

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680036

研究課題名(和文) 軸索ガイダンス分子 draxin が担う視床皮質軸索投射機構の解明

研究課題名(英文) Draxin roles in thalamocortical projections.

研究代表者

新明 洋平 (Shinmyo, Yohei)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：00418831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000 円、(間接経費) 6,330,000 円

研究成果の概要(和文)：draxinはサブプレート神経を含む大脳新皮質に強く、大脳腹側部と視床に弱く発現する。大脳新皮質に発現するdraxinが視床皮質軸索投射に重要であるかを検証するために、レスキュー実験を行った。pCAGGSプロモーター下にloxPを両端に持つ-geoとさらに下流にdraxin-IRES-eGFPを持つトランスジェニックマウスを作成した。このマウスを用いてdraxinノックアウトマウスにおいて大脳新皮質特異的にdraxinの発現を誘導した結果、多くの視床皮質軸索が大脳新皮質に向かって投射する事が分かった。この結果から、サブプレートを含む大脳新皮質に発現するdraxinの重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have focused on Draxin functions in thalamocortical projections. It has long been recognized that neocortical pioneer axons from subplate neurons are essential for the guidance of thalamocortical projections. Draxin is strongly expressed in early-born cortical neurons, including subplate and Cajal-Retzius cells, and weakly expressed in the ventral telencephalon and dorsal thalamus. Draxin deficient mice showed severe defects in thalamocortical projections. Thalamic axons showed a pathfinding error in the internal capsule region at embryonic day 14.5, when cortical axon pathfinding still appeared normal.

This suggests that draxin has direct functions in thalamocortical projections. Furthermore, the thalamocortical phenotype in draxin^{-/-} mice is sufficiently rescued by transgenic expression of draxin in the neocortex. These results suggest that draxin from neocortical pioneer neurons is required for the guidance of thalamocortical projections.

研究分野：脳神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：軸索ガイダンス 視床皮質軸索投射

1. 研究開始当初の背景

脳では膨大な数の神経細胞がそれぞれ適切な位置に配置され、非常に精密な神経回路網を形成している。これらの神経回路形成には、様々な細胞外神経ガイダンス分子が担う細胞間の相互作用が必須である (Tessier-Lavigne and Goodman, Science 274, 1123-1133, 1996)。この十数年の間に、Netrin, Ephrin, Slit, Semaphorin などの神経軸索ガイダンス因子とそれらの受容体が同定された事によりこの分野は急速に進歩した (Dickson, Science 298, 1959-1964, 2002)。一方で、脳神経系の複雑さを考えるに多数の未知の神経軸索ガイダンス因子の存在が示唆されるが、長い間、上記に示す分子に匹敵するような新規分子の発見には至っていない。この分野のブレークスルーには、新規の神経回路形成遺伝子の同定とその機能解析、さらにそのシグナル伝達の仕組みを明らかにする事が必要である。我々は新規ガイダンス分子を同定するために、膜タンパク質や分泌タンパク質の cDNA を選択的にクローニングするシグナルシークエンストラップ法を用いて (Kojima and Kitamura, Nat. Biotech. 17, 487-490, 1999)、分子探索を行ってきた (Okafuji and Tanaka, Gene Exp. Patterns 6, 57-62, 2005)。

その結果、ニワトリやマウス胚の中樞神経系に発現し、脊髄背側組織片や大脳皮質由来の神経軸索に対し反発活性を示す新規のシグナル分子を見出し、Draxin (Dorsal repulsive axon guidance protein) と命名した (Islam* and Shinmyo* et al., Science, 改訂中 *These authors contributed equally to this work.)。Draxin ノックアウトマウスでは、脊髄交連神経の形成異常に加え、すべての大脳交連神経 (脳梁、海馬交連、前交連) の形成異常が観察された。強い表現型を示す個体では、これらの交連神経軸索は正中線でまったく交差しない。これまでに、いくつかのガイダンス分子のノックアウトマウスにおいて、大脳の交連神経形成の異常が報告されているが、すべての交連神経に異常を示すのは Netrin, DCC, Frizzled3 ノックアウトマウスだけである (Lindwall et al., Curr. Opin. Neurobiol. 17, 3-14, 2007)。

Draxin ホモ欠損マウスではすべての交連神経に形成異常がみられ、さらに、20-30%の Draxin ヘテロ欠損マウスにおいてもそれらの表現型は観察される。このように、Draxin が大脳交連神経形成において中心的な役割

を果たすと考えられる。さらに、このノックアウトマウスでは視床皮質神経の軸索も正常に形成されない。これらの結果から、Draxin が脳神経回路形成において非常に重要なガイダンス分子であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が発見した新規ガイダンス分子である Draxin に着目し、非常に複雑な脳神経回路の形成メカニズムの一端を明らかにすることである。これまでに、Draxin ノックアウトマウスでは、すべての大脳交連神経が形成不全である事を報告した。他方で、Draxin は胚発生期に大脳新皮質、大脳腹側部、視床など広範囲に発現が観察される事から、大脳交連神経以外の脳神経回路形成においても重要なガイダンス分子であると考えられ、他の神経系での機能解析が必須である。本研究では、視床皮質軸索投射機構に着目する。

視床にはそれぞれの感覚情報を受け持つ視床核が存在し、対応する大脳新皮質の領域へ軸索を投射している。その発生様式をみると、それぞれの視床核から発する視床皮質軸索は大脳腹側部に向かって伸長し、内包を経由して最終的な標的である大脳新皮質に侵入する。この発生過程において、大脳新皮質から内包にパイオニア軸索をもつサブプレート神経が視床皮質軸索の投射に必須であることが数多くの研究から明らかとなっている。つまり、サブプレート軸索と視床皮質軸索間の相互作用が視床皮質軸索投射に重要であると考えられるが、この異種軸索間相互作用を担う軸索ガイダンス分子は同定されていない。非常に興味深いことに、これまでの研究結果から、draxin がサブプレート軸索を含む大脳新皮質由来の視床皮質軸索ガイダンスに必須の分子である可能性が示唆されている。本研究では、draxin の機能を明らかにすることにより視床皮質軸索投射機構の解明、さらには多様な軸索投射パターンの形成機構の解明を目指したい。

3. 研究の方法

(1) Draxin の発現パターン解析

視床皮質軸索投射期に Draxin がどの領域に発現するかを特定するために、Draxin ヘテロマウスを用いて lacZ 染色を行う。

(2) Dil トレース、免疫染色による表現型解析

視床皮質軸索投射異常を正確に評価する。また、大脳新皮質の形成に異常があるかを調

べる。

(3) *draxin* 受容体の発現部位の同定

draxin-Alkaline Phosphatase (AP) タンパク質を用いた結合実験により、*draxin* 受容体の発現細胞を同定する。

(4) *draxin* トランスジェニックマウスを用いたレスキュー実験

pCAGGS プロモーター下に *loxp* を両端に持つ *-geo* とさらに下流に *draxin*-IRES-eGFP を持つトランスジェニックマウス (TG-*draxin*^{+/+}) を作成する。*draxin*^{-/-} との交配により得られる TG-*draxin*^{-/-} マウスと *Emx1*-Cre マウスを交配させ、*draxin* ノックアウトマウスにおいて大脳新皮質特異的に *draxin* の発現を誘導し、視床皮質軸索の投射異常が回復されるかを調べる。

(5) *draxin* コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析

大脳新皮質に発現する *draxin* の重要性を検証するために、*Emx1*-Cre マウスを用いて大脳新皮質特異的に *draxin* を消失したコンディショナルノックアウトマウスを作成する。

4. 研究成果

(1) *Draxin* の発現パターン解析

視床皮質軸索投射期に、*draxin* がサブプレート神経を含む大脳新皮質に強く、大脳腹側部と視床に弱く発現することが分かった。

(2) Dil トレース、免疫染色による表現型解析

Dil トレース実験から、*draxin*^{-/-} マウスの視床皮質軸索は内包までは到達するが、その後大脳新皮質に投射されず、一部は外包に異常に投射することが分かった。一方、パイオニア神経であるサブプレート神経は正常に分化し、その軸索投射も正常であることを確認した。

(3) *draxin* 受容体の発現部位の同定

未固定の脳切片を用いた *draxin*-AP タンパク質の結合実験を行った結果、*draxin* が視床皮質軸索に結合することを確認したことから、視床皮質神経細胞に *draxin* 受容体が発現すると考えられる。さらに、*draxin* は視床組織片からの神経突起に結合することを見出した。

(4) *draxin* トランスジェニックマウスを用

いたレスキュー実験

TG-*draxin*^{+/+} マウスの作成、確立に成功した。さらに、*draxin*^{-/-} との交配により TG-*draxin*^{-/-} マウスを作成した。*Emx1*-Cre マウスを用いて、*draxin* ノックアウトマウスにおいて大脳新皮質特異的に *draxin* の発現を誘導し、視床皮質軸索の投射異常が回復されるかを調べた。その結果、このトランスジェニックマウスでは、多くの視床皮質軸索が大脳新皮質に向かって投射することが分かった。この結果から、サブプレートを含む大脳新皮質に発現する *draxin* の重要性が示唆された。

(5) *draxin* コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析

大脳新皮質に特異的なコンディショナルノックアウトマウスを作製する事を考え、開始コドンとシグナル配列のある *draxin* の第2エクソンの上流と下流に *loxp* を配置した変異マウスを作製した。最初にコントロール実験として、すべての細胞に Cre を発現する CAGGS-Cre マウスとの交配により、CAGGS-Cre^{+/-}; *draxin*^{loxP/-} マウスを作製した。これらのマウスでは、*loxp* 間の excision は起こっているにも関わらず、*draxin*^{-/-} マウスに見られる表現型は観察されなかった。*draxin* タンパク質は7つのエクソンでコードされており、エクソン3以降で機能タンパク質が合成されていると考えられた。

次に、この *draxin* *loxp* マウスの ES 細胞を用いて、重要な機能ドメインをコードするエクソン6の下流に *loxp* を挿入したマウス(3つの *loxp* を持つ)を作製した。このマウスでは、Cre の存在下でエクソン2-6が切り出される。エクソン7には開始メチオニンになりうる配列がないため、*draxin* タンパク質が合成される可能性はない。現在、*loxp* マウスの確立を目指している。

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2件)

Hossain M, Ahmed G, Naser IB, Shinmyo Y, Ito A, Riyadh MA, Felemban A, Song X, Ohta K and Tanaka H*. The combinatorial guidance activities of *draxin* and *Tsukushi* are essential for forebrain commissure formation. *Dev. Biol.* 査読有, 374, 58-70, 2013.

新明洋平 神経回路形成における軸索ガイダンス分子 *draxin* の役割 生化学

ミニレビュー,査読有,Vol.85 No.9 2013.

〔学会発表〕(計 10 件)

Shinmyo Y, Riyadh A, Hossain M, Ahmed G, Naser IB, Song X, Ito A, Takebayashi H, Ohta K and Tanaka H. 大脳新皮質に発現する draxin が視床皮質軸索投射に必須である 第36回日本分子生物学会年会, 神戸市,神戸国際会議場, 2013年12月3~6日

Shinmyo Y, Riyadh A, Hossain M, Ahmed G, Naser IB, Song X, Ito A, Takebayashi H, Ohta K and Tanaka H. Draxin from neocortical neurons controls thalamocortical projections into the neocortex. Neuroscience 2013. Sandiego, USA. Sandiego Convention Center November, 9~13, 2013.

新明 洋平 大脳新皮質に発現する draxin が視床皮質軸索投射に必須である 第118回日本解剖学会 2013年3月28~30日,高松,かがわ国際会議場

Shinmyo Y. Draxin from neocortical neurons controls thalamocortical projections into the neocortex. U.S.-Japan Brain Research Cooperative Program "Growth Cones & Axon Regeneration" New Orleans, USA. The University of Texas, October, 10 ~ 12, 2012.

Shinmyo Y, Riyadh A, Hossain M, Ahmed G, Naser IB, Song X, Ito A, Takebayashi H, Ohta K and Tanaka H. Draxin from neocortical neurons controls thalamocortical projections into the neocortex. Neuroscience 2012. New Orleans, USA. October, Ernest N. Morial Convention Center, 13~17, 2012.

Shinmyo Y, Riyadh A, Hossain M, Ahmed G, Naser IB, Song X, Ito A, Takebayashi H, Ohta K and Tanaka H. Draxin from neocortical neurons controls thalamocortical projections into the neocortex. Gordon Research Conferences. Newport RI, USA. Salve Regina University, August, 12~17, 2012.

Shinmyo Y, Riyadh A, Hossain M, Ahmed G, Naser IB, Song X, Ito A, Takebayashi H, Ohta K and Tanaka H. Draxin from

neocortical neurons controls thalamocortical projections into the neocortex. 日本発生生物学会題45回大会, 神戸市,神戸国際会議場 2012年5月28~31日.

Shinmyo Y., Riyadh A., Hossain M., Ahmed G., Naser I.B., Song X., Ito A., Takebayashi H., Ohta K. and Tanaka H. draxin has a unique role for the guidance of thalamocortical projections. Neuroscience 2011. Washington DC, USA. Washington Convention Center, November, 12~16, 2011.

Shinmyo Y., Riyadh A., Hossain M., Ahmed G., Naser I.B., Song X., Ito A., Takebayashi H., Ohta K. and Tanaka H. draxin has a unique role for the guidance of thalamocortical projections. Assembly, Plasticity, Dysfunction and Repair of Neural Circuits. Cold Spring Harbor Asia, Suzhou, China. Suzhou Dushu Lake Conference Center, October, 17~21, 2011.

Shinmyo Y., Riyadh A., Hossain M., Ahmed G., Naser I.B., Song X., Ito A., Takebayashi H., Ohta K. and Tanaka H. draxin has a unique role for the guidance of thalamocortical projections The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 横浜市,パシフィコ横浜. 2011年9月14~17日.

〔図書〕(計2件)

新明洋平、田中英明。大脳新皮質での神経回路の形成における軸索ガイダンス機構 領域融合レビュー 3, e002 (2014)
DOI: 10.7875/leading.author.3.e002

宮田卓樹、山本巨彦編。脳の発生学 ニューロンの誕生・分化・回路形成 DOJIN BIOSCIENCE SERIES 07 (2013) (7章 "軸索投射のガイダンス、トポグラフィックマップ形成" 分担執筆)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新明 洋平(Shinmyo, Yohei)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号 : 00418831