

皮質脊髄路軸索側枝形成における微小管制御機構の解析

研究代表者： 猪口 徳一（子どものこころの発達研究センター・特命助教）

共同研究者： 佐藤 真（医学部・教授）、岡 雄一郎（子どものこころの発達研究センター・特命講師）、尾身 実（医学部・特命助教）

概 要	大脳からの主要な出力路である皮質脊髄路は、大脳皮質第5層に起始細胞を持ち、その主軸索から上丘や橋核などに軸索側枝を伸ばす。軸索側枝は神経活動の協調性を担う重要な機構といわれているが、その形成を制御する分子実態については多くが不明である。我々は現在までに、側枝形成が始まる時期にその標的脳領域で発現の高い側枝誘導因子の候補分子を得ているが、側枝形成領域軸索内では微小管を中心とした細胞骨格の再編成が起きていることから、候補分子が細胞骨格制御を介して側枝形成に関与すると考えた。そこで、微小管伸長端結合因子である EB3-EGFP を発現するベクターを作成し、共焦点顕微鏡で高速タイムラプス撮影することで微小管の動態をリアルタイムに観察する系を立ち上げた。また、脳で発現しており、微小管切断活性を持つ spastin について解析したところ、培養細胞で、微小管の形成を阻害することが示された。今後、候補因子による微小管の切断や伸長を評価し、微小管制御因子との関係を調べ、軸索側枝形成の制御機構を生体内で明らかにしていきたい。
関連キーワード	大脳皮質、皮質脊髄路、軸索側枝、細胞骨格

研究の背景および目的

大脳からの主要な出力路である皮質脊髄路(錐体路)は、大脳皮質第5層の神経細胞から伸長し、内包を通り、脊髄へと投射する。その主軸索からは、上丘、橋核、下オリブ核などの複数の神経核に「軸索側枝」を伸ばす。「軸索側枝」は高度な脳の働きに必要な神経活動の協調性を担う重要な機構であり、その形態学的・解剖学的な理解が進んでいる。しかし、過去の報告より、側枝伸長の標的である神経核より何らかの誘導因子が出ていることが示唆されているが、実際の脳内で側枝形成が誘導される分子実態については多くが不明である。本研究の目的は、「軸索側枝の形成や退縮・再編成の制御機構を細胞骨格に着目し、分子レベルで明らかにする」ことである。我々は、現在までに、皮質脊髄路軸索に作用する側枝誘導因子を

探索する目的で、側枝形成が誘導される脳領域の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイを用いて解析した。そして、側枝形成開始時期の側枝標的脳領域で発現の高い候補分子を同定している。本研究では、軸索内での細胞骨格の動態変化と細胞骨格制御分子の解析手法を確立し、候補分子による軸索側枝形成時の細胞骨格の制御機構を明らかにすることで、脳神経の協調的な働きを担う側枝形成現象の分子実体の解明を目指す。側枝形成は通常の脳発生のみでなく、傷害を受けた脳領域への代償機構においても重要な役割を担っており、側枝形成の分子基盤が明らかになれば、物理的傷害や梗塞などによって失われた神経機能の回復の手段に応用できると期待される。

研究の内容および成果

1. EB3-EGFP を用いた微小管の動態観察法

神経細胞において、軸索がダイナミックに変動するとき（枝分かれや回路のつなぎ替え）には、その軸索内の微小管も、切断や伸長など大きく変動することが報告されており、微小管の安定制御や切断活性を持つ分子の関与が示唆されている。

我々はこれまでの研究成果として、皮質脊髄路起始細胞が生まれる胎生12日の大脳皮質脳室帯に子宮内電気穿孔法で遺伝子を導入することで、皮質脊髄路神経細胞での遺伝子操作を可能とした。さらに、染色体組み込み型の遺伝子発現誘導手法を組み合わせることで、軸索側枝形成期や、成体脳内など、長期にわたって任意の時期に遺伝子操

作を行うことが可能となった(Iguchi T, et al. (2012) *PLoS ONE*)。そこで、これらの手法を利用して、我々が見出した側枝誘導候補因子が微小管の安定性や切断に与える影響を調べるため、今回新たに、微小管の伸長や切断をリアルタイムに観察可能な微小管プラス端結合蛋白質 EB3 に EGFP を融合した発現ベクターを作成した。このベクターを子宮内電気穿孔法で皮質脊髄路の起始細胞である大脳皮質5層の細胞に導入し、初代細胞培養を行い、共焦点顕微鏡で高速タイムラプス撮影することで微小管伸長端の動態をリアルタイムに観察することに成功した(図1)。この手法を用いることで、候補因子を作用させたときの微小管の切

断 (EB3-EGFP でラベルされた微小管プラス端の増減) や伸長 (EB3-EGFP の移動速度の変化) を評価することが出来る。

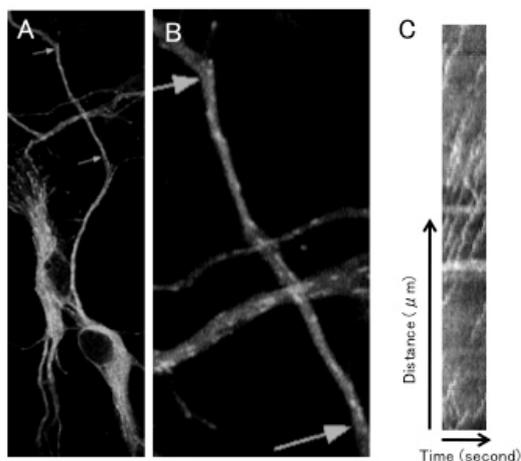


図1: EB3-EGFPのタイムラプス観察による微小管伸長速度の測定

- A) EB3-EGFPを発現させた大脳皮質5層神経細胞
 B) A)拡大図、微小管プラス端に結合したEB3-EGFPの蛍光粒子
 C) B)の矢印領域のタイムラプス画像から作成したキモグラフ

2. 微小管制御因子のクローニングと機能解析

培養神経細胞の側枝形成領域 (枝分かれ部分) を電子顕微鏡で見ると、軸索側枝が出芽した後、側枝内には短い微小管が数本進入した様子が観察される。これは、主軸索内部の微小管の切断によって伸長端であるプラス末端が出来、側枝内へと微小管が進入していったと考えられる。我々は、実際の脳内において軸索外側からの刺激が微小管の切断や安定性を変化させることで軸索の枝分かれを制御している可能性が高いと考え、微小管制御因子の中で、神経細胞で発現しており、微小管の切断への関与が知られている *spastin* をクローニングした。Cos7 細胞に発現させて、微小管への影

響を調べたところ、*spastin* は顕著に微小管の構築を阻害することが分かった。今後、大脳皮質 5 層神経細胞で過剰発現、若しくはノックダウンを行い上述の EB3-EGFP 等を利用して側枝形成への関与を調べる予定である。また、候補因子による微小管の切断や伸長を同様に評価することで、候補因子と微小管制御因子の相関関係を調べ、軸索側枝の形成や退縮・再編成の制御機構を生体内で明らかにしていく。

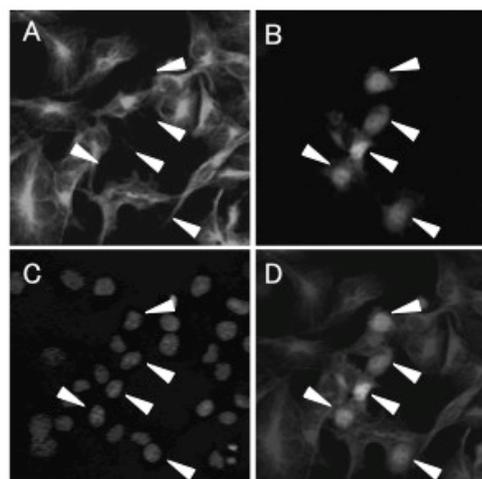


図2: 微小管切断分子 (*spastin*) の発現による微小管の消失

- A) 微小管の免疫染色像, B) *spastin* 発現細胞
 C) 核 (Hoechst), D) Merge 画像

現在、本研究とは別に共同研究者の尾身が側枝形成因子に対する受容体候補分子を選定し、受容体候補遺伝子を大脳皮質 5 層神経細胞で阻害した時の側枝形成への影響を解析しており、本研究とのシナジー効果を得られるように研究を進展させていきたい。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

1. Komada M*, **Iguchi T***, Takeda T, Ishibashi M, Sato M. Smoothed controls cyclinD2 expression and regulates the generation of intermediate progenitors in the developing cortex. (submitted)
*first two authors equally contributed.
2. **Iguchi T**, Oka Y, Kuroda K, Wang CC, Xie MJ, Yagi H, Sato M. Analyses on the potential candidates of collateral branch inducing factor that are specifically expressed in the targets of axon collaterals from the corticospinal projection. JSN-APSN 2012, (2012) Sept.
3. 猪口 徳一、岡本 昌之、佐藤 真「DBZ 共同研究に関する現在のデータ」第 14 回 ORIGIN 神経科学研究会、2012 年 9 月

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

文部科学省 科学研究費補助金 若手研究(B)、平成 24~25 年度 「皮質脊髓路と橋核での誘導型遺伝子発現制御技術を利用した軸索側枝形成機構の解明」代表、採択、2,600 千円