

## 神経回路網の多様性を生み出す発生分化プログラムの分子基盤

### Identification of Molecular Programs That Generate Neuronal Circuit Diversity

白崎 竜一 (SHIRASAKI RYUICHI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授



#### 研究の概要

記憶や学習などの脳の高次機能発現を規定する細胞生物学的基盤は、その生物がいかに多様な神経回路網を構築しているかによる。本研究では、個々の神経細胞の運命決定を担う転写調節因子により発現制御を受ける軸索ガイダンスプログラムとその初期プログラムの修飾改変の制御機構を明らかにすることで、神経回路網の多様性が生み出される分子機構の理解に迫る。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経発生・分化・異常、軸索ガイダンス、運命決定、転写調節因子

#### 1. 研究開始当初の背景

個々の神経細胞は発生期に、その固有の遺伝プログラムが付与され運命（個性）が決定されると、その固有の分子プログラムに基づき自分の最終標的への特異的な軸索伸長及び標的認識を行うようになり、その結果として神経細胞の個性を反映した多様な神経回路網が形成される。この分子プログラムに関しては、個々の神経細胞のサブクラス（サブタイプ）に特異的に発現するようになる転写調節因子によって発現制御を受けている軸索ガイダンスプログラムが中心的な役割を担っていると考えられている。一方で、初期軸索ガイダンスプログラムは個体の発達とともに修飾改変（再編成）を受け、異なる階層で回路網に多様性を与えている。しかしながら、回路網の多様性形成において中核を担う軸索ガイダンスプログラムの実体に関しては、その多くが未だ不明である。

#### 2. 研究の目的

本研究課題では、発生期の軸索ガイダンスの研究において先導的な役割を担っている交連ニューロンの発生分化プログラムに焦点をあて、以下の目的の達成を目指すことで神経回路網の多様性が生み出される分子機構の解明に迫る。①交連ニューロンのサブクラスの運命決定を担う転写調節因子とその下流で発現制御を受けている軸索ガイダン

スプログラムを同定する。②交連ニューロン軸索の中間標的である正中部フロアプレート交差前後で引き起こされている初期軸索ガイダンスプログラムの修飾改変の制御機構を分子レベルで明らかにする。

#### 3. 研究の方法

目的①においては、交連ニューロンのサブクラス特異的な発現を示すことが明らかとなった転写調節因子に対して、マウス胎仔への *in vivo* 電気穿孔法と我々が独自に確立した交連ニューロン特異的に遺伝子発現を制御できる実験システムを導入することにより、*in vivo* で gain-of-function ならびに loss-of-function の実験を行い、交連ニューロンの軸索伸長パターンの表現型を解析し、交連ニューロンのサブクラス特異的な軸索ガイダンスのどの局面にこれらの転写調節因子が関与するのかを明らかにする。さらに、上記の *in vivo* 電気穿孔法の実験システムと DNA マイクロアレイを組み合わせることで、候補転写調節因子の制御下にある軸索ガイダンス関連分子の網羅的な発現解析を行い、交連ニューロンのサブクラス特異的な転写調節因子で制御されている軸索ガイダンス関連分子を探索する。これらの解析から見出されたガイダンス分子レセプターなどの軸索ガイダンス関連分子に対して、上記と同様に *in vivo* における機能アッセイを行う。

目的②においては、交連ニューロンの正中

交差前後の軸索膜上でのガイダンス分子レセプターの選択的な局在発現制御に、エピジェネティックな転写調節、mRNAの転写後調節、タンパク質修飾による翻訳後調節のどの局面が関与しているのかを明らかにする。また、正中交差前後で発現が変化している軸索ガイダンス関連分子を探索し、その分子が正中交差前後の軸索ガイダンスプログラムの再編成に関与しているかどうかを検討する。

#### 4. これまでの成果

① 交連ニューロンの発生分化に関わる遺伝子の機能を迅速かつ効果的に評価できる *in vivo* の実験系を構築するために、特定の交連ニューロンだけを *in vivo* で特異的に可視化し、着目した交連ニューロンにおいて機能獲得ならびに機能阻害の実験操作を可能とさせる実験システムを確立させた。

② 中脳の交連ニューロンのサブクラスの運命決定因子として、ホメオボックス型転写調節因子の *Dbx1* を同定することに成功した。また、この転写調節因子から始まる転写カスケードを明らかにし、その下流に位置する最終的な軸索ガイダンスプログラムの中核分子として *Robo3* を同定した。

③ 小脳において bHLH 型転写調節因子 *Atoh1* 陽性神経前駆細胞から生み出される交連ニューロンのサブクラスに特異的な軸索ガイダンスプログラムの発現制御に関わる転写調節因子として LIM ホメオボックス型転写調節因子の *Lmx1a* を同定した。

④ 交連ニューロンの特定のサブクラスを *in vivo* で特異的に、かつ長期間、低細胞密度の状態でラベルしモニターできる実験系を確立させた。これにより、交連ニューロン軸索の正中交差後の長期間に渡る詳細な軸索挙動の解析が可能となり、今までに報告のなかった新たな軸索伸長現象を捉えることに成功した。

⑤ 小脳の交連ニューロンを特異的に長期間モニターできる上記の実験系を導入することで、そのシナプス結合標的である赤核ニューロンの認識過程を *in vivo* で可視化することに成功した。これにより今まで不明であった交連ニューロンの最終標的認識過程の詳細が明らかになった。

⑥ 交連ニューロン軸索の正中交差前後で発現が変化し、軸索ガイダンスプログラムの修飾改変を担っている可能性のある分子の一つとして、MAP キナーゼ・カスケードの細胞内シグナル分子を同定した。

#### 5. 今後の計画

目的1においては、当初の計画通りに推移していることから、これを受けてさらに進展させる。特に、交連ニューロンのサブクラス特異的に発現する転写調節因子によって発現制御を受けている軸索ガイダンス関連分子の機能解析を *in vivo* において推し進める。

目的2においては、交連ニューロン軸索の正中交差前後で発現が変化している軸索ガイダンス関連分子の機能解析を行うことで、軸索ガイダンスプログラムの修飾改変に果たしている役割を明らかにする。また、ガイダンス分子レセプターの正中交差前後における選択的局在の制御機構の解明も引き続き行う。

#### 6. これまでの発表論文等

[発表論文]

① Zhao, H., Maruyama, T., Hattori, Y., Sugo, N., Takamatsu, H., Kumanogoh, A., Shirasaki, R., Yamamoto, N. A Molecular Mechanism That Regulates Medially Oriented Axonal Growth of Upper Layer Neurons in the Developing Neocortex. **J. Comp. Neurol.** 519, 834-848 (2011). (査読有)

[学会発表]

① 稲又靖之、白崎竜一：中脳における交連ニューロンの発生分化を規定する遺伝プログラム、第34回日本神経科学大会（2011年9月、横浜）

② 原聡史、小野寺亮太、稲又靖之、白崎竜一：小脳核ニューロン-赤核投射をモデルとした dI1 型交連ニューロンの標的認識過程、第34回日本神経科学大会（2011年9月、横浜）

③ 出崎太朗、稲又靖之、白崎竜一：Role of *Lmx1a* in the Guidance of Cerebellar Commissural Axons、第34回日本分子生物学会年会（2011年12月、横浜）

④ 池内彬、稲又靖之、白崎竜一：Role of Midline Crossing in Commissural Axon Guidance along the Anterior-Posterior Axis、第34回日本分子生物学会年会（2011年12月、横浜）

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/neurobiol/shirasaki/>