

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500375

研究課題名(和文) 神経回路形成における個々のニューロン識別機構

研究課題名(英文) Single-neuron discrimination in neural circuit formation

研究代表者

金子 涼輔 (Kaneko, Ryosuke)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40390695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは個々のニューロンごとに異なるプロトカドヘリン(Pcdh、細胞接着分子)が発現することを見出した。本研究は、仮説「同じPcdhを発現するニューロン同士で神経回路を作る」の検証を目的とした。具体的には、マウス小脳のバスケット細胞-プルキンエ細胞間の神経回路をモデル解析系とし、以下(i)(ii)を検討した。(i) Pcdh欠損により神経回路の配線が異常になるか？(ii)神経回路を構成するニューロン群におけるPcdh発現は同一か？解析に必要な遺伝子改変マウスを作製し解析した結果、本結果を支持する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We have discovered that each neurons express random repertoire of clustered protocadherins (Pcdh). In this study, we examined hypothesis "Neurons with the same Pcdh allow connection." The neural circuit of basket cell-to-Purkinje cell in mouse cerebellum was used as model system. Our aims are: (i)Pcdh-deficient results in neural circuit abnormality, and (ii) connected neuron pairs express the same repertoire of Pcdhs. We have obtained preliminary data supporting our hypothesis.

研究分野：神経発生・再生

キーワード：神経回路形成 小脳 局所回路 神経ネットワーク 運動学習

1. 研究開始当初の背景

国内・国外の研究動向及び位置づけ: 個々のニューロンは識別されている

ニューロンは適切なパートナーを識別して結合する。例えば、小脳皮質にある抑制性ニューロン的一种、バスケット細胞は周囲に存在する多様な細胞群(ステレイト細胞、顆粒細胞、バグマンングリア、プルキンエ細胞)の中からプルキンエ細胞のみと結合する。さらに、1つのバスケット細胞は平均8個のプルキンエ細胞のみと結合する(注: ヒト小脳には、プルキンエ細胞は約1400万個存在する)。”細胞種”の識別においては、接着分子L1CAMが関わる。一方、”個々のプルキンエ細胞”を識別する機構はほとんど解明されていない。

大脳皮質や網膜においても、個々のニューロンを識別した神経結合が観察される。したがって、個々のニューロン識別メカニズムの解明は、神経結合の制御機構を知る上で重要である。

これまでの成果: ニューロンごとに異なる Pcdh 発現パターン

個々のニューロンはどのように識別されるのだろうか?。申請者らは、この過程にも接着分子が関わりと考えた。特に、個々のニューロンごとに発現が異なる接着分子の関与を想定した。そこで、クラスター型プロトカドヘリン(Pcdh)に着目した。Pcdhは脳神経系で発現する接着分子群である。マウスでは58種類の互いに異なったPcdh遺伝子(α 、 β 、 γ)が同一染色体上にクラスターを作っている(図1a)(Kohmura et al, Neuron, 1998; Wu et al, Cell, 1999)。

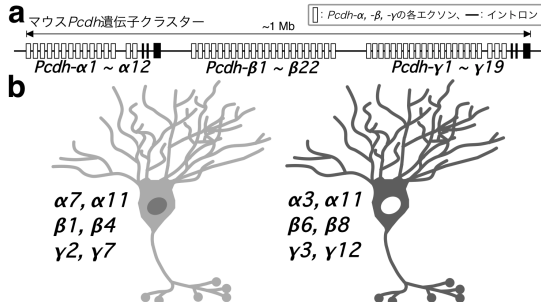


図1 プロトカドヘリン(Pcdh)は遺伝子クラスターにコードされており、個々のニューロンで異なる分子群を発現している。

申請者らは、マウス小脳の単一プルキンエ細胞を用いた single-cell RT-PCR 法を開発した(Esumi, Kaneko et al, Nature Protocols, 2006)。これを用いて、Pcdh- α および- γ の発現を調べた結果、個々のプルキンエ細胞に

おいて Pcdh- α 、- β 、- γ それぞれが細胞ごとに異なった組み合わせでランダムに発現していた(Kaneko et al, JBC, 2006, Hirano, Kaneko et al, Front Mol Neurosci, 2012) (図1b)。これら Pcdh の組み合わせは、理論上2000万以上の多様性をもたらす。さらに、大脳皮質や海馬の錐体ニューロン、背根神経節や三叉神経節のニューロンにおいても、個々のニューロンごとに異なる Pcdh が発現していた。

以上の結果は、Pcdh が個々のニューロンを識別する分子基盤となる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

最近、外国のグループが血球系培養細胞の強制発現系を用いて、同一の Pcdh 間でのホモフィリック結合を報告した。以上を踏まえ「同一の Pcdh を発現するニューロン同士が神経結合する」との仮説を立てた。本仮説を検証するためには以下の2点を明らかにする必要があります。

- (i) Pcdh 欠損により神経結合が異常になるか?
- (ii) 神経結合するニューロン間における Pcdh 発現は同一か?

本研究では、マウス小脳のバスケット細胞-プルキンエ細胞間の神経回路をモデル解析系とし、上記(i)(ii)を検討する。

研究期間内の目的

研究期間内に、仮説「同一の Pcdh を発現するニューロン同士が神経結合する」に白黒つける。そのため、以下3課題を行なう(図2)。

- a) 個々の神経回路を可視化する実験系の開発
- b) Pcdh 欠損マウスにおける個々の神経回路の形態学的解析
- c) 個々の神経回路における Pcdh の発現解析

疑問	同じPcdhを発現するニューロン同士で神経回路を作るか?	
24年度	①個々の神経回路を可視化する実験系の開発(ほぼ完了)	②Pcdh欠損マウスにおける個々の神経回路の形態学的解析
25年度以降	③個々の神経回路におけるPcdhの発現解析	
予想される成果	個々のニューロン識別メカニズムの解明 まったく新たな神経回路構築原理の確立	

図2: 本研究の全体構想

3. 研究の方法

仮説「同一の *Pcdh* を発現するニューロン同士が神経結合する」を検証するためには以下の2点を明らかにする必要がある。

- (i) *Pcdh* 欠損により神経結合が異常になるか？
- (ii) 神経結合するニューロン間における *Pcdh* 発現は同一か？

本研究では、バスケット細胞-プルキンエ細胞間の神経結合をモデル解析系とし、上記(i) (ii)を検討する。本解析系の利点は①神経結合の同定が容易、②*Pcdh* 発現解析が進んでいる、③両ニューロン共に *Pcdh* を発現している、の3点である。

(i)では、*Pcdh* 欠損によって、バスケット細胞の配線パターンが異常になると予想される。具体的には、結合パートナーの数や配置が変化すると予想している。このような解析の際には、一般的にはゴルジ染色法が使われる。しかしゴルジ法には運任せの部分があるため効率が悪い。

(ii)では、個々の神経回路を構成するニューロン群における *Pcdh* 発現を single-cell RT-PCR 法 (Nat Protocols, 2006, Neuroscience, 2011)を用いて解析する。このような解析の際には、個々の神経回路を可視化することが肝要となる。

本研究では上記2点に答えるため、個々のバスケット細胞回路を可視化できる遺伝子改変マウスを作製し、効率良く解析する。

さらに、(i)神経結合の異常による個体レベルへの影響を調べるため、*Pcdh* 欠損マウスの個体レベルでの表現型も調べる。

4. 研究成果

本研究では仮説「同一の *Pcdh* を発現するニューロン同士が神経結合する」を支持する結果を得た。課題ごとの具体的な成果を以下に述べる。

(1) 課題 a での成果

a) 個々の神経回路を可視化する実験系の開発

個々のバスケット細胞を可視化する実験系の確立に成功した。すなわち、以下の2重Tgマウスへのタモキシフェン投与により、ごくわずかのバスケット細胞で蛍光タンパク質を発現することが出来た。

[1系統目] Cre 依存的GABAニューロン特異

的な蛍光タンパク質発現マウス

Cre 活性依存的に赤色蛍光タンパク質を発現する、VGAT-stop-tdTomato マウスを作製した。組織学的解析により「GABAニューロン特異的」かつ「十分に強い蛍光」を確認した。

[2系統目]バスケット細胞でまばらに Cre 活性化するマウス

薬剤(タモキシフェン)投与量によってDNA 組換え頻度を制御できる CreER 遺伝子をバスケット細胞にて発現するマウス (Galnt14-CreER マウス)を作製した。

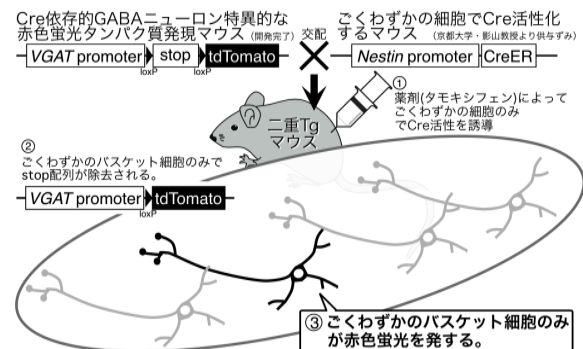


図3 個々のバスケット細胞の神経回路を可視化する方法

最適なタモキシフェン投与条件の決定

上記2系統のマウスを交配した2重Tgマウスを作製した。タモキシフェンの投与量と時期を検討した結果、胎生18.5日に2mgのタモキシフェン投与により、まばらにバスケット細胞を可視化できることを見出した(図3)。

(2) 課題 b での成果

b) *Pcdh* 欠損マウスにおける個々の神経回路の形態学的解析

問(i) *Pcdh* 欠損により神経結合が異常になるか?に答えるため、*Pcdh* 欠損マウス小脳のバスケット細胞の配線パターン解析を検討した。小脳バスケット細胞にて *Pcdh* を欠損させるため、PV-Cre と *Pcdh* flox マウスを交配し、小脳バスケット細胞にて *Pcdh* を欠損するマウス (PV-Cre:: *Pcdh*-g cKO マウス) を作製した。その結果、以下を見出した。

PV-Cre:: *Pcdh*-g cKO マウスは:

- ア) 運動失調を呈する
- イ) 小脳サイズが小さい
- ウ) 小脳分子層インターニューロン (MLI) 密度が半減している

エ) 成体マウスでは、小脳依存的学習課題の一つ、瞬目条件付け学習課題では大きな異常は無い

なお、エ)の結果はオランダ・エラスムス医療センター・Chris De Zeeuw 教授との共同研究である。

これらの結果は、マウス小脳形成において *Pcdh* が重要な役割を果たすこと、*Pcdh* は運動機能発現に重要であることを示している。興味深いことに、*Pcdh* 欠損による学習異常を補償するメカニズムの存在が示唆される。

本 PV-Cre::*Pcdh*-g cKO マウスの小脳 MLI の軸索形態を細胞内バイオサイチン注入により調べた。その結果、軸索形態の異常が示唆された。本結果は私達の作業仮説「同一の *Pcdh* を発現するニューロン同士が神経結合する」を支持する。

(3) 課題 c での成果

c) 個々の神経回路における *Pcdh* の発現解析

まず、申請者らが開発・利用してきたパッチクランプ single-cell RT-PCR 法を用いた (Nat Protocols, 2006, Neuroscience, 2011)。プルキンエ細胞にパッチクランプし、ギガシール達成後 mRNA を吸い取り、single-cell RT-PCR 法にて *Pcdh* 発現の解析を試みた (オランダ・ラドバウド大学・Nael Nadif Kasri 助教との共同研究)。しかしながら、*Pcdh* 発現を解析できなかった。この原因は、*Pcdh* 発現量が少ないためだと考えられた。そこで、高感度の逆転写酵素や PCR 酵素を用いて条件検討したものの再現性のある結果は得られなかった。

そこで、別アプローチを試みた。すなわち、蛍光タンパク質ノックインマウスの作製である。現在最も明るいと言われる蛍光タンパク質 tdTomato 遺伝子を *Pcdh* 遺伝子座にノックインした遺伝子改変マウスを作製した。その結果、見事に *Pcdh* 遺伝子発現を可視化できた。現在までの予備的検討では、本ノックインマウス小脳のバスケット細胞-プルキンエ細胞間の神経回路において tdTomato 遺伝子 (すなわち、*Pcdh* 遺伝子) の発現を見出している。本結果は私達の作業仮説「同一の *Pcdh* を発現するニューロン同士が神経結合する」を支持する。

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 10 件)

① Transgenic rat model of childhood-onset dermatitis by overexpressing telomerase reverse transcriptase (TERT).

Kaneko R, Sato A, Hamada S, Yagi T, Ohsawa I, Ohtsuki M, Kobayashi E, Hirabayashi M, Murakami T.

Transgenic Res. 2016 Feb 17. Epub ahead of print, doi:10. 1007/ s11248-016-9939-3 査読有

② Regulation of human subcutaneous adipocyte differentiation by EID1.

Vargas D, Shimokawa N, Kaneko R, Rosales W, Parra A, Castellanos Á, Koibuchi N, Lizcano F.

J Mol Endocrinol. 2016 Feb;56(2):113-22. doi: 10.1530/JME-15-0148. 査読有

③ Glutamate Decarboxylase 67 Deficiency in a Subset of GABAergic Neurons Induces Schizophrenia-Related Phenotypes.

Fujihara K, Miwa H, Kakizaki T, Kaneko R, Mikuni M, Tanahira C, Tamamaki N, Yanagawa Y.

Neuropsychopharmacology.

2015 Sep;40(10):2475-86.

doi: 10.1038/npp.2015.117 査読有

④ Genetic Mapping in Mice Reveals the Involvement of *Pcdh9* in Long-Term Social and Object Recognition and Sensorimotor Development.

Bruining H, Matsui A, Oguro-Ando A, Kahn RS, Van't Spijker HM, Akkermans G, Stiedl O, van Engeland H, Koopmans B, van Lith HA, Oppelaar H, Tieland L, Nonkes LJ, Yagi T, Kaneko R, Burbach JP, Yamamoto N, Kas MJ.

Biol Psychiatry. 2015 Oct 1;78(7):485-95. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.01.017.

査読有

⑤ Expansion of stochastic expression repertoire by tandem duplication in mouse Protocadherin- α cluster.

Kaneko R, Abe M, Hirabayashi T, Uchimura A, Sakimura K, Yanagawa Y, Yagi T.

Sci Rep. 2014 Sep 2;4:6263.

doi: 10.1038/srep06263. 査読有

⑥ Littermate influence on infant growth in mice: comparison of SJL/J and ICR as cotransferred carrier embryos.

Kaneko R, Kakinuma T, Sato S, Jinno-Oue A,

Hata H.
Exp Anim. 2014;63(4):375-81. 査読有

⑦ The vestibulo- and prepositus-cerebellar cholinergic neurons of a ChAT-tdTomato transgenic rat exhibit heterogeneous firing properties and the expression of various neurotransmitter receptors.

Zhang Y, Kaneko R, Yanagawa Y, Saito Y.
Eur J Neurosci. 2014 Apr;39(8):1294-313.
doi: 10.1111/ejn.12509. 査読有

⑧ Motor dysfunction in cerebellar Purkinje cell-specific vesicular GABA transporter knockout mice.

Kayakabe M, Kakizaki T, Kaneko R, Sasaki A, Nakazato Y, Shibasaki K, Ishizaki Y, Saito H, Suzuki N, Furuya N, Yanagawa Y.
Front Cell Neurosci. 2014 Jan 16;7:286.
doi: 10.3389/fncel.2013.00286. 査読有

⑨ Critical role of the astrocyte for functional remodeling in contralateral hemisphere of somatosensory cortex after stroke.

Takatsuru Y, Eto K, Kaneko R, Masuda H, Shimokawa N, Koibuchi N, Nabekura J.
J Neurosci. 2013 Mar 13;33(11):4683-92.
doi: 10.1523/JNEUROSCI.2657-12.2013.
査読有

⑩ Single-neuron diversity generated by Protocadherin- β cluster in mouse central and peripheral nervous systems.

Hirano K, Kaneko R, Izawa T, Kawaguchi M, Kitsukawa T, Yagi T.
Front Mol Neurosci. 2012 Aug 31;5:90.
doi: 10.3389/fnmol.2012.00090. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

①金子涼輔、阿部 学、高鶴裕介、Chris De Zeeuw、渡辺雅彦、崎村建司、柳川右千夫、八木 健

ニューロン ID の可視化 ～クラスター型プロトカドヘリンの発現解析～

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)

2015 年 12 月 1 日 (火) - 4 日 (金)

神戸ポートアイランド

②金子涼輔、阿部 学、渡辺雅彦、崎村建司、柳川右千夫、八木 健

Pcdh-bが決めるニューロン ID の可視化

第58回日本神経化学会大会

2015 年 9 月 11 日 (金) ~ 13 日 (日)
大宮ソニックシティ

③金子涼輔、高鶴裕介、柳川右千夫

抑制性ニューロン赤色標識マウス

第38回日本神経科学大会

2015 年 7 月 28 日 (火) ~ 31 日 (金)

神戸ポートアイランド

他 7 件

[その他]

ホームページ等

群馬大学大学院医学系研究科附属生物資源センター

http://doujitsu.dept.med.gunma-u.ac.jp/cms/?page_id=16

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 涼輔 (KANEKO RYOSUKE)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40390695