

## 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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：63801  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22700369  
 研究課題名（和文） セロトニン神経の軸索投射メカニズムの解析

研究課題名（英文） Mechanism of Serotonergic Projections

## 研究代表者

香取 将太 (KATORI SHOTA)  
 国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・特任研究員  
 研究者番号：50562394

## 研究成果の概要（和文）：

攻撃性、摂食、うつ病などに関与するセロトニン神経は、脳幹から脳全体に軸索を投射しているが、その投射メカニズムについてはほとんど解明されていない。本課題では、遺伝子改変マウスを用いて、膜貫通タンパク質 PcdhaC2 (Pcdha ファミリーの一つ)が細胞自律的にセロトニン神経軸索の分布を制御することを明らかにした。さらに、Pcdha は軸索の先端に局在し、PcdhaC2 同士は接着活性を持つことから、セロトニン神経の軸索の分布は、PcdhaC2 同士の接触によって制御されていると推測される。

## 研究成果の概要（英文）：

Serotonergic neurons in the brain stem project their axons to the whole brain. The molecular mechanism of serotonergic projections had been almost unknown. We showed that single-pass transmembrane protein PcdhaC2 cell-autonomously regulates serotonergic axonal distribution, using Pcdha mutant mice. The extracellular domain of PcdhaC2 showed homophilic interaction. Therefore distribution of serotonergic axons may be regulated by PcdhaC2 homophilic interaction.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

## 研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

 キーワード：セロトニン神経、軸索投射、プロトカドヘリン $\alpha$ 、接着分子、遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

セロトニン(5-HT)神経は、不安、摂食、概日リズム、攻撃性、うつ病などの脳機能、精神疾患に関与する。5-HT 神経の細胞体は脳幹の正中領域に集まり、脳や脊髄全体に軸索を投射させ、広い範囲を統合的に調節していると考えられている。これまで 5-HT 神経の薬理的な解析が多くなされてきたが、5-HT

神経の軸索投射メカニズムについては、ほとんど明らかになっていなかった。代表者らは 5-HT 神経で膜貫通タンパク質プロトカドヘリン $\alpha$  (Pcdha)ファミリーが強く発現することを見つけ、5-HT 神経の軸索投射に Pcdha が関与することを明らかにした(Katori et al., *J Neurosci*, 2009)。

Pcdha 遺伝子は、遺伝子クラスターを形成し、14 種類の遺伝子を含む。Pcdha 遺伝子

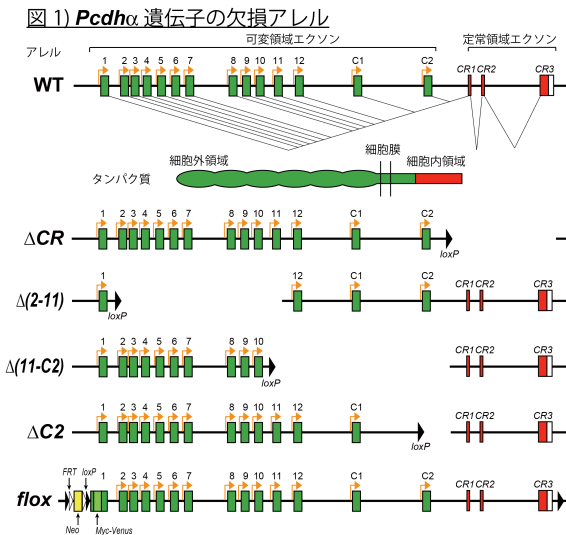
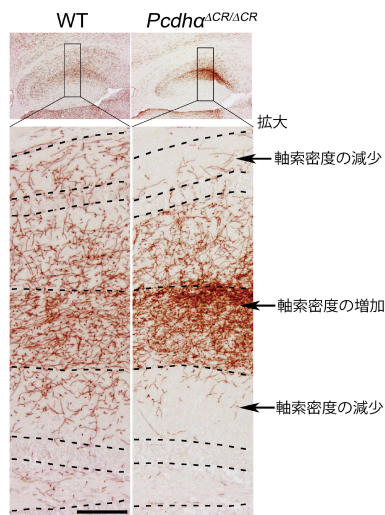


図2) 海馬に投射するセロトニン神経の軸索



クラスターは上流から 14 種類の変領域エクソンが並び、それらは個別のプロモーターによって転写された後、定常領域エクソンとスプライシングする (図1の WT (野生型) アレル)。変領域エクソンには 1~12, C1, C2 と名付けられ、それらは *Pcdha1~Pcdha12*, *PcdhaC1*, *PcdhaC2* 遺伝子に対応する。変領域エクソンは、細胞外、膜貫通、一部の細胞内領域をコードし、定常領域エクソンは残りの細胞内領域をコードする。*Pcdha* 遺伝子の下流には、*Pcdhb* (22 種類)、*Pcdhy* (22 種類)があり、全体として大きな遺伝子クラスターを形成する。これらはまとめてクラスター型プロトカドヘリン (cPcdh) と呼ばれる。

cPcdh で注目すべきなのは、神経細胞毎に数種類の異なるアイソフォームが確率的に選択されて発現している点である (Esumi et al, *Nat Genet* 2005; Kaneko et al., *J Biol Chem* 2006)。さらに研究開始当時、Pcdhy 分子は同種特異的な接着活性を持つことが報告されていたので、共通して発現する

cPcdh のアイソフォームの割合が高い神経細胞同士では、シナプスが形成される確率が高くなると推測された。

代表者らは、*Pcdha* ファミリー全てのアイソフォームの機能が欠損していると考えられる *Pcdha* 定常領域欠損マウス (*Pcdha*<sup>ΔCR/ΔCR</sup>, 図1の ΔCR アレル)を用いて 5-HT 神経の解析を行ったところ、細胞数や軸索の初期 (細胞体の近傍) の投射には異常が見られないが、最終的な軸索の末端、つまり標的領域で軸索の分布異常が見られた (図2)。標的領域の一部では軸索の密度が増加し、一部では低下していたことから、*Pcdha* 分子は 5-HT 神経の軸索投射の最終段階で、軸索の分布密度を制御する分子であると考えられた (Katori et al., *J Neurosci*, 2009)。しかし、5-HT 神経の軸索投射において *Pcdha* の多様なアイソフォーム、発現様式がどのように関与しているのか、どの細胞が投射を制御しているのかについては全く不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) *Pcdha* は 5-HT 神経に特に強く発現するが、5-HT 神経軸索の投射領域である大脳皮質、海馬でも強い発現が見られる。ゆえに、5-HT 神経とその投射領域の細胞の間で *Pcdha* の同種依存的な接着が起こり、それを介して 5-HT 神経の軸索投射が制御されている可能性がある。一方、5-HT 神経の軸索同士の接触に *Pcdha* が関与している可能性もある。そこで、5-HT 神経、投射領域それぞれの *Pcdha* 欠損マウスを作製し、それらのマウスにおける軸索投射を解析することで、軸索投射を制御する *Pcdha* を発現する細胞 (領域) を明らかにすることを目的とする。

(2) *Pcdha* 分子が局在している場所を調べることは、その機能を知る上で重要な情報となる。そこで、5-HT 神経における *Pcdha* 分子の局在を明らかにすることを目的とする。

(3) *Pcdha* の個々のアイソフォームは大脳皮質、海馬、小脳で確率的に発現することが報告されているが、5-HT 神経における発現様式は明らかになっていない。そこで、5-HT 神経に発現する *Pcdha* のアイソフォームを明らかにすることを目的とする。

(4) *Pcdha* のアイソフォームを減らしたマウスを作製し、5-HT 神経の軸索投射における *Pcdha* のアイソフォームの役割を明らかにすることを目的とする。

(5) *Pcdha4* の細胞外領域同士に接着活性が無いことは報告されているが、他のアイソフォームについては調べられていない。接着活

性の評価方法を変更して、他のアイソフォームについて同種同士に接着活性があるか否かを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) *Pcdha* 遺伝子クラスターを Cre-loxP システムで条件的に欠損させるために、2度の遺伝子ターゲティングにより *Pcdha1* プロモーターの下流と *Pcdha* 定常領域エクソンの下流それぞれに *loxP* 配列を挿入したアレルを持つ ES 細胞を得て (*Pcdha<sup>flox/+</sup>*)、その ES 細胞からマウス個体を作製した (図 1 の *flox* アレル)。背側終脳特異的 Cre 発現マウス *Emx1-Cre* との交配により、背側終脳特異的 *Pcdha* 欠損マウス (*Emx1-Cre; Pcdha<sup>flox/flox</sup>*) を作製した。セロトニン神経特異的 Cre 発現マウス *Pet1-Cre* との交配により、セロトニン神経特異的 *Pcdha* 欠損マウス (*Pet1-Cre; Pcdha<sup>flox/flox</sup>*) を作製した。5-HT 神経軸索の染色には抗 Serotonin transporter (SERT) 抗体を用いた。

(2) 胎児期のマウスの腹側中脳を切り出し、培養後、抗 SERT 抗体と抗 *Pcdha* 定常領域抗体を用いて抗体染色を行った。

(3) *Pcdha* 可変領域エクソンに対するプローブを設計し、*in situ* ハイブリダイゼーションを行い、セロトニン神経に発現する *Pcdha* のアイソフォームを解析した。

(4) ① *Pcdha2~Pcdha11* を欠損させるために、*loxP* 配列を *Pcdha1* 可変領域エクソンの下流、*Pcdha11* のプロモーターの下流にそれぞれ遺伝子ターゲティングにより挿入し、それらのアレルと精巣特異的に Cre 組換え酵素を発現する *Sycp-Cre* を持つ雄マウスと野生型の雌マウスを交配し、trans-allelic meiotic recombination (TAMERE) により、*Pcdha2~Pcdha11* を欠損したアレルを持つマウス (*Pcdha<sup>+Δ2-11</sup>*) を得た (Noguchi et al., *J Biol Chem* 2009, 図 1 の  $\Delta 2-11$  アレル)。

② 同様の手法で、*Pcdha11* のプロモーターの下流と *PcdhaC2* 可変領域エクソンの下流に *loxP* 配列を挿入後、*Pcdha11~PcdhaC2* を欠損したアレルを持つマウス (*Pcdha<sup>+Δ11-C2</sup>*) を作製した (Noguchi et al., *J Biol Chem* 2009, 図 1 の  $\Delta 11-C2$  アレル)。

③ 同様の手法で *PcdhaC2* を欠損させるために、*PcdhaC2* プロモーターの下流と *PcdhaC2* 可変領域エクソンの下流に *loxP* 配列を挿入し、最終的に  $\Delta C2$  アレルを持つマウスを作製した (図 1 の  $\Delta C2$  アレル)。

(5) 膜表面にタンパク質を発現させるために、pDisplay ベクターに *PcdhaC2* の細胞外領域

の配列を挿入し、それらを HEK293T 細胞あるいは K562 細胞で強制発現させた。

### 4. 研究成果

(1) *Pcdha* 定常領域欠損マウス (*Pcdha<sup>ACR/ACR</sup>*) では、海馬に投射する 5-HT 軸索に明らかな分布異常が見られるので、海馬に着目した (図 2)。海馬特異的 (正確には背側終脳特異的) *Pcdha* 欠損マウスとセロトニン神経特異的 *Pcdha* 欠損マウスの軸索投射を解析したところ、前者には異常が見られないが、後者には異常が見られた。これは、5-HT 神経に発現する *Pcdha* が 5-HT 神経の軸索投射に必須であることを示している。

(2) *Pcdha* タンパク質の局在を解析するために、5-HT 神経を培養し、免疫染色を行ったところ、*Pcdha* タンパク質は軸索の成長円錐に強く局在していた。*Pcdha* タンパク質は、糸状仮足の先端を除いて軸索の細胞膜表面の局在は検出できなかった。この結果は、*Pcdha* が軸索のガイダンスに関与することを示唆している。

(3) 5-HT 神経に発現する *Pcdha* のアイソフォームを調べるために *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、*PcdhaC2* が特に強く、*PcdhaC1* の発現も見られた。しかし、*Pcdha1~12* の発現は極めて弱く、ほとんど検出できなかった。この結果は、*PcdhaC2* と *PcdhaC1* がセロトニン神経の軸索投射に関与することを示唆している。

(4) 5-HT 神経の軸索投射における *Pcdha* 分子のアイソフォームの役割を調べるために *Pcdha2-11* 欠損マウス (*Pcdha<sup>Δ2-11/Δ2-11</sup>*) と *Pcdha11-C2* 欠損マウス (*Pcdha<sup>Δ11-C2/Δ11-C2</sup>*) の 5-HT 軸索の分布を解析したところ、前者には異常が見られず、後者には *Pcdha<sup>ACR/ACR</sup>* マウスと良く似た異常が見られた。この結果は、*Pcdha11, 12, C1, C2* の全て、あるいはいずれかが 5-HT 神経の軸索投射に必須であることを示している。(3)の結果より、5-HT 神経に *PcdhaC2* は強く発現するのでさらに *PcdhaC2* 欠損マウス (*Pcdha<sup>ΔC2/ΔC2</sup>*) を作製し、解析したところ予想通り 5-HT 神経の軸索投射に異常が見られた。5-HT 神経特異的 *PcdhaC2* 欠損マウス (*Pet1-Cre; Pcdha<sup>ΔC2/flox</sup>*) も 5-HT 神経の投射異常が見られた。これら結果は少なくとも *PcdhaC2* が 5-HT 神経の軸索投射に必須であることを示している。

(5) *PcdhaC2* 分子同士の細胞外領域に接着活性があるか否かを解析するために、*PcdhaC2* 全長を HEK293T 細胞に発現させたところ、細胞膜の表面への局在が見られなかった。一

方、PcdhaC2 の細胞内領域を除去すると、細胞膜表面への局在が見られ、特に細胞間への強い局在が見られた。さらに、カドヘリン類を発現しない K562 細胞に細胞内を欠損した PcdhaC2 を発現させたところ、PcdhaC2 の発現依存的に細胞の凝集が見られた。この結果は、PcdhaC2 の細胞外領域には同種親和性があることを示している。また、(2)の結果を合わせて考えると、PcdhaC2 の細胞内領域には細胞表面への移行を抑制する機能があり、成長円錐の先端のみで細胞膜表面への移行するように制御されているのかもしれない。

本研究の開始当初は、Pcdha の役割はプレシナプスとポストシナプスの接続、認識ではないかという仮説があり、本研究では細胞種（領域）特異的 KO マウスの作製、解析を行った。その結果、投射先の細胞ではなく、5-HT 神経に発現する Pcdha が 5-HT 神経の正常な軸索投射に必須であることがわかった。

さらに、Pcdha の発現パターンの多様性が神経細胞に個性を与え、それが神経回路形成に関わるのではないかという仮説があったが、5-HT 神経の投射に関しては、Pcdha2~11 は必須ではなく、PcdhaC2 というアイソフォームが必須であるという結果が得られた。PcdhaC1 と PcdhaC2 は、5-HT 神経では一様に発現し、他のアイソフォームはほとんど発現していないことから、Pcdha の多様性は必須でないと考えられる。

これらの結果は、当初の予測とは異なるものとなったが、本研究により PcdhaC2 を介して 5-HT 神経は軸索の密度の調節に関与していることが明らかになった。網膜アクリン細胞や小脳プルキンエ細胞の樹状突起の細胞内（自己）での反発に Pcdhy の多様な発現様式が関与していることが最近報告された(Lefebvre et al., *Nature* 2012)。一方、5-HT 神経の軸索は、自己、非自己を問わず PcdhaC2 を介して反発し、軸索密度が高くなりすぎるのを防いでいると推測する。今後、この点について明らかにしていきたい。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

① Katori S., Protocadherin- $\alpha$ C2 is required for normal distributions of serotonergic axons. 新学術領域「メゾスコピック神経回路から探る脳の情報処理基盤」平成 24 年度第 1 回領域会議、2012 年 7 月 26 日、仙台

② Katori S., Okayama A., Noguchi Y., Kawamura Y., Deneris S., Hirabayashi T., Yagi T., The control of serotonergic projections by protocadherin- $\alpha$  family. Naito Conference, Oct. 20<sup>th</sup> 2011 Yamanashi.

③ Katori S., Okayama A., Deneris E., Yagi T., The protocadherin-alpha family is required for normal serotonergic projections. 第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 15 日、横浜

④ Katori S., Noguchi Y., Hirabayashi T., Kawamura Y., Yagi T., Protocadherin alpha subfamily C, 2 is required for normal serotonergic projections. Society for Neuroscience, Nov. 17<sup>th</sup> 2010, San Diego (USA)

[図書] (計 1 件)

香取将太、八木健、株式会社エル・アイ・シー、<series モデル動物利用マニュアル>疾患モデルの作製と利用—脳・神経疾患「第 3 節 CNR/プロトカドヘリン分子群変異マウス (神経軸索の投射)」、277-287 頁、2011 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

香取 将太 (KATORI SHOTA)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・特任研究員

研究者番号：50562394

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

## 研究協力者

大阪大学大学院生命機能研究科

八木健、木津川尚史、平林敬浩、内村有邦、野口由紀子、岡山厚、松下健一郎

慶応義塾大学

河村佳見

ケースウエスタンリザーブ大学

Evan S Deneris

国立遺伝学研究所

岩里琢治