

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300116

研究課題名(和文) 神経回路構築の時間スケジュールを調節する機構

研究課題名(英文) Spatiotemporal control mechanisms of neural circuit formation

研究代表者

斎藤 哲一郎 (SAITO, Tetsuichiro)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00202078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：動物の体内で神経回路が作られる時には、細胞分化などの各ステップのスケジュールが厳密に管理されている。本研究では、マウスの体内で遺伝子の働きを人為的に操作する新しい実験系を開発した。さらに、神経細胞の個性を決める遺伝子の働く場所やスケジュールを変えることにより、神経回路の一部のみを狙って限定的な回路異常を作り出し、特定の行動を正常に行えないモデルマウスを効率よく作製することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Neural circuit formation requires fine spatiotemporal control of each step, such as neuronal differentiation and axonal projection. We have developed a new method in which gene expression is turned on in an aimed portion of the mouse nervous system in vivo. Mice that have a defect in a restricted part of neural circuits and a specific behavioral disorder have been efficiently obtained.

研究分野：神経科学

キーワード：遺伝子 細胞・組織 神経科学 脳・神経 発生・分化 脊髄 神経細胞 電気穿孔法

1. 研究開始当初の背景

神経回路の構築では、神経細胞の誕生から軸索の伸長とシナプス形成に至る一連のステップが時間的に精巧に制御され、高次神経機能を支えている。神経細胞の分化などの各ステップで働く分子は明らかとなってきたが、これらの分子の作用スケジュールを調節する機構や厳密なスケジュール管理の意味はほとんど不明である。研究代表者は、脊髄の交連神経をモデルとして、神経細胞の分化の初期を制御する因子群と神経回路の形成で働く因子群との上下関係を初めて解明した。その中で、それぞれの因子が働くスケジュールが精巧に制御されていることが示唆された。

- (1) 研究代表者等が開発したマウス胎仔への電気穿孔法により、マウス神経系の特定の部位へ遺伝子導入することは可能となった。しかし、導入された遺伝子の発現を任意の時間で制御することはできなかった。
- (2) 研究代表者等が発見した哺乳類の Bar 型ホメオボックス遺伝子 *Barh1* (*Mbh1*) や *Barh2* (*Mbh2*) を脊髄の発生過程で強制発現させると、本来は別の神経細胞になるべき細胞を交連神経細胞へ運命転換できることが示された。しかし、*Barh1* や *Barh2* が幹細胞と分裂後の神経細胞のいずれで運命転換を起こすのかは、それまでの実験系で調べることは不可能だった。
- (3) 神経系で働く遺伝子のノックアウトマウスを用い、神経系に異常を有する多くのマウスが作られてきたが、神経回路の特定の部位のみを狙って異常を有するマウスを効率よく作製することは不可能だった。

2. 研究の目的

研究代表者等が世界に先駆けて分化機構を解明しモデル神経の代表である脊髄の交連神経を軸とし、研究代表者等が開発した独自の実験系を進展させるとともに、神経細胞の誕生からシナプス形成に至る神経回路構築のスケジュール調節機構を解明することを目的とする。特に、細胞分化因子などの分子レベルの視点から神経回路の組織レベルや行動制御の個体レベルへと研究を展開するための基盤を作ることを目指す。

3. 研究の方法

研究代表者等が明らかにしてきた *Barh1* や *Barh2* 等の機能を利用し、研究代表者等が開発した電気穿孔法などの独自の手法を改良し、以下の研究を実施する。

- (1) マウス子宮内外手術法と電気穿孔法等を用いた新しい遺伝子発現誘導系の開発
- (2) *Barh1* や *Barh2* 等を用いた時期特異的な運命転換解析
- (3) 上記(1)の新しい実験系を利用した行動異常モデルマウスの作製と高効率作製法の開発

4. 研究成果

研究代表者等が開発した独自の実験系を進展させ、マウス体内での新しい遺伝子発現誘導系を開発するとともに、この実験系を用い、交連神経回路の構築機構で新しい発見をした。さらに、行動異常モデルマウスを作製するための新しい手法の開発にも成功した。具体的には、

- (1) 研究代表者等が開発した子宮内外のマウス胎仔への電気穿孔法 (Saito (2015) など) と最新型テトラサイクリン遺伝子発現誘導系を組み合わせることにより、マウス胎仔の神経系に遺伝子を導入後、ドキシサイクリン注射により任意の時間にマウス体内の特定の神経細胞で遺伝子発現を誘導できる新しい実験系を構築することに成功した (Sato et al. (2013))。
- (2) 分裂後の神経細胞で *Barh1* や *Barh2* の発現を誘導することにより、細胞分裂の後であっても、本来は交連神経でない細胞を交連神経細胞へ運命転換できることを初めて明らかにした (Sato et al. (2015))。
- (3) 神経分化の初期に働く遺伝子の一部が、神経細胞が移動を終え神経回路を作る時にも一過的に機能することを明らかにした。さらに、これらの遺伝子を上記の(1)で開発した新しい手法で異所的・短時間的に発現させることにより、神経回路の一部のみに異常を起こさせ、特定の行動を正常に行えないモデルマウスを作製することに成功した。

以上の結果、脊髄の交連神経回路の中心をなす交連神経細胞をモデルとして神経細胞の運命決定と回路形成能が、分裂後の細胞であっても1つの遺伝子の一過的な発現で劇的に変化しうることが初めて明らかになった。さらに、神経回路形成能を変化させる遺伝子と、本研究で研究代表者等が開発した新しい遺伝子発現誘導系を用いることにより、動物体内の神経回路の狙った部位のみに異常を有するモデル動物を容易に作製できるようになったことは、神経科学研究に新しい展開を与えるものであり、今後の発展が大いに期待される。

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5件)

Tatsuya Sato, Yuko Muroyama, and Tetsuichiro Saito (2015) Control of gene expression in neurons by the use of in vivo electroporation and the tetracycline system. *Neuromethods* **102**,187-195 査読有
DOI:10.1007/978-1-4939-2459-2_15

Atsushi Baba, and Tetsuichiro Saito (2015) Electroporation of dissociated hippocampal neurons. *Neuromethods* **102**,169-178 査読有
DOI:10.1007/978-1-4939-2459-2_13

Tetsuichiro Saito (2015) Exo utero electroporation of the mouse embryo. *Neuromethods* **102**,21-31 査読有
DOI:10.1007/978-1-4939-2459-2_2

Tetsuichiro Saito (2015) In utero electroporation of the mouse embryo. *Neuromethods* **102**,1-20 査読有
DOI:10.1007/978-1-4939-2459-2_1

Tatsuya Sato, Yuko Muroyama, and Tetsuichiro Saito (2013) Inducible gene expression in postmitotic neurons by an *in vivo* electroporation-based tetracycline system. *J. Neurosci. Methods* **214**, 170-176 査読有
DOI:10.1016/j.jneumeth.2013.01.014

[学会発表](計9件)

Tatsuya Sato, Yuko Muroyama, and Tetsuichiro Saito: Postmitotic dorsal spinal cord neurons are transfected into commissural neurons by induced misexpression of Barh1. Society for neuroscience 2014 annual meeting (2014年11月18日, Washington, DC, U.S.A.)

室山 優子, 斎藤 哲一郎 「大脳皮質初期神経幹細胞の維持における Nepro の機能」第9回 Chiba neuroresearch meeting (2014年1月11日, 京葉銀行文化プラザ(千葉県・千葉市))

佐藤 達也, 室山 優子, 斎藤 哲一郎 「テトラサイクリン遺伝子発現誘導システムと電気穿孔法を組み合わせることにより分化した神経細胞において遺伝子発現を誘導できる」第36回日本分子生物学会年会(2013年12月3日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市))

Tatsuya Sato, Yuko Muroyama, and

Tetsuichiro Saito: Gene induction to postmitotic neurons by the use of in vivo electroporation and the tetracycline system. Neurogenesis 2013 in Matsushima (2013年10月16日, ホテル松島大観荘(宮城県・宮城郡))

斎藤 哲一郎 「新皮質神経幹細胞の初期プログラム」新学術領域 山森・門松・宮田合同シンポジウム「糖鎖・細胞動態・皮質構築」(2013年9月1日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市))

Tatsuya Sato, Yuko Muroyama, and Tetsuichiro Saito: Tightly controlled induction of gene expression is achieved in postmitotic neurons by the combination of the tetracycline system and in vivo electroporation. Neuro 2013 サテライトシンポジウム "Molecular & Cellular Mechanisms of Brain Development & Evolution" (2013年6月19日, 京都府立医科大学(京都府・京都市))

Tetsuichiro Saito: Specification of commissural neurons and formation of neural circuits. The First symposium of leading graduate school at Chiba University "Immune regulation and innovative therapeutics" (2013年6月8日, ステーションコンファレンス(東京都・千代田区))

佐藤 達也, 室山 優子, 斎藤 哲一郎 「ニューロンにおける新たな遺伝子発現誘導系の開発」第8回 Chiba neuroresearch meeting (2013年1月19日, 京葉銀行文化プラザ(千葉県・千葉市))

斎藤 哲一郎 「大脳新皮質の幹細胞の初期プログラム」包括脳夏のワークショップ(2012年7月25日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市))

[その他]

ホームページ:

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/de/v/index.html>

佐藤 達也, 斎藤 哲一郎 「エンハンサー」脳科学辞典(2015年1月)
DOI:10.14931/bsd.2781

室山 優子, 斎藤 哲一郎 「転写制御因子」脳科学辞典(2014年1月)
DOI:10.14931/bsd.4360

斎藤 哲一郎 「子宮内手術法」脳科学辞典(2013年3月)
DOI:10.14931/bsd.2141

斎藤 哲一郎「電気穿孔法」脳科学辞典
(2012年7月)
DOI : 10.14931/bsd.2138

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斎藤 哲一郎 (SAITO Tetsuichiro)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号 : 00202078

(2) 研究分担者

室山 優子 (MUROYAMA Yuko)
千葉大学・大学院医学研究院・特任講師
研究者番号 : 20422248

佐藤 達也 (SATO Tatsuya)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号 : 00568222