

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06503

研究課題名(和文)軸索ガイダンスにおけるリンクスの機能と作用機構

研究課題名(英文)Role of linx in axon guidance and its mechanism of action

研究代表者

萬代 研二 (Mandai, Kenji)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：50322186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膜貫通タンパク質のリンクス/IsIr2が制御する、内包をはじめとする軸索投射の形成におけるリンクスの作用機構の解明のため、リンクス欠損マウス脳に変異リンクス遺伝子を入れ戻した。その結果、内包形成におけるリンクスのドメインの役割が明らかにされた。また、神経科学研究で頻用されるCreドライバーマウスを使った条件付き遺伝子欠損マウスにおいて、本来遺伝子組換えが起こることがない生殖細胞系列で組換えが起き得ることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経回路形成機構の研究分野は、脳の損傷後の機能回復の機構や精神・神経疾患の病因の解明といった臨床医学研究とも密接に関連している。そのため、本研究の成果は、脳虚血による内包の損傷や種々の精神・神経疾患に対する新規治療法の開発のための基盤を提供する可能性がある。さらに、Creドライバーマウスを使った条件付き遺伝子欠損マウスにおいて、本来遺伝子組換えが起こることがない生殖細胞系列で組換えが起き得ることを見出した。この予期していなかった発見は、マウス遺伝学的実験手法を用いる研究者に対して有益な注意喚起となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We re-expressed mutants of the transmembrane protein Linx/IsIr2 in the brains of Linx-deficient mice, in order to elucidate the mechanisms of action of Linx in the formation of axon projections, including the internal capsule, which is regulated by Linx. The results clarified the roles of the Linx domains for the formation of the internal capsule. Additionally, it was unexpectedly found that unexpected germline recombination occurs at varying rates in the mouse Cre driver lines frequently used in neurobiology research.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索ガイダンス 神経回路 内包 細胞接着分子 リンクス IsIr2

1. 研究開始当初の背景

脳は、感覚および、運動、ならびに学習と記憶などの高次脳機能や、体内環境の恒常性の維持などの脳機能のための情報の処理と指令を司る最上位の神経系の中核である。脳がこのような機能を果たすためには、神経細胞が互いに結合し、集団として特定の機能を果たす神経回路を形成することが必要である。神経回路は、軸索が樹状突起や神経細胞体の標的に誘導されてシナプスを介して結合することによって形成される。この軸索の誘導の機構には、分泌因子依存性の機構と細胞接着分子依存性の機構がある。ヒトの脳には1千億から2千億の神経細胞があり、それぞれが神経回路に組み込まれて機能していると考えられている。しかし、このように高度に複雑な神経回路の形成機構には依然として不明な点が多い。

研究代表者は、神経回路の形成機構を解明する目的で、発生期の後根神経節の神経細胞に発現する遺伝子のゲノムレベルでの網羅的な発現解析を行い、新規膜貫通タンパク質をコードする遺伝子リンクス/Islr2を見出している(*Neuron*, 2009)。リンクスは受容体型チロシナーゼのTrkAとRetに結合して、それらの分子の機能を促進する。リンクスは類似のドメイン構造を持つ他の17個の遺伝子と共にLIG遺伝子ファミリーを構成する。このファミリーの代表的な分子は、リンクス同様に種々の受容体に結合する。そのため、リンクスとLIG遺伝子ファミリーの分子は限られた数のリガンドと受容体のシグナルを調節して、神経回路の形成機構に多様性をもたらせる分子基盤の一つと考えられる(*Neuron*, 2009)。さらにリンクスは内包の形成に必要不可欠である(*Neuron*, 2014)。内包は主として大脳皮質から末梢への連絡路の皮質-皮質下投射線維と、末梢から視床を介した大脳皮質への連絡路の視床-皮質投射線維より構成される。研究代表者は皮質-皮質下投射線維に発現するリンクスが、リンクスを発現していない視床-皮質投射線維に結合してその軸索の伸長と誘導を制御することを明らかにしている。しかし、リンクスが結合する視床-皮質投射線維に発現する細胞接着分子は不明である。さらに、研究代表者は、リンクスが内包以外の軸索の誘導に関与していることを明らかにしている。リンクスは視交叉と視索での網膜神経節細胞の軸索の誘導を制御する(*Neural Dev*, 2015)。加えて、研究代表者は、リンクス遺伝子欠損マウスにおいて、内包や視神経以外の、ある神経細胞の軸索の投射がほぼ完全に欠損していることを見出している。この神経細胞の軸索誘導の分子基盤はほとんど解明されていない。リンクスはこの神経細胞の軸索が通過する発生期の脳の組織に発現しているがこの神経細胞には発現していない。これらの結果から、研究代表者は、内包の形成の機構と同様に、リンクスが細胞接着分子依存性の軸索誘導分子として作用して、この神経細胞の軸索の伸長と誘導を制御しているという仮説を着想するに至った。

神経回路形成機構の研究分野は、精神・神経疾患の病因の研究とも密接に関連し、国際的にも競争が激化しており、本研究課題は早急に推進すべき研究と位置づけられる。このような学術的背景に加え、研究代表者は、世界に先駆けてリンクスを見出して機能解析してきており、研究に必要な遺伝子、抗体などの試料、さらには、リンクスfloxedマウス、リンクスEGFPノックインマウスの系統を有している。このように、本研究課題を推進する準備は整っている。

本研究の成果は、細胞接着分子依存性の軸索誘導機構の解明による基礎医学・生物学研究への貢献のみならず、脳虚血による内包の損傷や種々の精神・神経疾患に対する新規治療法の開発のための基盤を提供する可能性があると考えられる。このように、本研究の成果は広く生物学から基礎医学研究に貢献し、ひいては臨床への橋渡し研究にも寄与することが期待され、医学的・社会的な波及効果は大きいと考える。

2. 研究の目的

上述の学術的背景のもと、本研究では、リンクスによる内包形成の作用機構と、上述したリンクスが制御する他の軸索投射の形成におけるリンクスの機能と作用機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 内包とリンクスが制御する軸索投射の形成におけるリンクスの作用機構の解明：
リンクスに結合する膜貫通タンパク質を、生化学的手法を用いて単離し、質量分析に供した。単離・同定した分子について、発現組織および、発現時期、遺伝子欠損マウスの表現型などの情報を取得し、それらの情報を参考にして候補となる分子を選択した。また、リンクス欠損マウスに変異リンクス遺伝子を入れ戻してリンクスの作用機構を解析した。

(2) リンクスが制御する軸索投射の形成におけるリンクスの機能の解明：
上述した、内包や視神経以外のリンクスが制御する軸索投射の形成において、その軸索が通過する発生期の脳の組織と軸索投射の異常の表現型との時空間的な関係を、リンクス遺伝子座にEGFP遺伝子を導入したノックインマウスラインを用いて組織学的に詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) 内包とリンクスが制御する軸索投射の形成におけるリンクスの作用機構の解明：

種々の条件で免疫沈降実験を行い、リンクスに結合する可能性のある膜貫通タンパク質を同定した。それらの内、有力な候補について、発現組織および、発現時期、遺伝子欠損マウスの表現型のリンクス欠損マウスとの類似性について解析を行った。しかし、単一遺伝子の欠損でリンクス欠損マウスと類似の表現型を示す有望な候補となる膜貫通タンパク質は見つけられなかった。そのため、クロスリンカーを用いた免疫沈降実験、近接標識法を用いた実験を開始している。一方、変異リンクス遺伝子の入れ戻しの実験によって、リンクスのドメインごとに内包形成において個別化した役割があるという新しい知見を得た。この発見については、論文発表に向けて準備を進めている。

(2) リンクスが制御する軸索投射の形成におけるリンクスの機能の解明：

リンクス欠損マウスにおける軸索投射が障害される時期にこの軸索に発現し、リンクスに結合する膜貫通タンパク質の同定を試みた。(1)の解析と同様に、今後も解析を継続してリンクスの作用機構を解明したい。

(3) 予期していなかった発見：

神経科学研究において頻繁に使用される Cre ドライバーマウスを使った条件付き遺伝子欠損マウスにおいて、本来遺伝子組換えが起こることがないとされている生殖細胞で組換えが起こることがあることを見出し、その発見を共同研究として報告した (Luo et al., 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Luo, L., 19名略、Sinclair, J. L., Stogsdill, J. A., Traunmuller, L., Wang, J., Wortel, J., You, W., Abumaria, N., Beier, K. T., Brose, N., Burgess, H. A., Cepko, C. L., Cloutier, J. F., Eroglu, C., Goebbels, S., Kaeser, P. S., Kay, J. N., Lu, W., Luo, L., Mandai, K., 15名略、Kawabe, H., Craig, A. M.	4. 巻 106
2. 論文標題 Optimizing Nervous System-Specific Gene Targeting with Cre Driver Lines: Prevalence of Germline Recombination and Influencing Factors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 37 ~ 65.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2020.01.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	丸尾 知彦 (Maruo Tomohiko) (10625114)	北里大学・医学部・講師 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
カナダ	University of British Columbia		