

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350980

研究課題名(和文)体性感覚野の神経回路形成における神経細胞多様性の役割

研究課題名(英文)The role of neuronal diversity in the neural circuit of somatosensory cortex

研究代表者

平山 晃斉 (HIRAYAMA, Teruyoshi)

大阪大学・生命機能研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：40437398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：複数のクラスター型プロトカドヘリン(c-Pcdh)変異マウスおよびコンディショナルノックアウトマウス(cKO)を用いて、大脳皮質体性感覚野のバレル構造形成におけるc-Pcdhの役割について解析をおこなった。その結果、Pcdh-alpha、Pcdh-beta、Pcdh-alpha-beta欠損マウスでは、バレル構造形成に異常は認められなかった。Pcdh-gamma欠損マウスは生後1日以内に死亡するため、cKOマウスを用いて解析したところ、バレル構造形成に変化が認められた。これらの結果を受け、CRISPR/Cas9システムを用いて新たなc-Pcdh遺伝子改変マウスの作製をおこなった。

研究成果の概要(英文)：Using several c-Pcdh deletion mutant and conditional knockout (cKO) mouse lines, I investigated the role of c-Pcdh in the somatosensory cortical barrel formation. Pcdh-alpha, Pcdh-beta and Pcdh-alpha-beta deletion mutant mice showed normal barrel formation. Pcdh-gamma deletion mutant mice died within 24h after birth. I analyzed Pcdh-gamma cKO mice and found that obscure barrel formation. Based on these results, I generated c-Pcdh gene modified mouse using CRISPR/Cas9 system.

研究分野：神経科学 ゲノム科学

キーワード：神経細胞 多様性 神経回路形成

1. 研究開始当初の背景

脳には、莫大な数の神経細胞が個性をもちながら存在している。これらは、複雑な神経回路網を形成して統合的に活動する脳の基盤となっている。しかし、個々の神経細胞が個性を持つに至るその分子的基盤は未だ明らかとは言えない。

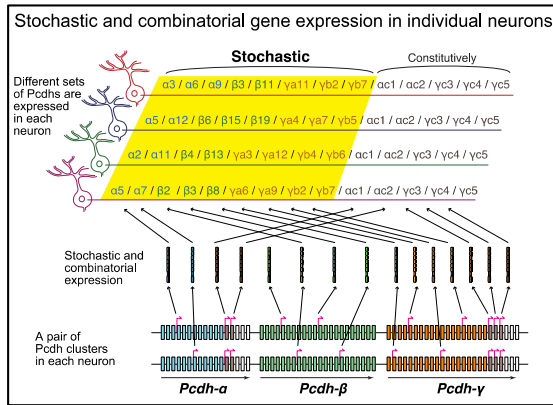


図1 *c-Pcdh* の遺伝子構造と個々の神経細胞における発現様式

クラスター型プロトカドヘリン(*c-Pcdh*)遺伝子群は、*Pcdh*- α 、 β 、 γ の3つのクラスターからなり、マウスでは計58種類の遺伝子からなる(図1)。一つの神経細胞には、異なる種類の*c-Pcdh*遺伝子が複数発現しており、その種類は個々の神経細胞で異なることが明らかとなっている(Esumi et al. *Nat. Genet.* 2005, 37, 171-176)。また、一つの神経細胞に発現された複数の*c-Pcdh*タンパク質は、多量体を形成してホモフィリックな接着活性を示すことが報告されている(Schreiner & Weiner *PNAS* 2010, 107, 14893-8)。これらの結果から、*c-Pcdh*遺伝子群は、一つの神経細胞に数種類の*c-Pcdh*遺伝子を発現し、かつ多量体を形成することで神経細胞に多様性を与えることができる分子であることが分かってきた。最近、*Pcdh*- α クラスターを全て欠損させたマウスの解析により、小脳プルキンエ細胞や網膜アマクリン細胞で、樹状突起が互いに反発することなく絡まってしまう dendritic self-avoidance の異常が見つかり、*Pcdh*- α が神経細胞の自己と非自己に關与する可能性が報告された(Lefebvre et al. *Nature* 2012, 488, 517-521)。一方、*Pcdh*- β クラスターのうち1つでも遺伝子があれば dendritic self-avoidance の異常が無くなることから、*c-Pcdh*の多様性の役割は未だ明らかとは言えない。

私はこれまで、個々の神経細胞で発現する*c-Pcdh*遺伝子の種類が異なることに注目して、その発現制御機構の解析を行い、明らかとなった制御機構を操作することで*c-Pcdh*の多様性の役割を明らかとする研究を進めてきた。その中で、染色体高次構造形成に関わる CCTCC(CTCF)結合因子を欠損させたマウスでは、*c-Pcdh*遺伝子群の遺伝子発現が顕

著に低下すること、大脳皮質体性感覚野のパレル構造が全く形成されないことを見出した(図2)(Hirayama et al. *Cell Rep.* 2, 345-357, 2012)。

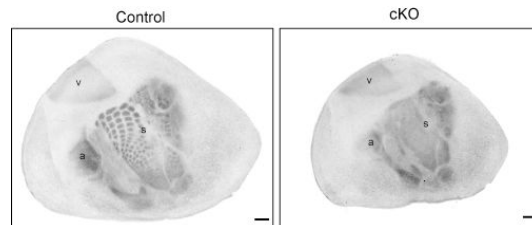


図2 *Ctcf* 欠損マウスにおける大脳皮質の感覚地図
Ctcf 欠損マウス(cKO)では、感覚地図は正常に形成されているが、体性感覚野のパレル構造(ヒゲ1本1本と対応)が形成されない。s; 体性感覚野、a; 聴覚野、v; 視覚野。Scale = 500 μ m。

また、私たちが同定した *Pcdh*- β のエンハンサーを含む領域を欠損させたマウスでも、パレル構造が全く形成されないことが分かった(Yokota et al. *J Biol Chem.* 286, 31885-95, 2011)。これらの結果は、*c-Pcdh* 遺伝子群がパレル構造形成に働いている可能性を強く示唆する。

パレル構造は、齧歯類をはじめ様々な哺乳類の大脳皮質において組織化学的に容易に可視化できる神経回路で、生後のヒゲからの入力刺激を受ける事で、生後1週間かけて形成される。また、生後数日以内にヒゲからの入力刺激を受けなかった場合には、パレル構造は形成されない。これらの知見から、パレル構造の形成は神経活動に依存した機能的な神経回路形成のメカニズムを解析するのに適したモデルの一つとして、分子的、生理学的な解析がなされてきた。

2. 研究の目的

マウス大脳皮質体性感覚野には、生後にヒゲからの刺激入力を受けることで、1週間かけて形成される神経回路が、パレルと呼ばれる樽状の特徴的な構造体を形成する。私は、この神経活動に依存したパレル構造の形成に、クラスター型プロトカドヘリン(*c-Pcdh*)遺伝子群が働いている可能性を見出した。*c-Pcdh*は58種類の遺伝子からなり、個々の神経細胞で複数の遺伝子を異なる組み合わせにより発現する事で、神経細胞に莫大な多様性を生む細胞接着分子である。そこで、本研究では、パレル構造の形成に*c-Pcdh*の分子的多様性が働いている事を示し、*c-Pcdh*の遺伝子数がどのくらいあればパレル構造が形成できるのかを明らかとすることによって、個々の神経細胞の多様性が神経活動に依存した神経回路形成の基盤となっている事を示すことを目的とする。

3. 研究の方法

以下の遺伝子欠損マウス()が作製済みである。 *Pcdh-^{-/-}*、 *Pcdh-^{-/-}*、 *Pcdh-^{-/-}*、 *Pcdh-^{-/-}*、 *Pcdh-^{-/-}*、 *Pcdh-^{-/-}* マウス。また、*Pcdh-^{-/-}* クラスターのコンディショナルノックアウトマウス(cKO)、及び *Pcdh-^{-/-}* のエンハンサーである CCR を含む領域を欠損した CCR マウスも作製済みである。 CCR マウスは、*Pcdh-^{-/-}* のエンハンサー領域に加えて、*Pcdh-^{-/-}* 遺伝子の poly-A signal 配列と CCR 領域に含まれる別の遺伝子 *Diap1* の一部が欠損している。このため、CCR マウスは、*Pcdh-^{-/-}* クラスターの発現が著しく減少するのに加えて、*Pcdh-^{-/-}* クラスターの発現が半分以下になるとともに、*Diap1* の発現が無くなっている(Yokota et al. *J Biol Chem.* 286, 31885-95, 2011)。 *Diap1* 遺伝子の欠損マウスでは、脳に大きな異常は報告されていない。

Pcdh-^{-/-} クラスターを欠損したマウスは、生後すぐに振戦をおこして 24 時間以内に死亡することが分かっている。脊髄で細胞死が生じることが原因と考えられる。一方、大脳皮質では細胞死の増加は認められない。マウスが生後すぐに死亡するためにバレル構造の解析ができなくなる事を回避するため、*Pcdh-^{-/-}* を欠損させた上で、大脳皮質特異的に *Pcdh-^{-/-}* クラスターを欠損させる cKO マウスの作製をおこなう。また、*Pcdh-^{-/-}* C グループは、ほぼ全ての神経細胞で恒常的に発現しているため欠損させずに残しておき、確率的な発現を示す *Pcdh-^{-/-}* アイソフォームだけを欠損させたマウスの作製もおこなう。複数の cKO マウスの作製をおこなうため、従来の方法で作製すると多くの時間と労力を必用とする。本研究では、近年開発された CRISPR/Cas9 システムを用いて、受精卵に対して直接 loxP 配列を挿入することで cKO マウスを直接得る方法をとる (Wang et al. *Cell*, 153, 910-918, 2013)。これにより、マウスの作製に要する時間の大幅な短縮を計る。

4. 研究成果

作製されたマウス、およびマウス間で交配することにより得られた *c-Pcdh* 遺伝子の多様性が減少したマウスの大脳皮質体性感覚野をシトクローム C 染色、およびニッスル染色することでバレル構造の解析をおこない、以下の結果を得た。 *Pcdh-^{-/-}* / *Pcdh-^{-/-}* マウス、および *Pcdh-^{-/-}* / *Pcdh-^{-/-}* マウスは、バレル構造に明らかな異常が認められなかった。次に *Pcdh-^{-/-}* / *Pcdh-^{-/-}* マウスの解析をおこなったが、バレル構造に明らかな異常が認められなかった。 *Pcdh-^{-/-}* / *Pcdh-^{-/-}* マウスは生後すぐに死亡することから、機能的にも *Pcdh-^{-/-}* の働きが重要であることが示唆された。

次に、*Pcdh-^{-/-}* クラスターをコンディシヨ

ナルに欠損させる *Pcdh-^{-/-}* flox マウスを用いて、解析をおこなった。シトクローム C 染色をおこなうと、バレル構造が少しぼやけて見えることが分かった。一方、ニッスル染色をおこなうとバレル構造が不鮮明になっていることがわかった。

これらの結果から、大脳皮質体性感覚野のバレル構造形成には *Pcdh-^{-/-}* クラスターが関与していることが示された。一方、 *Pcdh-^{-/-}* / *Pcdh-^{-/-}* マウスでは、バレル構造に異常が認められないことから、少なくとも *Pcdh-^{-/-}* クラスターの片方のアレルがあればバレル構造形成ができることが明らかとなった。

Pcdh-^{-/-} マウスは生存して交配も可能で、バレル構造も正常であり、 *Pcdh-^{-/-}* マウスは生後すぐに死亡することから、 *Pcdh-^{-/-}* flox マウスの *Pcdh-^{-/-}* クラスターと *Pcdh-^{-/-}* クラスターを CRISPR/Cas9 システムを用いて欠損させておいて Cre 依存的に *Pcdh-^{-/-}* クラスターを欠損させる *Pcdh-^{-/-}* _ *Pcdh-^{-/-}* flox マウスの作製をおこなった。はじめに *Pcdh-^{-/-}* クラスターと *Pcdh-^{-/-}* クラスターを一度に欠損させることを試みたが、欠損させる領域が大き過ぎたためか目的のマウスが得られず多くの時間を要した。そこで、まず *Pcdh-^{-/-}* クラスターの遺伝子群が共通に用いる遺伝子領域に CRISPR/Cas9 システムを用いて欠失を入れたマウスの作製をおこなった。作製された *Pcdh-^{-/-}* CR_ *Pcdh-^{-/-}* flox マウスの受精卵を用いて、さらに CRISPR/Cas9 システムで *Pcdh-^{-/-}* クラスターを欠損させたマウスの作製をおこなった。また、 *Pcdh-^{-/-}* マウスの *Pcdh-^{-/-}* クラスターの可変領域エキソンに loxP 配列を挿入したマウスの作製もおこなった。

これらの新たに作製したマウスを用いることで体性感覚野のバレル構造形成をモデルとした *c-Pcdh* 遺伝子群の多様性の意義をさらに解析することが可能となった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

(1), Onishi K, Uyeda A, Shida M, Hiramaya T, Yagi T, Yamamoto N, Sugo N. Genome Stability by DNA polymerase in Neural Progenitors Contributes to Neuronal Differentiation in Cortical Development. *J Neurosci.* 2017 37, 8444-8458. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0665-17.2017 (査読有)

(2) Jiang Y, Loh YE, Rajarajan P, Hiramaya T, Liao W, Kassim BS, Javidfar B, Hartley BJ, Kleofas L, Park RB, Labonte B, Ho SM, Chandrasekaran S, Do C, Ramirez BR, Peter CJ, CW JT, Safaie BM, Morishita H, Roussos P, Nestler EJ, Schaefer A, Tycko B,

Brennand KJ, Yagi T, Shen L, Akbarian S., The methyltransferase SETDB1 regulates a large neuron-specific topological chromatin domain. *Nat Genet.* 2017 49(8):1239-1250. doi: 10.1038/ng.3906 (査読有)

(3) Hirayama T and Yagi T, Regulation of clustered protocadherin genes in individual neurons. *Semin Cell Dev Biol.* 2017 Jun 4. pii: S1084-9521(17)30254-9. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.05.026. (査読無)

(4) Hasegawa S, Kumagai M, Hagihara M, Nishimaru H, Hirano K, Kaneko R, Okayama A, Hirayama T, Sanbo M, Hirabayashi M, Watanabe M, Hirabayashi T, Yagi T. Distinct and Cooperative Functions for the *Protocadherin-1, -2, and -3* Clusters in Neuronal Survival and Axon Targeting. *Front Mol Neurosci.* 2016 Dec 23;9:155. Doi: 10.3389/fnmol.2016.00155. (査読有)

(5) Tarusawa E, Sanbo M, Okayama A, Miyashita T, Kitsukawa T, Hirayama T, Hirabayashi T, Hasegawa S, Kaneko R, Toyoda S, Kobayashi T, Kato-Itoh M, Nakauchi H, Hirabayashi M, Yagi T, Yoshimura Y. Establishment of high reciprocal connectivity between clonal cortical neurons is regulated by the Dnmt3b DNA methyltransferase and clustered protocadherins. *BMC Biol.* 2016 Dec 2;14(1):103. DOI: 10.1186/s12915-016-0326-6. (査読有)

(6) Toyoda S, Kawaguchi M, Kobayashi T, Tarusawa E, Toyama T, Okano M, Oda M, Nakauchi H, Yoshimura Y, Makoto S, Hirabayashi M, Hirayama T, Hirabayashi T, Yagi T. Developmental epigenetic modification regulates stochastic expression of clustered Protocadherin genes, generating single neuron diversity. *Neuron.* 2014 82, 94-108. DOI;10.1016/j.neuron.2014.02.005. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

(1) 平山晃斉、Niels Galjart、八木健、大脳皮質神経幹細胞における DNA 結合因子 CTCF の役割、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸) 2015 年 12 月 1 ~ 4 日

(2) 有賀理恵、谷垣宏美、平山晃斉、吉武講平、足澤悦子、Niels Galjart、吉村由美子、渋木克栄、八木健、CTCF 欠失は大脳皮質抑

制性神経細胞の分布と神経活動に影響を及ぼす、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸) 2015 年 12 月 1 ~ 4 日

(3) 角岡佑紀 平山晃斉 中山寿子 足澤悦子 崎村建司 Niels Galjart 吉村由美子 橋本浩一 八木健、プルキンエ細胞における CTCF 欠損は樹状突起に Giant Lamellar Body の形成を即す、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸) 2015 年 12 月 1 ~ 4 日

(4) 植田堯子、大西公平、菅生紀之、豊田俊輔、平山晃斉、八木健、山本亘彦、生後発生過程の大脳皮質において pol1 欠損細胞は 2 本鎖 DNA 切断を異常に蓄積させる、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸) 2015 年 12 月 1 ~ 4 日

(5) 谷垣 宏美、八木 健、木津川 尚史、平山 晃斉、渋木 克栄、吉武 講平、Galjart Niels、CTCF は抑制性神経細胞の発生、発達、移動に重要な因子である、第 37 回日本神経科学学会 (横浜) 2014 年 9 月 11 ~ 13 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 晃斉 (HIRAYAMA, Teruyoshi)
大阪大学・生命機能研究科・特任講師
研究者番号 : 40437398