

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500387

研究課題名(和文) 大脳皮質体性感覚野バレル形成における活動依存性Notchシグナリングの役割

研究課題名(英文) Activity-Dependent Notch signaling is required for the barrel formation in the somatosensory system of mouse brains.

研究代表者

中尾 啓子 (Nakao, Keiko)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：70338185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Notchシグナル関連分子は、最終分裂を終えた後の神経細胞でも引き続き発現し、視床一皮質軸索黒の入力を受けて活動依存的に形成される第四層のバレルシステムにおいて、入力依存的にそのシグナル活性が活性化されること及びその活性がバレルシステムの形成に関与していることを子宮内エレクトロポレーション法によるNotchシグナルのノックダウン及び活性化型Notchの強制発現により明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Notch signaling has a key role in cell fate specification in the developing brains. However Notch related genes are continuously expressed in the postmitotic neurons after completion of the last cell division. Notch signaling is activated in the c-Fos positive neurons. Downregulation or overexpression of Notch caused disruption of barrel cortex, suggestion that Notch signaling is required for the barrel formation in the developing mouse brains.

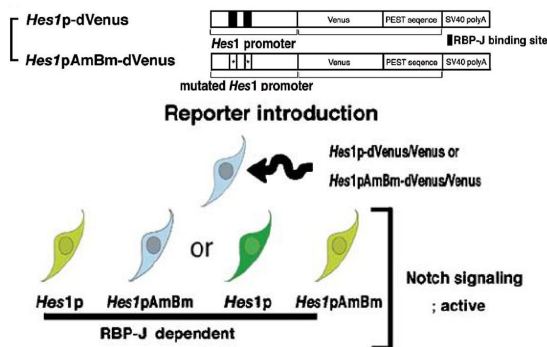
研究分野：神経発生過程におけるNotchシグナリングの機能

キーワード：Notch シグナル 神経活動依存的シグナル伝達 子宮内電気穿孔法 c-Fos barrel cortex

1. 研究開始当初の背景

Notch シグナル伝達系は、特に神経系の初期発生の様々な場面において細胞分化に決定的な役割を果たす働きが知られている。しかし、Notch シグナル関連分子は、最終分裂を終えた神経細胞においても引き続き発現し続けることも知られている。最終分裂を終えた神経細胞は、移動しながらそれぞれの神経細胞の運命に従って異なる層に分布し、可塑的な機能分化(成熟)をしながら神経回路に組み込まれる。近年になって Notch シグナルは、ショウジョウバエの嗅覚神経系やマウス海馬において、電気活動依存性に活性化されて、神経系の可塑的变化に関与しているということが報告された(Lieber et al Neuron2011、Alberi et al Neuron 2011)。げっ歯類の大脳皮質体性感覚野第 4 層においては樽状のバレルと呼ばれる特殊な構造が形成されるが、ヒゲ(洞毛)を焼灼して外部からの入力を遮断するとそれに対応する第 IV 層のバレルが縮退することなどから、バレルシステムの形成が外部入力や神経活動に依存していることは知られているが、未だにバレル形成の分子機構については未解明の部分が多い。

我々は、かつて RBPJ-k 依存的な Notch シグナルの活性を in vivo で検出できるレポーター(下図)を開発したが(Kohyama et al Dev. Biol. 2005 特許第 4599610 号(平成 22 年 10 月 8 日)、Tokunaga et al J Neurochem. 2004)、



このレポーターを子宮内エレクトロポレーションにより導入したところ、バレル形成期に第 IV 層の興奮性神経細胞において一過性に Notch シグナルの活性が RBP-Jk 依存的に上昇していることを見いだした。

2. 研究の目的

Notch シグナル関連分子が発生過程において種々の細胞分化に決定的な役割を果たしていることは我々も含めて多くの研究者が明らかにしてきたことであるが、Notch シグナル関連分子は、最終分裂を終えた神経細胞でも引き続き発現している。我々は、子宮内電気穿孔法で Notch シグナルのレポーター遺

伝子を導入し 1 次体性感覚野バレルシステム第 4 層の興奮性神経細胞でも Notch シグナルが活性化されていることを見いだした。神経細胞は最終分裂を終えた後の神経回路形成の中で活動依存的にダイナミックなリモデリングを行うが、視床-皮質軸索路の入力を受けて活動依存的に形成される第 4 層のバレルシステムにおいて活性化されている Notch シグナルは発生過程同様ダイナミックな変化(神経細胞の形態変化(樹状突起や軸索)、シナプス形成、可塑性)に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。そこで本研究では、神経活動依存的な Notch シグナルが大脳皮質体性感覚野バレルシステムの形成に果たす役割を解明することを目的とする。さらに、Notch シグナル活性を指標として神経回路全体の形成機構の理解にもつなげる。

3. 研究の方法

Notch シグナルの活性を in vivo で視覚化できるレポーターコンストラクトを一次体性感覚野第 IV 層興奮性神経細胞における Notch シグナルの活性化の詳細を解析し、活動依存的、リガンド依存的な Notch シグナルの活性化の詳細を明らかにする。次に Notch シグナルの活動依存的活性化が体性感覚野バレルシステム形成において果たす役割を Notch shRNA 型ベクターの子宮内エレクトロポレーション法により Notch 遺伝子を不活化し(1)バレル内の神経細胞の形態(樹状突起の微細形態と軸索の投射パターン)(2)バレル構造の形成に異常が生じるかどうかを免疫組織化学的手法で解析した。

4. 研究成果

生後のマウス脳内で Notch シグナリングがいつどのように活性化されているのかを我々の開発した Notch レポーターで詳細に解析したところ P10 の体性感覚野で c-fos 陽性の神経細胞内で一過性に強い活性が見られた。Notch の細胞内ドメイン(cleaved Notch)特異的抗体によっても同様の活性が確認できた。そこで、Notch の shRNA 型プラスミッド及び Notch の細胞内ドメイン(活性型)をその時期のマウス脳で発現させたところバレル形成が著しく阻害された。このことから、Notch シグナルが視床からの入力に依存して活性化されることが、バレル形成にとって必要であることが明らかになった。

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 1 件)

1.Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A,

Taya S, Hashimoto R, Hayashi T, Abe M, Yamazaki M, Nakao K, Nishioka T, Sakimura K, amada K, Kaibuchi K, Hoshino M
Cytoskeletal regulation of AUTS2 in neuronal migration and neuritogenesis.
Cell Reports, 9, 2166-2179 (2014)
(査読あり)

[学会発表](計22件)

1. 中尾啓子、松本恵 熊谷 恵、溝井 令一、荒木 信夫、池田 正明、今井 貴雄
In vivo 電気穿孔法を用いて作成した眼咽頭筋ジストロフィー疾患モデルにおける原因遺伝子 PABPN1の機能解析
第38回日本分子生物学会年会
神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市) 2015.12.01-04

2. 小泉 恵太、中尾啓子、中島 日出夫
ストレスホルモン、グルココルチコイド応答分子、Hit の機能解析
第38回日本分子生物学会年会
神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市) 2015.12.01-04

3. Keita Koizumi, Keiko Nakao, Hideo Nakajima
A newly identified stress hormone responsive molecule, Hit, regulates nuclear transport of Glucocorticoid Receptor
The 58th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. 2015.09.11-13
大宮ソニックシティ(埼玉県、さいたま市)

4. Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Taya S, Hashimoto R, Hayashi T, Abe M, Yamazaki M, Nakao K, Nishioka T, Sakimura K, Yamada K, Kaibuchi K, Hoshino M: Roles of the autism susceptibility candidate gene AutS2 for neuronal migration and neuritogenesis in the developing brain. 第58回日本神経化学学会大会. 埼玉県さいたま市: 20150911 - 20150913

5. K. Koizumi, K. Nakao, H. Nakajima
Study if a newly identified molecule that respond to a stress hormone ,glucocorticoid.
Society of Neuroscience
Chicago,IL, USA

2015,10.17-21

6. Hoshino M, Nagai T, Shen W, Sakamoto A, Taya S, Hashimoto R, Hayashi T, Abe M, Yamazaki M, Nakao K, Nishioka T, Sakimura K, Yamada K, Kaibuchi K, Hori K: Cytoplasmic function of AUTS2 in neural network formation . Society for Neuroscience 45th annual meeting . Chicago, IL, USA: 20151017 - 20151021

7. K. Koizumi, M. Ito, K. Nakao, H. Nakajima
Functional analysis of FAM107B, a newly identified stress hormone responsive molecule.
Society for Neuroscience.
Washington DC,USA
2014.11.15-19

8. Nakao K, Matsumoto, M., Kumagai, M., Mizoi, R., Ikeda, M.
Development of oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) disease model by persistent expression of patient-type PABPN1 mutant genes by high-efficiency in vivo electroporation to muscle tissues
The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 2014.11. 25-27 Pacifico Yokohama (神奈川県、横浜市)

9. Keita Koizumi, Keiko Nakao, Hideo Nakajima
A stress hormone responsive molecule, FAM107B shows critical effects on prenatal neural development
The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 2014.11. 25-27 Pacifico Yokohama (神奈川県、横浜市)

10. 堀 啓、永井 択、Wei Shan、坂本 亜沙美、田谷 真一郎、橋本 了哉、林 宗、阿部 学、山崎 真弥、中尾 啓子、西岡 朋生、崎村 健司、山田 清文、貝淵弘 三、星野 幹雄
大脳発生における新規自閉症関連遺伝子の生理機能の解明
第37回日本分子生物学会年会.
2014.11. 25-27 Pacifico Yokohama (神奈川県、横浜市)

11. K. Koizumi, M. Ito, K. Nakao,
H. Nakajima
Functional analysis of FAM107B,
a newly identified stress hormone
responsive molecule.
The 57th Annual Meeting of the
Japanese Society for
Neurochemistry. 2014.09.29-10.1
奈良県文化会館 & 新公会堂(奈良県
奈良市)

12. Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Taya S,
Abe M, Yamazaki M, Nakao K, Nishioka T,
Sakimura K, Yamada K, Kaibuchi K, Hoshino M:
Cytoskeletal regulation by AUTS2 in Neuronal
migration and neuritogenesis . International
Symposium "New Frontier of Neuropathology
2014" . Tokyo, Japan: 20140316 – 20140317

13. Keiko Nakao, Megumi Kumagai, Reiichi
Mizoi, Emi Tani, Megumi Matsumoto,
Masaaki Ikeda, Nobuo Araki
Development of oculopharyngeal muscular
dystrophy (OPMD) disease model by
persistent expression
of patient-type PABPN1 mutant genes by
high-efficiency in vivo electroporation to
muscle tissues
第36回日本分子生物学会年会 2013年12月03
日 ~ 2013 年12月06日神戸ポートアイラン
ド (兵庫県神戸市)

14. Keita Koizumi , Keiko Nakao, Haruhiro
Higashida, Hideo Nakajima
New Candidate Genes Critical for Human
Developmental Disorders Such as Autism and
Mental Retardation. (自閉症、精神遅滞などの
発達障害に関わることが期待される新規遺
伝子)
第36回日本分子生物学会年会 2013年12月03
日 ~ 2013年12月06日 神戸ポートアイランド
(兵庫県神戸市)

15. Keita Koizumi, Keiko Nakao, Hideo
Nakajima
Study of new candidate genes that may have
critical role for autism and also
schizophrenia.
Society for Neuroscience.
San Diego, California, USA
2013.11.09-13

16. 小泉 恵太、中尾 啓子、中島
日出夫
脳発達障害に関わることが期待される新規
遺伝子の解析
Study of new candidate genes critical

for human developmental disorders
日本神経科学学会大会2013年06月20日 ~
2013年06月23日 国立京都国際会館 (京
都府京都市)

17. Keita Koizumi, Keiko Nakao, Hideo
Nakajima
Study of new candidate genes that may have
critical role for autism and also schizophrenia.
第35回日本分子生物学会年会 福岡国際会議
場・マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)2012
年12月11日 ~ 12月14日

18. Keiko Nakao, Megumi Kumagai, Reiichi
Mizoi, Emi Tani, Megumi Matsumoto,
Masaaki Ikeda, Nobuo Araki
Development of Oculopharyngeal Muscular
Dystrophy (OPMD) Disease Model by
Persistent Expression of Patient-type PABPN1
Mutant Genes by High-efficiency in vivo
Electroporation to Muscle Tissues.
(高効率 in vivo 電気穿孔法を用いた眼咽頭筋
ジストロフィー原因遺伝子PABPN1疾患変異
型の筋肉組織における持続性発現による疾
患モデルの作成)
第35回日本分子生物学会年会 福岡国際会議
場・マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)2012
年12月11日 ~ 12月14日

19. Keita Koizumi , Keiko Nakao , Hideo
Nakajima Study of new candidate genes
critical for human developmental disorders
The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific
Society for Neurochemistry
The 55th Annual Meeting of the Japanese
Society for Neurochemistry
Kobe International Conference Center (**兵庫県
神戸市**) 2012年09月30日 ~ 2012年10月02日

20. Keiko Nakao, Chiaki Itami, Mayumi
Yamada, Fumitaka Kimura (中尾 啓子, 伊丹
千晶, 山田 真弓, 木村 文隆)
Electrophysiological and neurochemical
analyses of neurons in the developmeing
barrel cortex following in utero gene-transfer
directed to the medial ganglionic eminence.
子宮内電気穿孔法により遺伝子導入された
大脳皮質体性感覚野抑制性神経細胞の電気
生理学的・神経化学的解析
The 35th Annual Meeting of the Japan
Neuroscience Society , Nagoya Congress
Center (愛知県名古屋市)
2012年09月18日~9月21日

21. Minako Orihara-Ono , Masako Toriya ,
Keiko Nakao, Hideyuki Okano

Downregulation of Notch mediates the seamless transition of individual Drosophila neuroepithelial progenitors into optic medullar neuroblasts during prolonged G1
ISSCR 2012 (国際幹細胞学会第10回年次大会) Pacifico Yokohama (神奈川県横浜市)
2012年6月13日～6月16日

22.堀永 実, 丹羽 直也, 平澤 陽介, 勝井 政博, 花島 文成, 中平 洋子, 矢内原 仁, 朝倉 博孝, 中尾 啓子
正所性膀胱癌モデルにおけるin vivoエレクトロポレーション法の検討
第10 0回日本泌尿器科学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2012年04月21日～2012年04月24日

〔図書〕(計3件)

1. 「発生生物学～基礎から応用展開～」培風館 2017年刊行予定
塩尻信義、弥益恭、加藤容子、加野浩一郎、中尾啓子 企画編集
第15章 発生生物学から再生医療への展開

2. 新しい生物科学 培風館 2017年刊行予定
弥益恭、野口航、中尾啓子 企画編集
第11章 医療に貢献する生物学

3. 動物の事典(共著) 朝倉書店、in press(2016年刊行予定)
7.6章「再生と組織幹細胞」
中尾啓子

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

1. 名称: 抗腓ポリペプチド特異的モノクローナル抗体
発明者: 藤谷与士夫、原朱美、中尾啓子、綿田裕孝
権利者: 順天堂大学、埼玉医科大学
種類: 特願
番号: 2015-246912
出願年月日: 2015年12月
国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 啓子 (NAKAO, Keiko)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70338185

(2) 研究分担者

伊丹 千晶 (ITAMI Chiaki)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90392430

*2012年4月～2012年8月のみ
(2012年8月末辞退)

(3) 連携研究者

星野 幹雄 (HOSHINO, Mikio)
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経センター病態生化学研究部・部長
研究者番号: 70301273