

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700326

研究課題名（和文）神経結合における個々のニューロン識別メカニズム

研究課題名（英文）Molecular codes for neuronal individuality in neural circuit formation

研究代表者

金子 涼輔（KANEKO RYOSUKE）

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40390695

研究成果の概要（和文）：単一バスケット細胞（ニューロンの一種）を可視化できるマウスおよびクラスター型プロトカドヘリン欠損マウスを世界に先駆けて作製・解析した。その結果、プロトカドヘリン a&b 二重欠損マウスは運動障害様の異常を認めた。本研究により、神経結合における個々のニューロン識別への Pcdh の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have generated transgenic mice that genetically label individual cerebellar GABAergic neurons with red fluorescence. Moreover, several lines of clustered *Pcdhs* deficient mice have been generated and the *Pcdh-a&b* deficient mice showed motor abnormalities. These experiments support our hypothesis that protocadherins provide molecular codes for neuronal individuality in neural circuit formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：神経発生・再生

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：(1)神経発生 (2) 多様性 (3) 神経回路 (4) バスケット細胞 (5) プロトカドヘリン (6) GABA ニューロン (7) 小脳 (8) 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

国内・国外の研究動向及び位置づけ：個々のニューロンは識別されている

ニューロンは適切なパートナーを識別して結合する。例えば、小脳皮質にある抑制性ニューロンの一種、バスケット細胞は周囲に存在する多様な細胞群（ステレイト細胞、顆粒細胞、バークマングリア、プルキンエ細胞）

の中からプルキンエ細胞のみと結合する。さらに、1つのバスケット細胞は平均8個のプルキンエ細胞のみと結合する（注：ヒト小脳には、プルキンエ細胞は約1400万個存在する）。”細胞種”の識別においては、接着分子L1CAMが関わる。一方、”個々のプルキンエ細胞”を識別する機構はほとんど解明されていない。

大脳皮質や網膜においても、個々のニューロンを識別した神経結合が観察される。したがって、個々のニューロン識別メカニズムの解明は、神経結合の制御機構を知る上で重要である。

これまでの成果：ニューロンごとに異なる *Pcdh* 発現パターン

個々のニューロンはどのように識別されるのだろうか？。申請者らは、この過程にも接着分子が関わると考えた。特に、個々のニューロンごとで発現が異なる接着分子の関与を想定した。そこで、クラスター型プロトカドヘリン (*Pcdh*) に着目した。*Pcdh* は脳神経系で発現する接着分子群である。マウスでは 58 種類の互いに異なった *Pcdh* 遺伝子 (α 、 β 、 γ) が同一染色体上にクラスターを作っている (図 1a) (Kohmura *et al*, *Neuron*, 1998; Wu *et al*, *Cell*, 1999)。

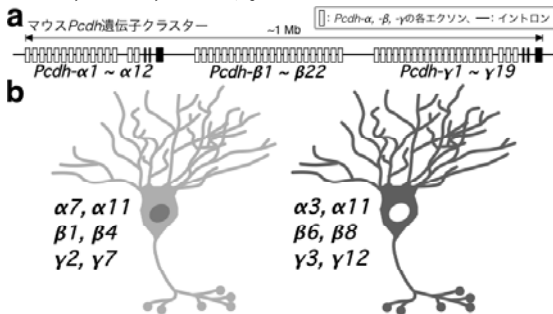


図1 プロトカドヘリン (*Pcdh*) は遺伝子クラスターにコードされており、個々のニューロンで異なる分子群を発現している。

申請者らは、マウス小脳の単一プルキンエ細胞を用いた single-cell RT-PCR 法を開発した (Esumi, Kaneko *et al*, *Nature Protocols*, 2006)。これを用いて、*Pcdh-α* および γ の発現を調べた結果、個々のプルキンエ細胞において *Pcdh-α*、 γ がそれぞれが細胞ごとに異なった組み合わせでランダムに発現していた (Kaneko *et al*, *JBC*, 2006)。*Pcdh-β* も同様の発現パターンであった (図 1b)。これら *Pcdh* の組み合わせは、理論上 2500 万以上の多様性をもたらす。さらに、大脳皮質や海馬の錐体ニューロン、背根神経節や三叉神経節のニューロンにおいても、個々のニューロンごとに異なる *Pcdh* が発現していた (Hirano, Kaneko *et al*, in preparation)。

以上の結果は、*Pcdh* が個々のニューロンを識別する分子基盤となる可能性を示唆している。

2. 研究の目的 着想に至った経緯

最近、外国のグループが血球系培養細胞の強制発現系を用いて、同一の *Pcdh* 間でのホモフィリック結合を報告した。以上を踏まえ「同一の *Pcdh* を発現するニューロン同士が神経結合する」との仮説を立てた。本仮説を証明するためには以下の 2 点を明らかにする必要がある。

- (i) *Pcdh* 欠損により神経結合が異常になるか？
- (ii) 神経結合するニューロン間における *Pcdh* 発現は同一か？

本研究では、上記 (i) を検討する。

研究期間内の目的

研究期間内に、「*Pcdh* 欠損により神経結合が異常になるか？」を明らかにする。そのため、以下 3 課題を行なう。

- a) 個々のバスケット細胞の神経結合を可視化できる遺伝子改変マウスの開発
- b) *Pcdh* 欠損マウスの作製
- c) *Pcdh* 欠損マウスにおけるバスケット細胞神経結合の解析 (課題 a のマウスを利用する)

これらにより、個々のニューロン識別メカニズムへの *Pcdh* の関与を調べることを目的とした (図 2)。

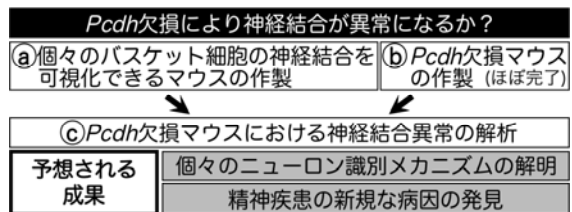


図 2：本研究の全体構想

3. 研究の方法

仮説「同一の *Pcdh* を発現するニューロン同士が神経結合する」を証明するためには以下の 2 点を明らかにする必要がある。

- (i) *Pcdh* 欠損により神経結合が異常になるか？
- (ii) 神経結合するニューロン間における *Pcdh* 発現は同一か？

本研究では、バスケット細胞-プルキンエ細胞間の神経結合をモデル解析系とし、上記 (i) を検討する。本解析系の利点は①神経結

合の同定が容易、②*Pcdh* 発現解析が進んでいる、③両ニューロン共に *Pcdh* を発現している、の3点である。

上述の仮説によれば、*Pcdh*欠損によって、個々のバスケット細胞が神経結合するプルキンエ細胞の数や配置が異常になると予想される。このような解析の際には、一般的にはゴルジ染色法が使われる。しかし本方法には運任せの部分があるため効率が悪く、多重染色も困難である。

本研究では、ごくわずかのバスケット細胞で蛍光タンパク質を発現するマウスを作製する。本マウスでは、蛍光シグナルによって個々のバスケット細胞の神経結合を効率よく可視化でき、多重染色も可能である。本マウスを用いて、*Pcdh* 欠損による神経結合への影響を解析する。

さらに、*Pcdh* 欠損マウスの個体レベルでの表現型も調べる。

4. 研究成果

a) 個々のバスケット細胞の神経結合を可視化できる遺伝子改変マウスの開発

目的は「個々のバスケット細胞の神経結合を効率良く可視化する方法」の確立である。そのため、ごくわずかのバスケット細胞で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製する (図3)。実験には、以下2系統のマウスを作製・交配した、二重 Tg マウスを用いた。

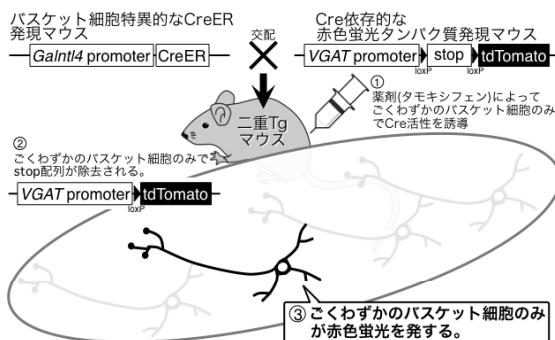


図3 個々のバスケット細胞の神経結合を可視化する方法

[1 系統目] バスケット細胞特異的な CreER 発現マウス

バスケット細胞特異的に発現する遺伝子 *Galnt14* プロモーターの制御下で DNA 組換え酵素 CreER を発現するマウスを作製した。*Galnt14* の BAC プラスミド (#RP23-199G5) を利用した Tg マウスを作製した。In situ

ハイブリダイゼーションにより、バスケット細胞優先的な Cre 発現する系統の確立を確認した。本マウスでは、薬剤(タモキシフェン)投与によって DNA 組換え頻度を制御できる。

[2 系統目] Cre 依存的な蛍光タンパク質発現マウス

Cre 活性依存的に蛍光タンパク質を発現する、*VGAT-stop-tdTomato* マウスを作製した。具体的には、小胞型 GABA トランスポーター遺伝子 (*VGAT*) プロモーター-BAC プラスミド (#160L22) へ *tdTomato* 遺伝子を挿入した。*tdTomato* (アメリカ・Tsien 教授より供与) は現在最も明るい赤色蛍光タンパク質である。本改変 BAC を用いて Tg マウスを作製した。その結果、抑制性ニューロンを特異的に赤色蛍光標識できるマウスの作製に成功した。

現在までの予備的検討により、上記2系統を交配した二重 Tg マウス (胎生 19.5 日齢) に薬剤(タモキシフェン)投与することで、個々のバスケット細胞の神経結合を可視化できている。今後はさらに綿密な条件検討を進めることで、効率の良い解析が可能となる。

個々のバスケット細胞の神経結合を可視化できる遺伝子改変マウスは、これまでに報告は無く世界初の成果である。

b) *Pcdh* 欠損マウスの作製

下記3系統の *Pcdh* 欠損マウスを世界に先駆けて作製成功した (図4) (大阪大学・八木健教授との共同研究)。

- b-1) *Pcdh-α* 欠損マウス
- b-2) *Pcdh-β* 欠損マウス
- b-3) *Pcdh-α&Pcdh-β* 二重欠損マウス

いずれのマウスも生存・成長に異常は見られず、繁殖も通常通り可能であった。

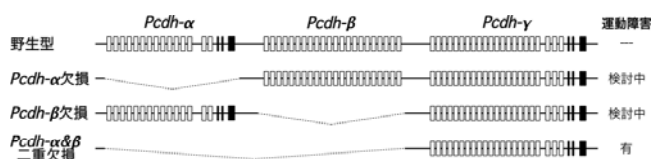


図4 使用するマウスの*Pcdh*遺伝子クラスター構造と運動障害

しかし、興味深いことに、*Pcdh-α&Pcdh-β* 二重欠損マウスでは軽微な運動障害が観

察された。運動制御における小脳の関与を踏まえると、本観察結果は課題(i)「*Pcdh* 欠損により神経結合が異常になるか？」を肯定する結果である。

以上に記した本研究の成果は以下2つにまとめられる。

(1) 個々のバスケット細胞の神経結合を効率良く可視化する方法を確立できた。

(2) *Pcdh* 欠損マウスを作製し、運動障害を認めた。

本研究により、*Pcdh* 欠損により神経結合が異常になることが示唆された。したがって、今後、今回の成果を元にして研究を進めることで、神経結合における個々のニューロン識別メカニズムの解明が期待できる。

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2件)

①Masato Shino, Ryosuke Kaneko (co-first author), Yuchio Yanagawa, Yasuo Kawaguchi, Yasuhiko Saito.

Electrophysiological characteristics of inhibitory neurons of the prepositus hypoglossi nucleus as analyzed in Venus-expressing transgenic rats regions. *Neuroscience*, 2011, 197: 89-98. 査読有

②Shinnichi Yokota, Teruyoshi Hirayama, Keizo Hirano, Ryosuke Kaneko, Shunsuke Toyoda, Yoshimi Kawamura, Masumi Hirabayashi, Takahiro Hirabayashi, Takeshi Yagi

Identification of the Cluster Control Region for the Protocadherin- β Genes

Located beyond the Protocadherin- γ Cluster

J. Biol. Chem., 2011, 286: 31885-31895. 査読有

[学会発表] (計6件)

①Ryosuke Kaneko, Manabu Abe, Takahiro Hirabayashi, Arikuni Uchimura, Kenji Sakimura, Yuchio Yanagawa, Takeshi Yagi
Gene regulatory changes in Protocadherin-a cluster by gene duplication
第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

②Ryosuke Kaneko

Unique gene regulation of clustered Protocadherins to confer neuronal diversity

国際神経科学会 23rd Biennial Meeting of the ISN-ESN (招待講演)2011年8月30日、Megaron アテネ国際会議場 (ギリシャ)

③ Ryosuke Kaneko, Yuchio Yanagawa, Takeshi Yagi

Gene duplication influences expression and DNA methylation in Protocadherin-a cluster

Keystone Meeting “Evolutionary Developmental Biology”
2011年3月1日、Granlibakken Resort・Tahoe City, California・USA

④金子涼輔、阿部 学、平林敬浩、内村有邦、崎村建司、柳川右千夫、八木 健、Gene duplication alters expression and DNA methylation in Protocadherin-a cluster
BMB2010 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会
2010年12月8日、神戸コンベンションセンター (兵庫県)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 涼輔 (KANEKO RYOSUKE)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40390695

(2) 研究分担者

該当なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし

()

研究者番号：