

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770184

研究課題名(和文) 海馬神経細胞における膜分子プレキシンの機能の解析

研究課題名(英文) Functions of axon guidance receptors, plexins, in the developing hippocampus

研究代表者

須藤 文和 (SUTO FUMIKAZU)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40345848

研究成果の概要(和文)：

海馬神経細胞におけるプレキシ分子の局在制御機構について、初代培養神経細胞を用いた解析を行い、プレキシ-A2分子の局在に必要な分子内領域を同定した。また、プレキシ-A4およびセマフォリン6Aが、海馬苔状細胞(mossy cell)軸索の細胞部位特異的投射に必要な遺伝子であることを明らかにした。さらに、プレキシ-A2が海馬顆粒細胞の細胞層形成に必要な遺伝子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

We have shown that axon guidance molecule *Sema6A* and its receptor, *plexin-A2* and *plexin-A4*, regulate the lamina-restricted projection of the hippocampal mossy fibers. We examined the role of semaphoring/plexin signaling in the formation of hippocampal network, and found that the *Sema6A/plexin-A4* signaling is required for the sub-dendritic projection of the axons of hippocampal mossy cells. We also identified the molecular domain that is required for the dendritic localization of *plexin-A2*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,300,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：神経科学、発生生物(学)、神経発生(学)、遺伝子、発生・分化、脳・神経、分子局在、軸索誘導

1. 研究開始当初の背景

動物の行動、学習・記憶の基盤となる神経回路網は、発生過程において規則性を持って形成される。近年、発生過程での神経回路形成について、軸索誘導関連分子とその受容体の単離、および、ノックアウトマウスなどの遺伝子欠損動物を用いた生体内での解析から、軸索誘導を制御する分子機構の一端が明らかになってきた (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Dickson, 2002)。

我々は、軸索反発因子として機能するセマフォリンとその受容体である膜タンパク質プレキシンに着目して研究を行い、セマフォリン/プレキシンのシグナルが末梢神経系の軸索走行と (Suto *et al.*, 2005)、海馬苔状線維の軸索投射 (Suto *et al.*, 2007) を制御することを明らかにしてきた。海馬苔状線維投射の分子機構の解析では、2種類のプレキシン分子、プレキシン-A2 とプレキシン-A4 が異なる機能を持ち軸索投射を制御することを見出した。海馬苔状線維は、標的細胞である錐体細胞樹状突起の最近位部に局限して投射する (細胞部位特異的な軸索投射)、という特徴を持つ。我々は、プレキシン-A4 が反発因子のシグナルを軸索内へ伝達することで標的細胞の限定された部位への軸索投射を制御し、一方、プレキシン-A2 は標的細胞上で反発因子シグナルを抑制することで軸索が進入可能な領域を生み出すことを示してきた。海馬神経回路において、プレキシン分子は苔状線維以外の線維でも発現しており、他の神経繊維に置いても同様の作用を持つことが推察される。さらに分布解析により、プレキシン-A4 は軸索に、プレキシン-A2 は細胞体と樹状突起に局限することを明らかにした。つまり、神経細胞膜上におけるこれらの分子の適切な局在が、海馬神経回路の軸索投射を制御する基盤となっていることを意味する。プレキシン-A2、プレキシン-A4 の局在を制御する分子機構は不明であり、プレキシン分子の局在機構の解明は軸索投射制御を分子レベルで理解する上で重要な課題である。

中枢神経系では最終分裂を終えた神経細胞は特定の位置に移動し、形態的に成熟する。海馬歯状回を構成する顆粒細胞は、発生過程において神経上皮で最終分裂を終えたのち移動し顆粒細胞層を形成するものと、成体において歯状回 subgranular zone (SGZ) で神経細胞新生を行い顆粒細胞に分化するものが存在する。顆粒細胞は脳の他の領域からの入力を受け、苔状線維により海馬錐体細胞に情報を伝達することが明らかになっており、この細胞の分化障害や細胞層形成異常は海馬機能の障害を生じ精神疾患に結びつくものと考えられている。このように海馬の機能的な側面からも顆粒細胞層の形成/維持機構の解明は重要な課題となっているが、発生期、および、成体における分子制御機構は未解明である。

2. 研究の目的

(1) 神経細胞でのプレキシン-A2、プレキシン-A4 の分子局在を制御する分子機構の解明を目的とし、各プレキシン分子の局在制御に関して、必要十分性を持つ分子内ドメイン (局在化ドメイン) の特定、局在化ドメインと相互作用する分子探索と機能解明、ならびに、海馬苔状線維投射における分子局在制御機構の役割について解析を行う。

(2) 海馬 mossy 細胞軸索投射の細胞部位特異性におけるプレキシン-A4 の役割を解明する。細胞部位特異性は中枢神経系の軸索投射の特徴でもある。この特異性制御において、プレキシン-A4 が共通して利用される分子であるか否かを明らかにする。

(3) 海馬歯状回顆粒細胞層の形成/維持における plexin-A2 の機能とその役割を明らかにすることを目的とする。予備的な知見として、プレキシン-A2 遺伝子破壊マウスでは、歯状回顆粒細胞の層構造および位置の異常が認められている。そこで、これらの異常が生じる始める時期の特定により、細胞層構造異常や位置異常が形成過程で生じるものか、あるいは維持異常により生じるのかを明ら

かにする。また、顆粒細胞における Plexin-A2 の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 局在化に必要な領域を特定するために、複数の欠損体を作製し、初代培養海馬神経細胞での分布解析を行う。欠損体には細胞外領域にタグ (myc-tag など) を付加したものを、細胞膜に存在する欠損体を抗タグ抗体により検出する。次に、局在化に必要な領域を、mCD8 (神経細胞膜上の全体に分布: 樹状突起と軸索に存在する) に付加した組換え体を作製し、神経細胞での分布解析を行い、局在化ドメインの十分性を検討する。

(2) 野生型マウスとプレキシンやセマフォリン遺伝子破壊マウスの切片に対して、mossy 細胞軸索のマーカであるカルレチニン分子に対する抗体染色を行い、比較解析を行う。

(3) 顆粒細胞のマーカであるカルビンデイン (カルシウム結合タンパク質) と Prox-1 (転写因子) に対する抗体を用いて、プレキシン-A2 遺伝子破壊マウスの切片を染色解析する。

4. 研究成果

(1) 一般的なタグを付加したプレキシン分子を初代海馬神経細胞に導入したところ、他のタンパク質に比べてプレキシン分子は検出されにくいことが判明した。そこで、高感度に外来組換えタンパク質を検出できる方法 (Howarth ら, 2005) を導入した。この方法は、目的のタンパク質にビオチン分子を付加し、さらにこのビオチンに結合するアビジンをあらかじめ蛍光分子で標識アビジンを利用して検出する方法である。この方法により、培養神経細胞に導入したプレキシン分子を検出することが可能となった。そこで、プレキシン-A2 について種々の分子内欠損タンパク質発現コンストラクトを作製し、初代培養神経細胞を用いた分子分布解析を行った。その結果、分子局在が異なる欠失変異を同定し、分子局在に必要な領域を明らかにした。この成果により、セグメント特異的な入力線

維の投射におけるプレキシン-A2 分子局在の役割を明らかにする事が可能となった。現在、局在に必要なドメインと相互作用する分子の探索を行うとともに、細胞部位特異的投射における plexin-A2 分子局在の役割について、器官培養系を用いて解析している。

(2) セマフォリン 6A およびプレキシン-A4 変異マウスにおいて、海馬神経回路を構成する mossy cell の部位特異的な軸索投射に異常が生じていることを見出した。それぞれの遺伝子破壊マウスでは、カルレチニン陽性の mossy 細胞の軸索が野生型マウスと比較して、投射領域の拡大が認められた (Tawarayama et al., 2010)。この結果は、セマフォリン/プレキシンシグナルが細胞部位特異的な投射において共通して用いられていることを示しており、大脳新皮質などの他の脳領域においても共通した分子機構である可能性を示している。

(3) プレキシン-A2 ノックアウトマウスについて、歯状回顆粒細胞層の構造異常が発生時期を特定するために、顆粒細胞のマーカ分子である Prox1 を用いて免疫組織学的な解析を行ったところ、層構造形成初期にあたるマウス胎生後期においては、野生型マウスと比べて顕著な差は認められなかったが、少なくとも形成後期の生後 10 日目には、細胞層構造に異常が生じることが判明した。現在、層構造形成におけるプレキシン-A2 の機能の解析を進めている。

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. Tawarayama, H., Yoshida, Y., Suto, F., Mitchell, KJ., and Fujisawa, H. Roles of Sema6B and Plexin-A2 in mossy fibers projection. *Journal of Neuroscience* 30: 7049-7060 (2010)、査読あり。
- ②. Rünker, AE., Little, GE., Suto, F., Fujisawa, H. and Mitchell, KJ. Semaphorin-6A controls guidance of corticospinal tract axons at multiple

choice points. Neural Development 3 :
34(2008)、査読あり。

〔学会発表〕(計3件)

- ①. 須藤文和、軸索接続における細胞種および細胞部位特異性を制御する分子機構、日本発生物学会秋期シンポジウム、2009年11月28日、三島市。
- ②. 須藤文和、大隅典子、Role of axon guidance receptor in the development of amygdaloid circuitry、第31回日本神経科学学会大会、2008年7月11日、東京。
- ③. 須藤文和、Role of semaphorin/plexin signaling in the developing nervous system. 第41回日本発生物学会年会、2008年5月28日、徳島市。

〔図書〕(計1件)

- ①. 須藤文和、セマフォリン／プレキシンシグナルによる神経回路形成機構、実験医学増刊 神経回路の制御と脳機能発現メカニズム、Vol. 26-No. 22、63(1869)-68(1874)、2008年 羊土社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 文和 (SUTO FUMIKAZU)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40345848

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：