

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430042

研究課題名(和文) CRMP4タンパク質の機能解析—視床下部と嗅球を中心として—

研究課題名(英文) Functional analysis of CRMP4 in the developing olfactory bulb and hypothalamus

## 研究代表者

金子 律子(大谷律子)(Ohtani-Kaneko, Ritsuko)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：00161183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：CRMP4は、マウス視床下部に存在する性的二型核(anteroventral periventricular nucleus)で性差形成タンパク質候補の1つとして、プロテオミクス解析により我々が同定したタンパク質である(Iwakura et al., 2013)。CRMP4は基本的知見が殆どなかった。本研究では、CRMP4がニューロンの形態形成や脳の層構造形成に関わっていることや、神経の興奮・抑制バランス形成のための神経回路の発達に関与していることを、嗅球を中心とした解析から明らかにした。更に嗅覚識別能力の発達などの脳の高次機能発現にも関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Our previous study revealed that CRMP4 is one of candidate proteins involving in the sexual differentiation of sexually dimorphic nucleus (AVPV) (Iwakura et al., 2013). In this study, morphological analysis of the olfactory bulb (OB) in Crmp4-KO mice showed a new role for CRMP4 in the regulation of dendritic elongation and the determination of certain layer thickness. Furthermore, focusing on the olfaction process, we found impaired olfactory ability in Crmp4-KO pups. In addition, the study on c-Fos expression demonstrated hyperactivity in the OB of Crmp4-KO pups compared with WT when both pups were exposed to one odorant. Since the mRNA and protein expression levels of GluR1 and GluR2 were exaggerated in Crmp4-KO pups, it is implied that enhanced expression of these excitatory receptors contributes to the hyperactivity of neurons in the OB and the impaired olfactory ability. The results of this study provide much suggestive information on the function of CRMP4.

研究分野：神経発生学

キーワード：CRMP4 ノックアウトマウス 神経回路 嗅球

## 様式 C-19, F-19, Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳には神経細胞（ニューロン）が作る神経回路が存在する。脳が正常に機能するためには、発生時期に脳内で神経回路が正常に形成されなくてはならない。そのためにニューロンは決まった時期に神経幹細胞から誕生し、正しい場所へ移動するとともに、正しく軸索を伸ばし、正しい相手とシナプスを形成し、神経回路を作っていくなくてはならない。ニューロンが軸索を伸ばす際、その進行方向を制御する因子の1つとしてセマフォリン3A（Sema3A）が知られている。Sema3Aは軸索先端の成長円錐を崩壊（collapse）させ軸索の伸長を抑制する「反発性軸索ガイダンス分子」と呼ばれるものの1つである。本研究の研究分担者である五嶋たちは、Sema3Aの細胞内シグナル伝達を媒介する因子の1つとして、1995年に collapsin response mediator protein 2（CRMP2）を発見した。それ以後、これまでに5種類のCRMP（CRMP1-4）が同定されている。これらのうち、CRMP4に関しては研究があまり進んでおらず、我々が脳内での発現部位や発現時期を明らかにした（Tsuboi & Ohtani-Kaneko, 2012）。この研究により、神経回路が発達する時期に、脳部位ごとに異なるタイミングでCRMP4 mRNAの発現が高まることが明らかとなった。また、性差のある神経核として知られている視床下部の前腹側脳室周囲核（AVPV）では、性差形成時期にCRMP4のmRNAおよびタンパク質の発現に一過性の性差が現れることをプロテオミクス解析により我々は明らかにしたが、CRMP4がAVPVにどのような影響をもたらすかは不明であった。そこで、嗅球の神経回路形成に果たすCRMP4の役割および視床下部性的二型核AVPVに対するCRMP4の役割について、主にノックアウトマウスを用いて解析した。

### 2. 研究の目的

我々の研究によりCRMP4 mRNAの発現の生後変化が顕著であった嗅球と発現に性差のあった視床下部に注目し、神経回路形成に関わるCRMP4の機能を明らかにすることを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

CRMP4の神経回路形成に及ぼす役割を明らかにするため、五嶋らが作製したCRMP4欠損動物（CRMP4-KOマウス）を使用した。そして、野生型とCRMP4-KOマウスの脳を形態的および生理学的に比較し、CRMP4-KOマウスではど

のような異常が見られるかについて、まず明らかにした。

次に、それらの現象のメカニズムを明らかにするために、単一匂い刺激による嗅球でのニューロンの興奮を調べることや、神経伝達物質のmRNA発現等を調べること、あるいは培養細胞を用いてCRMP4の欠損実験や強制発現実験などを実施した。以下に使用動物や実験内容を順に示す。

**使用動物:**野生型マウス(C57BL)およびCRMP4欠損マウス(CRMP4-KO mice (Accession no. CDB0637K: <http://www.cdb.riken.jp/arg/mutant%20mice%20list.html>))(Nisato et al., 2012)を実験には用いた。

#### (3-1) 形態学的研究

**嗅球の大きさの比較:**CRMP4-KOマウスでは、野生型と比較して嗅球の大きさに変化があるか、嗅球のサイズを測定した。  
**嗅球の層構造の比較:**CRMP4-KOマウスでは、嗅球の層の並びや層の厚さに異常があるか、層構造の観察と嗅球の各層の厚さを測定することにより調べた。

**アポトーシス細胞頻度の比較:**CRMP4-KOマウスの層の厚さの異常の原因を探るため、細胞死を起こしている細胞をアポトーシス検出キットを用いて切片上で調べた。

**僧帽細胞先端樹状突起長の比較:**CRMP4-KOマウスの層の厚さの異常が、僧帽細胞の先端樹状突起の伸長異常による可能性を調べるため、僧帽細胞の先端樹状突起をDiIで逆行性に標識し、先端樹状突起長をCRMP4-KOマウスおよび野生型マウスで計測した。

CRMP4-KOマウスおよび野生型由来の初代培養細胞およびCRMP4-KOマウス由来の培養細胞へのCRMP4強制発現実験:CRMP4が樹状突起伸長に影響するか確かめるために、CRMP4-KOマウスおよび野生型マウスから抽出した嗅球の細胞の初代培養を行い、突起長を比較した。さらに、CRMP4-KOマウス嗅球から作製した初代培養細胞にCRMP4を強制発現させ、突起長を計測した。なお実験では、MAP2に対する抗体を用いた免疫染色を行い、MAP2陽性突起（樹状突起と考えられる突起）の計測を行った。これらの培養細胞群間で樹状突起長を比較することにより、CRMP4が樹状突起伸長に対して調節機能を持つか調べた。

**THニューロン数の比較:**抗TH抗体を

用いて、TH ニューロンの数を計測し、野生型マウスと CRMP4-KO マウス間で比較した。

### (3 - 2) 生理学的研究

- (1) 匂い識別能力の検査：生後 0 日から 7 日に CRMP4 mRNA はマウス嗅球で強く発現していた。この時期の仔マウスは、運動能力が十分発達していなため、匂いの識別能力を忌避行動などで調べることはできない。一方、この時期の仔マウスは超音波発声 (UVs) によって母親マウスとコミュニケーションをとっていることが知られており、単離刺激、触覚刺激、冷温刺激、匂い刺激を受けた際、UVs を発生すると報告が出されていた。そこで UVs を用いて、匂い刺激に対する CRMP4-KO マウスと野生型マウスの反応を比較することにした。まず、単離刺激、触覚刺激、冷温刺激 (14 度) に対する UVs 発生数を野生型と CRMP4-KO 仔マウスとで比較した。次に、匂い識別能力を調べる物質とし、自分のホームの床敷と新しい床敷を用い、それぞれでの UVs 発生数を同じく野生型と CRMP4-KO 仔マウス間で比較した。
- (2) 単一匂い刺激により誘発される嗅球内で興奮したニューロン数と部位の比較：酢酸エチルを単一匂い物質として野生型と CRMP4-KO 仔マウスに暴露した。その後、動物を灌流固定し、切片を作製後、c-Fos に対する抗体を用いて、興奮したニューロンの位置と数を嗅球前長および全層について計測した。
- (3) 興奮性および抑制性神経伝達物質の合成酵素や受容体の mRNA 発現比較：嗅球に存在するニューロンの興奮性に違いが見られたことから、その原因を探るため、野生型と CRMP4-KO マウスの嗅球から RNA を抽出し、興奮性や抑制性の神経伝達物質の合成酵素や受容体の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で比較した。

## 4. 研究成果

### (4 - 1) 形態学的研究により明らかになったこと (以下の番号は、方法の番号に対応している。)

嗅球の大きさ比較：CRMP4-KO と野生型仔マウス間に、嗅球の大きさは差が無かった。

嗅球の層構造比較：CRMP4-KO と野生型仔マウスの嗅球各層の厚さを切片上で比較したところ、生後 0 日では CRMP4-KO 仔マウス嗅球の僧帽細胞層が、野生型仔マウスに比べて薄いことが分かった。逆

に、僧帽細胞の先端樹状突起で主に構成される外叢状層は、野生型よりも Crmp4-KO 仔マウスの方が有意に厚いことが明らかになった。

アポトーシス細胞頻度比較：野生型および CRMP4-KO 仔マウス嗅球では、どちらも生後 0 日に目立ったアポトーシス細胞は検出されなかった。このことから、CRMP4-KO 仔マウス嗅球で僧帽細胞層が薄いのは、アポトーシスが起きているためではないことが分かった。

僧帽細胞先端樹状突起長の比較：逆行性蛍光色素である Dil による標識から、僧帽細胞の先端樹状突起が Crmp4-KO 仔マウスでは WT マウスより伸長していることが見出された。

初代培養細胞に対する CRMP4 ノックダウンおよび強制発現実験：CRMP4-KO 新生児マウスから摘出した嗅球を用いて初代培養を行った。その結果、CRMP4 の欠損マウスからの細胞では、野生型の細胞に比べて樹状突起が長くなることが分かった。さらに、初代培養細胞に CRMP4 を強制発現したところ、樹状突起の伸長が抑えられることを発見した。これらから、CRMP4 が樹上突起伸長を抑制的に制御することを初めて明らかにした。さらに、CRMP4-KO マウスで見られた層構造の異常 (僧帽細胞層が薄く、外叢状層が厚い) は、僧帽細胞の先端樹状突起の伸長がノックアウトマウスでは促進されたためではないか、という可能性が示された。

嗅球内および AVPV 内の TH 陽性細胞数を数えたところ、AVPV では TH 陽性細胞の性差が CRMP4-KO マウスでは拡大していた。また嗅球でも同様の傾向が見られた。

以上から、CRMP4 には樹状突起伸長を抑える機能があること、および CRMP4-KO ではその機能の欠損により僧帽細胞の先端樹状突起が伸長し、それにより層の厚さに異常がもたらされた可能性が示唆された。また嗅球および視床下部での TH ニューロン数の計測から、CRMP4 が TH ニューロンの生存率に関わる機能を持つ可能性と、その機能に性ステロイドホルモンが影響する可能性が示唆された。

### (4 - 2) 生理学的研究により明らかになったこと (以下の番号は、方法の番号に対応している。)

- (1) 仔マウスの匂い識別能力は、仔マウスが発声する超音波を指標に調べた。単離刺激、触覚刺激、温度変化に対する超音波発声回数を比較し、野生型仔マウスと

CRMP4-KO 仔マウスの超音波発声能力には差が無いことを確認した上で、2つの床敷の匂い識別を比べたところ、野生型に比べ CRMP4-KO 仔マウスでの匂い識別能力の低下が明らかとなった。

- (2) CRMP4-KO 仔マウスの匂い識別能力低下原因を明らかにするために、単一匂い刺激 (EA) 後の興奮ニューロン (c-Fos 陽性ニューロン) の分布を嗅球内で調べた。匂い刺激の無い状態では、野生型と CRMP4-KO 仔マウスとも、興奮ニューロンは極めて少数であった。単一匂い刺激後には、野生型では匂い地図に一致した限局した位置に興奮ニューロンが出現したのに対して、CRMP4-KO 仔マウスでは、嗅球の吻側から尾側にかけて広範囲に亘り興奮ニューロンが広く出現した。これらの結果から CRMP4-KO 仔マウスでは、単一匂い刺激により正常な匂い地図に則った興奮ニューロンの局在が起きず、広範囲に亘る興奮過多状態が起こることが示された。
- (3) 神経の興奮・抑制に関わる様々な神経伝達物質の受容体や合成酵素の発現レベルを野生型および CRMP4-KO 仔マウス嗅球で比較した。その結果、CRMP4-KO では、神経の興奮に重要であるグルタミン酸受容体 1 (GluR1) および GluR2 の mRNA 発現およびタンパク質発現のレベルが野生型より有意に高かった。一方、興奮の抑制に重要である GABA 受容体や GABA トランスポーター等の発現レベルには、両マウス嗅球間で有意な差は認められなかった。

以上の結果から、CRMP4-KO 仔マウスでは、グルタミン酸受容体の発現レベルが亢進することにより、匂い刺激により興奮するニューロンが広範囲に出現し、匂い地図が嗅球内に正確に形成できず、匂い識別の低下が引き起こされた可能性が提起された。

これら形態学および生理学的所見により、CRMP4 の神経回路形成への関与を示すことができた。最近、CRMP4 の点変異を持つ自閉症の患者が見つかり、CRMP4 が正常な神経回路形成に必要であることが裏付けられた。現時点では、CRMP4 の機能の分子機構は明らかではないので、今後更に調べる必要がある。

#### 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)(すべて査読有)

Tsutiya A, Watanabe H, Nakano Y, Nishihara M, Goshima Y, Ohtani-Kaneko R.

Deletion of collapsin response mediator protein 4 results in abnormal layer thickness and elongation of mitral cell apical dendrites in the neonatal olfactory bulb. *J Anat.* 2016 May;228(5):792-804. doi: 10.1111/joa.12434. Epub 2016 Jan 6.

Tsutiya A, Nishihara M, Goshima Y, Ohtani-Kaneko R. Mouse pups lacking collapsin response mediator protein 4 manifest impaired olfactory function and hyperactivity in the olfactory bulb.

*Eur J Neurosci.* 2015 42(6):2335-45. doi: 10.1111/ejn.12999.

③ Iwakura T, Sakoh M, Tsutiya A, Yamashita N, Ohtani A, Tsuda MC, Ogawa S, Tsukahara S, Nishihara M, Shiga T, Goshima Y, Kato T, Ohtani-Kaneko R. Collapsin response mediator protein 4 affects the number of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the sexually dimorphic nucleus in female mice. *Dev Neurobiol.* 2013 73(7):502-17. doi: 10.1002/dneu.22076

〔学会発表〕(計 8 件)

Takanori Kawachi, Atsuhiko Tsutiya, Hiromi Motegi, Takahiro Okada, Ritsuko Ohtani-Kaneko. Age-related Changes of Collapsin Response Mediator Protein 4 第 40 回日本比較内分泌学会・第 37 回日本比較生理生化学会 合同大会 (CompBiol 2015 広島大会), 2015 年 12 月 11 日~13 日 (広島県広島市, JMS アステールプラザ)

Tsutiya A, Watanabe H, Nishihara M, Goshima Y, Ohtani-Kaneko R. Collapsin response mediator protein 4 (CRMP4) knockout mice showed physiological alterations related to olfactory function.

Society for Neuroscience 2015 年 10 月 17 日~21 日 (Chicago, USA)

③ Takanori Kawachi, Atsuhiko Tsutiya, Hiromi Motegi, Takahiro Okada, Ritsuko Ohtani-Kaneko. Age-related changes of Collapsin Response Mediator Protein 4 (CRMP4). Society for Neuroscience 2015 年 10 月 17 日~21 日 (Chicago, USA)

Tsutiya A, Nishihara M, Goshima Y, Ohtani-Kaneko R. Deletion of Crmp4 results in altered morphology and physiology in the olfactory bulb.

第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2015 年 3 月 21 日～3 月 23 日 (兵庫県、神戸市、神戸国際会議場)

Tsutiya A, Watanabe H, Nishihara M, Goshima Y, Ohtani-Kaneko R. CRMP4 contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits. Society for Neuroscience 2014 年 11 月 15 日～19 日 (Washington D.C., USA)

川内貴雄, 渡辺ひかる, 土屋貴大, 大谷金子律子. マウス脳の成長および発達に伴う CRMP4 の発現変化について. 日本動物学会 第 85 回仙台大会 (2014 年 9 月 11 日～13 日 (宮城県、仙台市、東北大学川内北キャンパス))

土屋貴大, 大谷金子律子. マウス脳での Crmp4 mRNA 発現の生後変化. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014 年 3 月 27 日～29 日 (栃木県、下野市、自治医大学キャンパス)

Tsutiya A, Watanabe H, Nishihara M, Goshima Y, Ohtani-Kaneko R. Influence of CRMP4 in the olfaction and olfactory bulb development. Society for Neuroscience 2013 年 11 月 9 日～19 日 (San Diego, USA)

〔図書〕(計 0 件)

本研究に関わる図書は無い。

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

本研究に関わる出願は無い。

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)

本研究に関わる取得は無い。

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

<http://ris.toyo.ac.jp/profile/ja.VWH1y7KAzpugV0Dz1JiH3w==.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 律子 (大谷 律子) (Ritsuko Ohtani-Kaneko), 東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：00161183

(2) 研究分担者

1) 五嶋 良郎 (Yoshio Goshima), 横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：00153750

2) 西原 真杉 (Masugi Nishihara), 東京大学・農学生命科学研究科 (農学部)・教授

研究者番号：90145673