

機関番号：17401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700382

研究課題名 (和文)

脳梁と視床-皮質神経回路形成における Draxin シグナルの役割

研究課題名 (英文)

Roles of Draxin signaling in formation of the corpus callosum and 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・助教

研究者番号：00418831

研究成果の概要 (和文)：

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事である。本研究では、Draxinがユニークな役割を果たすと考えられる脳梁形成と視床皮質軸索投射に着目した。視床皮質軸索と皮質視床軸索は内包で直接的に相互作用し、最終的な標的にお互いをガイドする。パイオニア軸索を発するサブプレート神経が視床皮質軸索投射に必須であることが明らかにされているが、その過程に関わるガイダンス分子は報告されていない。我々は、Draxinの機能に関して以下の事を明らかにした。1) *Draxin* ノックアウト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。2) *Draxin*はサブプレート神経を含む大脳新皮質に強く発現する。3) *Draxin*-Alkaline Phosphatase (AP) タンパク質は視床皮質軸索に結合する事から、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し、その伸長を阻害する。4) *Draxin* ノックアウトマウスにおけるサブプレート神経の形成は正常である。以上の結果から、サブプレート神経を含む大脳新皮質から分泌されるDraxinが視床皮質軸索の内包から大脳新皮質への投射に必須のガイダンス分子であると考えられた。脳梁形成に関しては、Draxinの反発活性を仲介する受容体がdccである事を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we focused on Draxin functions in corpus callosum formation and thalamocortical projections. We found that Draxin has a critical role for the projections of corticothalamic and thalamocortical axons. *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 the guidance of these axons: thalamocortical and corticothalamic axons followed an ectopic route through the external capsule instead of projecting to the cortex and thalamus, respectively. We found that 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 primary defects in the thalamocortical axon pathfinding cause misprojection of cortical axons. In addition, we showed that Draxin binds to thalamocortical axons and has inhibitory effects for neurite outgrowth from thalamic explants. Thus, we propose that Draxin repulsion from the neocortex may be essential for proper guidance of thalamocortical axons. We also found that Draxin repulsion is mediated by a receptor, dcc in the callosal neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：Draxin, 反発活性, 脳梁, 視床皮質神経

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ケ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脳神経系に発現し、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事である。脳神経回路に異常がある Draxin ノックアウトマウスの詳細な表現型解析に加え、in vitro の培養系やトランスジェニックマウスを用いた解析を行うことにより、脳神経回路形成における Draxin の機能を明らかにしたい。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ド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、ユニークな表現型である視床皮質軸索投射の異常に着目する。さらに、Draxin 受容体の同定とそのシグナル機構の解析を行い、脳梁と視床皮質軸索投射機構の解明を目指す。

本研究の独創性と新規性は、新規のシグナル分子である Draxin の機能を世界に先駆けて我々が発見したことにある。Draxin は既知のシグナル分子とは全くホモロジーの無い新規分子であり、新規の受容体を介したシグナリング経路を形成している可能性がある。従って、Draxin に関する研究は、神経回路形成機構の解明に新たな局面をもたらす可能性がある。また、現在までに同定された神経回路形成遺伝子の中には、実験モデル動物やヒトの神経疾患の原因遺伝子であるものが多く存在する。Draxin ノックアウトマウスは脳神経回路形成に大きな異常が見られるものの、生存・生殖が可能であり、ヒト神経疾患の原因遺伝子である可能性が考えられる。従って、本研究は脳神経回路形成の分子メカニズムの解明のみならず、ヒトの遺伝性・難治性神経疾患の発症機序の解明にもつながる可能性がある。

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) 視床皮質神経に対する Draxin のガイド活性の検定

組織片の共培養実験から大脳皮質に視床皮質神経に対する誘因分子が発現すると考えられるが (Molnar and Blakemore, Exp. Neurol. 156, 363-393, 1999)、その実体は明らかになっていない。Draxin ノックアウトマウスの視床皮質神経軸索は internal capsule までは到達するが、その後、大脳皮質に投射されない。視床皮質神経形成期に Draxin は皮質視床神経を含む大脳皮質で発現が観察される。これらの事から、Draxin が視床皮質神経軸索に対して誘因活性を持つ事が予想される。そこで、視床組織片を Draxin 発現 cos 細胞と共培養することにより、神経軸索成長における Draxin の効果を調べる。

(3) Draxin ノックアウトマウスの詳細な表

現型解析

Draxin ノックアウトマウスの視床皮質神経軸索の投射異常がどのようにして起こるのかを調べるために、詳細な表現型解析を行う。視床皮質軸索と皮質視床軸索の投射はお互いに依存する。どちらかの軸索投射に異常が起こった場合、もう一方の軸索投射にも異常が生じる事が分かっている。Draxin ノックアウトマウスの場合、どちらの軸索投射に最初の異常が起こるのかを特定するために、経時的に表現型を調べる。視床軸索の特異的マーカーである calretinin と皮質軸索マーカーである Tag1 の二重染色を行う。また、DiI による解析を行う。

(4) グリア細胞への Draxin 遺伝子導入によるレスキュー実験

GFAP 陽性のグリア細胞が正常な IGG と脳梁形成に必須であると考えられている (Smith et al., Nat. Neurosci. 9, 787-797, 2006)。そこで、GFAP プロモーターを用いてグリア細胞選択的に Draxin を発現するトランスジェニックマウスを作製し、ノックアウトマウスの IGG および脳梁形成異常をレスキューできるか検討する。また、GFAP 陽性グリア細胞に一過的に Draxin を強く発現させる方が、より効果的にその表現型をレスキューできる可能性も考えられるので、子宮内エレクトロポレーション法により GFAP-Draxin プラスミドを導入する事も検討する。

(5) Hek293 細胞を用いた発現クローニングによる Draxin 受容体同定の試み

マウス E14.5 嗅球由来の cDNA ライブラリーを用いた発現クローニングを行う (Kawasaki et al., J. Neurobiol. 15, 330-340, 2005)。1 プールあたり約 100 個の独立したクローンに分割されたライブラリー (3000 プール) を Hek293 細胞に発現させた後、アルカリフォスファターゼ (AP) を融合させた Draxin タンパク質に結合性のある細胞群をスクリーニングする。陽性のプールから同様のスクリーニングを行い、標的のクローンを特定する。

(6) Draxin 受容体候補 (Y) 遺伝子の解析

上記により単離された候補 (Y) が真に Draxin 受容体であるかどうかを以下の方法により検定する。① Y 遺伝子を一過的に発現させた cos 細胞に Draxin-AP タンパク質が結合するかを AP 発色により調べる。② 切片 in situ hybridization 法を用いて脳・脊髄における Y 遺伝子の発現パターンを調べ、Draxin

に反応する神経細胞の分布パターンと比較し、相関関係があるかどうかを検討する。③ Y 遺伝子の siRNA を用いて大脳皮質におけるその発現阻害を試みる。siRNA-IRES-GFP プラスミドをエレクトロポレーション法により大脳皮質に導入する。その後、GFP 陽性組織片からの神経軸索成長に対する Draxin の反発活性が低下しているかどうか調べる。これらの実験において期待通りの結果が得られた場合、Y 分子が Draxin 受容体である可能性が極めて高いと判断される。

4. 研究成果

(1) Draxin の発現パターン解析

視床軸索投射期である E14 の脳組織切片を用いて、lacZ 染色を行った。Draxin はサブプレート神経を含む大脳新皮質で強く発現し、その他にも、大脳腹側部、視床など広範囲に発現が観察された。大脳新皮質での発現が投射神経であるかどうかを調べるために、皮質軸索マーカーである Tag1 と β -gal の二重染色を行った結果、両者の発現がオーバーラップしていた。この結果から、Draxin は大脳新皮質の神経細胞に強く発現することが分かった。

(2) 視床皮質神経に対する Draxin のガイド活性の検定

E14 の視床組織片をコラーゲン中で培養すると 36 時間後には神経突起の伸長が観察される。視床神経突起成長における Draxin の活性を調べるために、Draxin-AP タンパク質を培地に加え、視床組織片からの神経突起伸長に対する影響を調べた。その結果、Draxin-AP が濃度依存的に、神経突起伸長を阻害した。この結果は、予想に反して、Draxin が視床軸索に対しても反発活性を持つ事を示唆した。

(3) Draxin ノックアウトマウスの詳細な表現型解析

Draxin ノックアウトマウスにおける軸索投射異常を調べるために、蛍光色素 DiI を用いたトレース実験を行った結果、以下のことが明らかとなった。①視床皮質神経軸索は internal capsule までは到達するがその後、大脳皮質に投射されず、一部は external capsule に異常に投射する。②皮質視床軸索の一部は、internal capsule に入ることができず、external capsule に異常に投射する。次に、視床皮質軸索と皮質視床軸索のどちらが最初に投射異常を示すかを調べるために、Tag1 (皮質視床軸索のマーカー) と

calretinin (視床皮質軸索のマーカー) の二重染色を行った。E14.5 で、皮質視床軸索は正常であるが、視床皮質軸索は internal capsule 内で異常が観察された。このことから、最初の異常は視床皮質軸索に起こり、それに伴い皮質視床軸索の異常が引き起こされると考えられた。

(4) グリア細胞への Draxin 遺伝子導入によるレスキュー実験

GFAP プロモーターを用いてグリア細胞選択的に Draxin を発現するトランスジェニックマウスの作製を試みた。約 80 匹のインジェクション個体の中から、トランスジーンを持つ 9 ラインを PCR により特定した。その 9 ライン中から、グリア細胞特異的な発現を示すラインを免疫染色によりスクリーニングしたが、十分な発現が認められるラインをとる事ができなかった。

(5) Hek293 細胞を用いた発現クローニングによる Draxin 受容体同定

cDNA ライブラリーの発現スクリーニングにより Draxin 受容体の同定を試みた。最初にスクリーニングに用いる、ビオチン化 Draxin とアルカリフォスファターゼ (AP)-Draxin タンパクを調製し、これらのタンパクに反発活性がある事を in vitro の培養系を用いた実験により明らかにした。次に、これらのタンパクの脳組織への結合性を調べた。その結果、これらの Draxin タンパクが脳梁や海馬交連や前交連などの神経軸索に特異的に結合することがわかった。以上の結果を基に、これらのタンパクを用いて Draxin 受容体の発現スクリーニングを行った。しかしながら、現在までに目的とする受容体候補遺伝子のクローニングには至っていない。一方、同時並行で、既知の受容体タンパクからのスクリーニングを行った (candidate approach)。その結果、netrin 受容体である dcc が Draxin と強く結合することを見出した。

(6) Draxin 受容体候補 (Y) 遺伝子の解析

$dcc^{-/-}$ マウスでは、Draxin $^{-/-}$ マウスと同様にすべての大脳交連神経の形成不全が報告されており、これらの軸索投射において dcc が Draxin の重要な受容体である事が予想された。そこで両者の関係を in vivo で調べるために、ダブルヘテロマウスの大脳交連神経を解析したところ、脳梁においてのみそれぞれのシングルヘテロマウスでは観察されない重篤な異常が観察された。さらに、 dcc ノックアウトマウスの大脳新皮質組織片 (脳梁神

経を含む)では、Draxinの神経突起伸長阻害が低減することから、*Draxin*^{-/-}マウスにおける脳梁形成異常は、*dcc*を介したDraxinの反発活性の欠如により起こると考えられた。交連の異常に顕著な違いは見られないが、*Draxin*^{+/-};*dcc*^{+/-}マウスの脳梁に重篤な異常が観察された。一方、*dcc*^{-/-}マウスでは*Draxin*^{-/-}マウスで見られるような重篤な視床皮質軸索投射異常が見られないことから共受容体の存在が示唆されるが、視床皮質軸索投射において*dcc*がDraxinの重要な受容体であるなら、*Draxin*^{+/-};*dcc*^{+/-}もしくは*Draxin*^{+/-};*dcc*^{-/-}マウスにおいて重篤な異常が観察される可能性がある。今後、これらのマウスの視床皮質軸索形成をcalretinin抗体を用いた免疫染色により調べたい。

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 12 件)

- (1) Mito T., Shinmyo Y., Kurita K., Nakamura T., Ohuchi H., and Noji S. Ancestral functions of Delta/Notch signaling in the formation of body and leg segments in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development in revision* : These authors contributed equally to this work. 査読有.
- (2) Ahmed G., Shinmyo Y., Ohta K., Islam S. M., Hossain M., Naser I. B., Riyadh A., Su Y., Zhang S., Tessier-Lavigne M. and Tanaka H. Draxin Inhibits Axonal Outgrowth through the Netrin Receptor DCC. *J. Neurosci. in revision*. 査読有.
- (3) Nakamura T., Yoshizaki M., Ogawa S., Okamoto H., Shinmyo Y., Bando T., Ohuchi H., Noji S., Mito T. Imaging of transgenic cricket embryos reveals cell movements consistent with a syncytial patterning mechanism. *Curr. Biol.* 20, 1641-1647, 2010.
- (4) Ito A., Shinmyo Y., Abe T., Oshima N., Tanaka H., Ohta K. Tsukushi is required for anterior commissure formation in mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402, 813-818, 2010. 査読有.
- (5) Ahmed G., Shinmyo Y., Naser I. B., Hossain M., Song X., and Tanaka H. Olfactory bulb axonal outgrowth is inhibited by draxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 730-734 2010. 査読有.
- (6) Su Y., Zhang S., Islam S. M., Shinmyo Y., Naser I. B., Ahmed G. and Tanaka H. Draxin is involved in the proper development of the dI3 interneuron in chick spinal cord. *Dev. Dyn.* 239, 1654-1663 2010. 査読有.
- (7) Hayashida M., Minoda R., Shinmyo Y., Ohta K., Tanaka H. and Yumoto E. PC3 is involved in the shift from proliferation to differentiation and maturation in spiral ganglion neurons. *Neuroreport.* 21, 90-93 2010. 査読有.
- (8) Zhang S., Su Y., Shinmyo Y., Islam S. M., Naser I. B., Ahmed G., Tamamaki N. and Tanaka H. Draxin, a repulsive axon guidance protein, is involved in hippocampal development. *Neurosci. Res.* 66, 53-61, 2010. 査読有.
- (9) Su Y., Naser I. B., Islam S. M., Zhang S., Ahmed G., Chen S., Shinmyo Y., Kawakami M., Yamamura K. and Tanaka H. Draxin, an axon guidance protein, affects chick trunk neural crest migration. *Dev. Growth Differ.* 51, 787-796, 2009. 査読有.
- (10) Naser I. B., Su Y., Islam S. M., Shinmyo Y., Zhang S., Ahmed G., Chen S. and Tanaka H. Analysis of a repulsive axon guidance molecule, draxin, on ventrally directed axon projection in chick early embryonic midbrain. *Dev. Biol.* 332, 351-359, 2009. 査読有.
- (11) 新明洋平、田中英明 反撥性ガイダンス分子 draxin は脊髄と大脳の交連線維形成に必須である 実験医学 Vol. 27 No. 9 (6月号):1376-1379 (2009)
- (12) Islam S. M. Shinmyo Y., Okafuji T., Su Y., Naser I. B., Ahmed G., Zhang S., Chen S., Ohta K., Kiyonari H., Abe T., Tanaka S., Nishinakamura R., Terashima T., Kitamura T. and Tanaka H. Draxin, a repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures. *Science* 323, 388-93, 2009. : These authors contributed equally to this work. 査読有.

[学会発表] (計 5 件)

- (1) Yohei Shinmyo, MD Riyadh, Iftekhar Bin Naser, Giasuddin Ahmed, Mahmud Hossain, Xiaohong Song, Kunimasa Ohta, Hideaki Tanaka. draxin has a unique role for the guidance of thalamocortical projections 日本発生生物学会 44 回大会 2011 年 5 月 18 日-21 日, 沖縄 沖縄コンベンションセンター
- (2) Yohei Shinmyo, Tatsuya Okafuji, Iftekhar Bin Naser, Giasuddin Ahmed, Mahmud Hossain, Xiaohong Song, Kunimasa Ohta, Hideaki Tanaka draxin is essential for the guidance of thalamocortical projections 日本発生生物学会 43 回大会 2010 年 6 月 20 日-23 日, 京都 国立京都国際会議
- (3) Yohei Shinmyo, Shahidul Islam, Tatsuya Okafuji, Yuhong Su, Iftekhar Naser, Giasuddin Ahmed, Sanbing Zhang, Kunimasa Ohta, Hideaki Tanaka. A novel repulsive guidance protein, draxin 第 32 回日本神経科学大会 2009 年 9 月 16 日-18 日, 名古屋 名古屋国際会議場
- (4) Yohei Shinmyo, Shahidul Islam, Tatsuya Okafuji, Yuhong Su, Iftekhar Naser, Giasuddin Ahmed, Sanbing Zhang, Kunimasa Ohta, Hiroshi Kiyonari, Takaya Abe, Hideaki Tanaka A novel repulsive guidance protein, Draxin 日本発生生物学会 42 回大会 2009 年 5 月 28 日-31 日, 新潟 朱鷺メッセコンベンションセンター
- (5) Yohei Shinmyo. A novel repulsive guidance protein, Draxin. *Construction and Reconstruction of the Brain*. 2009 年 10 月 8 日-10 日 淡路 淡路島夢舞台国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新明 洋平 (SHINMYO YOUHEI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：00418831