

令和 4 年 5 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22738

研究課題名（和文）後天的因子が関与する左右非対称な視覚ネットワーク形成機構と生理的意義の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of left-right asymmetric visual network formation involving acquired factors and their physiological significance.

研究代表者

鈴木 俊章（Suzuki, Toshiaki）

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・学術研究員

研究者番号：50877941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳において機能不明の遺伝子の役割を探った。遺伝子が機能した細胞を標識することができるモデルマウスを用いて、その標識のパターンを分析した。すると、この標識は脳神経細胞のみで観察された。また、大人の個体では標識が脳領域問わず、点在して観察された。しかし生後直後の個体では、特定の領域のみで観察された。以上から、この遺伝子は脳の発生と加齢に関与する可能性を初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では世界に先駆け、脳にて機能未知の遺伝子の発現パターンについて明らかにした。

この遺伝子は、哺乳類や鳥類などの陸上脊椎動物以上にのみ認められるため、脳の種差形成に関する知見を深めるためにも、その機能性の解明が求められる。

また、この遺伝子は他の器官では疾患のリスクと指摘されているため、脳においても変性疾患疾患などのリスクになる可能性がある。本研究結果はこれらの課題解決に繋がる学術的意義のあるものとなった。

研究成果の概要（英文）：The role of our target gene was unknown in the brain. To analyze how the gene act, we used a model mouse that could label cells in which the gene functioned. The labeled cells were observed only in neurons. In adults, the labeling was asymmetrically scattered throughout the whole brain. However, in the immediately postnatal individuals, the label was observed only in specific regions. These results indicate for the first time that this gene may be involved in brain development and aging.

研究分野：神経科学

キーワード：脳神経科学 感覚器官 遺伝子発現

### 1. 研究開始当初の背景

生物における左右非対称性への注目は、19世紀後半にBrocaが左半球優位に存在する運動性言語中枢を見出したことに始まる。脳機能の左右差はヒトなどの哺乳類だけでなく、鳥類、魚類に至るまで幅広い脊椎動物において存在する。左右非対称性の形成機構として、初期発生における分子基盤が明らかにされつつあるが、生後発達や生体機能との関連性については、左右非対称な発現パターンを有する指標分子の報告が乏しいことから進んでいない。

活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) は、生体防御や種々の生理的機能を担う。神経変性疾患や脳虚血病態への関与も報告されているが、ROSが脳に与える影響の詳細については、不明な点が多い。NADPH oxidase (Nox) ファミリーは、ROSを産生する酵素として7種存在し、その内Nox3はスーパーオキシドを産生することが知られている (図1A)。申請者はこれまでに、Nox3の発現を、tdTomato 蛍光を指標に容易に確認できる Nox3-Cre; tdTomato マウスを作製し、加齢性及び薬剤性難聴とNox3の関連を報告した (図1B, Mohri *et al.*, *J. Neurosci.*, 2021)。

Nox3は、元々、頭位が常に傾いた head-tilt マウスが持つ遺伝子変異より同定され、内耳を中心に発現することが報告されている (Paffenholz *et al.*, *Genes Dev.*, 2004; Bánfi *et al.*, *J Biol Chem.*, 2004.)。このように Nox3 は、生体では内耳を中心に研究が進められてきたが、わたしたちの作製した Nox3 遺伝子発現を標識できるマウスを観察すると、脳などにおいて、発現することが明らかになり、何らかの役割を果たす可能性が予想された。

### 2. 研究の目的

「Nox3 発現がどのように行われ、生体機能に影響を及ぼすのか」を解明することを本研究の主たる目的とした。

### 3. 研究の方法

Nox3-Cre ノックインマウスと ROSA26-LSL-tdTomato マウスを掛け合わせた本システムでは、片アレルの Nox3 Exon 1 が Cre に置換されたヘテロノックアウトの Nox3<sup>Cre/+</sup> マウスと、両アレルが置換され Nox3 が発現しないホモノックアウトの Nox3<sup>Cre/Cre</sup> マウスが得られ、それぞれのマウスを用いた。それぞれ生後0日齢から6ヶ月齢までをPFA灌流固定し、固定脳サンプルを得た。30% sucrose で脱水後、凍結切片作製装置にて20µmの冠状薄切切片を作製し、蛍光顕微鏡等で観察・撮像した。The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Paxinos and Franklin, 2012) に従って、各切片の脳領域を定義し、tdTomato 陽性細胞数のカウント及び領域面積を ImageJ 1.52i で解析した。統計処理は GraphPad Prism を用いて、多重比較検定 (2-way ANOVA followed Tukey 's test) にて有意水準を5%とし、検定した。

### 4. 研究成果

いずれの遺伝子型のマウスにおいても、脳において tdTomato 発現細胞が確認された。tdTomato 発現細胞種を検討すると、神経細胞マーカーである NeuN (neuronal nuclei) 陽性で、グリア細胞マーカーの GFAP (Glial fibrillary acidic protein) やミクログリアマーカーの Iba1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1) は陰性であったことから、神経細胞であることが示唆された。

次に、6ヶ月齢の各遺伝子型の脳を用い、領域毎に tdTomato 発現細胞数と密度を分析した。その結果、統計的な有意差は得られてないものの、個体毎では一定の偏りが認められた。また Nox3<sup>Cre/Cre</sup> マウスでは、Nox3<sup>Cre/+</sup> マウスに比べ tdTomato 発現細胞数が有意に多く観察された。

更に、Nox3<sup>Cre/Cre</sup> マウスを用いて、加齢と Nox3 発現の関係を検討したところ、tdTomato 発現細胞は既に生後0日齢では確認され、6ヶ月齢までの経時的解析において、ほとんどの脳領域で2

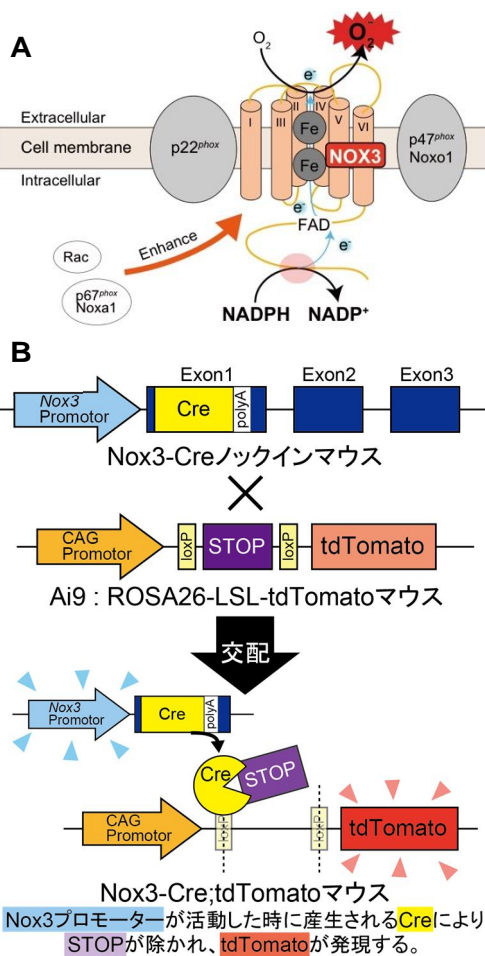


図1 (A) Nox3 の概要  
(B) Nox3 発現細胞標識マウス

ヶ月齢までは増加、その後はプラトーに推移する傾向が認められた。一方、 $Nox3^{Cre/+}$ マウスでは、その発現に明確な傾向を見出せなかった。

これまで、 $Nox3$ の脳における発現分布や機能は、ほとんど解っていなかった。本研究で、 $Nox3$ を発現する神経細胞が生後0日齢から存在したこと、加齢や $Nox3$ の欠損によりtdTomato発現細胞数が増加したことから、 $Nox3$ は脳の発生及び加齢に何らかの役割を果たすことが予想される。今後、 $Nox3^{Cre/Cre}$ マウスと $Nox3^{Cre/+}$ マウスの差異に注目して、細胞死等の観点から検討を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 俊章、山口 恭子、上山 健彦
2. 発表標題 活性酸素産生酵素Nox3のマウス脳内発現分布に関する解析
3. 学会等名 日本薬理学会第140回近畿部会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------