

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790192

研究課題名(和文) 神経突起の分岐を制御する新規因子のマウスを用いた遺伝学的解析

研究課題名(英文) Genetical analysis of a new regulator of neurite branching in mice

研究代表者

犬束 歩 (Inutsuka, Ayumu)

名古屋大学・環境医学研究所・研究員

研究者番号：30584776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：神経突起の分岐形成は神経回路の複雑性を増加し、より高度な情報処理を可能にしている。申請者は神経系に特に強く発現し神経突起の分岐を強く引き起こすような分子を探索し、プロテインキナーゼBranckを見出した。Branckの遺伝子欠損マウスにおいては、軸索突起の軽度分岐不全が見出され、in vitroで観察された分子機能が確認された。結合タンパク質については、yeast two-hybrid法にて新規分子の同定に成功し、神経系に濃縮して発現する分子を見出した。下流因子としては、Branckの存在下にその凝集が観察される細胞骨格分子が得られている。

研究成果の概要(英文)：Neurite branching is a critical determinant of nervous system function, but the intracellular molecular mechanisms which regulate neurite branching remain poorly understood. To investigate the function of kinases in the regulation of neurite branching, we undertook qPCR screening and identified a kinase (Branck) that is strongly enriched in brain. We found that elevation of Branck activity in primary hippocampal neurons increased neurite number and promoted neurite branching, while these effects were not induced by kinase-dead mutant of Branck. Consistent with these findings, neurons of Branck KO mice show reduced dendritic arborization in both the CNS and PNS. We also identified binding proteins by yeast two-hybrid system. Our findings suggest that Branck play an important role in regulating neurite branching in vivo.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：神経突起 形態形成 Ser/Thrキナーゼ 細胞骨格

### 1. 研究開始当初の背景

脳神経が正常な機能を果たすためには、神経細胞から延びる軸索および樹状突起の複雑な形態が適切に形成されることが必要不可欠である。実際に、樹状突起の形態異常には自閉症や統合失調症、ADHD(注意欠陥・多動性障害)といった精神疾患との関連性が知られている。このように重要な役割を果たしている樹状突起形態を制御する分子メカニズムに関しては、ROCK(Nakayama et al., 2000)やMAPK(Wu et al., 2001)といった幾つかのプロテインキナーゼの関与が報告されている。また、神経系に強く発現するセリン・スレオニンキナーゼであるSADキナーゼは未分化な神経突起が軸索と樹状突起とに分化する機構に深く関与している(Kishi et al., 2005)が、こうした極性形成の制御因子は細胞骨格分子の動態を制御することによって、神経突起の分岐形態に影響を与えていることが想定される。そこで、申請者は神経系に強く発現するキナーゼで神経細胞の形態形成に関与している未知の分子がある可能性を考え、その同定を目的としてセリン・スレオニンキナーゼを対象としたスクリーニングを行った。

### 2. 研究の目的

申請者らは神経系に濃縮して発現しているプロテインキナーゼ群を解析する過程で、神経突起の分岐形成を強く誘導する新規分子を見出し、Branching Kinase (BrancK) と名付けた。本申請開始までの実験により、BrancKは神経突起の分岐本数の制御に加え、突起内径を小さく保つために必要であることがマウス神経芽細胞腫 Neuro2A を用いた *in vitro* の実験系で判明していた。本研究では最近作製が完了した BrancK ノックアウトマウスの解析を通じて、その *in vivo* における神経突起の形態形成に関する必要性を証明し、さらに精神・神経疾患や行動異常との関わりを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

生体内における BrancK の機能を明らかにするため、BrancK ノックアウトマウスを対象とした解析を行った。具体的には以下の各項目に対応する実験を実行した。

#### (1) 組織内の神経突起分岐形成における BrancK の必要性

BrancK ノックアウトマウスの神経組織、特に分散培養において突起本数の減少が確認されている海馬について、神経細胞の突起形態に野生型マウスと比較して異常の有無を解析した。

#### (2) 組織内の神経連絡における BrancK の必要性

神経細胞の形態変化の結果として神経の走行パターンに変化が生じる可能性が考えら

れる。BrancK の発現量は神経系全体で高いので、脳梁や皮質視床間神経線維など中枢神経系における重要な神経連絡に関して BrancK ノックアウトマウスと野生型マウスとを比較解析した。

(3) BrancK ノックアウトマウスの行動解析  
BrancK はヒト染色体では ADHD (注意欠陥・多動性障害)との関連が報告されている遺伝子座に位置しており、線条体にも強く発現している。そこで、神経伝達の異常による運動機能の低下を検討するための一般的な解析に加え、多動性や衝動性の向上といった行動面での変化を調べた。

### 4. 研究成果

本研究では、BrancK について、その遺伝子欠損マウスの解析を中心に、結合タンパク質、上流下流因子の同定を含めた総合的な解析を行い、その作用機序と生体内での役割を明らかにした。

BrancK ノックアウトマウスにおいては、海馬 CA1 領域の錐体細胞、および腹部末梢神経の一部において軸索突起の軽度分岐不全が見出され、*in vitro* で観察された分子機能が生体内の神経発生過程においても確認した。しかし、ニューロフィラメントや L1 抗体を用いた免疫染色などによる組織レベルでの解析においては、脳梁や皮質視床間神経線維などの主要な神経連絡に大きな変化は見られなかった。また、行動解析についても、運動機能、多動性、衝動性といった要素に野生型マウスとの大きな違いはなかった。

そこで、研究期間の後半は BrancK が神経突起の形態を制御する分子メカニズムの解析に研究の重点を移した。BrancK の蛍光ライブイメージングでは細胞膜への局在が確認され、神経突起の途中で微小突起が形成される部位において濃縮する様子が観察された。これと対応するように、BrancK は神経突起の途中に形成されるフィロポディア様の微小突起の数を増減させることを見いだした。接着分子として良く知られる Laminin には同様の効果が知られているが、BrancK のドミナントネガティブ体を過剰発現させた海馬初代神経細胞ではこうした効果が抑制されていた。BrancK の結合タンパク質については、yeast two-hybrid 法にて新規分子の同定に成功し、やはり神経系にほぼ特異的に発現する分子を見出した。現在は、その遺伝子欠損マウスを導入して機能を解析中である。必ずしも同様の同じような表現系ではないが、軸索突起の異常が観察されているので、両者の掛け合わせによって表現系の増強などがおこるのかどうかを解析している。下流因子としては、BrancK の存在下にその凝集が観察されるような細胞骨格分子が得られているので、そのリン酸化や分子会合に必要な領域などを決定しつつある。

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 3 件)

Inutsuka A, Yamanaka A

The regulation of sleep and wakefulness by the hypothalamic neuropeptide orexin/hypocretin.

Nagoya Journal of Medical Science 75: 29-36, 2013.

[http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya\\_j\\_med\\_sci/7512/03\\_Yamanaka.pdf](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya_j_med_sci/7512/03_Yamanaka.pdf)

Inutsuka A, Yamanaka A

The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions.

Frontiers in Endocrinology, 2013.

doi: 10.3389

Nagaoka T, Ohashi R, Inutsuka A, Sakai S, Fujisawa N, Yokoyama M, Huang Y, Igarashi M, Kishi M

The Wnt/Planar Cell Polarity Pathway Component Vangl2 Induces Synapse Formation through Direct Control of N-Cadherin.

Cell Reports 6(5):916-927, 2014.

doi: 10.1016/j.celrep.2014.01.044.

[学会発表](計 8 件)

犬束 歩, 長岡唯宏, 上村 駿, 阿部 学, 崎村建司, 横山峯介, 五十嵐道弘, 山中章弘, 岸 将史

神経突起の分岐形態を制御する新規因子 BrancK の機能解析

2012 年包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ

2012.7.24 (仙台)

犬束 歩, 常松友美, 田中謙二, 岡部 勝, Karl Deisseroth, 山中章弘

新規 KENGE-Tet Chr2(ET/TC)マウスを用いた特定神経高頻度刺激法の開発

第 4 回光操作研究会

2012.9.28 (岡崎)

Inutsuka A, Tabuchi S, Tsunematsu T, Black SW, Kilduff S, Tominaga M, Yamanaka A

New model mice for narcolepsy using timing controlled gene expression system in transgenic mice which induces specific ablation of orexin/hypocretin neurons.

Neuroscience 2012

2012.10.17 (New Orleans, LA, U.S.A.)

犬束 歩, 常松友美, 田中謙二, 岡部 勝,

Karl Deisseroth, 山中章弘

改変型チャンネルロドプシン 2 を用いた特定神経高頻度刺激法の開発

第 59 回中部日本生理学会

2012.11.15 (岡崎)

犬束 歩, 乾 あずさ, 常松友美, 富田江一, 平林真澄, Michael Lazarus, 今吉 格, 景山龍一郎, 山中章弘

新規 orexin-Cre マウス, ラットの作成

Neuro 2013

2013.6.20 (京都)

犬束 歩, Michael Lazarus, 富田江一, 平林真澄, 今吉 格, 影山龍一郎, 山中章弘

オレキシン神経による摂食行動・代謝の統合的機能調節

第 60 回中部日本生理学会

2013.10.25 (岐阜)

犬束 歩

薬理遺伝学的手法を用いた摂食行動・代謝調節メカニズムの解明

名古屋大学環境医学研究所・群馬大学生体調節研究所 第 10 回合同シンポジウム

2013.11.22 (渋川)

犬束 歩

The integrative role of orexin neurons in feeding and metabolism revealed by pharmacogenetic activation and selective ablation.

第 6 回 NAGOYA グローバルリトリート

2014.2. (大府)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

## ホームページ等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

犬束 歩 ( INUTSUKA, Ayumu )  
名古屋大学・環境医学研究所・研究員  
研究者番号：30584776

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

岸 将史 ( KISHI, Masashi )  
新潟大学・医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号：60573938