

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 2 月 29 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300118

研究課題名 (和文)  $\alpha$ キメリン変異マウスを用いた中枢神経回路の形成と機能の研究

研究課題名 (英文) Studies of formation and function of neuronal circuits using alpha-chimerin mutant mice

研究代表者

岩里 琢治 (IWASATO TAKUJI)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・教授

研究者番号：00311332

研究成果の概要 (和文)：

Rac 特異的 GTPase activating protein (GAP) の一つである  $\alpha$ キメリンに着目し、中枢神経回路の形成と機能におけるその役割を明らかにすることを目的として研究を行った。全身性および Cre/loxP システムを用いた領域特異的  $\alpha$ キメリン変異マウス、さらに、 $\alpha$ 1 および  $\alpha$ 2 イソフォームのそれぞれに特異的なノックアウトマウスを作成した。それらのマウスを行動学的、および、組織学的に解析することにより、海馬機能における  $\alpha$ キメリンの働きの一端を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We aim to reveal roles of alpha-chimerin Rac-GTPase activating protein (GAP) in formation and function of neuronal circuit in the mammalian brain. We generated global and Cre-mediated conditional knockout mice of alpha-chimerin. Furthermore, we generated knockout mouse lines specific to alpha1 and alpha2 isoforms. By analyzing these mice behaviorally and histologically, we found important roles of alpha-chimerin in hippocampus function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2009 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経科学、マウス、遺伝学、神経回路、発達

## 1. 研究開始当初の背景

軸索誘導、スパイン形成、活動依存的精緻化、シナプス可塑性など、神経回路発達・機能の様々な局面において、アクチン細胞骨格制御は重要な細胞基盤だが、その機構に関して、生体での解明はほとんどなされていない。

申請者らは、ウサギのような歩行をする突然変異マウス（ミッフィー変異マウス）の発見、および、引き続く一連の解析により、 $\alpha$ キメリンという Rho-GTPase activating protein (GAP)（「アクチン細胞骨格を制御する Rho ファミリーG 蛋白質」を不活化する蛋白質）が、皮質-脊髄路や中枢パターン発生器といった運動系神経回路における軸索誘導で鍵となる働きをすることを見出した（Iwasato et al., Cell 2007）。近年、神経回路の発達と機能における Rho ファミリーおよびその正の制御因子である Rho-guanine nucleotide exchange factor (GEF)の重要性が注目され始めた（Murai & Pasquale, Neuron 2005）。一方、Rho ファミリーの負の制御因子である Rho-GAP の重要性に関しては、これまでほとんど認識されて来なかった。

$\alpha$ キメリンは、発達期および成体の脳で広範に発現することが知られている。また、発達中の軸索先端の成長円錐だけでなく、スパインにも豊富に局在することから、 $\alpha$ キメリンは、運動系の軸索誘導に限定されない、神経回路発達・機能の幅広い局面で重要な働きをすることが期待された。

## 2. 研究の目的

本研究は、 $\alpha$ キメリンという Rho-GAP を起点として、神経回路の発達・機能を理解することを目的として行った。

具体的には、脳神経回路の発達と機能における  $\alpha$ キメリンの役割の解明、および、キメ

リンシグナル伝達機構の解明、を主に行った。

## 3. 研究の方法

(1) Emx1Cre マウス (Iwasato et al., Nature 2000) と  $\alpha$ キメリン flox マウス (Iwasato et al. 未発表) の交配による、背側終脳特異的  $\alpha$ キメリンノックアウト (KO) マウスの作成。これらのマウスはすべて C57B1/6J (B6) 由来の ES 細胞を用いて作成され、B6 の遺伝的背景で維持、使用された。

(2)  $\alpha$ キメリンの二つのイソフォーム  $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  のそれぞれを特異的に欠損する KO マウスの作成。これらのマウスはすべて B6 由来の ES 細胞を用いて作成され、B6 の遺伝的背景で維持、使用された。

(3)  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  のそれぞれの条件的ノックアウトマウスの作成。これらのマウスはすべて B6 の遺伝的背景で維持、使用された。

(4) 各種の行動バッテリーテスト（恐怖条件付け、モーリス水迷路、高架式十字迷路、オープンフィールド、放射型迷路、Y 迷路、ロータロッド、ホームケージ活動、プレバルスインヒビションなど）。これらの解析において成体雄マウスが用いられ、ゲノタイプに関して盲検がなされた。

(5) 組織学的手法による海馬スパイン形態の解析。これらの解析においてマウスのゲノタイプに関して盲検がなされた。

(6)  $\beta 2$ キメリンの生化学的解析。

## 4. 研究成果

$\alpha$ キメリン変異マウスの神経回路に何らかの異常が存在する場合、それは、最終的に動物の行動異常として現れる可能性が高い。それを知る目的で  $\alpha$ キメリン変異マウスの網羅的行動学的解析を行った。具体的な検査項目としては、恐怖条件付け、モーリス水迷路、高架式十字迷路、オープンフィールド、

放射型迷路、Y 迷路、ロータロッド、ホーム  
ケージ活動、プレバルスインヒビションなど  
を行った。その結果、解析を行ったほとんどの  
項目で異常が検出された。これらの結果は、 $\alpha$  キメリンが脳の様々な神経回路の機能に  
おいて重要な働きをすることを示す。

$\alpha$  キメリンの作用機序を理解するためには、より限定された脳領域に焦点をあてて解析を行うことが望ましい。その最初の試みとして、 $\alpha$  キメリン flox マウスを Emx1Cre マウスと交配することにより、背側終脳特異的ノックアウト (DT- $\alpha$  ChnKO) マウスを作成した。全身性  $\alpha$  キメリンノックアウトマウスは、ウサギのように両足をそろえて歩くが、DT- $\alpha$  ChnKO マウスは正常な歩行を示した。DT- $\alpha$  ChnKO マウスの網羅的行動解析を行ったところ、全身性変異マウスで見られた異常の多くは消失したが、文脈型恐怖条件付けによる恐怖記憶の亢進という表現型は、保存されていた。一方、音と電気刺激を組み合わせる恐怖条件付けに関しては、全身性ノックアウトマウスにも DT- $\alpha$  ChnKO マウスにも顕著な異常はみられなかった。

全身性ノックアウトマウスは泳ぎに異常がみられたため、海馬機能として重要な空間記憶のテストであるモーリス水迷路を行うことができなかった。一方、DT- $\alpha$  ChnKO は正常な水泳能力を示し、水迷路を用いた空間記憶の成績に亢進がみられた。これらの結果から  $\alpha$  キメリンが海馬機能に関与することが示唆された。

次に、海馬機能の異常の細胞機構を探る目的で  $\alpha$  キメリン変異マウス海馬の組織学的解析を行った。 $\alpha$  キメリンはアクチン細胞骨格を制御する分子だが、アクチンは細胞内において、成長円錐および樹状突起スパインに特に豊富に存在する。DT- $\alpha$  ChnKO マウスの海馬スパインの形態を DiI 標識で解析したと

ころ、CA1 領域のスパインの密度と形態に異常が見られた。発達段階をさかのぼって解析したところ、そうした異常は 2 週齢以降に検出されることが明らかになった。これらの結果は、 $\alpha$  キメリンが海馬神経細胞の樹状突起スパインの形態形成に重要な働きをすることを示すものである。一方、 $\alpha$  キメリンが海馬の軸索走行に関与する可能性も存在する。それに関しては、現在、解析中である。

$\alpha$  キメリンには  $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  というスプライシングイソフォームが存在する。 $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  では C1 ドメインと GAP ドメインをもつ C 末は共通だが、N 末に関しては、 $\alpha 1$  は特別なモチーフは持たないが、 $\alpha 2$  は SH2 ドメインをもつという違いがある。この両者は生化学的に異なる性質を持つと共に、 $\alpha 2$  は主に発達期に強く発現し、一方、 $\alpha 1$  は成体で強く発現するという発現時期の違いもある。上記のような  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  イソフォームの発現時期や生化学的性質の違いのため、それぞれのイソフォームの働きを区別して理解することは、 $\alpha$  キメリンの作用機序を深く理解するために有効と考えられる。

神経回路の形成と機能における  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  イソフォームの役割の違いを明らかにする目的で、それぞれのイソフォーム特異的ノックアウトマウスを作成した。それぞれのマウスに関して網羅的行動解析を行ったところ、 $\alpha 1$  特異的ノックアウトマウスはほとんどの項目で正常であった。一方、 $\alpha 2$  ノックアウトマウスでは、文脈型恐怖条件付けの亢進という背側終脳特異的  $\alpha$  キメリン変異マウスと同様の表現型がみられた。

上に述べた各種  $\alpha$  キメリン変異マウスの詳しい組織学的解析は現在進行中であるが、そうした解析により、海馬における神経回路形成と機能における  $\alpha$  キメリンの作用機序が明らかになることが期待される。

$\beta$ キメリンは $\alpha$ キメリンと同様に $\beta$ 1と $\beta$ 2イソフォームからなるRac特異的GAPである。連携研究者である京都大学生命科学の加藤裕教グループとの共同研究として、 $\beta$ 2キメリンが $\alpha$ 2キメリンと同様にエフリン-EphAシグナルの下流として働くかを、*in vitro*の系を用いて検証した。その結果、 $\beta$ 2キメリンも $\alpha$ キメリンと同様にEphと結合すること、および、エフリン刺激によりRacを不活化することを明らかにできた。さらに、エフリン $\rightarrow$ Eph $\rightarrow$  $\beta$ キメリンシグナルが細胞移動を制御していることが明らかになった(Takeuchi et al., 2009)。

#### 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7件)

- ① Dande, OS., Bhatt, S., Anishchenko, A., Elstrott, J., Iwasato, T., Swindell, EC, Xu, HP., Jamrich, M., Itohara, S., Feller, MB, Crair, MC. Role of adenylyl cyclase 1 in retinofugal map development. *J. Comp. Neurol.* 査読有, Epub. 2011. doi: 10.1002/cne.23000
- ② Tanabe, Y., Hirano, A., Iwasato, T., Itohara, S. et al. Molecular characterization and gene disruption of a novel zinc-finger protein, HIT-4, expressed in rodent brain. *J. Neurochem.* 査読有, 112巻, 2010, pp.1035-1044
- ③ 岩里琢治 中枢神経回路の活動依存的精緻化-マウス体性感覚野に「バレル」が形成される仕組み. 生物の科学「遺伝」 査読無, 63巻, 2009, pp.79-85
- ④ Singer, P., Yee, BK., Feldon, J., Iwasato, T., Itohara, S. et al. Altered mnemonic functions and resistance to N-METHYL-d-Aspartate receptor antagonism by forebrain conditional knockout of glycine transporter 1. *Neuroscience*, 査読有, 161巻, 2009, pp.635-654
- ⑤ Takeuchi, S., Yamaki, N., Iwasato, T., Negishi, M., Katoh, H. Beta2-chimaerin binds to EphA receptors and regulates cell migration. *FEBS Lett.* 査読有, 583巻, 2009, pp.1237-1242
- ⑥ Iwasato, T., Inan, M., Kanki, H., Erzurumlu, RS., Itohara, S. et al. Cortical adenylyl cyclase 1 is required for thalamocortical synapse maturation and aspects of layer IV barrel development. *J. Neurosci.* 査読有, 28巻, 2008, pp.5931-5943
- ⑦ Araya, R., Kubo, M., Ishii, K., Hashikawa, T., Iwasato, T., Itohara, S., Terasaki, T., Oohira, A., Mishina, Y., Yamada, M. BMP signaling through BMPRIA in astrocytes is essential for proper cerebral angiogenesis and formation of the blood-brain-barrier. *Mol. Cell Neurosci.* 査読有, 38巻, 2008, pp.417-430.

[学会発表] (計12件)

- ① Iwata, R., Goto, H., Tanaka, M., Itohara, S., Iwasato, T. Loss of Rac-GAP  $\alpha$ -chimerin leads to alterations of emotional and cognitive behaviors in mice, Neuroscience 2011, 2011年11月12日-11月26日, Washington, DC
- ② Iwata, R., Goto, H., Tanaka, M., Itohara, S., Iwasato, T. Loss of Rac-GAP  $\alpha$ -chimerin leads to alterations of emotional and cognitive behaviors in mice, Molecular and cellular cognition society, 2011年11月10日-11月11日, Washington, DC
- ③ 岩田亮平. 後藤大道. 田中三佳. 糸原重美, Rac GAP  $\alpha$ -キメリン欠損マウスの網羅的行動解析 Comprehensive behavioral analysis of Rac-GAP  $\alpha$ -chimaerin deficient mice, 第34回 日本神経科学大会, 2011年9月14日-9月17日, 神奈川県横浜市
- ④ 岩里琢治 Circuit refinement during postnatal development of the mouse somatosensory cortex. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会)シンポジウム発表 2010年12月7日 兵庫県神戸市
- ⑤ Iwata, R., Goto, H., Tanaka, M., Itohara, S., Iwasato, T. Comprehensive behavioral analysis of miffy mice, a spontaneous mutant of Rac-GAP  $\alpha$ -chimerin. Molecular and Cellular Cognition Society - Society for Neuroscience Satellite Symposium 2010. 2010年11月11日 San Diego Convention Center (アメリカ合衆国サンディエゴ)
- ⑥ 岩里琢治 左右の手足の非対象な動きを可能にする神経回路形成の分子機構 BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会)シンポジウム発表 2008年12月12日 兵庫県神戸市
- ⑦ Iwasato, T. Dissociation of pre- and postsynaptic mechanisms in maturation

of the barrel cortex. The6th FENS  
forum of European Neuroscience(シンポ  
ジウム,招待講演) 2008年7月15日  
Geneva

- ⑧ 岩里琢治 Dissociation of pre- and  
postsynaptic mechanisms of barrel  
cortex development. 第31回日本神経科  
学大会(ワークショップ,招待講演)  
2008年7月10日 東京

[図書](計1件)

岩里琢治,糸原重美、Miffy 変異マウス：  
ウサギのように両足をそろえて歩く自然  
発生変異マウス(分担執筆)  
<series モデル動物利用マニュアル>  
疾患モデルの作製と利用ー脳・神経疾患、  
三品昌美編、LIFE-SCIENCE INFORMATION  
CENTER、2011、pp.99-110

[その他](計2件)

ホームページ：

<http://www.nig.ac.jp/section/iwasato/iwasato-j.html>

<http://homepage3.nifty.com/iwasato/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩里 琢治 (IWASATO TAKUJI)  
国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・教授  
研究者番号：00311332

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

糸原 重美 (ITO HARA SHIGEYOSHI)  
独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学  
技術開発チーム・シニアチームリーダー  
研究者番号：60252524

加藤 裕教 (KATO HIRONORI)  
京都大学・生命科学研究所・准教授  
研究者番号：50303847

西丸 広史 (NISHIMARU HIROSHI)  
筑波大学大学院・人間総合科学研究科・  
准教授  
研究者番号：20302408