

## 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 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700368

研究課題名（和文）

遺伝子改変マウスを用いたスパインにおけるアクチン制御因子の生理機能解析

研究課題名（英文）

Genetic analysis of physiological function of Rac1 and Cdc42 in dendritic spines

研究代表者

葛西 秀俊 (KASSAI HIDETOSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40403232

研究成果の概要（和文）：

本研究では、Rho ファミリーGTPase の Rac1 および Cdc42 の神経細胞における機能を明らかにすることを目的に研究を行った。大脳皮質・海馬特異的な遺伝子ノックアウトマウスをおよび、スライス培養系を用いて、Rac1 が樹状突起スパインの制御に深くかかわっていることを明らかにすることができた。本研究結果により、精神遅滞といったヒト疾患の理解が深まることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I focused on analysis of neuronal functions of Rho family GTPase, Rac1 and Cdc42. We adopted analyses using both region-specific knockout mice and brain slice culture, and revealed that Rac1 is involved in the regulation of spine formation and/or morphogenesis in the cerebral cortex and hippocampus. These results may provide insights into human diseases such as mental retardation.

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：遺伝子操作マウス, Rac1, Cdc42, 神経細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脳は多数の神経細胞によって構成され、それらがネットワークを形成することによって高次機能を発現する。神経細胞のネットワークはシナプスを介して連絡し、シナプスの伝達効率は、記憶や学習といった外界からの刺激などの神経活動に依存して可塑的に変

化する。スパインは樹状突起上に形成されるシナプス後部の構造体で、その形態や動態がシナプス可塑性に深く関与していると考えられている。実際、単一シナプスにおいて長期増強とスパインの構造変化が同時に惹起されることが明らかにされ (Matsuzaki et al., *Nature*, 2004)、自閉症や脆弱 X 症候群におい

てはスパインの形成不全が見られることが知られている (Govak et al., *Nat. Neurosci.*, 2004)。従って、スパインの形成や動態の分子基盤の解明は、いかにして神経細胞が活動依存的にそのネットワークを変化させるのかという脳神経科学の重要課題であるとともに、精神遅滞や自閉症といった社会的関心事の本質の理解につながると期待できる。

## 2. 研究の目的

申請者は、スパインの形態変化はアクチン細胞骨格が主に制御していることに着目し (Bhatt et al., *Ann. Rev. Physiol.*, 2009)、この制御メカニズムは Rho ファミリーGTPase の遺伝子改変マウスを用いることによって系統的に明らかにすることができると考えた。これまでスパインにおける Rho ファミリーGTPase の機能を *in vivo* において具体的に検証した例はわずかであり、ほとんどが培養細胞実験やドミナントネガティブ体を用いた *in vitro* 解析に依拠するものである。Rho ファミリーGTPase は細胞骨格の中心制御因子であるため、スパインにおける生理機能を遺伝子改変マウスを用いて正確に位置づけておく必要がある。そこで、Rac1 や Cdc42 によるスパイン制御の分子基盤を遺伝子操作マウスを用いて生理的に明らかにすることを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

スパインの形成・動態における Rho ファミリーGTPase の機能を明らかにするために、長期スライス培養を行うことによって、経時的にスパインの形態を観察する。具体的には、まず floxed-Rac1・floxed-Cdc42 マウスを、終脳特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウス (Emx1-Cre マウス) と交配することによって、スパイン形成前の胎生期において、大脳皮質

と海馬の興奮性ニューロンにおいて Rac1・Cdc42 をノックアウトする。これらのマウスから脳スライスを作製し、ジーンガンを用いて GFP を発現するプラスミドを導入し一部の神経細胞を標識する。その後、スライスを長期培養することによって、大脳皮質および海馬 CA1 領域における錐体細胞のスパインの形態や数を共焦点レーザー顕微鏡を用いて経時的に観察・定量化を行う。この解析を通して、スパインの形成期から定常期に至るまでのステップにおいて、Rac1 および Cdc42 が重要な役割を担っているのかを明らかにすることができる。この解析と同時に、スパイン制御に関わると考えられる分子を探索し、トランスジェニックマウスを用いた分子機能解析を行う。

## 4. 研究成果

2011 年度は、遺伝子操作マウスの個体および脳スライスを用いて、脳および神経細胞の形態形成における低分子量 G タンパク質 Rac1 および Cdc42 の役割について検討した。具体的にはまず、大脳皮質や海馬において Rac1 あるいは Cdc42 を欠損したマウスを作製し、これらのマウスの脳をゴルジ染色することによって、大脳皮質・海馬の神経細胞の形態を観察した。その結果、Rac1 を欠損した神経細胞において、スパインの数の減少と形態の異常が観察された。一方、Cdc42 欠損細胞においては、コントロールと比較してスパインの形態や数に大きな違いは認められなかった。

次に、Rac1-flox マウスまたは Cdc42-flox マウスより海馬スライスを作製し、ジーンガンによって Cre 組換え酵素を遺伝子導入することによって、一部の神経細胞においてのみ Rac1 あるいは Cdc42 をノックアウトした。この解析によって細胞自律的な各分子の機能

を明らかにすることができる。海馬スライスを長期培養した結果、Rac1 を欠損した神経細胞においてはスパインの形態が非常に細長く、未熟であった。一方、Cdc42 を欠損した神経細胞は、コントロールと比較してスパインの数や形態に大きな違いは認められなかった。これらの結果より、Rac1 は細胞自律的にスパインの形成に重要な役割を担っていることが明らかになったと同時に、RhoファミリーGタンパク質間で神経細胞において機能的な相違があることが示唆された。Rac1 の下流分子のPAKは精神遅滞の原因遺伝子であり、この疾患においてはスパインの減少や形態異常が引き起こされることが知られている。このことから、本成果は、ヒトの疾患メカニズムを明らかにする上で科学的・社会的に重要であると考えられる。

2012年度は、他のスパイン制御に関わるタンパク質の解析を行った。Mammalian target of rapamycin (mTOR)は、細胞のエネルギー代謝において重要な役割を果たす分子で、エネルギー消費量の高い神経細胞において重要な役割を担っていると推定される。実際、mTOR経路の異常な活性化は結節性硬化症を発症し、自閉症の原因であることも示唆されている。そこで、大脳皮質の細胞構築およびスパイン形成におけるmTORシグナルの機能について明らかにすることを試みた。本研究では、細胞外の栄養状態やインスリン刺激に依存せずに高いキナーゼ活性を維持し続ける活性化型mTORを用いて下記の実験を行った。Cre-loxP組換え依存的に活性型mTORを発現するトランスジェニックマウスの作製を試みた。Emx1-Creマウスを用いて、胎生期の終脳特異的に活性型mTORを発現させたところ、成熟マウスにおいて大脳皮質の大きさが著しく縮小することを見出した。この委縮は胎生12日齢において既に認められ、

cleaved caspase 3 陽性の細胞が数多く観察された。これらの結果から、胎生期におけるmTORシグナルの活性化は神経前駆細胞のアポトーシスを引き起こすことが明らかとなった。本実験では、mTORによるスパイン制御のメカニズムを明らかにするには至らなかったが、大脳皮質形成におけるmTORシグナルの新たな機能を世界で初めて明らかにすることができた。

今後の展望としては、大脳皮質神経細胞に活性化型mTORを導入したマウスについてスパインの動態を明らかにする。具体的には活性化型mTORおよびGFPを子宮内エレクトロポレーションによって大脳皮質神経細胞に導入し、大脳皮質スライスの長期培養を行うことによってスパインの数や成熟過程をリアルタイムで観察する。また、本年度の研究によって明らかとなったmTORによる神経細胞の移動および生存制御に関しては、mTOR下流の分子メカニズムを明らかにすることを旨とする。

## 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)

1, Kato HK, Kassai H, Watabe AM, Aiba A, Manabe T, “Functional coupling of the metabotropic glutamate receptor, InsP<sub>3</sub> receptor and L-type Ca<sup>2+</sup> channel in mouse CA1 pyramidal cells.” *J. Physiol.*, 590, 3019-3034, 2012

査読有

2, Aizawa R, Yamada A, Suzuki D, Iimura T, Kassai H, Harada T, Tsukasaki M, Yamamoto G, Tachikawa T, Nakao K, Yamamoto M, Yamaguchi A, Aiba A, Kamijo R, “Cdc42 is

required for chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development.” *Mech. Dev.*, 129, 38-50, 2012  
査読有

[学会発表] (計2件)

- 1, 葛西秀俊, 「大脳皮質形成における mTOR シグナリングの機能解析」  
第34回 日本分子生物学会年会、2011年12月16日、横浜市・パシフィコ横浜

- 2, Hidetoshi Kassai, “Genetic manipulation of mTOR signaling in mouse cerebral cortex”  
42nd annual meeting of the Society for Neuroscience, 2012.10.17, New Orleans, USA.

[図書] (計2件)

- 1, 葛西秀俊, 饗場 篤, 「mTOR シグナルによる脳機能の調節と破綻」  
*細胞工学*, 学研メディカル秀潤社, 31, 1355-1359, 2012

- 2, Hidetoshi Kassai, Yoshitaka Fukada, “Farnesylation versus geranylgeranylation in G-protein-mediated light signaling.”  
*The Enzymes*, 29, 125-145, 2011

[その他]

ホームページ等

<http://lar.cdbim.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

葛西 秀俊 (KASSAI HIDETOSHI)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：40403232

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：