子組換えマウスを複製する従来の方法よりも、より簡便で迅速に遺伝子の機能解析を行うためにレンチウイルスを用いた遺伝子導入の系を嗅球介在ニューロンに試みた。その結果、レンチウイルスを脳室に注入して感染させると新生の嗅球介在ニューロンに効率良く外来遺伝子が導入できることが申請者の実験によって明らかになった。このレンチウイルスの系を用いて嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な回路形成機構の解析に現在着手している。これまでに申請者は、神経活動は嗅球介在ニューロンの樹状突起の伸展とシナプス形成に必須であることを明らかにした。

次に、この嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な発達の分子機構を解明するために、片側の鼻孔を閉じて匂い刺激を遮断したマ

ウス嗅球と正常な嗅球とで発現量が変動する遺伝子について **DNA マイクロアレイ**による探索を行った。その結果、膜タンパク質である **5T4** 遺伝子や転写因子である **NPAS4** 遺伝子などの発現が匂い刺激を遮断した嗅球で減少しているという結果が得られた。ここに申請する研究では、これらの神経活動依存的な神経回路形成に関与する可能性のある遺伝子群の機能解析を、レンチウイルスの発現系を用いて行い、嗅球介在ニューロンの神経回路形成機構を解明することを目的とする。

申請者はこれまでに片側の鼻孔を閉じて匂い刺激を遮断したマウス嗅球と正常な嗅球とで発現量が変動する遺伝子について **DNA マイクロアレイ**による探索を行った。解析の結果、膜タンパク質 **5T4** や転写因子 **NPAS4** などの遺伝子の発現が変動しているという結果が得られた。これらの遺伝子群について片側の鼻孔を閉じた嗅球において **in situ hybridization** を行うことで、発現細胞種及び神経活動による発現量の変化を明らかにする。

in situ hybridization によって嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な回路形成に関与していると思われる遺伝子についてはレンチウイルスを用いた機能解析実験を行う。まず、強制発現させた嗅球介在ニューロンの形態変化を、発達段階を追って解析を行う。更に、この **gain of function** 実験の他に、ドミナントネガティブ型の分子を強制発現させる実験及び **RNAi** を用いた目的遺伝子の **loss of function** 実験も行う。また、これらの遺伝子と相互作用をする分子の探索実験を行い、それら相互作用する分子の嗅球神経回路形成における機能解析をレンチウイルスによる発現形によって明らかにする。これらの実験を行うことで神経活動依存的に発現する遺伝子の介在ニューロンの回路形成における機能を明らかにしたい。

3. 研究の方法

申請者によるこれまでの**DNA** マイクロアレイによる解析から、匂い刺激を遮断したマウス嗅球においては細胞接着に関与する膜タンパク質**5T4**やシナプス形成を制御する転写因子である**NPAS4**の発現が変動している結果が得られた(吉原ら、未発表データ、図3)。これらの神経活動依存的なニューロンの発達に関与すると考えられる遺伝子について、後述するレンチウイルスを用いた遺伝子の**in vivo**での機能解析実験を行う。

レンチウイルスはレトロウイルスの一種であり、改変されたレンチウイルスベクターによって神経細胞を含む様々な種類の細胞に効率よく遺伝子導入できることが報告されている。申請者の実験によってレンチウイルスベクターを生後1日目のマウス脳室に感染させ1週間後に解析を行ったところ新生嗅球介在神経細胞に効率よく遺伝子導入されていることが明らかになった。レンチウイルスベクターに嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な発達に関与すると考えられる**5T4**及び**NPAS4**遺伝子を組み込み、マウス脳室に感染させることで、その遺伝子の*in vivo*での神経回路形成における機能解析を行う。またその遺伝子のドミナントネガティブ型タンパク質の強制発現や**RNAi**を用いた遺伝子の発現阻害実験も行うことで、目的遺伝子の嗅球介在神経細胞の発達における機能を明らかにする。

具体的にはレンチウイルスにより遺伝子導入された嗅球介在神経細胞とコントロールとして**GFP** 遺伝子のみを遺伝子導入された細胞について以下の点について比較解析をする。嗅球介在神経細胞における神経活動依存的な発達過程としては、既存の神経回路への組み込み・樹状突起の伸展・スパイン形成によるシナプスの成熟などが考えられる。これまでの申請者の実験により、**5T4** 遺伝子を強制発現させた場合には嗅球介在ニューロンの枝分かれが増加し、**NPAS4** 遺伝子を強制発現させた場合にはスパイン数が増加することが明らかになっている（吉原ら、未発表データ、図4）。今後さらにレンチウイルスにより遺伝子導入された嗅球介在神経細胞について、嗅球の特定の細胞層への移動・樹状突起の形態・スパイン及びシナプスの形成について正常の介在神経細胞と比較することで、目的遺伝子の介在神経細胞の発達における機能を明らかにする。

上記の実験と共に、**5T4** 分子と相互作用する遺伝子の探索を **yeast two hybrid** 法によって行う。また、転写因子である **NPAS4** 遺伝子が制御する遺伝子の探索を、クロマチン免疫沈降(**ChIP**) **array** 法を用いて行う。上記の探索実験により、**5T4** 及び **NPAS4** 分子と相互作用する分子もしくはその下流に位置する分子が得られた場合には、それらの分子の嗅球介在ニューロンの発達における機能を前述したレンチウイルスの系を用いて明らかにする。これらの嗅球介在ニューロンの発達を制御する分子の同定及びその分子の発達における機能を明らかにすることで、嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な発達の分子メカニズム解明に向けてさらに大きな進展が得られると考えられる。

4. 研究成果

片鼻を閉じて匂い刺激を遮断すると嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれの長さが短くなり、枝分かれの数が減少することが明らかになった。さらに、DNA マイクロアレイ及び *in situ hybridization* による解析の結果、ロイシンリッチリピートを持った膜タンパク質である **5T4** の発現が嗅球介在ニューロンにおいて神経活動依存的に制御されていることが明らかになった。レンチウイルスを用いて **5T4** を嗅球介在ニューロンにおいて強制発現すると嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれが促進された。また、**5T4** ノックアウトマウスにおいては嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれが野生型に比べて減少していた。これらの結果から **5T4** 分子は嗅球介在ニューロンにおいて神経活動依存的に樹状突起の枝分かれを制御する分子であることが明らかになった。

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1件)

1. Yoshihara S., Takahashi H., Nishimura N., Naritsuka H., Shirao T., Hirai H., Yoshihara Y., Mori K., Stern P.L., and Tsuboi A.
5T4 Glycoprotein regulates the sensory input-dependent development of a specific subtype of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb. *Journal of Neuroscience* 32, 2217-2226 (2012)

[学会発表] (計6件)

国際学会

1. Yoshihara S., Takahashi H., Kinoshita M, Nishimura N and Tsuboi A.
Sensory input regulates the dendritic development of specific neuronal subtypes in the mouse olfactory bulb.
Cold Spring Harbor Meeting: Axon Guidance, Synapse Formation & Regeneration, Cold Spring Harbor, USA (2012).
2. Yoshihara S., Takahashi H., Mori K, Stern PL and Tsuboi A.
5T4 glycoprotein regulates the sensory input-dependent development of a specific subtype of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb.
The 19th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Mumbai, India (2012)

国内学会

3. Yoshihara S., Takahashi H., Kinoshita M, Nishimura N and Tsuboi A.

Sensory experience regulates the dendritic development of specific neuronal subtypes in the mouse olfactory bulb.

第 35 回日本分子生物学会大会、福岡 (2012)

4. 吉原誠一、高橋弘雄、木下雅仁、西村信城、永井拓、山田清文、坪井昭夫

Sensory input regulates the dendritic development of specific neuronal subtypes in the mouse olfactory bulb.

第 35 回日本神経科学学会大会、名古屋国際会議場 (2012).

5. 吉原誠一、高橋弘雄、西村信城、木下雅仁、北村邦夫、坪井昭夫

The proper development of radial glia is required for axonal projection in the mouse olfactory system.

第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (2011).

6. 吉原誠一、高橋弘雄、西村信城、木下雅仁、森憲作、Peter L Stern、坪井昭夫

Oncofetal protein 5T4 regulates the dendrite arborization of olfactory bulb interneurons in an odor-evoked activity-dependent process

第 34 回日本神経科学学会大会、パシフィコ横浜 (2011)

[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

<http://www.narmed-u.ac.jp/~amrc-lab1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉原 誠一 (YOSHIHARA SEIICHI)

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

なし

(3) 連携研究者

高橋 弘雄 (TAKAHASHI HIROO)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 20390685

坪井 昭夫 (TSUBOI AKIO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 20163868