

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430073

研究課題名(和文)小脳系神経回路の構造的的特異性を決定する転写制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms establishing the circuit connectivity in the cerebellar afferent fibers

研究代表者

桑子 賢一郎 (KUWAKO, KEN-ICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：30468475

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)：小脳入力神経回路群の一つを構成する橋核神経細胞とその標的である小脳顆粒細胞との間の特異的シナプス結合を担う分子を探索し、細胞接着因子cadherin-7(Cdh7)を同定した。Cdh7は標的認識と軸索伸展終了の両方の機構を制御することで、これらの神経細胞間の特異的なシナプス接続を確立する重要な役割を持つことが明らかとなった。また、小脳入力神経回路群では複数のcadherin分子が回路特異的に発現しており、これらの分子の発現のON/OFFが回路の接続特異性を決定する重要な要因であることがわかった。さらに、発現解析などによってこれらのcadherin分子の上流発現制御因子の候補を複数同定した。

研究成果の概要(英文)：We identified cadherin-7 (Cdh7) as a critical regulator of synaptic specificity in the cerebellar mossy fiber circuit between pontine nucleus neurons and cerebellar granule neurons. Cdh7 plays a dual role in target recognition and axonal growth termination to establish the specific synaptic connections in the cerebellar mossy fiber circuit. Several cadherin family members including Cdh7 are expressed in the cerebellar afferent fiber circuits (i.e. mossy fiber and climbing fiber) in a circuit-specific manner and the precise control of their expression is essential to the circuit connectivity. Through combinatorial analysis, some potential candidate regulators for the expression of those cadherins were identified.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：神経回路 シナプス結合 軸索伸展 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

脳神経系の精巧な回路網は、知覚・運動・思考などのすべての神経活動を生み出す最も重要な構造的基盤である。多様な神経細胞は発生プログラムに基づいて特定の標的細胞と接続して固有の神経回路を構築するが、この神経回路の“構造的特異性”は各回路の機能を規定する最も重要な要素の一つとなる。このような特異的な回路接続の大枠は主に「標的領域への軸索誘導」と「標的領域内での特定細胞との特異的シナプス結合」という二段階のステップによって確立される。これまでの研究により、軸索誘導機構で働く軸索誘導因子やその受容体などの“実行因子”が多数同定され、それらの働く場所とタイミングを制御する上流の遺伝子発現プログラムも徐々に明らかになってきた。一方で、シナプス結合の特異性を担う実行因子は未だに多くの神経回路で不明のまま、さらに、それらの回路特異的な発現パターンを規定する遺伝子発現プログラムについては全く明らかにされていない。

本研究のモデルシステムである小脳入力神経回路を構成する小脳前核神経細胞群は、後脳で複数の神経核を形成し、軸索を小脳へ投射して小脳神経細胞とシナプスを形成する。これらの神経回路は、脳神経系の様々な領域からの信号を小脳へと伝える求心性線維として運動機能の制御などで必須の役割を担っている。小脳前核神経細胞群は、苔状線維を構成する橋核神経細胞・外側網様核神経細胞・外楔状束核神経細胞、また登上線維を構成する下オリーブ核神経細胞などからなり、小脳皮質内において苔状線維神経細胞群は主に小脳顆粒神経細胞と、登上線維神経細胞はブルキンエ細胞とそれぞれ特異的にシナプスを形成する。これらの苔状線維神経細胞群と登上線維神経細胞は、その回路形成過程の細胞移動や軸索投射などの分子機構に共通性があるが、最後のシナプス結合のス

テップには特異性があるという特徴を持っている。しかし、これらの神経細胞の特異的シナプス結合を担う分子機構は明らかにされていない。

2. 研究の目的

小脳入力神経回路を構成する小脳前核神経細胞群をモデルシステムとして、その特異的シナプス結合を担う実行因子を同定してその分子作用機序を明らかにし、さらにそれらの実行因子の発現を制御する上流遺伝子発現プログラムの解明を目指す。

3. 研究の方法

橋核神経細胞と下オリーブ核神経細胞は、発生期の回路形成過程に共通性があるが、同じ時期に同じ領域で異なる標的細胞と特異的にシナプス結合することから、シナプス形成期にどちらか一方の神経細胞で特異的に発現するシナプス膜分子が、これらの神経細胞の特異的シナプス結合を担う実行因子である可能性が高いと考え、以下の解析を進めた。

(1) レーザーマイクロダイセクション法によってシナプス形成期の橋核と下オリーブ核から RNA を採集し、DNA マイクロアレイ解析を行って、それぞれの神経細胞で特異的に発現しているシナプス接着因子や発現制御因子などを抽出した。

(2) 上記(1)の橋核神経細胞で特異的に発現しているシナプス接着因子に関して、子宮内電気穿孔法と shRNA による発現抑制を組み合わせて橋核神経細胞の小脳内軸索投射を指標とした *in vivo* 機能的スクリーニングを行い、橋核神経細胞の特異的シナプス結合に関わる候補実行因子 Cadherin-7(Cdh7)を同定した。

(3) Cdh7 の発現・細胞内局在を免疫組織化学的手法や生化学的手法などにより検証し

た。

(4) 橋核神経細胞などの初代神経細胞培養系を用いて発現変動実験を中心とした解析を行い、シナプス形成や軸索伸展における Cdh7 の機能を検討した。

(5) 上記(2) で用いた *in vivo* 解析系と組織学的解析により、生体内で橋核神経細胞の回路接続における Cdh7 の役割について検討した。

(6) 上記(1) で同定した下オリブ核神経細胞で特異的に発現する cadherin ファミリー分子を子宮内電気穿孔法によって橋核神経細胞に異所的に発現させ、その回路接続を組織学的に解析した。

(7) 上記(1) の DNA マイクロアレイ解析で抽出した橋核神経細胞あるいは下オリブ核神経細胞に特異的な発現制御因子に関して、組織学的・生化学的発現解析による検証を行った。

(8) 橋核神経細胞・下オリブ核神経細胞において cadherin 分子の回路特異的な発現を制御する因子を明らかにするために種々の生化学実験を行った。

4. 研究成果

上述の DNA マイクロアレイ解析および *in vivo* 機能的スクリーニングによって、橋核神経細胞の特異的なシナプス結合を担う候補実行因子として Cdh7 を同定した。種々の発現解析による検証の結果、Cdh7 はシナプス形成期において、橋核神経細胞を含む苔状線維神経細胞群で発現し、登上線維を構成する下オリブ核神経細胞では発現していないことが明らかになった。また、Cdh7 が属する classic cadherin 分子は同種親和性結合を基本結合様式とすることから、橋核神経細胞の軸索投射組織である小脳での発現を調べたところ、その標的である小脳顆粒神経細胞の樹状突起表面に発現していることが明らかになった。また、Cdh7 は、橋核神経細胞の標

的ではないプルキンエ細胞でも発現が認められたが、プルキンエ細胞ではゴルジ体に局限して細胞表面には存在しないことがわかった。

そして、初代神経細胞培養系での解析の結果、Cdh7 は、橋核神経細胞と小脳顆粒神経細胞との間のシナプス結合を特異的に促進し、さらに橋核神経細胞の軸索で前シナプス分化を誘導する作用を持つことが明らかになった。一方、最終標的細胞である成熟小脳顆粒神経細胞で発現する Cdh7 が橋核神経細胞の軸索伸展を抑制することも明らかになった。そこで、生体内で橋核神経細胞の回路接続における Cdh7 の重要性を検討するために、橋核神経細胞で Cdh7 の発現抑制を行ったところ、Cdh7 の発現が抑制された橋核神経細胞の軸索は標的選択性を失って本来の標的ではないプルキンエ細胞とも多数接続してしまうことが明らかになった。また、Cdh7 の発現が抑制された橋核神経細胞の軸索終末では、小脳顆粒神経細胞とシナプスを形成する際にみられる膨隆した特殊構造の形成に異常が認められ、Cdh7 の発現がなくなることで本来の標的である小脳顆粒細胞とのシナプス形成にも異常が起こっている可能性が示唆された。一方、DNA マイクロアレイ解析で同定した下オリブ核神経細胞で特異的に発現する classic cadherin 分子を異所的に橋核神経細胞に発現させると、橋核神経細胞の軸索がプルキンエ細胞とも多数接続してしまうことも明らかになり、小脳入力神経回路における cadherin 分子の回路特異的な ON/OFF 発現制御がこれらの回路の接続特異性を確立する上で非常に重要であることが示された。

また、DNA マイクロアレイ解析によって抽出したシナプス形成期の橋核神経細胞または下オリブ核神経細胞で特異的に発現する発現制御因子群について組織学的・生化学的発現解析を行って、それらの後脳・小脳に

おける時空間的な発現パターンを検証し、実際に各神経細胞で特異的に発現する発現制御因子を絞り込んだ。現在、生化学的解析法によりこれらの中で橋核神経細胞あるいは下オリブ核神経細胞で cadherin 分子の発現を制御する因子の同定を進めている。

<まとめ>

細胞接着因子 Cadherin-7 は、橋核神経細胞とその標的である小脳顆粒神経細胞で発現し、「標的認識」および「軸索伸展終了」の両方の機構を制御することで、これらの神経細胞間の特異的なシナプス接続を確立する重要な役割を持つことが明らかとなった。このことから、一つの膜蛋白質が軸索を“止める”、“つなぐ”という二つの機能を担うことでスムーズかつ正確な回路接続を可能にする新たなメカニズムが存在することが示された。また、2種類の小脳入力神経回路である苔状線維と登上線維では、複数の classic cadherin 分子が回路特異的に発現しており、これらの分子の厳密な発現制御が回路の接続特異性を確立する上で重要であることが明らかとなった。また、これらの cadherin 分子と同じく回路特異的に発現し、cadherin の発現を制御する候補上流制御因子群を絞り込み、機能解析を進めた。

<今後の展望>

今後、小脳入力神経回路における cadherin 分子群の発現を制御する上流因子・シグナルを解明していくことで、複雑な脳神経回路網において混線することなく正しいシナプス接続を構築するための「設計図」ともいえる遺伝子発現プログラムの一端が初めて明らかになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

(1) Kuwako K *, Nishimoto Y, Kawase S, Okano HJ, Okano H * (*Corresponding author)“ Cadherin-7 regulates mossy fiber

connectivity in the cerebellum.”

Cell Reports 9, 311-323 (2014)

doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.063. 査読あり

(2) Kawase S, Kuwako K, Imai T, Renault-Mihara F, Yaguchi K, Itohara S, Okano H

“ Rfx transcription factors control Musashi1 transcription in mouse neural stem/progenitor cells.”

Stem Cells and Development 23, 2250-2261 (2014)

doi: 10.1089/scd.2014.0219. 査読あり

(3) 桑子賢一郎

“ 小脳系神経回路における特異的シナプス結合の分子機構 ”

かなえ医薬振興財団2012年度研究業績集(第41集), 34 (2014) 査読なし

(4) Nishimoto Y, Nakagawa S, Hirose T, Okano HJ, Takao M, Shibata S, Suyama S, Kuwako K, Imai T, Murayama S, Suzuki N, Okano H

“ The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis.”

Molecular Brain 6, 31 (2013)

doi: 10.1186/1756-6606-6-31. 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

(1) 桑子賢一郎

「Cadherin 蛋白質による特異的回路接続」

第121回日本解剖学会 [シンポジウム]
21世紀の発生神経科学を解剖する：今後の回路発達研究の新展開をめざして

2016年3月28日 ビッグパレットふくしま
(福島県・郡山市)

(2) Ken-ichiro Kuwako, Hideyuki Okano

「 Mechanism for regulating the connectivity of cerebellar afferent fibers」

第9回神経発生討論会 2016年3月19日 東京医科歯科大学(東京都・文京区)

(3) 桑子賢一郎、岡野栄之

『 Cadherin-7 regulates the circuit connectivity of the cerebellar mossy fiber 』
第37回日本神経科学会 2014年9月12日
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(4) 桑子賢一郎、岡野栄之

『小脳辺縁系神経回路のシナプス接続を制御する分子機構の解析』
第36回日本神経科学会 2013年6月21日
国立京都国際会館(京都府・京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

アウトリーチ活動

平成26年度県立高校改革リーディングプロジェクト推進事業「グローバルリーダー養成事業」職業・学問体験プログラム「研究者へのキャリアパス」講演

(1) 「研究者の仕事」 桑子賢一郎

2015年3月25日 岐阜県立岐阜高等学校

(2) 「最新の脳科学研究 ～神経回路研究～」

桑子賢一郎 2015年3月26日 岐阜県立岐阜高等学校

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・特任講師

研究者番号：30468475

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし