

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成27年5月27日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (S)

研究期間：2009～2014

課題番号：21670002

研究課題名 (和文) 神経回路網の多様性を生み出す発生分化プログラムの分子基盤

研究課題名 (英文) Identification of Molecular Programs That Generate Neuronal Circuit Diversity

研究代表者

白崎 竜一 (SHIRASAKI, Ryuichi)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：40423149

交付決定額 (研究期間全体) (直接経費)：72,900,000 円

研究成果の概要 (和文)：

ホメオボックス型転写調節因子 *Dbx1* が中脳における交連ニューロンの運命決定因子であることを明らかにした。また、*Dbx1* はその転写カスケードの下流で転写調節因子 *Evx2* の発現を介して、軸索正中交差を直接制御する軸索ガイダンス分子 *Robo3* の遺伝子発現を制御していることが示された。さらに、*Dbx1* は非交差性ニューロンの分化プログラムに対しては逆に抑制的に作用することで、交連ニューロンの運命決定を確実なものにしていることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

We identified the progenitor homeodomain factor *Dbx1* as a crucial genetic determinant of commissural neurons in the dorsal midbrain. We also found that the *Dbx1*-triggered transcriptional program ultimately induces the expression of *Robo3* for midline crossing, which is hierarchically regulated via the expression of the homeodomain factor *Evx2* at the postmitotic stage. Furthermore, we showed that *Dbx1* suppresses in parallel the expression of ipsilateral neuron genetic programs to consolidate the identity of commissural neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：神経発生分化、神経回路網形成、運命決定因子、転写調節因子、遺伝子発現制御  
交連ニューロン、軸索ガイダンス、正中交差

## 1. 研究開始当初の背景

記憶や学習などの脳の高次機能発現を規定する細胞生物学的基盤は、その生物がいかに多様な神経回路網を構築しているかによる。これまでの研究により、個々の神経細胞は発生期に、その固有の遺伝プログラムが付与され運命 (個性) が決定されると、その固有の分子プログラムに基づき細胞自律的な挙動を示すようになり、その結果として自分の最終標的への特異的な軸索伸長及び標的認識を行うようになることが示されてきた。この分子プログラムの実体に関しては、個々の神経細胞のサブクラス (サブタイプ) に特異的に発現するようになる転写調節因子が実際のプログラムの実行命令を司っていると考えられ、これらの転写調節因子が軸索伸長路選択に関わる特異的なガイダンス分子

に対するレセプター発現を最終的に促すことで、個々の神経細胞の軸索が特異的なガイダンス分子に応答できるようになり、結果として神経細胞の個性を反映した多様な神経回路網が形成されると考えられている (Shirasaki & Pfaff, *Annu. Rev. Neurosci.* 2002; Shirasaki et al., *Neuron* 2006)。

一方で、軸索がどのような細胞外環境を経験して伸長していったのかの情報は随時フィードバックされることで、神経細胞の運命決定時である分化初期に付与された軸索ガイダンスプログラムは個体の発達とともに修飾改変 (再編成) を受けるようになる。実際このような再編成の結果は、特異的なガイダンス分子に対するレセプターの発現レベルやその局在の変化、さらにはレセプター機能自体のダイナミックな変化につながるものが推測され、初期の遺伝子コードに起因す

る回路網形成とは異なる階層で、軸索伸長パターンに多様性を付与していると考えられる。本研究で焦点をあてている交連ニューロンの系は、初期の軸索ガイダンスプログラムが中間標的の神経管腹側正中部のフロアプレートで実際に再編成されていることが示された最初の例でもある (Shirasaki et al., *Science* 1998)。

しかしながら、多様な神経細胞の運命決定とそれに連動する回路網レベルでの多様性形成に関する一連の研究は、日本国内はもとより世界的な研究動向の中においても、そのほとんどが端緒についたばかりであり、回路網の多様性形成において中核を担う軸索ガイダンスプログラムの発現制御や再編成の過程に関しては、その多くが不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、発生期の軸索ガイダンスの研究において先導的な役割を担っている交連ニューロンの発生分化プログラムに焦点をあて、以下の目的の達成を目指すことで神経回路網の多様性が生み出されるメカニズムの分子レベルでの理解に迫る。

(1) 交連ニューロンの回路網の多様性を生み出す素子レベルで重要なサブクラスレベルでの運命決定プログラムに着目し、これに連動して発現制御を受ける初期軸索ガイダンスプログラムの実体を、サブクラス固有に発現される転写調節因子(運命決定因子)とその転写調節因子カスケードの下流で発現が制御され中核的な役割を果たしている軸索ガイダンス制御分子の同定を目指すことで明らかにする。

(2) 交連ニューロン軸索の中間標的である正中部フロアプレートでの交差前後で引き起こされる初期軸索ガイダンスプログラムの再編成の制御機構を、軸索ガイダンス制御分子の正中交差前後における選択的な局在発現の制御機構を解析することで、再編成の実体を分子レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究課題の目的達成には、交連ニューロンの発生分化に関わる遺伝子の機能を迅速かつ効果的に評価できる *in vivo* の実験方法を確立できるかどうかの一つの鍵であった。そのためにまず、特定のサブクラスの交連ニューロンだけを特異的に可視化し、着目した交連ニューロンにおいて遺伝子の機能獲得ならびに機能阻害の実験操作を *in vivo* で可能とさせる実験システムの確立に優先的に取り組み、研究期間の早い段階で確立させることに成功した(この研究課題開始以前より取り組んでいたため)。哺乳類マウスを用いた *in vivo* における実験系で、特定の交連ニューロンだけをターゲットとして遺伝子機能の人為的な操作を迅速に可能とさせた実

験システムは、世界的にも例をみない画期的なものである。この実験システムとマウス胎仔への子宮内電気穿孔法による遺伝子導入法を本研究課題遂行の中心にそえている。尚、上記2つの目的達成にあたり、具体的に以下の観点からのアプローチにより目的の達成を目指す。

目的(1)においては、交連ニューロンのサブクラス特異的に発現する転写調節因子に対して、*in vivo* で機能獲得と機能阻害の実験を行い、交連ニューロンの軸索伸長パターンへの影響の表現型を解析し、交連ニューロンの軸索ガイダンスのどの局面にこれらの転写調節因子が関与するのかを明らかにする。さらに、上記の *in vivo* の個体レベルにおける遺伝子発現誘導システムとDNAマイクロアレイによるゲノムスケールでの遺伝子発現解析を組み合わせることで、候補転写調節因子の制御下にある軸索ガイダンス制御分子の網羅的な解析を行い、交連ニューロンのサブクラス特異的な転写調節因子の転写カスケードで制御されている軸索ガイダンス制御分子を探索する。

目的(2)においては、交連ニューロン軸索の正中部フロアプレートでの交差前後で発現が変化し、実際の正中交差時の軸索ガイダンスに関わっていることが示唆されている軸索ガイダンス制御分子の正中交差前後での選択的な局在発現に、転写後調節や翻訳後調節が関与しているのかを調べる。ここでは、交連ニューロン軸索の正中交差前後でそのタンパク質発現が劇的に増加または消失することが知られている Robo3 などの膜タンパク質を手がかりに解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 交連ニューロンのサブクラスにおける運命決定因子とそれによって制御されている軸索ガイダンスプログラムの同定

ホメオボックス型転写調節因子である Dbx1 が交連ニューロンが生み出されている時期の中脳の特定の前駆細胞において発現していることを見出した。Dbx1 の時空間的な遺伝子発現制御を担うエンハンサーエレメントを同定することで詳細な細胞系譜解析を行い、実際に Dbx1 が交連ニューロンのサブクラスの前駆細胞に特異的に発現していることを明らかにした。さらに Dbx1 のマウス胎仔への遺伝子導入(子宮内電気穿孔法)による個体レベルでの機能解析(gain of function ならびに loss of function)の結果、Dbx1 がまさに中脳における交連ニューロンの運命決定因子であることを明らかにした。また、Dbx1 を起点とする転写カスケードの下流で軸索正中交差を直接制御する軸索ガイダンス制御分子として Robo3 (スプライシング・バリエーション Robo3.1) を見出した。

さらに、Dbx1 から Robo3.1 への遺伝子発現制御に至る転写カスケードの詳細を解析することで、交連ニューロンの軸索正中交差時に Robo3.1 の発現を促進的に制御している下流の分子がホメオボックス型転写調節因子 Evx2 であることも突き止めた。また、Dbx1 を起点とする転写プログラムは交連ニューロンへの専属的な分化プログラムを促進させるにとどまらず、これと拮抗する作用をもつ POU 型転写調節因子 Brn3a を中核とする非交差性ニューロンの分化プログラムに対しては、逆に抑制的に作用することで交連ニューロンの運命と個性の決定をより確実なものにしていることも明らかとなった。さらに、これまでの神経発生学においては神経軸索の正中交差を決定づける分子プログラムの付与は最終細胞分裂後になされていると長らく考えられていたが、本研究においてその分子プログラムの付与がそれより以前の神経前駆細胞の時期であることを明らかにした。したがって、本成果は交連ニューロンの運命決定機構とその後の軸索正中交差という回路形成における重要な局面を分子レベルで直接結びつけた学術的価値の高い画期的な成果となった。これらの成果は 2011 年度、2012 年度、2014 年度の日本神経科学大会(稲又ら、2011; 2012; 2014)、2012 年度の米国神経科学学会 (Society for Neuroscience; Inamata & Shirasaki, 2012) にて発表した。また、これらの一連の成果は目的①でその達成を目指していたものであり、重要なデータの多さから当初は 2 本の論文としての公表を予定していたが、最終的には 1 本の論文として公表するに至った (Inamata & Shirasaki, *Development* 2014)。

### (2) 小脳における交連ニューロンのサブクラス特異的な軸索投射パターン形成を制御する軸索ガイダンス制御分子の同定

小脳の交連ニューロンは小脳核ニューロンよりおこり、いくつかのサブクラスが知られている。なかでも中位核・外側核由来の交連ニューロンは、腹側正中部のフロアプレートで交差を形成するが、内側核由来の交連ニューロンは反対側の背側正中部であるループプレートで交差を形成する。これら 3 つの小脳核ニューロンは bHLH 型転写調節因子 Atoh1 を特異的に発現している神経前駆細胞から同じ時期に生み出されるにも関わらず、全く正反対の軸索伸長パターンの個性を示す。本研究では、背側正中部のループプレートで正中交差を形成する小脳内側核ニューロンに特異的に発現するようになる転写調節因子として LIM ホメオボックス型転写調節因子 Lmx1a を見出し、この転写調節因子が小脳内側核ニューロン固有の軸索伸長パターン形成に関わることを明らかにした。また、小脳内側核ニューロン固有の背側での正中交差を生み出す軸索ガイダンス制御分子として、Netrin の反発型受容体の 1 つである

Unc5c が関与していることを in vivo において明らかにした。さらに、小脳核ニューロンのすべてのサブクラスは共通に Netrin の受容体の 1 つとして知られる DCC を発現するが、背側正中部のループプレートで交差を形成する内側核ニューロンだけが DCC と Unc5c を共発現していることを突き止めた。これらの成果は 2011 年度の日本分子生物学会年会、2012 年度の日本神経科学大会にて発表した (出崎ら、2011; 2012) (Desaki<sup>1</sup>, Kaneyama<sup>1</sup>, Inamata & Shirasaki\*, 論文準備中)。

### (3) 小脳における交連ニューロンのサブクラスに特異的な最終標的(赤核細胞)認識過程の詳細を捉えることに成功

交連ニューロン軸索の正中交差後に起こる対側での最終標的認識過程は今まで不明であった。その主な理由は交連ニューロンを in vivo で特異的に長期に渡り低細胞密度でラベルすることで、その挙動を詳細に解析できる実験システムが確立されていなかったことと、標的細胞を同時に特異的にラベルすることが難しかったことによる。本研究では、今回確立させた交連ニューロン特異的な可視化技術を腹側正中部のフロアプレートで交差を形成する Atoh1 陽性神経前駆細胞から生み出される小脳核ニューロン由来の交連ニューロンに適用し、そのシナプス形成標的細胞である脳幹の赤核細胞を同時に特異的にラベルできる分子マーカーを見出すことで、小脳核ニューロンの赤核細胞認識過程の詳細を in vivo で捉えることに成功した。この成果は交連ニューロンのシナプス形成標的細胞の認識過程を捉えた初めてのものであり、これにより正中交差後の交連ニューロンの標的認識機構の一端を世界に先駆けて明らかにした。これらの成果は 2011 年度、2012 年度の日本神経科学大会にて発表した (原ら、2011; 2012) (Hara, Kaneyama, Inamata, Onodera & Shirasaki\*, 論文投稿中)。

### (4) 脊髄交連ニューロンの正中交差後に生じる軸索分岐による運動ニューロン認識過程を捉えることに成功

脊髄の交連ニューロンは、これまでの齧歯類における生理学的・解剖学的な研究により、運動ニューロンに単シナプス性の結合をすることで左右の協調的な歩行運動制御の中核素子の一つとして働いていることが知られている。しかしながら、交連ニューロンがいつ、どのような過程をへて対側の運動ニューロンに投射するようになるのかは、今まで不明であった。本研究では、今回中心的に用いている交連ニューロンのサブクラス特異的な可視化技術をさらに改変発展させることで、交連ニューロン軸索の腹側正中部フロアプレートでの交差前の段階から正中交差後以降の長期間に渡って、低密度の細胞ラベル状態(シングル細胞レベルでの可視化)で、その軸索挙動を詳細にモニターできる実験

系を確立させた。これにより、正中交差の直後の段階では運動ニューロンから分泌される反発分子の反発作用のために運動ニューロンへ近づけなかった交連ニューロン軸索が、交差後の回路形成後期には軸索の中間部から枝分かれを生じさせることで、その軸索分岐を運動ニューロンに直接投射させているという今までに報告されていなかった軸索伸長過程を捉えることに成功した。したがって、この新たな実験系の確立により世界的にも全く解析がなされていなかった回路形成の局面を見出すことにつながった新規性の高い成果を得た。これらの成果は 2012 年度、2013 年度の日本神経科学大会にて発表した (金山ら、2012; 2013)。現在、運動ニューロンを特異的に欠損する遺伝子改変マウスの胎仔に対して子宮内電気穿孔法により今回新規に確立させた交連ニューロン特異的な長期低細胞密度ラベルによる可視化技術を導入し、交連ニューロンの軸索分岐形成における最終標的細胞である運動ニューロンの役割を直接的に検討している。その表現型解析の結果を最終的に盛り込み、投稿論文として取りまとめる予定である。

#### (5) 交連ニューロンの軸索ガイダンスプログラムの再編成スイッチに関わる遺伝子の探索

交連ニューロンの正中部フロアプレートでの軸索ガイダンスプログラムの再編成機構の手がかりを掴むために、交連ニューロン特異的な遺伝子発現システムと DNA マイクロアレイを駆使することで、交連ニューロン軸索の正中交差前後で発現が変化する遺伝子を探索し、そのタンパク質発現部位を解析した。その結果、MAP キナーゼ・カスケードの JNK1 (Mapk8) は、その mRNA 発現が交差後に増加し、交連ニューロン軸索の正中交差後の軸索セグメントにそのタンパク質が局在するようになる分子であることを見出した。さらに、JNK1 の構成的活性化型変異体を用いた機能解析の結果から、JNK1 の活性化が軸索ガイダンスプログラムの再編成誘導に関わる細胞内シグナルの一つである可能性を示唆する知見を得た。これらの成果は 2011 年度の日本分子生物学会年会、2012 年度の日本神経科学大会にて発表した (池内ら、2011; 2012)。現在、in vivo での機能阻害実験を行っており、その結果を盛り込むことで、投稿論文として取りまとめる予定である。

#### (6) 交連ニューロン軸索の正中交差前後での軸索ガイダンス制御分子の選択的局在機構

交連ニューロンの正中部フロアプレートでの軸索ガイダンスプログラムの再編成を分子レベルで明らかにするために、軸索の正中交差前後でそのタンパク質発現が劇的に変化し、正中交差の軸索ガイダンスに関わっていることが知られている軸索ガイダンス制御分子 Robo3 に着目し、その選択的な局在発現の制御機構を調べた。Robo3 には 2 つの

スプライシング・バリエーション Robo3.1 と Robo3.2 があり、Robo3.1 は正中交差前の、Robo3.2 は正中交差後の軸索セグメントに選択的に局在する。当初、Robo3.1 の正中交差前の選択的局在機構の解明を試みたが、予想した転写後調節、翻訳後修飾の関与の可能性を支持する結果が得られなかった。そこで、解析の対象を Robo3.2 に変更して、その正中交差後の選択的局在に転写後調節が関与しているかの検討を行った。そのために、Robo3.2 の mRNA の非翻訳領域 (untranslated region: UTR) で、転写後調節が関わる可能性がある 3' 側の UTR の完全長を単離して、その 3' UTR が正中交差後の選択的なタンパク質局在を引き起こすエレメントかどうかの解析を進めていた矢先、交連ニューロンの正中交差後の Robo3.2 の選択的な局在が Robo3.2 mRNA の 3' UTR が制御している一連のプロセスの結果であることが Cell 誌より報告された (Colak et al., *Cell* 153, 1252-1265, 2013)。この論文報告による痛手は大きく、Robo3 mRNA の UTR に着目した研究テーマの継続断念に追い込まれた。ただし、完全撤退という選択ではなく、そこまで進めてきた内容と関連する別の観点からのアプローチで研究を進めることとした。そのためにも、最終年度において本研究課題の科研費の一部を次年度に繰越申請した。

ここでは再度、Robo3.1 の正中交差前の軸索セグメントにおける選択的な局在に着目したが、今まで着目していた交連ニューロン側からの観点ではなく、Robo3.1 の交連ニューロンにおける発現が正中交差後に消失するきっかけを与える要因の解明に取り組んだ。(尚、この発現消失のきっかけが何であるかは不明であった。) まず、今までに得られていた我々の実験結果から、Robo3.1 の発現制御には転写後の過程ではなく、転写そのものの時空間的な制御機構が関与している可能性があった。また、Robo3.1 のスプライシング・バリエーションに特異的なアミノ酸配列を認識する Robo3.1 のアイソフォーム特異的な抗体の作成にも既に成功していた。そこで、このアイソフォーム特異的な抗体を利用することで、Robo3.1 の発現消失のメカニズムに交連ニューロンの内在的なクロック (ある時間がくると遺伝子発現がオフになるような自律的な分化プログラム) が要因として関与しているかどうかを調べた。ここでは、交連ニューロン特異的に Netrin の反発型受容体である Unc5c を強制的に発現させることで、交連ニューロン軸索の正中交差をブロックさせ続けた状態を in vivo で作り出して発現解析を行った。その結果、Robo3.1 の交連ニューロンにおける発現は軸索のみならず細胞体においても消失せずに維持され続けていることが明らかとなった。したがって、Robo3.1 が正中交差後に消失するメカニズムには、交連ニューロンの内在的な要因が関わるのではなく、交連ニューロン軸索と正中部

フロアプレート細胞との相互作用が交連ニューロン軸索と細胞体の両方におけるRobo3.1の発現消失をトリガーしていることが示唆された。また、この結果を受けてその細胞間相互作用を担うフロアプレート細胞に発現している制御分子を同定し解析するための機能的なアッセイ系を確立させた。現在、この機能的なアッセイ系を用いることで候補分子の探索を行っており、今後、このスクリーニングで特定されてくる分子を中心にこの研究をさらに推進していきたい。

#### 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 Inamata Y & Shirasaki R\*. Dbx1 triggers crucial molecular programs required for midline crossing by midbrain commissural axons. *Development* 141, 1260-1271 (2014).

[\* Corresponding author]

DOI: 10.1242/dev.102327 (査読有)

② Zhao H, Maruyama T, Hattori Y, Sugo N, Takamatsu H, Kumano A, Shirasaki R & Yamamoto N. A molecular mechanism that regulates medially oriented axonal growth of upper layer neurons in the developing neocortex. *J. Comp. Neurol.* 519, 834-848 (2011).

DOI: 10.1002/cne.22536 (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

① 稲又靖之、金山武司、白崎竜一：交連ニューロンの運命決定因子 Dbx1 が制御する分子プログラムの解析。第 3 7 回日本神経科学大会 (2014 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市)

② 金山武司、池内彬、稲又靖之、白崎竜一：脊髄交連ニューロンの軸索分岐形成の時空間制御の in vivo 解析。第 3 6 回日本神経科学大会 (2013 年 6 月 22 日、国立京都国際会館、京都府・京都市)

③ Inamata Y & Shirasaki R. Identification of a genetic determinant that specifies commissural neuron identity in the developing mouse midbrain. 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2012 年 10 月 14 日、New Orleans、アメリカ合衆国)

④ 稲又靖之、白崎竜一：中脳における交連ニューロンの運命決定因子とその転写カスケードの解析。第 3 5 回日本神経科学大会 (2012 年 9 月 20 日、名古屋国際会議場、愛知県・名古屋市)

⑤ 原聡史、小野寺亮太、稲又靖之、白崎竜

一：交連ニューロン軸索の正中交差後の標的認識と軸索側枝形成の in vivo 解析。第 3 5 回日本神経科学大会 (2012 年 9 月 20 日、名古屋国際会議場、愛知県・名古屋市)

⑥ 出崎太朗、稲又靖之、白崎竜一：小脳の交連ニューロンのサブタイプ特異的な軸索投射形成における Lmx1a の役割。第 3 5 回日本神経科学大会 (2012 年 9 月 20 日、名古屋国際会議場、愛知県・名古屋市)

⑦ 池内彬、稲又靖之、白崎竜一：交連ニューロンの正中交差後の吻側への軸索伸長をトリガーする分子プログラムの解析。第 3 5 回日本神経科学大会 (2012 年 9 月 20 日、名古屋国際会議場、愛知県・名古屋市)

⑧ 金山武司、稲又靖之、白崎竜一：脊髄 DI1 型交連ニューロン軸索の正中交差後の吻背側への伸長と軸索分岐の形成過程。第 3 5 回日本神経科学大会 (2012 年 9 月 20 日、名古屋国際会議場、愛知県・名古屋市)

⑨ 出崎太朗、稲又靖之、白崎竜一：Role of Lmx1a in the Guidance of Cerebellar Commissural Axons. 第 3 4 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市)

⑩ 池内彬、稲又靖之、白崎竜一：Role of Midline Crossing in Commissural Axon Guidance along the Anterior-Posterior Axis. 第 3 4 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市)

⑪ 稲又靖之、白崎竜一：中脳における交連ニューロンの発生分化を規定する遺伝プログラム。第 3 4 回日本神経科学大会 (2011 年 9 月 17 日、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市)

⑫ 原聡史、小野寺亮太、稲又靖之、白崎竜二：小脳核ニューロン-赤核投射をモデルとした dI1 型交連ニューロンの標的認識過程。第 3 4 回日本神経科学大会 (2011 年 9 月 17 日、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市)

[その他] ホームページ

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/neurobiol/shirasaki/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

白崎 竜一 (SHIRASAKI, Ryuichi)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：40423149