

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22123006

研究課題名（和文）神経軸索投射による多様性形成機構の解析

研究課題名（英文）Studies on diversity of axon guidance mechanisms

研究代表者

榎 正幸（Masu, Masayuki）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20243032

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 85,600,000円

研究成果の概要（和文）：皮質脊髄路形成におけるヘパラン硫酸糖鎖の役割について調べた。ヘパラン硫酸の6位の硫酸基を選択的に分解するエンドスルファターゼ（Sulf1, Sulf2）を破壊したダブルノックアウトマウスでは、視床下部付近の脳表に軸索ガイダンス分子Slit2が過剰に蓄積し皮質軸索を反発するために、中脳付近で異常な背側への投射異常異常が起こること、錐体交差にも異常が観察されることなどを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：We studied the roles of heparan sulfate in corticospinal tract formation. We generated the double knockout (DKO) mice for Sulf1 and Sulf2, which are normally required for 6-O-desulfation of heparan sulfate. We found that Sulf1/2 DKO mice had axon guidance defects in the corticospinal tract. The cortical axons abnormally projected towards the superior and inferior colliculi, and midline crossing did not occur normally in the pyramidal decussation. These results suggest that heparan sulfate modification by Sulf1/2 is required for normal corticospinal tract formation.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：脳 発生 糖鎖 神経回路 大脳皮質 ヘパラン硫酸 軸索ガイダンス 皮質脊髄路

### 1. 研究開始当初の背景

発生期に神経細胞は標的細胞へ軸索を投射し神経回路網を形成する。この時、神経軸索は誘引分子と反発分子の作用により特異的な標的へ誘導される。6層から成る大脳皮質は、各層のニューロンが異なる入出力を持ち、皮質間でも機能的結合が存在するため、複雑なネットワークを作る。また、皮質脊髄路は最も長い神経経路であり、その形成に複数のガイダンス分子が関与することが知られている。研究開始当初までの研究で、大脳皮質線維の形成に関わる分子が複数報告されていたが、軸索ガイダンスの多様性を生み出す仕組みは未解明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、シグナル分子、受容体、細胞外マトリックス制御などの観点から研究し、高次脳機能の基盤となる大脳皮質の多様性獲得の分子機構を解明することを目的とした。特にヘパラン硫酸の修飾を行うエンドスルファターゼ (Sulf1, Sulf2) に注目し、糖鎖による軸索ガイダンス調節機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ (Sulf1, Sulf2) 遺伝子を破壊したノックアウトマウス、特に Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウトマウスを用いて皮質脊髄路形成におけるヘパラン硫酸修飾の役割を調べた。具体的には、免疫組織化学と *in situ* ハイブリダイゼーション法による蛋白質と mRNA の局在解析、DiI 標識や神経路特異的蛍光蛋白発現マウス系統を用いた神経回路の解析、糖鎖の生化学的解析などを行った。

### 4. 研究成果

研究開始時に、Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウトマウスでは、皮質脊髄路に走行異常があることが分かっていたが、異常が生じる分子機構については不明であった。そこで、次の実験を行い、以下の点について明らかにした。

#### (1) Sulf 蛋白質の局在解析

Sulf1 と Sulf2 の mRNA は、胎児期には第3脳室の脳室壁に強く発現しているが、皮質脊髄路の軸索が伸長するのは脳表であり、どのようにして遠く離れた場所を走行する軸索に影響を及ぼすのかが疑問であった。Sulf1/Sulf2 を発現する細胞が長い突起を脳表まで延ばす放射状グリア細胞であることがわかり、電気穿孔法で導入した Sulf1/Sulf2 蛋白質が脳表に存在することから、Sulf1/Sulf2 蛋白質は放射状グリア細胞の endfeet まで運ばれて作用すると考えられた。しなしながら、内在性の Sulf1/Sulf2 蛋白質も同じ局在を示すかどうか不明であったため、市販の抗体を複数チェックし、細胞外マトリクス蛋白質を保持しやすい固定法を選択することにより、

Sulf1/Sulf2 蛋白質の局在を免疫組織化学法により示すことができた。そのデータによると、Sulf1 蛋白質と Sulf2 蛋白質はいずれも、脳表の基底膜に沿って局在していた。

#### (2) ヘパラン硫酸の構造変化の解析

Sulf1/Sulf2 はヘパラン硫酸糖鎖の中の6位の硫酸基を選択的に加水分解する活性があり、特に、2位、6位、N位の3箇所が硫酸化された triS 構造を認識して、その6位の硫酸基を脱硫酸化する。実際、脳から抽出したヘパラン硫酸の二糖組成解析を行うと、triS 構造が増加していることが分かった。しかしながら、生体内で均一にその変化が起こっているのか、どこか一部で局所的に起こっているかは分からなかった。そこで、オランダの van Kuppevelt 博士から供与された複数の抗ヘパラン硫酸抗体を用いて免疫染色を行ったところ、Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウトマウスでは、triS 構造を多く含むヘパラン硫酸が大脳脚～視床下部領域の脳表の基底膜で増加していることが明らかとなった。前述のデータと合わせると、正常マウスの脳では、Sulf1/Sulf2 蛋白質が脳表で働いて、triS 構造の少ないヘパラン硫酸を作り出していると言える。

#### (3) 質量分析法を用いた軸索ガイダンス分子の網羅的解析

これまでの実験から、Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウトマウスでは、脳表のヘパラン硫酸の組成が変化した結果、軸索ガイダンス分子の発現や局在が変化し、皮質脊髄路の異常を引き起こすのではないかと考えられた。そこで、Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウトマウスと対照マウスの胎児脳から取り出した蛋白質を質量分析法を用いて解析したところ、複数の軸索ガイダンス分子の発現量に差があることが明らかになった。そこで、これら候補分子の全てについて *in situ* ハイブリダイゼーションで発現部位を調べ、電気穿孔法による過剰発現により皮質軸索に対する効果の有無を調べた。その結果、Slit2 が胎児脳の第3脳室脳室壁に強く発現し、皮質軸索を反発する活性を有することが分かった。Slit2 蛋白質はヘパリンやヘパラン硫酸に結合し、しかもその結合に6位の硫酸基が必要なことが分かっている。従って、Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウトマウスでは、6位の硫酸基が過剰に付加されたヘパラン硫酸に Slit2 蛋白質が結合して異常に蓄積し、皮質脊髄路の異常を引き起こすと考えられた。

#### (4) Slit2 蛋白質の局在

そこで、内在性の Slit2 蛋白質の局在を調べるために多数の市販の抗体をチェックしたが、免疫組織化学に用いることのできる抗体は得られなかった。そこで、Slit2 の受容体である Robo2 の細胞外ドメインに免疫グロブリンの Fc 領域を結合した組換え蛋白質を合成し、

それを用いて Slit2 蛋白質の局在を調べた。その結果、正常マウスの脳表では Robo2-Fc の結合はほとんど検出できなかったが、Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウトマウスでは、脳表に強い結合が観察された。一方、Sulf1/Sulf2/Slit2 トリプルノックアウトマウスでは Robo2-Fc の結合がほとんど消失することから、Robo2-Fc のシグナルは Slit2 に由来することが分かった。

#### (5) Slit2 関与の証明

Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウトマウスで観察された表現型が Slit2 蛋白質の異常蓄積によることを証明するために、Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウト; Slit2 ヘテロマウスを作成したが、表現型の回復は見られなかった。そこで次に、Robo2-F を電気穿孔法により発現させ Slit 蛋白の機能を中和したところ、Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウトマウスの異常が部分的に回復することが分かった。従って、少なくとも Slit が Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウトマウスの表現型出現に強く関わっていることが明らかになった。

#### (6) 成獣マウスを用いた解析

これまで用いてきた純系の遺伝背景では、Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウトマウスは生後 1 日以内に死亡するため、生後に完成する皮質脊髄路の詳細については解析できなかった。最近になり、純系マウスを ICR 系統と交配した雑種では、Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウトマウスが成獣まで育つことがわかった。そこで、このマウスを用いて皮質脊髄路について解析したところ、錐体交差に異常があり、多くの繊維が交差せずに延髄から脊髄の腹側部を伸長するが比較的側内側を走行している繊維の一部は交差すること、胎児期に見られた上丘・下丘への異常投射が成獣でも残存していることが明らかとなった。

以上の結果から、Sulf1/Sulf2 は脳表基底膜のヘパラン硫酸に作用して 6 位の脱硫酸化を行うことにより Slit2 蛋白質の局在量を調節し、皮質軸索が正しく伸長する状態を作り出していることを明らかにすることができた。

#### 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 14 件)

Freeman, S.D., Keino-Masu, K., Masu, M., and Ladher, R.K. Expression of the heparan sulfate 6-O-endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, in the avian and mammalian inner ear suggests a role for sulfation in inner ear development. *Dev. Dyn.* 244, 2015, 168-180, 査読有

Wang, R., Iwakura, Y., Araki, K.,

Keino-Masu, K., Masu, M., Wang, X., Takei, N., Higashiyama, S., and Nawa, H. ErbB2 dephosphorylation and anti-proliferative effects of neuregulin-1 in ErbB2-overexpressing cell lines; re-evaluation of their low-affinity interaction. *Scientific reports.* 3, 2013, 1402, 査読有

Akamatsu, M., Takuma, H., Yamashita, T., Okada, T., Keino-Masu, K., Ishii, K., Kwak, S., Masu, M., and Tamaoka, A. A unique mouse model for investigating the properties of amyotrophic lateral sclerosis-associated protein TDP-43, by in utero electroporation. *Neurosci. Res.* 77, 2013, 234-241, 査読有

榎 和子, 榎 正幸. ヘパラン硫酸微細構造の組織特異性とその決定機構. *医学のあゆみ.* 245 (7), 2013, 600-602, 査読有

Nagamine, S., Tamba, M., Ishimine, H., Araki, K., Shiomi, K., Okada, T., Ohto, T., Kunita, S., Takahashi, S., Wismans, R.G.P., van Kuppevelt, T.H., Masu, M., and Keino-Masu, K. Organ-Specific Sulfation Patterns of Heparan Sulfate Generated by Extracellular Sulfatases Sulf1 and Sulf2 in Mice. *J. Biol. Chem.*, 287, 2012, 9579-9590, 査読有

Nikitopoulou, I., Oikonomou, N., Karouzakis, E., Sevastou, I., Nikolaidou-Katsaridou, N., Zhao, Z., Mersinias, V., Armaka, M., Xu, Y., Masu, M., Mills, G. B., Gay, S., Kollias, G., and Aidinis, V. Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *J. Exp. Med.* 209, 2012, 925-933, 査読有

榎 正幸. 小脳回路形成の分子機構. *生体の科学.* 63, 2012, 20-25, 査読有

Koike, S., Yutoh, Y., Keino-Masu, K., Noji, S., Masu, M., and Ohuchi, H. Autotaxin is required for the cranial neural tube closure and establishment of the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. *Dev. Dyn.* 240, 2011, 413-421, 査読有

Terawaki, S., Yano, K., Katsutani, T., Shiomi, K., Keino-Masu, K., Masu, M., Shomura, Y., Komori, H., Shibata, N., and Higuchi, Y. Crystallographic characterization of the DIX domain of the Wnt signalling positive regulator Ccd1. *Acta Crystallographica F67*, 2011, 758-761, 査読有

Kamijo, H., Matsumura, Y., Thumkeo, D., Koike, S., Masu, M., Shimizu, Y., Ishizaki, T.

and Narumiya, S. Impaired vascular remodeling in the yolk sac of embryos deficient in ROCK-I and ROCK-II. *Genes Cells*, 16, 2011, 1012-1021, 査読有

Nagamine, S., Keino-Masu, K., Shiomi, K., and Masu, M. Proteolytic cleavage of the rat heparan sulfate 6-O-endosulfatase SulFP2 by furin-type proprotein convertases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 2010, 107-112, 査読有

Koike, S., Keino-Masu, K., and Masu, M. Deficiency of autotaxin/lysophospholipase D results in head cavity formation in mouse embryos through the LPA receptor-Rho-ROCK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400, 2010, 66-71, 査読有

Yamazoe, H., Keino-Masu, K., and Masu, M. Combining the Cell Encapsulation Technique and Axon Guidance for Cell Transplantation Therapy. *J. Biomaterial Sci.* 21, 2010, 1815-1826, 査読有

Syu, A., Ishiguro, H., Inada, T., Horiuchi, Y., Tanaka, S., Ishikawa, M., Arai, M., Itokawa, M., Niizato, K., Iritani, S., Ozaki, N., Takahashi, M., Kakita, A., Takahashi, H., Nawa, H., Keino-Masu, K., Arikawa-Hirasawa, E., and Arinami, T. Association of the HSPG2 Gene with Neuroleptic-Induced Tardive Dyskinesia. *Neuropsychopharmacology* 35, 2010, 1155-1164, 査読有

[学会発表](計25件)

藤田 祥平、寺脇 慎一、塩見 健輔、榎 和子、榎 正幸、若松 馨、柴田 直樹、樋口 芳樹. ゼブラフィッシュ CCD1 DIX ドメインの X 線結晶解析 X-ray crystallographic analysis of zebrafish CCD1 DIX domain. 第 32 回 PF シンポジウム(2015/3/17-18、つくば国際会議場、茨城県・つくば市)

Takuya Okada, Kazuko Keino-Masu, Masayuki Masu. A role of neurotrophin signaling in the migration and nucleogenesis of precerebellar neurons. 第 38 回日本神経科学学会大会(2015/9/28-31、神戸国際会議場、兵庫県・神戸市)

Kazuko Keino-Masu, Takuya Okada, Masayuki Masu. Heparan sulfate modification by endosulfatases Sulf1 and Sulf2 is required for the corticospinal tract formation. International Symposium on Glyco-Neuroscience. (2014/1/9-11, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo・Awaji)

詫間 浩、赤松 恵、山下 雄也、Oehring, H., 岡田 拓也、榎 和子、石井 一弘、Jirikowski, G., 郭 伸、榎 正幸、玉岡 晃. 子宮内電気穿孔法 TDP-43 遺伝子導入による in vivo 形成封入体の微細形態の検討. 第 55 回日本神経学会総会 (2014/5/21-24、福岡国際会議場、福岡県・福岡市)

Takuya Okada, Nana Kagaya, Kazuko Keino-Masu, Masayuki Masu. Analysis of the corticospinal tract formation in adult *Sulf1*;*Sulf2* double knockout mice. 第 37 回日本神経科学学会大会 (2014/9/11-13、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市)

Megumi Akamatsu, Hiroshi Takuma, Takenari Yamashita, Takuya Okada, Kazuko Keino-Masu, Hartmut Oehring, Shin Kwak, Masayuki Masu, Gustav F Jirikowski, Akira Tamaoka. Electron microscopic observation of intranuclear aggregation of TDP-43 in mouse cerebral cortex produced by in utero electroporation. 第 37 回日本神経科学学会大会 (2014/9/11-13、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市)

Takuya Okada, Nana Kagaya, Kazuko Keino-Masu, Masayuki Masu. Analysis of the corticospinal tract formation in adult *Sulf1*;*Sulf2* double knockout mice. 第 37 回日本神経科学学会大会(2014/9/11-13、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市)

詫間 浩、赤松 恵、山下 雄也、岡田 拓也、石井 一弘、榎 和子、郭 伸、榎 正幸、玉岡 晃. マウス胎仔電気穿孔法による in vivo TDP-43 遺伝子導入と封入体形成の検討. 第 54 回日本神経学会総会 (2013/5/29-6/1、有楽町フォーラム、東京都・千代田区)

榎 和子、奥谷 文乃、椛 秀人、榎 正幸. ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ Sulf1 の嗅覚記憶における役割. 第 36 回日本神経科学学会大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 30 回日本神経回路学会大会 (2013/6/20-23、国立京都国際会館、京都府・京都市)

赤松 恵、詫間 浩、山下 雄也、岡田 拓也、石井 一弘、榎 和子、郭 伸、榎 正幸、玉岡 晃. 筋萎縮性側索硬化症関連タンパク：TDP-43 封入体の形成-マウス胎児電気穿孔法による大脳皮質運動野への疾患関連遺伝子の導入. 第 36 回日本神経科学学会大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 30 回日本神経回路学会大会 (2013/6/20-23、国立京都国際会館、京都府・京都市)

榎 正幸、昌子 浩孝、塩見 健輔、宮川 剛、榎 和子. Ccd1/Dixdc1 欠損マウスにおける行動異常. 第 36 回日本神経科学学会大会・第

56 回日本神経化学学会大会・第 30 回日本神経回路学会大会(2013/6/20-23、国立京都国際会館、京都府・京都市)

Takashima, Y., Yashiro, H., Masu, M., Keino-Masu, K., and Nagata, M. Extracellular sulfatases regulate PDGF signaling and promotes nephropathy in diabetes. Kidney week 2012 (2013/11/5-10, Atlanta, USA)

Akamatsu, M., Takuma, H., Yamashita, T., Okada, T., Ishii, K., Keino-Masu, K., Kwak, S., Masu, M., Tamaoka, A. TDP-43 aggregation produced by In utero electroporation and its properties in the mouse motor neurons. 43th Annual Meeting of Society for Neuroscience (2013/11/11, San Diego Convention Center, USA)

Masayuki Masu, Takuya Okada, Satoshi Nagamine, Tatsuyuki Ohto, Fuyuki Kametani, Masato Hasegawa, Satoshi Kunita, Satoru Takahashi, and Kazuko Keino-Masu. Heparan Sulfate Modification by Endosulfatases is Required for Cortical Axon Guidance. 1<sup>st</sup> international symposium/ 59<sup>th</sup> NIBB conferences “Neocortical organization” (2012/3/10-13、岡崎カンファレンスセンター、愛知県・岡崎市)

詫間 浩、赤松 恵、岡田 拓也、山下 雄也、石井 一弘、榎 和子、郭 伸、榎 正幸、玉岡 晃。マウス胎仔電気穿孔法を用いた新規筋萎縮側索硬化症モデルの開発。第 53 回日本神経学会総会(2012/5/23-25、東京国際フォーラム、東京都・千代田区)

Takashima, Y., Yamashita, H., Sakamoto, K., Hara, S., Kobayashi, N., Ueno, T., Keino-Masu, K., Masu, M. and Nagata, M. Role of podocyte extracellular sulfatase in regulation of glomerular permeability. Kidney week 2012 (2012/10/30-11/4, San Diego, USA)

M. Masu. Roles of heparan sulfate endosulfatases in neural development. The 3rd Workshop between University of Tsukuba and University of Edinburgh (2011/6/13, Edinburgh, University of Edinburgh, UK)

榎 正幸、岡田 拓也、長嶺 聖史、大戸 達之、亀谷 富由樹、長谷川 成人、國田 智、高橋 智、榎 和子。ヘパラン硫酸糖鎖による軸索ガイダンス制御機構。第 34 回日本神経科学学会大会(2011/9/14-17、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市)

寺脇 慎一、塩見 健輔、榎 正幸、柴田 直樹、樋口 芳樹。Wnt シグナル伝達機構ではたらく CCD1 の構造化学的研究。第 10 回日本蛋白質科学学会年会(2010/6/16-18、札幌コンベン

ションセンター、北海道・札幌市)

岡田 拓也、榎 和子、長嶺 聖史、國田 智、高橋 智、Arie Oosterhof, Toon Kuppevelt、榎 正幸。マウス胎児脳におけるヘパラン硫酸多様性の検出。第 33 回日本神経科学学会大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会(2010/9/2-4、神戸コンベンションセンター、兵庫県・神戸市)

② 寺脇 慎一、塩見 健輔、榎 正幸、柴田 直樹、樋口 芳樹。Wnt シグナル伝達で機能する CCD1 オリゴマー形成機構に関する構造学的研究。日本結晶学会 2010 年年会(2010/12/3-5、大阪大学コンベンションセンター、大阪府・吹田市)

② 榎正幸。The roles of heparan sulfate in axon guidance. International Graduate Schools International Conference (2010/11/1、つくば国際会議場、茨城県・つくば市)

③ T. Okada, K. Keino-Masu, S. Nagamine, S. Kunita, S. Takahashi, M. Masu. Heparan sulfate 6-O-endosulfatases are required for neural network formation. The 40th Annual meeting of the Society for Neuroscience(2010/11/13-17, San Diego convention center, USA)

④ 寺脇 慎一、塩見 健輔、榎 正幸、柴田 直樹、樋口 芳樹。Wnt シグナル伝達で機能する CCD1 DIX ドメインの X 線結晶構造解析。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会(2010/12/7-10、神戸国際会議場、兵庫県・神戸市)

⑤ Tagiuchi, S. Koike, Y. Yutoh, K. Keino-Masu, S. Noji, M. Masu, H. Ohuchi. Autotaxin is required for anterior neural ridge formation, midbrain-hindbrain boundary patterning, and cranial neural tube closure. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会(2010/12/7-10、神戸国際会議場、兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 2 件)

Masu, M. Springer-Verlag, Tokyo, Emerging roles of heparan sulfate in axon guidance. In: Cortical Development: Neural Diversity and Neocortical Organization (ed. by R. Kageyama and T. Yamamori), 2013, pp. 203-214.

Masu, M., Koike, S., Okada, T., and Keino-Masu, K. Studies on autotaxin signaling in endocytic vesicle biogenesis and embryonic development using whole embryo culture and electroporation. In: Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry. (Ed. by J. Chun et al.), chapter 7, 2013, pp. 121-136.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/duo/molneurobiol/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

榎 正幸 (MASU Masayuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20243032

### (2)研究分担者

塩見 健輔 (SHIOMI kensuke)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：00311598

榎 和子 (MASU Kazuko)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50344883