

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：82611
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700364
 研究課題名（和文）神経回路形成における標的細胞認識と細胞部位特異性を担う分子機構
 研究課題名（英文）Molecular mechanisms of target recognition and subcellular specificity in developing nervous system

研究代表者

須藤 文和（SUTO FUMIKAZU）

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 微細構造研究部・室長

研究者番号：40345848

研究成果の概要（和文）：

中枢神経系での神経接続様式の特徴である神経核間の接続と、細胞部位特異的な接続様式について、軸索誘導分子セマフォリンとその受容体プレキシンに着目した解析を行った。神経核間の接続様式については扁桃体と分界条床核間接続をモデル系とし、一方、細胞部位特異的な接続について小脳バスケット細胞とプルキンエ細胞との接続をモデル系として、分子分布とノックアウトマウスを用いた解析を行い、セマフォリン/プレキシンにより扁桃体と分界条床核のトポグラフィックな接続が制御されていることを明らかにした。細胞部位特異的な接続におけるセマフォリン/プレキシンによる制御機構については今後の解析を必要とする。

研究成果の概要（英文）：

The amygdaloid complex is a principal component of the limbic system with important roles in emotion and fear memory. During development, axons of distinct amygdaloid nuclei project to different parts of the bed nucleus of the stria terminalis (BNST). However, it remains largely unknown how these connections are formed during development. Here, we examined the role of axon guidance molecule semaphorins and their receptor plexins in the formation of the amygdala-BNST network, and found that Sema6A/plexin-A4 signaling regulates the precise connectivity between the distinct amygdala projection neurons and their targets in the BNST.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

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）神経科学、（2）発生・再生、（3）神経発生、（4）分子、（5）神経回路、（6）軸索誘導、（7）プレキシン、（8）セマフォリン

1. 研究開始当初の背景

動物の学習や記憶、および、行動発現は神経回路網を基盤とする。この神経回路網の特徴として、ネットワーク形成が規則性と特異性をもってなされることが挙げられる。これ

らの規則性や特異性を制御する分子機構は未解明であり、特に、神経核間連絡の形成や、入力線維の細胞部位特異的認識について、その分子制御機構は明らかとなっていない。

中枢神経系では、機能単位としての神経核間の適切な連絡が、大脳皮質への末梢からの感覚情報伝達などを担うが、このような神経核間の適切な連絡を制御する分子機構はほとんど明らかにされていない。扁桃体は複数の神経核より構成され、その主たる出力の一つが分界条床核と規則性をもった線維連絡を形成することから、神経核間連絡の形成機構を解析するための良いモデルである。扁桃体神経核のうち、中心核と一部の主嗅覚系神経核からの出力線維は分界条床核の前方部（内側、外側部）と接続し、一方、副嗅覚系神経核とその他の主嗅覚系神経核からの出力線維は分界条床核の後部および前方内側部と接続する。このような規則性を有する扁桃体-分界条床核間の連絡形成において、軸索反撥分子 **Sema3F** とその受容体 **Neuropilin-2** の遺伝子破壊マウスにおいて、扁桃体-分界条床核間接続での異常が報告されているが(Sahay et al., 2003)、その分子制御機構は明らかでない。我々は、扁桃体から分界条床核への出力系において、上記の規則的な線維連絡が、軸索誘導分子受容体であるプレキシシン(plexin)のうち **plexin-A1** と **plexin-A4** の発現の組み合わせにより分類できることを見出していた(plexin code)。また、**plexin-A4** 遺伝子変異マウスでは、分界条からの線維で構成される前交連の形成不全が認められている(Suto et al., 2005)。これらの予備的な結果より、**plexin-A1**、**plexin-A4**、および、それらのリガンド分子のシグナルが、扁桃体-分界条床核間連絡を制御する分子機構であると予想している。

一方、入力線維が標的細胞へ接続する際の様式の一つに、細胞部特異的な接続が知られている。このような接続様式は、神経回路の動作を考える上で重要であると考えられているが、その形成および維持機構は未解明である(Williams et al., 2010)。小脳では、生後発達に伴い、バスケット細胞の軸索がプルキンエ細胞の軸索基部に限局して接続することが知られている。この接続過程において、膜蛋白質 **neurofascin** がプルキンエ細胞側において接続部位に限局し、さらにこの局在を細胞内分子である **ankirin-G** が制御することで、標的細胞側の接続部位が限定されること

が明らかとなっている(Ango et al., 2005)。しかしながら、バスケット細胞の軸索側で接続部位を認識する分子は同定されておらず、その分子機構は未解明である。

2. 研究の目的

(1) 扁桃体から分界条床核への出力線維のうち、分界条床核の前方外側部、前方内側部、後部に投射する線維が、それぞれ **plexin-A4**、**plexin-A1** と **plexin-A4**、**plexin-A1** を高レベルで発現する線維として分類できる。そこで、本研究では、神経核間の規則的な投射が **plexin** の発現の組み合わせによって制御されることを示すことを目的とする。すなわち、**plexin-A4** は分界条床核の前方部への投射を、**plexin-A1** は後方部または、内側部への投射を制御するという、投射制御モデルの証明を試みる。

(2) 小脳バスケット細胞軸索のプルキンエ細胞への接続をモデルとし、細胞部位特異的な接続を制御する機構を、**plexin-A4** とそのリガンドであるセマフォリン (**Sema6A**、**Sema6B** など) に着目して解析する。**plexin-A4** は、軸索誘導分子として、細胞外因子の軸索誘導シグナル(おもに、軸索反撥シグナル)を軸索内に伝達する機能をもつことが知られている。そこで、バスケット細胞で発現する **plexin-A4** の機能とプルキンエ細胞で発現するセマフォリンについて、バスケット細胞の軸索に対する作用とプルキンエ細胞での分子局在等の解析により、セマフォリン/プレキシシンによる細胞部位特異性を制御する分子制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) プレキシシンとそのリガンドによるモデルを検証するため、それぞれの遺伝子欠損マウスを用いた投射様式解析により、プレキシシン遺伝子の必要性を示すとともに、異所的発現解析により十分性を明らかにする。さらに、リガンド分子の作用と **plexin** 分子の機能を解析する神経路内における規則的な軸索走行および、標的神経核内への特異的な投射様式について、**plexin** 遺伝子の欠

損による影響を調べる。特に、分界条の形成、分界条内における軸索走行様式、分界条床核での投射様式に着目して調べる。扁桃体出力線維の走行について、抗 *Neuropilin-2* 抗体(Suto ら、未発表)や抗 *GAP-43* 抗体(Aizawa et al., 2004)を用いた免疫組織学的手法により可視化する。また、脂溶性蛍光色素 DiI と DiO により、それぞれ異なる扁桃体神経核(中心核と副嗅覚系神経核)の出力線維を標識し、異常の有無を調べる。

(2) バスケット細胞軸索のプルキンエ細胞への部位特異的投射において、*plexin-A4* と *Sema6A*, *Sema6B* 遺伝子欠損による影響を調べるために、バスケット細胞の軸索を、抗 *HCN1* 抗体を用いて可視化する(Ango et al., 2004)。野生型、または、*plexin-A4* とセマフォリン遺伝子破壊マウスの小脳組織切片を抗 *HCN1* 抗体で染色し、バスケット細胞軸索投射様式を比較解析する。また、セマフォリンの分子機構を解析するために、プルキンエ細胞でのセマフォリンの分布様式を明らかにする必要がある。そこで、免疫組織学的な解析に適した *Sema6A* と *Sema6B* に対する抗体を作製する。得られた抗体を用いて、プルキンエ細胞でのセマフォリンの局在様式を調べる。

4. 研究成果

(1) まず、扁桃体と分界条床核間の神経接続形成過程における *plexin-A1* と *plexin-A4* の分子分布を詳細に解析したところ、神経接続完了期と同様に、形成初期に置いても *plexin-A1* と *plexin-A4* は相補的な分子分布を示していたことから、それぞれの分子は形成初期より異なる神経軸索に分布し、扁桃体と分界条床核の接続に関与することが示唆された。さらに、*plexin-A4* のリガンドの一つである *Sema6A* を認識する新規抗体を作製し、*Sema6A* の分子分布を解析したところ、*Sema6A* は *plexin-A4* とは相補的な分布様式を示すことを明らかにした。さらに、*plexin-A4* ノックアウトマウスにおける投射様式を抗 *Neuropilin-2* 抗体と DiI を用いて解

析したところ、分界条床核前方部位に接続する扁桃体からの出力線維の走行異常が認められた。異常を示す出力線維は *Sema6A* を強く発現する神経線維が投射する分界条床核後方部へと異所的に侵入していることから、*Sema6A* による軸索反撥作用を *plexin-A4* が受容することにより前方部への投射を制御していると考えられる。

(2) 小脳バスケット細胞とプルキンエ細胞との部位特異的な接続様式について、まず、発生時期における *plexin-A4* と *Sema6A* の分子分布を調べたところ、*plexin-A4* は移動中のバスケット細胞より発現を開始し、プルキンエ細胞との接続期、ならびに完成期以降成体まで発現を持続することを明らかにした。一方、*Sema6A* はバスケット細胞には発現せず、バスケット細胞移動期には外顆粒層で強く発現していた。また、神経接続期には小脳分子層に分布し、その発現を成体まで維持することを明らかにした。神経接続形成時期および完成期以降における *plexin-A4* と *Sema6A* の分布様式は相補的であることから、*Sema6A* の反撥作用によるバスケット細胞軸索の接続制御が予想される。また、完成期以降にも両分子は発現を継続することから、接続の維持への関与が予測される。一方、免疫染色可能な抗 *Sema6B* 抗体は今のところ作製できておらず、分子タグを付加した *Sema6B* を発現するトランスジェニックマウスにおいて *Sema6B* の分子分布を調べる方法を検討している。現在、このトランスジェニックマウスを作製中である。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

①. 須藤文和、大隅典子、一戸 紀孝、軸索分子受容体による扁桃体神経回路形成の制御、第 34 回 日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜市

②. 須藤文和、大隅典子、一戸 紀孝、*Plexin-A4* regulates the development of topographic connection in the

amygdaloid circuits、Joint Meeting of
The 45th Annual Meeting of the
Japanese Society of Developmental
Biologists & The 64th Annual
Meeting of the Japan Society for Cell
Biology、2012年5月29日、神戸
市

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 文和 (SUTO FUMIKAZU)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究セ
ンター・神経研究所・微細構造研究部・室
長

研究者番号：40345848