

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20300130

研究課題名 (和文)

神経ガイダンス分子 Draxin の総合的解析

研究課題名 (英文)

Comprehensive analyses of the axon guidance molecule Draxin

研究代表者

田中 英明 (TANAKA HIDEAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：90106906

研究成果の概要 (和文)：

脳の機能は、その膨大な数の神経細胞が形成する正確な神経回路網に依存する。神経軸索が、正しい標的細胞に到達する選択的な軸索成長は、発生過程における神経回路網形成において重要な位置を占め、様々な神経ガイダンス分子とその受容体による細胞間相互作用を積み重ねた結果である。脳の複雑さを考慮すると、既知のガイダンス分子以外にもガイダンス分子が存在すと期待して分子探索した結果、既知のガイダンス分子とは全くホモロジーの無い反発性の新規神経ガイダンス分子を見出し、Draxin (Dorsal repulsive axon guidance protein) と命名した。この研究計画では、(1) Draxin 遺伝子欠損マウス脳で見出された脳梁、海馬交連、前交連の欠損と視床から新皮質への投射欠損の発症機構を解明し、(2) Draxin 受容体を同定し、そのシグナル機構を解明することを目的とした。

その結果、Draxin 遺伝子欠損マウスに見出された軸索形成の欠失は神経細胞の細胞死によるものではなく、軸索は伸び出すものの正しい方向に伸びれないガイダンスの異常であった。Draxin 受容体の探索からは、Netrin の受容体として知られる DCC に Draxin は結合し、DCC 遺伝子欠損により、Draxin 感受性が低減することを見出した。DCC が異なるガイダンス分子の受容体としてどのようなシグナルを伝えるのか明らかにすることが今後の課題である。

研究成果の概要 (英文)：

The function of the nervous system depends on the establishment of precise and intricate neuronal connections. The combinatorial effects of attractive and repulsive guidance cues, present in the extracellular environment, direct axons to grow towards their intermediate targets and thus play a crucial role in forming proper connections between neurons. Four conserved families of axon guidance cues, the netrin, semaphorin, ephrin and slit proteins, mediate their guidance effects via receptors of the DCC or UNC5, Neuropilin/Plexin, Eph and Robo families, respectively. Although these proteins have been found to regulate a wide variety of guidance decisions, it is expected that others await identification, and will help address the immense complexity of the nervous system. We recently reported the discovery of a novel axon guidance molecule, draxin, which shares no sequence homology with other known guidance molecules (Islam et al., Science 2009). *In vitro*, draxin can repel spinal commissural axons whose outgrowth is stimulated by netrin-1; *in vivo*, genetic deletion of *draxin* results in mild guidance defects of spinal commissural axons, and in a dramatic loss of all forebrain commissures by losing their growing directional cues, but not by their cell death.

Identification of the draxin receptor is important to elucidating the precise mechanism through which it functions. We found unexpectedly that the netrin-receptor DCC binds draxin with high affinity and is required for draxin's inhibitory effect on the cortical neurite outgrowth. This study identifies DCC as a functional receptor or receptor component for draxin. Next, we need to identify what kinds of signaling molecules are activated by draxin and DCC binding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経軸索、ガイダンス、遺伝子欠損マウス、draxin、大脳皮質、genetic interaction、DCC

1. 究開始当初の背景

脳の機能はその膨大な数の神経細胞が形成する正確な神経回路網に依存する。神経軸索が、正しい標的細胞に到達する選択的な軸索成長は、発生過程における神経回路網形成において重要な位置を占め、様々な神経ガイダンス分子とその受容体による細胞間相互作用を積み重ねた結果である。1990年代に、Netrin, Ephrin, Slit, Semaphorinのような重要な機能を果たすガイダンス分子が次々と発見されたが(Tessier-Lavigne & Goodman, The molecular biology of axon guidance. Science 1996;274:1123-1133)、その後、これらに匹敵するような新規のガイダンス分子としては、RGM(Nature 2002, 419, 392-395)しか見つかっていない。我々は、膜蛋白質や分泌蛋白質の cDNA を選択的にクローニングするシグナルシーケンストラップ法を用いて、既知のガイダンス分子とは全くホモロジーの無い反発性の新規神経ガイダンス分子を見出し、Draxin (Dorsal repulsive axon guidance protein)と命名した。

それまでの解析から

(1)Draxinは分子量約50Kdの分泌型蛋白質で、ヒト、マウス、ゼブラフィッシュなどの脊椎動物には存在するが、ハエ、線虫には存在しなく、既知の神経ガイダンス分子とは全くホモロジーを持たない。

(2)Draxin は、ニワトリ胚やマウス胎児の脳から脊髄にいたる中枢神経系の背側に発現し、培養条件下において脊髄背側からのnetrin依存性の神経軸索成長を阻害する。さらに、ニワトリ胚脊髄にエレクトロポレーション法により Draxin を過剰発現させると、脊髄交連神経軸索成長を阻害する。このように、Draxin は脊髄交連神経細胞の腹側に伸び

る軸索成長に反発的に関与すると考えられた。

(3)さらに、Draxin の生理的な役割を調べるためにその遺伝子欠損マウスを作製し、組織化学的な解析を行った。Draxin 遺伝子欠損マウス脊髄交連神経において顕著な異常は観察されなかったが、一方、すべての個体において大脳の交連神経繊維(脳梁、海馬交連、前交連)の形成異常が観察され、強い表現型ではこれらの交連繊維は正中線でまったく交差していなかった。さらに、視床から新皮質への投射も欠損することが観察された。このような欠失にもかかわらず、Draxin 遺伝子欠損マウスは成熟し、ホモ間で妊娠出産する。

2. 研究の目的

(1) Draxin 遺伝子欠損マウス脳で見出された脳梁、海馬交連、前交連の欠損と視床から新皮質への投射欠損の発症機構を解明する。

(2) Draxin 受容体を同定し、そのシグナル機構を解明する。

3. 研究の方法

(1)Draxin 遺伝子欠損マウス大脳に発症している神経軸索走行異常の発生機構解析神経軸索走行の異常状態を、軸索成長に関連する分子やマーカー分子の免疫染色、in situ hybridization 及び DiI などの蛍光色素標識実験により詳細に解析する。次に、脳梁、海馬交連、前交連を形成する神経細胞と視床を培養し、その神経突起が Draxin に感受性を持つのかどうかを調べる。

① 蛍光色素DiIによりP0 Draxin伝子欠損マウスの大脳の神経繊維を標識することにより、これらの神経がどのように伸展し

ているのかをより正確に調べる。

- ② Draxin 遺伝子欠損マウス脳における既知ガイダンス分子の発現変化を *in situ* hybridization 法により解析する。
- ③ 交連神経と視床皮神経に対する Draxin のガイダンス活性を検証するために、新皮質や視床組織片を Draxin 蛋白の存在下で培養し、その組織片からの神経突起成長に Draxin がどのような効果を与えるかを調べる。
- ④ 視床から大脳皮質への軸索投射が著しく阻害されるが、Draxin は視床にも大脳皮質にも発現するため、どちらの発現が重要かを視床と大脳皮質のスライスを共培養することにより解析する。野生型と Draxin 遺伝子欠損マウス由来の組織の組み合わせで解析した。

(2) Draxin 受容体の同定とシグナル機構解析以下に示す 2 つの方法により、Draxin 受容体同定を試みた。

- ① ニワトリ胚神経 cDNA ライブラリーから I-magnet 及び FACS を用いた発現クローニング。
- ② 既知ガイダンス分子受容体の cDNA を HEK293 細胞にトランスフェクションし、Draxin タンパクの結合を解析した。

4. 研究成果

(1) Draxin に関する最初の論文を Science 誌に発表し、その後、関連する 5 報の論文を発表した。

(2) 網膜から視覚中枢である視蓋（上丘）への二次元的な面と面の規則正しい投射パターンの形成は、最も詳細に解析されてきた神経回路網形成のモデル系である。網膜の背側神経は視蓋の腹側に、網膜腹側神経は視蓋背側に、網膜耳側は視蓋前側に、網膜鼻側は視蓋後側に投射する。これまでに、視蓋の前後軸に沿っては EphA-ephrinA が、また背腹軸に沿っては、EphB-ephrinB と RYK-Wnt の軸索ガイダンス分子とその受容体が網膜と視蓋の軸に沿った勾配を形成し、その活性バランスによって二次元面における位置が決まり、網膜軸索は最終的な目的地に正しく到達することが出来ると考えられているが、未だ完結していない。

我々の見出した Draxin が発生過程の視蓋において背腹軸に沿って勾配を持って発現していることから、網膜—視蓋投射に機能していることを期待し、Draxin 遺伝子欠損マウスの網膜に微量注入した蛍光色素 DiI が上丘に形成するフォーカスを解析したところ、網膜からの上丘への投射パターンに異常が観

察されたことから、Draxin もこの規則正しい投射形成において機能していることが明らかになった。この詳細に研究されて来た神経回路網形成を徹底的に解析し理解することは、神経回路網形成の基本原則を確立することに貢献する。

(3) Draxin は新規な分泌タンパクであるため、新規受容体を期待して発現クローニングを行ったが成功しなかった。次に、可能性が想定される既知分子を発現スクリーニングし、以下のことを見出した。

- ① netrin 受容体である DCC、Neogenin、Unc5 に結合する。
- ② DCC とは netrin 結合部位とは異なる領域にハイアフィニティー（1nM）で結合し、netrin 存在の有無にかかわらず、同様に結合する。
- ③ DCC が幅広く発現するマウス胚大脳皮質からの神経突起伸長は draxin によって阻害され、DCC 遺伝子欠損により draxin による神経突起成長阻害作用は減弱する。
- ④ *Draxin (+/-) DCC (+/-)* のマウス大脳の解析から、それぞれの単独ヘテロマウスに比較し、ダブルヘテロにより脳梁形成が著しく阻害されることから、DCC と draxin には genetic interaction が有る。

以上の結果から、DCC は draxin 受容体として機能すると結論した。

(4) シグナル機構そのものの解析はこれからである。そのため、マウス Draxin 分子に対するモノクローナル抗体を作成し、マウス胚脳から Draxin タンパクを免疫沈降し、一緒に落ちて来る分子群をプロテオミックスの手法で解析することにした。

マウス Draxin-Fc タンパクを COS 細胞に発現し、その無血清培養上清からプロテイン A カラムにより Draxin-Fc タンパクを精製した。この精製タンパクを Draxin 遺伝子欠損マウスに免疫することにより、より効率的に抗体を産生することを試みた。免疫したマウスの脾臓を取り出し、モノクローナル抗体を作製し、Draxin を発現する細胞を用いた免疫染色スクリーニングにより抗体を得た。現在、得られたモノクローナル抗体が免疫沈降に使用可能かどうか、解析中である。

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）

- (1) Ito A, Shinmyo Y, Abe T, Oshima N, Tanaka H, Ohta K. Tsukushi is required for

- anterior commissure formation in mouse brain.
査読有 402, 2010, 813-818.
- (2) Ahmed G, Shinmyo Y, Naser IB, Hossain M, Song X, Tanaka H. Olfactory bulb Axonal outgrowth is inhibited by draxin. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 398(4), 2010, 730-734.
- (3) Su Y, Zhang S, Islam SM, Shinmyo Y, Naser IB, Ahmed G, Tanaka H. Draxin is involved in the proper development of the dI3 interneuron in chick spinal cord. *Developmental Dynamics*, 査読有, 239(6), 2010, 1654-1663.
- (4) Hayashida M, Minoda R, Shinmyo Y, Ohta K, Tanaka H, Yumoto E. PC3 is involved in the shift from proliferation to differentiation and maturation in spiral ganglion neurons. *Neuroreport*, 査読有, Vol. 21 No. 2, 2010, 90-93.
- (5) Zhang S, Su Y, Shinmyo Y, Islam SM, Naser IB, Ahmed G, Tamamaki N, Tanaka H. Draxin, a repulsive axon guidance protein, is involved in hippocampal development, *Neuroscience Research*. 査読有, Vol. 66 No. 1. 2010, 53-61.
- (6) Su Y, Naser IB, Islam SM, Zhang S, Ahmed G, Chen S, Shinmyo Y, Kawakami M, Yamamura K, Tanaka H. Draxin, an axon guidance protein, affects chick trunk neural crest migration. *Development Growth and Differentiation*, 査読有, Vol. 51. No. 9, 2009, 787-796.
- (7) Naser IB, Su Y, Islam SM, Shinmyo Y, Zhang S, Ahmed G, Chen S, Tanaka H. Analysis of a repulsive axon guidance molecule, draxin, on ventrally directed axon projection in chick early embryonic midbrain. *Developmental Biology*, 査読有, Vol. 332, 2009, 351-359.
- (8) Islam SM, Shinmyo Y, Okafuji T, Su Y, Naser IB, Ahmed G, Zhang S, Chen S, Ohta K, Kiyonari H, Abe T, Tanaka S, Nishinakamura R, Terashima T, Kitamura T, Tanaka H. Draxin, a Repulsive Guidance Protein for Spinal Cord and Forebrain Commissures. *Science*, 査読有, Vol. 323. No. 5912, 2009, 388 - 393.
- [学会発表] (計 14 件)
- (1) Iftekhhar B Naser, Draxin, an axon guidance protein, is involved in retinocollicular axon projection. 第 33 回日本神経科学学会年会, 2010 年 9 月 2 日 - 4 日, 神戸. 神戸コンベンションセンター
- (2) 増田知之, Analyses of the development of the spinal nerve in the chick embryo. 第 33 回日本神経科学学会年会, 2010 年 9 月 2 日 - 4 日, 神戸. 神戸コンベンションセンター
- (3) 坂本敏郎, Impairment of socio-emotional behavior and memory function in Draxin (Dorsal repulsive axon guidance protein) knockout mice. 第 33 回日本神経科学学会年会, 2010 年 9 月 2 日 - 4 日, 神戸. 神戸コンベンションセンター
- (4) 田中英明, A Novel repulsive Axon Guidance Protein, Draxin. 8th TLL Life Science Symposium, 2010 年 2 月 1 日 - 2 日, シンガポール. テマセック生命科学研究所
- (5) 田中英明, Correct Wiring of the Nervous System during Development. BSBMB International, 2010 年 1 月 29 日 - 31 日, バングラディッシュ. ダッカ大学
- (6) 新明洋平, Draxin, a novel chemorepulsive axon guidance protein. 第 32 回日本神経科学大会, 2009 年 9 月 16 日 - 18 日, 名古屋. 名古屋国際会議場
- (7) 田中英明, A Novel repulsive Axon Guidance Protein, Draxin. 第 52 回日本神経化学大会, 2009 年 6 月 21 日 - 24 日, 群馬. ホテル天坊
- (8) 新明洋平, A Novel repulsive Axon Guidance Protein, Draxin. 第 42 回大会日本発生生物学会, 2009 年 5 月 28 日 - 31 日, 新潟. 朱鷺メッセコンベンションセンター
- (9) Sanbing Zhang, Function of draxin on hippocampal development. 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 9 日 - 11 日, 東京. 東京国際フォーラム
- (10) Yuhong Su, Functional analysis of draxin in the migration of neural crest cells. 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 9 日 - 11 日, 東京. 東京国際フォーラム
- (11) Shahidul. MD. Islam, A Novel repulsive Axon Guidance Protein, Draxin. 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 9 日 - 11 日, 東京. 東京

国際フォーラム

- (12) 太田訓正, Tsukushi による網膜幹細胞の未分化性維持機構, 第31回日本神経科学大会, 2008年7月9日-11日, 東京. 東京国際フォーラム
- (13) 新明洋平, A Novel repulsive Axon Guidance Protein, Draxin. 日本発生生物学会第41回大会, 2008年5月28日-30日, 徳島. 徳島県郷土文化会館
- (14) 太田訓正, Tsukushi は網膜幹/前駆細胞の増殖を制御する Wnt シグナル阻害因子である, 日本発生生物学会第41回大会, 2008年5月28日-30日, 徳島. 徳島県郷土文化会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 英明 (TANAKA HIDEAKI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 90106906

(2) 研究分担者

新明 洋平 (SHINMYO YOUHEI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 00418831