

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 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23700472
研究課題名(和文) 神経軸索伸展期からシナプス形成期への移行を司る遺伝子発現制御プログラムの解析
研究課題名(英文) Analysis of gene expression program governing the transition from axon growth phase to synaptogenic phase
研究代表者
桑子 賢一郎 (KUWAKO KEN-ICHIRO)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：30468475

研究成果の概要(和文)：マウス小脳辺縁系神経回路を構成する橋核神経細胞において、その軸索投射の標的細胞である小脳顆粒細胞の存在下で発現が変動する転写因子群を同定した。そして、それらの中で複数の転写因子が軸索伸展抑制作用あるいはシナプス形成促進作用を示すことを明らかにした。本研究結果から、橋核神経細胞の軸索伸展期からシナプス形成期へのスムーズな移行が標的細胞由来のシグナルによって発現誘導された特定の転写因子群によって制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the developing pontine neurons (PN), we identified transcription factors that were up/down-regulated in the presence of cerebellar granule cells which are target cells of PN axons. Among those transcription factors, multiple molecules showed the abilities of axon growth inhibition or induction of synaptic differentiation. These results indicate that target-derived signal(s) may regulate the transition from axon growth phase to synaptogenesis phase in PN through the control of the expression of specific transcription factors.

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：神経発生

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：軸索伸展、シナプス形成、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

脳神経系の精巧な神経回路網は、厳密に決められた遺伝的プログラムと外環境からの調節

に従って、発生期に神経細胞分化→軸索伸展・誘導→シナプス形成→シナプス・ネットワークの成熟化などの各ステップを連続的に

経て完成される。これらの一連の流れの中では様々な因子の発現が適切なタイミングで俊敏にオン・オフ制御されることが重要であると考えられているが、その発現制御プログラムの実体はいまだに不明な点が多い。特に、大きな発現変動を伴うステップ間の移行の際にどのような発現制御プログラムが働いているかについてはこれまでほとんど明らかにされていなかった。

発生期の多くの軸索は、細胞外の軸索誘導因子に導かれながら遠く離れた標的組織に向かって伸展を続け、途中で異所的なシナプスを形成することなく、最終目的地に到達して伸展を終了したのちにはじめてシナプス形成を開始する。つまり、“軸索伸展期”から“シナプス形成期”への移行の際には、神経細胞では軸索伸展の終了とシナプス形成の開始というその直前までの過程とは正反対の現象が迅速に進められる。このことから、移行期にはこれらの現象に関わる分子群の発現が短期間に大きく変動する可能性が示唆され、実際に、小脳への求心性入力線維の一つである橋核神経細胞では、移行が起こるとされる新生仔期に、軸索伸展に関わる細胞骨格蛋白質群の発現低下とシナプス関連分子群の発現上昇が、同調的かつ急速に起こることが報告されている。したがって、軸索伸展やシナプス形成で働く実行因子群の発現を包括的に制御し、神経細胞の遺伝子発現プロファイルを「軸索伸展期型」から「シナプス形成期型」にシフトさせる上流の制御機構の存在が強く示唆される。軸索伸展期からシナプス形成期へのスムーズな移行に異常が起こると、異所的な軸索投射やシナプス形成が起こり、正しい神経回路網の形成が阻害されるため、この移行期の制御機構は極めて重要であるが、その実体は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

小脳辺縁系神経回路の苔状線維を構成するマウス橋核神経細胞をモデルシステムとして、神経回路形成過程の2つの重要なステップである“軸索伸展”から“シナプス形成”への移行を制御する分子機構の解明を目指し、特にその移行に重要な転写因子群を明らかにすることを目的として研究をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 橋核神経細胞と小脳顆粒細胞との初代神経細胞共培養系において、橋核神経細胞のみを高純度で回収する実験系を確立した。

(2) 小脳顆粒細胞の存在下において橋核神経細胞で発現変動する転写因子群を同定するために、上記(1)の実験系で橋核神経細胞の単独培養および小脳顆粒細胞との共培養の高純度試料を調整し、DNA マイクロアレイ解析をおこない、小脳顆粒細胞との共培養で発現が変動する転写因子群を同定した。

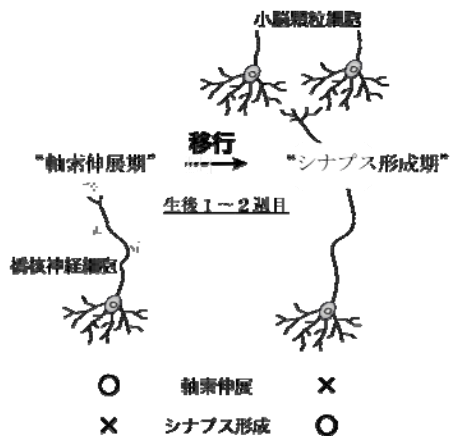
(3) 橋核神経細胞の軸索伸展からシナプス形成への移行期を正確に同定するために、トレーサーによる軸索標識法やシナプスマーカーによる免疫組織学的手法などを用いた解析をおこなった。

(4) 上記(2)で抽出した転写因子群について、*in situ* hybridization 法や免疫組織化学的解析およびRNA発現データベースの探索などをおこない、軸索伸展からシナプス形成への移行期に生体内で実際に発現が変動する転写因子群の絞り込みをおこなった。

(5) 橋核神経細胞の初代神経培養系において、上記(4)の転写因子群について過剰発現および発現抑制をおこない、種々の分子生物学的・細胞生物学的手法を用いて軸索伸展やシナプス形成に関する解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 橋核神経細胞の軸索は、出生期から生後1週目までに小脳皮質へと到達し、生後2週目までに標的細胞である小脳顆粒細胞とシナプスを形成することが明らかになった。したがって、軸索伸展期からシナプス形成期への移行は生後1～2週目に起こることが示唆された(下図)。



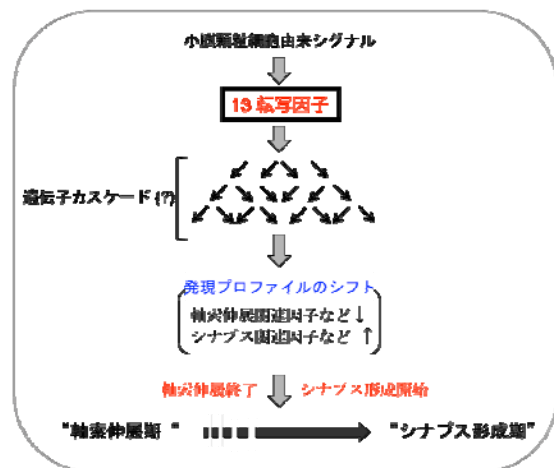
(2) 初代神経細胞培養系を用いたDNAマイクロアレイ解析と生体での発現パターンの解析によって、橋核神経細胞において小脳顆粒細胞の存在下で3倍以上発現が変動し、かつ生後1～2週目の“移行期”に生体内でも実際に発現変動する転写因子を探索し、ホメオボックス転写因子群やSOXファミリー転写因子群などを含む13個を同定した。そのうち、移行期に発現が上昇する転写因子が12個、低下する転写因子が1個存在した。このことから、橋核神経細胞では、標的細胞である小脳顆粒細胞から何らかのシグナルを受けて複数の転写因子の発現が誘導・抑制されていることが示唆された。

(3) 上述の13個の転写因子群のうち複数の転写因子が、*in vitro*神経細胞培養系において橋核神経細胞の軸索伸展抑制能あるいはシナプス形成作用を示した。

<まとめ>

橋核神経細胞の軸索伸展期からシナプス形成期への移行の際には、小脳顆粒細胞からのシグナルにより軸索伸展抑制やシナプス形成作用を持つ転写因子群の発現が誘導されることが明らかとなった。

本研究から、橋核神経細胞の軸索伸展期からシナプス形成期へのスムーズな移行が標的細胞由来のシグナルによって発現誘導された特定の転写因子群によって制御されている可能性が示唆され(下図モデル)、神経回路形成をつかさどる遺伝子発現プログラムの解明のための重要な知見が得られた。



<今後の展望>

今後、生体内での軸索伸展期からシナプス形成期への移行に必要な十分な転写因子群を同定し、それらの因子によって移行期の橋核神経細胞における発現プロファイルがどのように変化し、制御されているのかを明らかにしていくことで、神経回路形成をつかさどる発生プログラムの全容解明に近づくものと期待される。

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1件)

- ① Matsuda S.*, Kuwako K.*, Okano H. J., Tsutsumi S., Aburatani H., Saga Y., Matsuzaki Y., Akaike A., Sugimoto H., Okano H. (* Equal contribution)
“Sox21 promotes hippocampal adult neurogenesis via the transcriptional repression of the *Hes5* gene.”
Journal of Neuroscience 32, 12543-12557 (2012) doi:10.1523/JNEUROSCI.5803-11.2012 査読あり

[学会発表] (計4件)

- ① 桑子賢一郎、岡野栄之
「Analysis of mechanism regulating synaptic specificity in cerebellar limbic system」
第35回日本分子生物学会
2012年12月14日 (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)
- ② 桑子賢一郎、岡野栄之
「小脳辺縁系神経回路の特異的シナプス結合を制御する分子の探索」
第35回日本神経科学会
2012年9月21日 (名古屋国際会議場)
- ③ Ken-ichiro Kuwako, Hideyuki Okano
「Screening for molecules regulating synaptic specificity in cerebellar limbic system」
The 4th Biennial Symposium on Brain and Mind Research in the Asia-Pacific (BMAP 2012)
2012年8月30日 (Tokyo, Japan)
- ④ 桑子賢一郎、岡野栄之
「特異的神経回路形成を担う遺伝子発現プログラムの解析」
第34回日本神経科学会
2011年9月17日 (パシフィコ横浜)

[図書] (計1件)

- ① 桑子賢一郎 ほか8名 (共著)
「ブレインサイエンスレビュー2013」
2013年2月28日発行、(株)クバプロ、編集 (公財)ブレインサイエンス振興財 廣川信隆 (桑子賢一郎 著 “神経回路形成をつかさどる遺伝子発現プログラム”、p59-82)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑子 賢一郎 (KUWAKO KEN-ICHIRO)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：30468475