

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：

課題番号：18300120

研究課題名（和文） 聴覚神経回路・周波数依存性マップ形成に関わる
神経細胞接着分子 NB-2 の機能解析研究課題名（英文） Analysis of neural cell adhesion molecule NB-2 involved in
the postnatal development of auditory pathways

研究代表者 渡邊 和忠

研究成果の概要：

神経認識分子 NB-2 はコンタクチン5とも呼ばれ、聴覚系神経回路で特に顕著に発現している。本研究では、先ず NB-2 が音の聞こえ始める直前に発現が強くなり、特に高周波数に反応する領域で発現していることを明らかにした。次に、遺伝子欠損型マウスと野生型マウスで聴覚系神経回路の発達と機能を比較し、遺伝子欠損型マウスでは特に興奮性の神経回路のシナプス部位に異常があり、その結果、一部の神経細胞が細胞死を起こしていること、音に対する脳幹の反応に遅れが出ることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
19年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
20年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	11,800,000	3,540,000	15,340,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

私たちは、コンタクチンサブグループに属する神経細胞接着分子群に興味を持って研究を進める過程で、私たちが発見・同定した NB-2 (コンタクチン5とも呼ばれる) がサブグループの他の分子と異なり、脳内の極めて限定された部位でのみ強く発現していることを明らかにしていた。更に NB-2 欠損型マウス作製の際に、NB-2 遺伝子を TauLacZ で置換し発現部位を同定したところ、蝸牛神経核、上オリブ核、下丘、内側膝状体、聴覚野の全ての聴覚系神経回路で強い発現が認めら

れ、聴覚刺激性痙攣テストでの異常や純音刺激による解析で周波数依存性マップ形成不全などの異常を見いだしていた。

私たちは、(1) NB-2 が神経突起伸長活性を有すること、(2) 発現時期が聴覚系発達時期に一致すること、(3) NB-2 欠損マウスは下丘の中心核で神経興奮性低下、周波数依存性マップ形成不全を示すこと、(4) 周波数依存性マップ形成に関与する部位で特に強く発現していること、(5) 同じサブグループの他分子でこれまで明らかにされている機能から、NB-2 が PDZ タンパク質結合領域

を持つ Caspr ファミリー分子と複合体を形成し、チャネルの局在化制御やシナプス、ミエリン形成に関与している可能性が高いことなどから、NB-2 が聴覚系において回路形成と伝達物質をリンクさせる極めて重要な役割を果たしていると考えた。そこで、NB-2 の機能解析から聴覚系の神経回路網の形成、成熟の機構に迫ることを考えた。

当時、コンタクチンサブグループのうち、コンタクチンと TAG-1 が有髄神経のミエリン鞘の形成・維持に重要であることが明らかにされていたが、同じサブグループである NB-2 については、神経細胞上の局在すら不明であった。

2. 研究の目的

音の刺激は、蝸牛から螺旋神経核、蝸牛神経核 (CN)、上オリーブ核群 (SOC)、外側毛帯核 (LL)、下丘 (IC)、内側膝状体を経由し、最終的に大脳皮質・聴覚野に到達する (図 1 A)。聴覚の発達過程において、スナネズミやラットでは蝸牛神経核から上オリーブ核への投射は出生前におおよそ出来上がっており、出生後においては音が聞こえ始める前にシナプスの成熟を含む神経回路の洗練が行われる。

SOC のうち外側上オリーブ核 (LSO) は同側と対側の耳からの聴覚情報を統合し、音の位置を決めるために必須の部位である。LSO は同側の CN から興奮性入力であるグルタミン酸作動性を受け、対側の CN から入力を受けた台形体核 (MNTB) から抑制性入力を受けている (図 1 B)。LSO への、これら 2 つの入力のバランスによって音源定位が可能になると考えられている。

CN から MNTB や LSO へのおおよその投射は出生前に出来上がっているが、出生直後から 3 週間の内に、シナプスの成熟が起きる。CN の神経細胞の終末が MNTB の大型神経細胞とシナプスを作っている部位は calyx of Held と呼ばれる動物細胞最大のシナプスである。これらのシナプス形成・成熟に関与する分子メカニズムを明らかにするためには、これらの部位、及び時期に特異的に発現する分子の機能を解析することが重要である。

NB-2 は発達過程の聴覚系神経回路に特異的に発現している神経認識分子である。NB-2 欠損型マウスでは、聴覚刺激性痙攣テストでの反応性が野生型に比較して弱いこと、また、純音刺激では、下丘において c-Fos の発現が分散しており周波数に依存するバンド状の発現が見られないこと等、聴覚機能に異常が認められた。これらのことは NB-2 が聴覚系神経回路形成に重要な役割を担っていることを示唆しているが、分子レベルでの意義は不明である。そこで、本研究は、先ず、NB-2 が聴覚系神経回路において (1) どのような

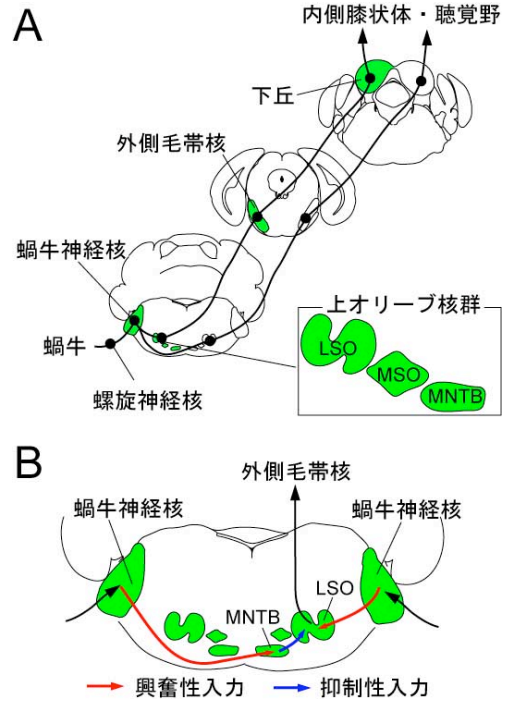


図 1 マウス聴覚回路の模式図

A: 上行性聴覚神経回路

B: 蝸牛神経核から上オリーブ核群への投射様式

LSO: 外側上オリーブ核, MSO: 内側上オリーブ核,

MNTB: 台形体核

神経細胞で発達のどの段階で発現しているか、また、(2) 細胞上でどこに局在しているか、(3) 遺伝子欠損によって聴覚系神経回路にどのような異常が認められるか、(4) 遺伝子欠損が聴覚系の機能にどのような影響を与えるかを解析し、NB-2 の聴覚系での役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物

Wistar ラットは長岡技術科学大学の動物施設で飼育した。129/SVJ の幹細胞を用いて作製した NB-2 欠損型マウスを C57BL/6 と 12 世代掛け合わせたものを使用した。全ての動物実験は本学の動物委員会の審査を受け、認められた数の動物を用いて、日本神経科学学会のガイドラインに沿って行った。

免疫組織化学と in situ ハイブリダイゼーションのためにマウスはペントバルビタールで麻酔した後、4%フォルムアルデヒドを含む 0.1 M のリン酸緩衝液を用いて灌流固定した。脳を取り出し、4°C の固定液中で一晩固定した後、30%ショ糖を含む PBS 中で一晩置いた。

(2) 抗体

マウス抗ラット NB-2 モノクローナル抗体 3G12、ラット抗マウス NB-2 モノクローナル

抗体 1B10、1C4 の作製には、それぞれラット、及びマウスの NB-2-Fc 融合タンパク質を HEK293T 細胞に発現させたものを免疫に使用した。その他の一次抗体としてはモルモット抗 VGLUT1 抗体 (Chemicon, AB5905)、マウス抗 MAP2 抗体 (Chemicon, MAB3418)、ウサギ抗 caspase-3 抗体 (BD Biosciences, 559565) を使用した。

(3) 免疫組織化学

O. C. T. compound (Sakura Finetek) に包埋した脳から 12 μm の厚さの切片を作製し、APS コートのスライドガラスに載せた。室温で乾燥させた後、抗 NB-2 抗体での蛍光染色では、Vectastain Elite ABC キット (Vector Laboratories) とチラミドシグナル増強キット (Molecular Probes) を用いた。切片は 0.3% の過酸化水素を含む PBS で処理した後、PBS で 3 回洗浄し、10% BSA, 3%ウサギ血清を含む PBS 中で室温、1 時間インキュベーションを行った。その後、1% BSA を含む PBS で 1,000 倍に希釈した 1 次抗体を加え 4°C で一晩、反応させた。PBS で 3 回、洗った後、1.5%ウマ血清で希釈したビオチン標識抗ラット IgG 抗体と 1 時間反応させ、その後、PBS で数回、洗浄した。ABC 試薬と室温で 30 分間反応させ、PBS で洗い、Alexa Fluor 488、又は Alexa Fluor 546 で標識したチラミドと 5 分間室温で反応させた。PBS で洗浄した後、カバーガラスを被せ、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus) で観察した。その他の抗体を用いた検出では、通常の方法によって染色した。

(4) in situ ハイブリダイゼーション

マウス NB-2 の cDNA 断片 (Ig 領域 III-VI) を含む pGEM-11Zf(+) を用いて RNA プローブを作製した。RNA は DIG 標識キット (Roche) を用いて合成した。マウス脳切片は乾燥させた後、4%パラフォルムアルデヒドを用いて室温で 15 分間固定した。PBS で洗った後、7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテナーゼ K を含む 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4 中で 37°C、10 分間インキュベートした。もう一度、4%パラフォルムアルデヒドで 10 分間固定、PBS による洗浄の後、0.25%無水酢酸、0.1M トリエタノールアミン、pH 8.0 中でインキュベートした。乾燥させた後、100 倍に希釈したプローブを加えて 50°C、16 時間反応させた。65°C の 50%フォルムアルデヒドを含む 2 x SSC、2 x SSC、最後に 0.2 x SSC 中でそれぞれ 2 回洗浄した。ブロッキング液でブロッキングした後、TSA ブロッキング緩衝液 (PerkinElmer) 中でインキュベートした後、HRP 標識した抗 DIG 抗体 (100 倍希釈) を加え、1 時間反応させた。100 mM マレイン酸、pH 7.5、150 mM NaCl, 0.3% Tween 20 中で 3 回洗った後、TSA キット (Molecular Probes) を用いてシグナルを検出した。

(5) 聴性脳幹反応 (ABR)

麻酔したマウスに対して 8 kHz から 20 kHz のクリック音を与えて ABR を測定した。ステンレス製の電極を両側の頭頂の皮下に、背中にアース電極を挿入した。10 dB から 90 dB の範囲で 5 dB 毎にクリック音を聞かせ、反応を記録した。

4. 研究成果

(1) モノクローナル抗体の作製と性質

ラット NB-2-Fc またはマウス NB-2-Fc を免疫し、NB-2-6xHis を用いた ELISA またはウエスタンブロットによってスクリーニングして、マウス抗ラット NB-2 モノクローナル抗体 3G12、ラット抗マウス NB-2 モノクローナル抗体 1C4、1B10 を得た。3G12 は免疫組織、ウエスタンブロットともにラットの組織のみに反応し、マウスには反応しなかった。一方、1C4 はマウスの免疫組織化学に使用することができ、1B10 はウエスタンブロットにそれぞれ使用可能であった。

(2) 聴性脳幹における NB-2 の局在

3G12、1C4 を用いてそれぞれラット、マウスの聴覚系神経回路の免疫染色を行ったところ、共に良く似た染色像が得られた。脳全体では聴覚系神経回路以外に前腹側視床、黒質、脳梁等に強いシグナルが見られた。出生後 7 日のラットの聴覚系神経回路では、CN や SOC などの聴性脳幹に強く発現しており、CN では後腹側 CN (PVCN)、前腹側 CN (AVCN) で発現が見られたが、背側 CN では見られなかった。PVCN と AVCN では、腹側軸に沿って減少していた。SOC では LSO や MNTB で特に発現が強かった。IC では、中心核の特に後腹側で強い発現が見られた。これらの部位は、CN および IC 共に高音感受性部であり、NB-2 は高音感受性部位での発現が特に強いことが明らかになった (図 2)。

(3) 脳幹における NB-2 発現細胞

SOC の MNTB は対側の腹側 CN (VCN) から入力を受け、主要細胞と calyx of Held と呼ばれる大型の興奮性シナプスを形成する。NB-2 と興奮性シナプスマーカーである VGLUT1 との二重免疫蛍光染色を行ったところ NB-2 は VGLUT1 と共局在することが明らかになった。また、LSO のシナプス部位においても同様に VGLUT1 と共局在していた。そこで、VCN において in situ ハイブリダイゼーションを行って NB-2 発現細胞を同定したところ、bushy neuron で発現していることが明らかになった。このことから、NB-2 は VCN の bushy neuron で発現し、腹側聴条を通過して MNTB、LSO のシナプス末端まで輸送されることが明らかになった。

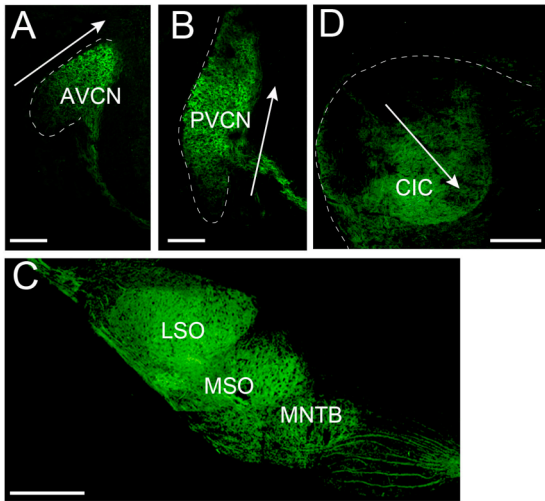


図2 聴覚系脳幹部意におけるNB-2の発現

作製した抗体 (3G12) を用いた免疫組織染色より、生後7日のラット聴覚系では、NB-2は蝸牛神経核 (A, B)、上オリーブ核群 (C)、下丘 (D) などの部位で発現し、特に高音感受性部位における発現が強かった。矢印は周波数の部位的表現を表しており、矢印の方向に従って低音から高音に至る。AVCN: 前腹側蝸牛神経核、PVCN: 後腹側蝸牛神経核、LSO: 外側上オリーブ核、MSO: 内側上オリーブ核、MNTB: 台形体核、CIC: 下丘中心核
Scale bars: A-D, 200 μm

(4) 発達段階でのNB-2とVGLUT1の発現時期
ラットでは、NB-2はVCNにおいては出生後2日から10日で強く、SOCでは、出生後7日に最も強い発現が見られた。一方、VGLUT1はNB-2と発現時期は一部オーバーラップするが、遅れており、NB-2の発現がかなり弱くなっている出生後12日頃から強くなっていた。VGLUT1は成熟したシナプスに局在していることが明らかにされているため、NB-2はシナプス形成、又は、成熟の過程に関与している可能性が考えられた。

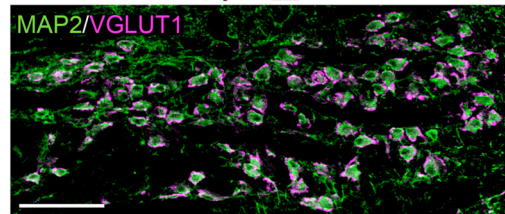
(5) NB-2欠損によるシナプス形成、及び細胞生存に与える影響

MNTBのcalyx of HeldはVCNのbushy neuronからの終末であり、主要細胞の周囲を包み込むように動物細胞最大のシナプスを形成し、bushy neuronと主要細胞がほぼ1:1に対応している。このため、NB-2のシナプスでの役割を明らかにするためには、NB-2遺伝子欠損型マウスと野生型マウスでcalyx of Heldを比較することが重要であると考えた。出生後6日の野生型マウスでは、ほぼ全ての主要細胞でVGLUT1陽性のcalyx of Heldが認められた。一方、NB-2欠損型マウスでは、VGLUT1のシグナルで囲まれていない主要細胞が見られた (図3)。定量的には、野生型で94.5 \pm 0.9%の主要細胞がVGLUT1陽性であったが、NB-2欠損型マウスでは、VGLUT1陽性

シグナルに囲まれた主要細胞は85.2 \pm 1.3%であった。出生後1か月になると、NB-2欠損型マウスにおいてもほとんどの主要細胞はVGLUT1陽性となった (野生型: 98.9 \pm 1.2%、NB-2欠損型: 99.9 \pm 0.8%)。

次に、MNTBの主要細胞の数を野生型とNB-2欠損型マウスで比較したところ、出生後6日では有意な差は認められなかった。しかし、出生後1か月では、NB-2欠損マウスで有意に主要細胞の数が減少していた。このことから、VCNからMNTBへの神経回路の発達にNB-2が重要な働きをしていることが明らかになった。

野生型



NB-2欠損型

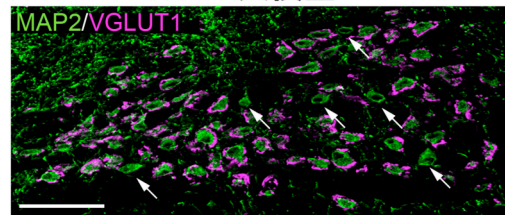


図3 NB-2欠損によるシナプス形成の変化

生後6日のNB-2欠損型と野生型マウスの台形体核をVGLUT1とMAP2で染色した。VGLUT1はプレシナプスのcalyx of Heldに局在し、MAP2はcalyx of Heldがシナプスを形成する主要細胞の細胞体に存在する。NB-2欠損型マウスではVGLUT1陽性calyx of Heldで囲まれていない主要細胞が多く見られた (矢印)。Scale bars: 50 μm

次にVCNからLSOへの投射に対する影響を明らかにするために、野生型とNB-2欠損型のLSOにおけるVGLUT1シグナルを出生後6日と1ヶ月でそれぞれ比較した。その結果、共にNB-2欠損型マウスの方がVGLUT1陽性のシナプス数が少なかった。

そこで、NB-2欠損型マウスにおいてMNTBの主要細胞とVCNのbushy neuronがアポトーシスを起こしている可能性を考え、Caspase-3陽性細胞の数を比較した。その結果、MNTBの主要細胞、VCNのbushy neuronともに、NB-2欠損型マウスの方が野生型に比べて多くのCaspase-3陽性細胞が認められた。

これらのことから、VCNのglobular bushy neuronとspherical bushy neuronでNB-2の発現が欠損することによってcalyx of Held、

及びLSOのグルタミン酸作動性シナプスが成熟できなくなり、その結果、VCNのglobular bushy neuronとspherical bushy neuronだけでなく、ポストシナプス側のMNTBの主要細胞にもアポトーシスが引き起こされたと考えられた。

(6)NB-2欠損によるABRの変化

NB-2欠損型マウスと野生型マウスで8 kHzから20 kHzの間でABRの閾値と波形(IからV)を比較した。その結果、ABRの閾値はこの範囲で有意な違いは見いだされなかった。一方、波形ではNB-2欠損型マウスで、IIIからVの波形が野生型と比較して遅れていた(図4A)。そこで、各波形間の潜時を比較したところ、II-III、III-IVの間の潜時が有意に増大していた(図4B)。

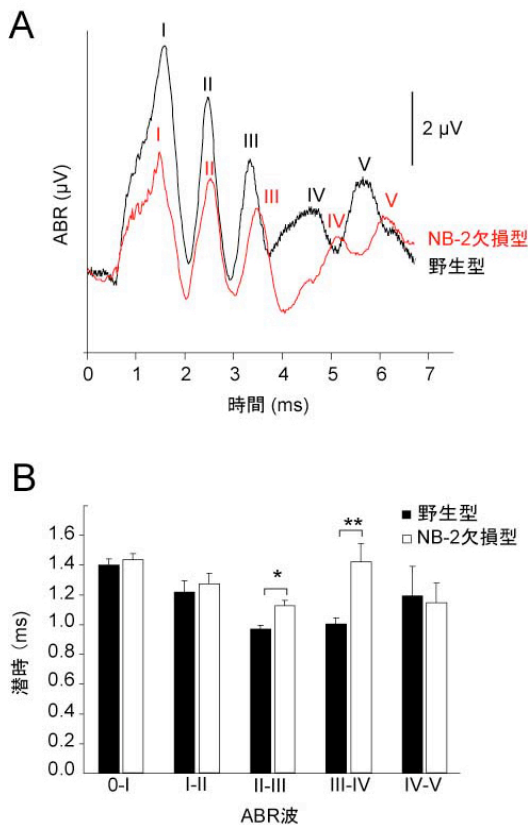


図4 NB-2欠損によるABRの変化

A: NB-2欠損型マウスと野生型マウスのABR波形の比較
生後1ヶ月齢のNB-2欠損型マウス(赤)と野生型マウス(黒)を8 kHz、80 dBのクリック音で刺激した時のABR波形を示す。NB-2欠損型マウスではABRのIII~V波が遅れた。

B: NB-2欠損型マウスと野生型マウスのABR波形の潜時の比較

生後1ヶ月齢のNB-2欠損型マウスと野生型マウスを8 kHz、80 dBのクリック音で刺激した時のABR波形から各波の間の潜時を比較した。NB-2欠損型マウスのII-III波、III-IV波の間の潜時が有意に増加していた(* P<0.05, ** P<0.01; Mann-Whitney test)。

II-III波はCNからSOCへの投射からの反応、III-IV波はSOCからLLへの反応をそれぞれ反映していることから、これら脳幹部分に機能的な欠陥があることを示している。これらの結果は、上記のVCN、LSO、MNTBにおけるNB-2欠損型マウスの欠陥とよく一致していると考えられた。

(7)まとめ

本研究により、NB-2の欠損によってLSOへの興奮性入力が増加し、対側のMNTBの主要細胞が減少することが明らかとなった。MNTBの主要細胞の減少は同側のLSOへの抑制性出力の減少を示唆しており、LSOへの興奮性入力と抑制性入力のバランスに異常が生じ、音源定位に重大な影響を与えることが考えられる。今後、NB-2の関与する聴覚系神経回路発達の機構を更に詳細に明らかにする必要がある。

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8件)

Shimoda, Y. and Watanabe, K.: Contactins: Emerging key roles in the development and function of the nervous system. *Cell Adh. Migr.*, 3(1) 64-70 (2009).

Toyoshima, M., Sakurai, K., Shimazaki, K., Takeda, Y., Nakamoto, M., Serizawa, S., Shimoda, Y. and Watanabe, K.: Preferential localization of neural cell recognition molecule NB-2 in developing glutamatergic neurons in the rat auditory brainstem. *J. Comp. Neurol.*, 513(4), 349-362 (2009).

Oiso, S., Takeda, Y., Futagawa, T., Miura, T., Kuchiiwa, S., Nishida, K., Ikeda, R., Kariyazono, H., Watanabe, K. and Yamada, K.: Contactin-associated protein (Caspr) 2 interacts with carboxypeptidase E in the central nervous system. *J. Neurochem.*, 109(1), 158-167 (2009).

Savvaki, M., Panagiotaropoulos, T., Stamatakis, A., Sargiannidou, I., Karatzioula, P., Watanabe, K., Stylianopoulou, F., Karagogeos, D. and Kleopa, K.A.: Impairment of learning and memory in TAG-1 deficient mice associated with shorter CNS internodes and disrupted juxtaparanodes. *Mol. Cell. Neurosci.*, 39(3), 478-490 (2008).

Chatzopoulou, E., Miguez, A., Savvaki, M., Levasseur, G., Muzerelle, A., Muriel, M.P., Goureau, O., Watanabe, K., Fisher, G., Goutebroze, L., Gaspar, P., Zalc, B., Karageos, D. and Thomas, J.L.: Structural requirement of TAG-1 for retinal ganglion cell axons and myelin in the mouse optic nerve. *J. Neurosci.*, 28(30), 7624-7636 (2008).

Ma, Q.-H., Yang, W.-I., Futagawa, T., Jiang, X.-D., Takeda, Y., Xu, R.-X., Bagnard, D., Schachner, M., Furley, A.J., Karageos, D., Watanabe, K., Dawe, G.S. and Xiao, Z.-C.: A TAG1-APP signaling pathway through Fe65 negatively modulates neurogenesis. *Nature Cell Biol.*, 10(3), 283-294 (2008)

Ye, H., Tan, Y.L.J., Ponniah, S., Takeda, Y., Wang, S.-Q., Schachner, M., Watanabe, K., Pallen, C.J. and Xiao, Z.-C.: Neural recognition molecule CHL1 and NB-3 regulate apical dendrite orientation in neocortex via PTP α . *EMBO J.*, 27(1), 188-200 (2008).

Nie, D.-Y., Ma, Q.-H., Law, J.W.S., Chia, C.-P., Dhingra, N.K., Xu, G., Shimoda, Y., Gong, N., Chen, Q.-W., Hu, Q.-D., Chow, P.K.H., Ng, Y.-K., Ling, E.-A., Watanabe, K., Xu, T.-L., Schachner, M. and Xiao, Z.-C.: Oligodendrocytes regulate formation of nodes of Ranvier via the recognition molecule OMgp. *Neuron Glia Biol.*, 2, 151-164. (2006).

[学会発表] (計 7 件)

国際学会

Toyoshima, M., Okumura, T., Sakurai, K., Shimazaki, K., Shimoda, Y. and Watanabe, K. (2007) Neural recognition molecule NB-2 in the auditory brainstem. 37th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Nov. 3-7, San Diego, USA

Sakurai, K., Suzuki, Y., Takeda, Y., Shimoda, Y., Karageos, D. and Watanabe, K. (2007) Neural cell recognition molecule NB-3 in the developing mouse cerebellum. 37th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Nov. 3-7, San Diego, USA

Toyoshima, M., Takagi, M., Takeda, Y., Shimoda, Y. and Watanabe, K. (2006)

Expression of NB-2 in GABAergic neurons of the rat auditory system. 36th Annual Meeting, Society for Neuroscience. Oct. 14-18, Atlanta, USA

国内学会

豊島学、桜井都衣、武田泰生、島崎久仁子、霜田靖、渡邊和忠 (2008) NB-2 欠損マウスにおける聴性脳幹反応(ABR)の変化とグルタミン酸作動性シナプスの形成異常: 第 51 回日本神経化学学会大会

豊島学、桜井都衣、島崎久仁子、霜田靖、渡邊和忠 (2008) 神経認識分子 NB-2 の欠損がマウス聴覚系に与える影響: 第 31 回日本神経科学大会

豊島学、桜井都衣、島崎久仁子、霜田靖、渡邊和忠 (2007) 聴覚系の上オリブ核群における NB-2 の発現: Neuro 2007 (第 30 回日本神経科学大会、第 50 回日本神経化学学会大会、第 17 回日本神経回路学会大会)

豊島学、武田泰生、霜田靖、渡邊和忠 (2006) ラット聴覚系の GABA 作動性ニューロンにおける NB-2 の発現: 第 29 回日本神経科学大会

6. 研究組織

- (1) 研究代表者: 渡邊 和忠
- (2) 研究分担者: 霜田 靖
- (3) 連携研究者: