

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640026

研究課題名(和文) 神経細胞のマクロ形態を制御する新しい機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms to control morphologies of postmitotic neurons

研究代表者

斎藤 哲一郎 (SAITO, Tetsuichiro)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00202078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞は各サブタイプに特異的な形態を有する。本研究では、未だに不明な点が多い神経細胞のサブタイプ特異的なマクロ形態を制御する機構を明らかにすべく、中枢神経系の様々な領域で移動を終了した神経細胞で特異的に発現を誘導できる実験系を開発した。さらに、大脳新皮質形成時の初期神経幹細胞の維持に必須なNeuroproタンパク質が、初期胚の核小体に局在し胚発生に必須であるとともに、神経細胞の分化方向を決定し細胞のマクロ形態制御に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Neurons are distinguished by morphologies typical of their subtypes. To unravel molecular mechanisms to control the subtype-specific morphologies, we have developed the gene expression system in which a gene of interest is specifically induced in postmitotic neurons in vivo. We have also found that Neuropro, which is necessary for the maintenance of neural progenitors in the early forebrain, is localized in the nucleolus in the developing embryo.

研究分野：神経科学

キーワード：遺伝子 細胞・組織 神経科学 脳・神経 発生・分化 神経細胞 電気穿孔法 テトラサイクリン

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の形態は各サブタイプに特徴的であり、神経系の情報処理の要となっている。多くの情報を集める小脳のプルキンエ細胞では樹状突起が極度に発達しているなど、神経細胞は情報処理で果たすべき個々の役割に適した形をしている。これまで軸索と樹状突起を分ける神経細胞内の極性や、樹状突起のスパインの形成などに関しては数多くの研究がなされてきた。しかし、神経細胞のマクロなレベルの形態に関しては、不明な点が多く残されている。その大きな原因として、遺伝子ノックアウトマウスや強制発現などのこれまでの多くの実験系では、時期特異的に遺伝子の gain of function や loss of function 解析を厳密に行うことが困難であったことが挙げられる。そのため、プロニューラル遺伝子の *Neurog2* などのノックアウトや強制発現などで神経細胞の形態が変化しても、神経細胞の分化や移動、neuronal identity などの様々な変化も同時に生じており、神経細胞の形態変化が何に起因するかを明確に調べることが不可能であった。この問題を解決するため、研究代表者等は、以前に開発した電気穿孔法を用いたマウス胎仔神経系への遺伝子導入法に加え、最近、テトラサイクリンを用いた遺伝子発現誘導系を細工し、特定の時期で遺伝子発現を誘導できる新しい実験系を開発した。

2. 研究の目的

未だに不明な点が多い神経細胞のマクロ形態を制御する機構に分子と個体の両レベルで直接的にアプローチすべく、研究代表者等が開発した電気穿孔法を用いた遺伝子導入法とテトラサイクリン遺伝子発現誘導系を進展させ、マウス個体内で細胞分化・移動・樹状突起発達を起こす様々な神経細胞において特定の時期で特異的に遺伝子発現を誘導できる新しい実験系を確立する。さらに、研究代表者等の実験により神経細胞の形態に影響を与えることが示唆されている遺伝子の発現を厳密に制御することにより、どの時期で神経細胞の形態・性質が決まるのかを明らかにするとともに、神経細胞の形態・性質と神経系の機能の関係を個体レベルで解明する研究へ新しい道を拓くことを目的とする。

3. 研究の方法

研究代表者等が開発した電気穿孔法を用いたマウス胎仔への遺伝子導入法とテトラサイクリン遺伝子発現誘導法を組み合わせた独自の実験系を軸として、神経細胞の形態・性質を制御する分子機構をマウス個体のレベルで解析する。

4. 研究成果

研究代表者等が開発した電気穿孔法を用いた遺伝子導入法やテトラサイクリン遺伝子発現誘導法などの独自の実験系を進展・応用させ、マウス中枢神経系のほぼ全ての部位の神経細胞において任意の時期に遺伝子発現を誘導できる新しい実験系の開発に成功した。具体的には、様々な時期の妊娠マウスに子宮内手術法もしくは子宮外手術法を施し電気穿孔法により遺伝子を導入後、出生前胎仔もしくは出生後マウスヘキシサイクリンを投与することにより、神経細胞の分化や移動、樹状突起発達期などの特定の時期のみで遺伝子発現を誘導できるとともに、遺伝子の発現量をドキシサイクリンの濃度依存的に調節できる実験系を初めて確立した(雑誌論文の Sato et al. (2015)、雑誌論文の Saito (2015)、雑誌論文の Saito (2015))。特に、ドキシサイクリン注入前では遺伝子の発現をほぼ完全に抑えつつ、大脳新皮質の興奮性神経細胞のみならず抑制性神経細胞や小脳のプルキンエ細胞、脊髄の様々な神経細胞など中枢神経系のほぼ全域の神経細胞で時期特異的に発現を誘導することが可能であった。これにより、これまで神経幹細胞の時点から発現し続けていた遺伝子を移動終了後などの特定の時期のみで特定種の神経細胞で発現誘導させることが可能となった。

一方、矩形波パルスを用いた電気穿孔法を分化後の培養神経細胞に応用することにより、細胞の生存率を高い状態で維持しつつ、再現性よく高い遺伝子導入効率を実現できる遺伝子導入法を開発した(雑誌論文の Baba and Saito (2015))。また、この遺伝子導入法を体外培養マウス初期胚に応用し、受精卵の全割球もしくは一部の割球のみに遺伝子導入できる新しい実験系の開発にも成功した(雑誌論文の Hashimoto et al. (2015))。これらの実験系を、上記のマウス胎仔神経系への遺伝子導入法と組み合わせ、細胞のマクロ形態をマウス個体の *in vivo* と *in vitro* の両方で解析することが可能となった。さらに、ニポウ式共焦点顕微鏡で観察することにより、細胞形態の継時変化を詳細に解析することも可能となった。

また、大脳新皮質が形成される初期の神経幹細胞の維持に必須であることを研究代表者等が発見した *Nepro* 遺伝子のノックアウトマウスを総合的かつ詳細に解析することにより、*Nepro* ノックアウトマウスは胚盤胞の形成直前に胎生致死となり、*Nepro* は個体発生にも必須であることが明らかとなった(雑誌論文の Hashimoto et al. (2015))。

さらに、研究代表者等が作製した *Nepro* タンパク質に特異的な抗体を用いた詳細な解析により、*Nepro* タンパク質は核小体に局在するとともに、*Nepro* ノックアウトマウスでは核小体前駆体及び核小体の形成に異常を来し、*Nepro* は正常な核小体の形成に必須で

あることが示された (雑誌論文の Hashimoto et al. (2015))。以上の結果、Neuro は大脳形成初期に神経幹細胞で機能し神経細胞の分化方向を制御するとともに、初期胚における核小体形成という2つの調節を通し、細胞の形態・性質を制御することが明らかとなった。

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5件)

Masakazu Hashimoto, Tatsuya Sato, Yuko Muroyama, Lisa Fujimura, Masahiko Hatano, and Tetsuichiro Saito (2015) Neuro is localized in the nucleolus and essential for preimplantation development in mice. *Develop. Growth Differ.* **57**, 529-538 査読有

DOI : 10.1111/dgd.12232

Tatsuya Sato, Yuko Muroyama, and Tetsuichiro Saito (2015) Control of gene expression in neurons by the use of in vivo electroporation and the tetracycline system. *NeuroMethods* **102**,187-195 査読有
DOI : 10.1007/978-1-4939-2459-2_15

Atsushi Baba and Tetsuichiro Saito (2015) Electroporation of dissociated hippocampal neurons. *NeuroMethods* **102**,169-178 査読有

DOI : 10.1007/978-1-4939-2459-2_13

Tetsuichiro Saito (2015) Exo utero electroporation of the mouse embryo. *NeuroMethods* **102**,21-31 査読有

DOI : 10.1007/978-1-4939-2459-2_2

Tetsuichiro Saito (2015) In utero electroporation of the mouse embryo. *NeuroMethods* **102**,1-20 査読有

DOI : 10.1007/978-1-4939-2459-2_1

[学会発表](計8件)

Tetsuichiro Saito: Neuro is required for the maintenance of early neural progenitors in the neocortex. International Symposium "Neocortical Organization III" (2016年2月11日, 東京大学(東京都・文京区))

Yuko Muroyama and Tetsuichiro Saito: Function and regulation of Neuro are different between the early neocortex and preimplantation embryos. International Symposium "Neocortical Organization III" (2016年2月11日, 東京大学(東京都・

文京区))

Satoshi Fujimoto, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, and Takeshi Imai: Spontaneous neuronal activity is required for dendrite pruning of olfactory mitral cells in early postnatal development. The 13th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception(2015年11月3日, 九州大学(福岡県・福岡市))

Satoshi Fujimoto, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, and Takeshi Imai: Spontaneous neuronal activity is required for dendrite pruning of olfactory mitral cells in early postnatal development. Society for neuroscience 2015 annual meeting (2015年10月20日, Chicago, U.S.A.)

Takeshi Imai, Satoshi Fujimoto, Yuko Muroyama, and Tetsuichiro Saito: Spontaneous neuronal activity regulates the postnatal development of olfactory bulb circuitry. 第38回日本神経科学大会(2015年7月30日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市))

Satoshi Fujimoto, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, and Takeshi Imai: Early postnatal spontaneous activity is required for dendrite pruning of olfactory mitral cells. 第38回日本神経科学大会(2015年7月28日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市))

Tatsuya Sato, Tetsuichiro Saito, and Noriko Osumi: Dendritic Morphology of cortical pyramidal neurons is regulated by the dopaminergic signals in early postnatal mice. 第38回日本神経科学大会(2015年7月28日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市))

Tatsuya Sato, Yuko Muroyama, and Tetsuichiro Saito: Postmitotic dorsal spinal cord neurons are transduced into commissural neurons by induced misexpression of Barhl. Society for neuroscience 2014 annual meeting (2014年11月18日, Washington, DC, U.S.A.)

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/dev/index.html>

佐藤 達也、齋藤 哲一郎「エンハン

サ一」脳科学辞典（2015年1月）

DOI：[10.14931/bsd.2781](https://doi.org/10.14931/bsd.2781)

6．研究組織

(1)研究代表者

斎藤 哲一郎 (SAITO Tetsuichiro)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00202078

(2)連携研究者

室山 優子 (MUROYAMA Yuko)

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：20422248