

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700356

研究課題名(和文) 大脳皮質形成における新規移動制御分子Dpy19ファミリーの機能解析

研究課題名(英文) Roles of Dpy19 family in development of the cerebral cortex

研究代表者

渡辺 啓介 (Watanabe, Keisuke)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20446264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：私たちはこれまで哺乳類大脳皮質の発生メカニズムに注目し、複数回膜タンパク質Dpy19L1が発生期マウス大脳皮質に強く発現し、神経細胞移動に深く関わることを明らかにした。しかしながら、中枢神経系の発生・機能におけるDpy19ファミリーの役割については未だ明らかになっていないことが多く、その解明を目的とした。Dpy19L1 K0マウスは多くの個体が致死になるが、一方で生存した少数のK0マウスは恐怖反応の低下がみられた。また、胎生期K0マウスにおいていくつかの脳領域に発生異常が認められた。これらの結果から、Dpy19L1は大脳辺縁系の発生にも関わり、恐怖反応など情動行動に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mammalian cerebral cortex has been evolutionarily expanded. Recently, we have revealed that a multi-transmembrane protein Dpy19L1 is required for migration of glutamatergic neurons in the developing cortex. In mammals, Dpy19 family consists of four members (Dpy19L1-L4). However their functions during development have been unclear. In the study, we examined roles of Dpy19 family members during development. Dpy19 showed distinct expression patterns. A large number of Dpy19L1 homozygotes displayed postnatal lethality. Some Dpy19L1 knockout mice were viable, but smaller in size. Cortical layer formation was apparently normal in Dpy19 knockout brains. Dpy19 homozygotes showed weaker fear responses to predator odours, compared with that of control mice. Furthermore, our in vitro studies suggest a possible association of Dpy19L1 with the endoplasmic reticulum. These results suggest important roles of Dpy19L1 in brain development and innate fear responses.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経発生 大脳皮質 細胞移動

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質の興奮性神経細胞と抑制性神経細胞は、発生期において、大きく異なる細胞移動様式、樹状突起形成パターンをもつが、分子レベルでの違いは不明な点が残されている。申請者はこれまで、Dumpy19 like1 (Dpy19L1)が、発生期大脳皮質の興奮性神経細胞細胞に強く発現し、放射状移動に関わることを明らかにした。Dpy19は線虫から存在し、Qニューロブラストの極性形成・細胞移動に関わる (Honigberg, Kenyon, *Development*, 2000)。ほ乳類では4つの遺伝子からなる複数回膜タンパク質ファミリー (Dpy19 Like1-4)を形成するが、既知の機能ドメインをもたず、分子機能は不明点が多い。しかしながら、DPY19L3と双極性障害との関連 (Smith et al, *Mol Psychiatry*, 2009)が報告され、さらにDPY19L2が雄性不妊症の一種である巨大頭部精子症の原因 (Harbuz et al, *Am J Hum Genet*, 2011、Koscinski et al, *Am J Hum Genet*, 2011)であることが報告され、Dpy19ファミリーが広範かつ重要な機能をもつ可能性が示唆された。しかしながら、哺乳類におけるDpy19ファミリーの機能はほとんど未だ明らかになっていないことが多い。

そこで本研究課題では、Dpy19 familyの機能とシグナルの解析を通して、大脳皮質を中心とする中枢神経系の発生の分子メカニズムの解明と高次脳機能を担う組織構造基盤を理解することを目的とした。

2. 研究の目的

Dpy19L1が大脳皮質神経細胞の移動に関わることを明らかにしたが、Dpy19ファミリーの神経系発生における機能については、未だに多くの点を明らかできていない。そこで、大脳皮質形成を中心にDpy19ファミリーメンバーの機能を明らかにし、さらにシグナルについて基礎的なデータを得る。この目的の達成のため、以下の3点について研究を実施した。

- (1) Dpy19の発現パターンと細胞内局在解析
- (2) Dpy19ノックアウト (KO)マウスを用いたDpy19ファミリーの機能解析
- (3) Dpy19L1 KOマウスの行動異常解析

(1)により、Dpy19がいつどこで神経回路形成に関わるのか、(2)では、個体レベルの解析を用いて、回路形成におけるDpy19の重要性を明らかにし、(3)ではDpy19が情動行動など個体の行動をいかに関わっているかを解明する。これらの解析を行うことにより、中枢神経系におけるDpy19の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) Dpy19の発現パターンと細胞内局在解析

- ① 中枢神経系におけるDpy19L1の発現解析
中枢神経系形成におけるDpy19ファミリーの機能を明らかにするため、まず様々な発生ステージ・脳領域におけるDpy19ファミリーメンバーの発現をin situ hybridization法により検討した。

- ② 培養細胞系を用いたDpy19の細胞局在解析

細胞内におけるDpy19の機能については明らかになっていないことが多い。そこで、COS-7細胞にDpy19L1-GFP発現プラスミドを導入し、GFPに対する免疫染色をおこなうことで、その細胞内局在を検討した。さらに小胞体膜を赤色蛍光タンパク質DsRed2でラベルすることができるER-DsRed2プラスミドを共導入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてタイムラプスイメージングを行うことにより、Dpy19L1-GFPタンパク質の細胞内動態を検討した。

- (2) Dpy19ノックアウト (KO)マウスを用いたDpy19ファミリーの機能解析

マウス個体におけるDpy19ファミリーメンバーの機能を解析する目的でDpy19 KOマウスの作製および表現型の解析を行った。

- ① Dpy19L1 KOマウスの作製および表現型解析

Dpy19L1コンディショナルノックアウトマウスを新潟大学脳研究所 崎村健司先生らとの共同研究により作製した。さらに胎生期のDpy19L1 KOマウスの脳切片を作製し、免疫染色などにより、表現型解析を行った。

- ② Dpy19L3 KO, Dpy19L4 KOマウスの組織化学的解析

Dpy19L3、L4 KOマウスの大脳皮質における大脳皮質形成に異常がみられるかについて組織化学的手法を用いて検討した。さらにDpy19L3;L4ダブルKOマウスを作製・解析を行った。

- (3) Dpy19L1 KOマウスの行動異常解析

生存したDpy19L1 KOマウスの行動異常を検討するため、天敵であるキツネの排泄物の臭い成分の一つであるトリメチルチアゾリン (TMT)を用いた忌避反応試験を行った。マウスケージの端にTMTをしみ込ませた濾紙をおき、5分間のマウスの行動を観察・記録し、TMTに対して忌避反応を示すかを調べた。

4. 研究成果

- (1) Dpy19の発現パターンと細胞内局在解析

- ① 中枢神経系におけるDpy19の発現解析
これまで中枢神経系におけるDpy19ファミリーメンバーの発現についてはほとんど

明らかになっていない。そこで、in situ hybridization (ISH)法を用いて、発生期の脳における Dpy19 メンバーの発現を検討した結果、Dpy19L1 が脳皮質に最も強く発現し、Dpy19L3 も発現することがわかった (図 1A,C,E,G)。RT-PCR を行った結果、Dpy19L1-L4 すべてのメンバーの発現が認められたが、今回 ISH では Dpy19L2,L4 の強い発現を観察することはできなかった (図 1B,D)。また、Dpy19L1 は発生ステージによって大きく発現が変化することが明らかになった (図 1A,E)。以上の結果から、発生期脳において Dpy19L1 と L3 が強く発現し、発生制御に関わっている可能性が示唆された。

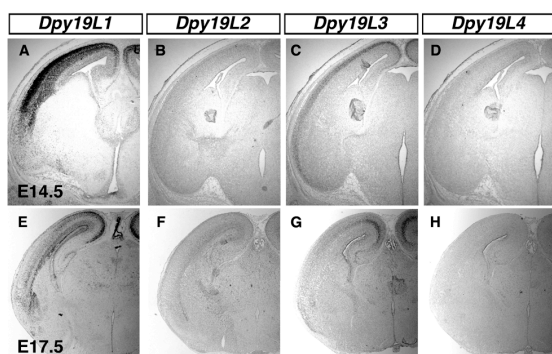


図1. 発生期前脳における Dpy19 ファミリーメンバー(Dpy19L1-L4)の発現パターン。(A-D) マウス胎生14日目の前額断切片。(E-H) 胎生17日目。

② 培養細胞系を用いた Dpy19 の細胞局在解析

Dpy19L1 の細胞内局在を明らかにするため、COS-7 細胞に Dpy19L1-GFP 発現プラスミドをトランスフェクションし、GFP の局在を検討した結果、核周囲に強く、また細胞質中に網目状に局在することがわかった (図 2A)。Dpy19L1 タンパク質は複数回の予想膜貫通領域をもつため、小胞体マーカー Calreticulin と共染色を行った結果、Dpy19L1 と Calreticulin は類似した局在を示すことがわかった (図 2A)。そこで、小胞体をラベルできる ER-DsRed2 と共導入し、タイムラプスイメージングを行った結果、Dpy19L1-GFP は小胞体、核膜に強く局在し、ダイナミックに細胞内を動くことが明らかになった (図 2B)。培養細胞を用いた強制発現系の結果ではあるが、哺乳類 Dpy19L1 が小胞体に局在し、機能している可能性が示唆された。近年、線虫の dpy-19 が小胞体に局在する新規の糖転移酵素であることが報告されたため (Buettner et al., Mol. Cell, 2013)、哺乳類においても糖転移酵素である可能性も考えられる。しかしながら、哺乳類 Dpy19L2 については精子の核膜に局在し、先体との結合に関与しているという報告もなされたため (Pierre et al., Development, 2012)、Dpy19L1 の細胞内局在とその機能に

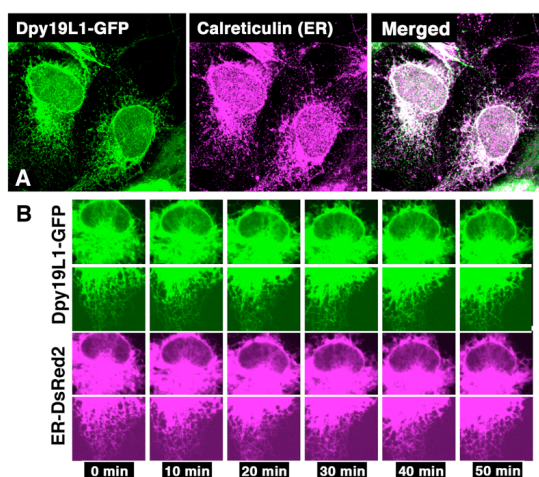


図2. COS-7 細胞における Dpy19L1-GFP の小胞体への局在。COS-7 に Dpy19L1-GFP 発現プラスミドを導入し、24 時間後に細胞内局在を検討した。(A) GFP (緑)、小胞体マーカー Calreticulin (マゼンタ)。(B) タイムラプスイメージングによる Dpy19L1-GFP と小胞体の動態観察。

ついては、今後解析を進める必要があると考えられる。

(2) Dpy19 ノックアウト (KO) マウスを用いた Dpy19 ファミリーの機能解析

① Dpy19L1 KO マウスの作製および表現型解析

脳皮質形成における Dpy19L1 の機能を調べるため、Dpy19L1 コンディショナル KO マウスを作製した。まず、全身で Dpy19L1 をノックアウトした null マウス (Dpy19L1 KO マウス) の解析を行った。3 週齢において、Dpy19L1 ヘテロマウス同士の交配による KO マウスの出現割合は 8% (野生型であれば 25%) と低く、多くの Dpy19L1 KO マウスが生後 1 日以内に致死になってしまうことがわかった (図 3A)。しかしながら、一方で少数の KO マウスは野生型と比べ低体重を示すが生存することができた (図 3B)。発生期の Dpy19L1 KO マウスについては、低体重を示す個体もいれば、正常な個体も観察され、個体により表現型に大きな違いがみられた。Nissl 染色や脳皮質層特異的マーカータンパク質に対する免疫染色により脳皮質形成異常を調べたところ、低体重を示した KO マウスについては脳皮質がコントロールに比較して薄くなっていたが、層形成については明らかな異常は認められなかった (図 3C,D)。

胎生期の Dpy19L1 KO マウスにおいて、脳皮質以外の脳領域に複数の異常が生じていることを見出した。まず、胎生期脳腹内側部の脳室層に顕著な細胞構築異常が観察された (図 4A,B)。野生型マウスにおいては脳室層に神経幹 (前駆細胞) が整然と配列されているのに対し、KO マウスでは島状に分布

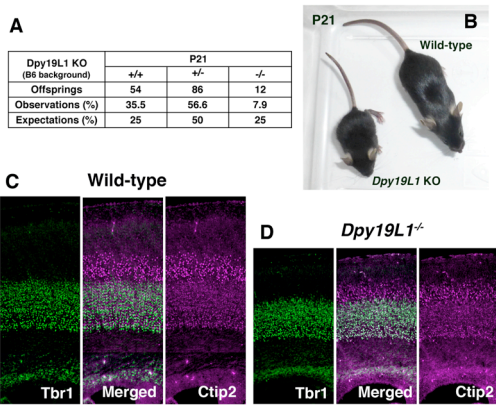


図 3. Dpy19L1 KO マウスの作製と解析。(A) Dpy19L1 ヘテロマウス同士の交配による産仔の遺伝子型の割合。(B) 生存した KO マウスは野生型と比較して低体重を示した。(C, D) 大脳皮質の層形成異常の解析。Tbr1: 大脳皮質 6 層マーカー、Ctip2: 5 層マーカー。KO マウスにおいて明らかな層構築異常はみられなかった。

することがわかった。さらに、beta-III tubulin 抗体を用いて神経細胞を染色すると、野生型で観察される beta-III tubulin 免疫陰性の脳室層が KO マウスでは認められず、脳室直下 (図 4D 右図: 黒線) まで神経細胞が異所性に存在した。これらの結果から、Dpy19L1 KO マウスにおいて、大脳腹内側部の脳室層において、premature な神経分化が起こっている可能性が示唆された。この領域の神経前駆細胞は大脳辺縁系の中隔野周囲の神経細胞の産生に関わることが報告されている。

嗅覚系に深い関わりをもつ前交連の投射異常がみられた。個体により表現型にばらつきがみられたが、前交連が二つに分かれてしまう個体 (図 4F)、正常マウスであれば正中で交叉するはずの線維束が、交叉せず背側に向かう個体などが観察された (図 4E, G)。

以上の結果から Dpy19L1 は大脳形成期において、大脳辺縁系の発生の制御に関わる可能性が示唆された。

② Dpy19L3, および Dpy19L4 ミュータントマウスの組織化学的解析

中枢神経系における Dpy19L3 および L4 の役割を明らかにするため、Dpy19L3 および L4 ミュータントマウスを作製し、組織化学的解析を行った。Dpy19L3, L4 ホモマウスともに正常な発育を示し、さらに Nissl 染色や大脳皮質層特異的マーカータンパク質に対する免疫染色によっては大脳皮質に顕著な細胞構築異常を見出すことはできなかった (図 5A-F)。Dpy19L3/L4 ダブルミュータントマウスを作製したが、上記同様の方法では大脳皮質形成に異常を観察す

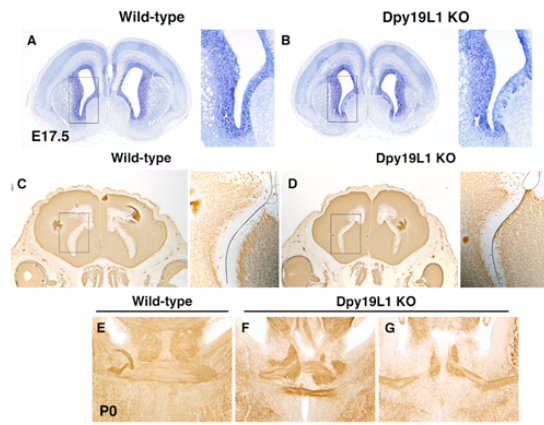


図 4. 胎生期 Dpy19L1 KO マウスの神経回路形成異常。(A, B) Nissl 染色。(C, D) betaIII tubulin 免疫染色。胎生期 Dpy19L1 KO マウスの腹内側部の脳室層に細胞構築異常が観察される。(E-G) Neurofilament 免疫染色。Dpy19L1 KO マウスについて、前交連の投射異常がみられた。

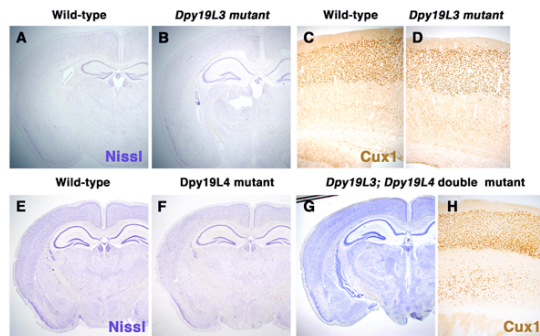
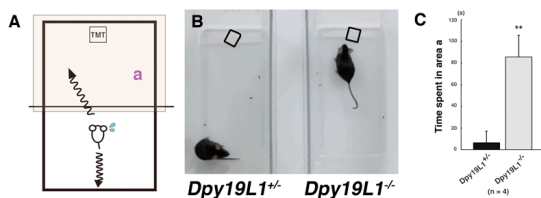


図 5. Dpy19L3, および Dpy19L4 ミュータントマウスの作製と 2 ヶ月齢マウスの解析。(A-D) Dpy19L3 ミュータントマウス。(A, B) Nissl 染色。(C, D) Cux1: 大脳皮質 2-4 層マーカー。(E, F) Dpy19L4 ミュータントマウス。Nissl 染色。(G, H) Dpy19L3; Dpy19L4 ダブルミュータントマウス。L3; L4 ダブルホモマウスについても、明らかな大脳皮質形成異常は観察されなかった。

ることができなかった (図 5G, H)。

(3) Dpy19L1 KO マウスの行動異常解析

上述したように、多くの Dpy19L1 KO マウスは生後致死となる。しかしながら、マウスを飼育する過程において、生存した Dpy19L1 KO マウスが非常に興味深い行動異常を示すことがわかった。成熟した 2 ヶ月齢の Dpy19L1 KO マウスは飼育者の手から逃げずに怖がらない傾向があった。そこで、天敵であるキツネの排泄物の臭い成分の一つであるトリメチルチアゾリン (TMT) を用いた忌避反応試験を行った結果、野生型マウスは TMT に対して強い忌避反応を示すのに対して、Dpy19L1 KO マウスは忌避反応が著



しく低下していることが示された (図 6)。

図 6. Dpy19L1 KO マウスが示す恐怖反応の異常 (A, B) キツネの分泌物成分 TMT を用いた忌避反応実験。(C) ケージの TMT 側半分にとどまる時間 (5 分間のテスト)。ヘテロマウスは TMT から遠ざかる傾向があるが、KO マウスは気にせず動き回る。

以上の結果から、これまで Dpy19L1 が大脳皮質形成に深く関わることを明らかにしたが、それ以外の脳領域、特に大脳辺縁系の神経回路形成にも関わっていることが示唆された。さらに多くの Dpy19L1 KO マウスは致死になってしまうが、生存した KO マウスについては本能的な恐怖反応に異常がみられる可能性を示した。胎生期に異常みられた脳領域は情動行動に深く関わる領域であるため、この部位の異常が恐怖行動異常に関連している可能性が強く考えられる。

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 2 件)

- ① Horie M, Watanabe K, Bepari AK, Nashimoto JI, Araki K, Sano H, Chiken S, Nambu A, Ono K, Ikenaka K, Kakita A, Yamamura KI, Takebayashi H. Disruption of actin-binding domain-containing Dystonin protein causes dystonia musculorum in mice. **Eur. J. Neurosci.**, 40, 3458-3471, 2014. (査読あり)
- ② Bepari AK, Watanabe K, Yamaguchi M, Tamamaki N, Takebayashi H. Visualization of odor-induced neuronal activity by immediate early gene expression. **BMC Neurosci.**, 13, 140, 2012. (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 渡辺啓介. 「大脳皮質特異的な発生メカニズムの解明」 第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回 日本生理

学会 合同大会、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)、2015 年 3 月 21-23 日。

- ② 渡辺啓介、周麗、備前典久、阿部学、夏目理恵、崎村建司、竹林浩秀. 「Dpy19 ファミリーによる大脳新皮質の発生制御」 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学学会大会 合同年会、奈良県分館 (奈良県奈良市)、2014 年 9 月 29 日-10 月 1 日。
- ③ 渡辺啓介、周麗、阿部学、夏目理恵、崎村建司、竹林浩秀. 「Dpy19 ファミリーによる大脳新皮質の発生制御」 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、自治医科大学 (栃木県下野市)、2014 年 3 月 27-29 日。
- ④ 渡辺啓介、周麗、阿部学、夏目理恵、崎村建司、竹林浩秀. 「Dpy19 ファミリーによる大脳新皮質発生制御」 第 19 回グリアクラブ、KKR 湯沢 (新潟県魚沼郡湯沢町)、2014 年 2 月 28 日-3 月 2 日。
- ⑤ 渡辺啓介、周麗、阿部学、竹田直樹、荒木喜美、夏目理恵、崎村建司、竹林浩秀. 「Dpy19 ファミリーによる大脳新皮質の発生制御」 第 54 回生化学懇話会、新潟大学脳研究所 (新潟県新潟市)、2013 年 7 月 13 日。
- ⑥ 渡辺 啓介. 「大脳皮質形成における Dpy19 ファミリーの役割」熊本シンポジウム 2013、熊本大学発生医学研究所 (熊本県熊本市)、2013 年 6 月 25-26 日。
- ⑦ 渡辺 啓介. 「哺乳類大脳皮質形成における Dpy19 ファミリーの役割」 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、サンポート高松 (香川県高松市)、2013 年 3 月 28-30 日。
- ⑧ Watanabe K, Bepari AK, Takeda N, Araki K, Takebayashi H. Roles of Dpy19 family in development of the cerebral cortex. 第 55 回日本神経化学学会・第 11 回 APSN 合同国際大会、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)、2012 年 9 月 30 日-10 月 2 日。

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 啓介 (WATANABE, Keisuke)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号： 20446264