

平成 16 年度 生理学研究所・シナプス研究会  
**「神経回路の機能の成り立ちに関する学際的研究」**

日程：12/2 (木)PM 1:00 ---- 12/3 (金)PM12:05 場所：生理研 1 階会議室

12 月 2 日 (木)

**セッション 1 (PM 1:00 – 3:35)**  
**「大脳と小脳における皮質形成」**

PM 1:00 – 1:05

**「Session organizer による Overview」**

宮田 卓樹 (名古屋大 院医 細胞生物学分野)

PM 1:05 – 1:55

**「大脳皮質投射ニューロンの層特異性・領域特異性獲得機構の解析」**

田辺 康人 (三菱化学生命科学研究所 神経構築研究チーム)

PM 1:55 – 2:45

**「脳皮質形成における Cdk5 の役割について」**

大島 登志男 (理研 脳科学総合研究センター 発生神経生物研究チーム)

PM 2:45 – 3:35

**「プルキンエ細胞の誕生・移動・配置の謎」**

宮田 卓樹

コーヒーブレイク (PM 3:35 – 3:55)

**セッション 2 (PM 3:55 – 6:30)**  
**「神経活動による神経棘の形態制御とシナプス可塑性の制御—その立役者たち」**

PM 3:55 – 4:00

**「Session organizer による Overview」**

柚崎 通介 (慶應義塾大学医学部生理学 I)

PM 4:00 – 4:50

**「アクチビンによるスパイン形態とシナプス可塑性の制御」**

井ノ口 馨 (三菱化学生命科学研究所)

PM 4:50 – 5:40

**「 $\alpha$ N-カテニン によるシナプス結合安定性の制御」**

安部 健太郎、竹市雅俊 (理化学研究所・発生再生科学総合研究センター)

PM 5:40 – 6:30

**「シナプス形成と可塑性を制御する古くて新しい分子**

**--- デルタ受容体とシナプトロフィン ---」**

柚崎 通介、松田 恵子、飯島 崇利、幸田 和久、松田 信爾、小川 康

**懇親会 (PM 7:00-8:30) 於職員会館 2F**

12月3日(金)

セッション3 (PM 9:30 – 12:05)

「モデル動物の特徴を生かした遺伝子 遺伝子経路の機能解析」

AM 9:30 – 9:35

「Session organizer による Overview」

齊藤 実 (東京都神経科学総合研究所・神経機能分子治療)

AM 9:35 – 10:25

「線虫 *C. elegans* における感覚情報処理の分子機構」

石原 健 (九州大学大学院・理学研究院・生物科学)

AM 10:25 – 11:15

「ショウジョウバエによる加齢性記憶障害の分子機構の解析」

齊藤 実

AM 11:15 – 12:05

「脳機能解析を目的とした遺伝子改変マウスの作成とその使い方」

柳川 右千夫 (群馬大学大学院 医学系研究科・遺伝発達行動学)

今年度の代表者：久保 義弘

所内世話役： 重本 隆一 (秘書：浜崎 由佳)

主催：大学共同利用機関法人 自然科学研究機構

# 大脳皮質投射ニューロンの層特異性 領域特異性獲得機構の解析

田辺 康人

(三菱化学生命科学研究所 神経構築研究チーム)

神経系の発達段階において、個々の神経細胞の細胞体、軸索および樹状突起が空間的位置に正確に配列され、機能的に関連した細胞集団が局在し、神経回路網が形成されることで、当該神経系領域に固有な神経構築様式があらわれる。層構築は中枢神経系全般に見られる基本的な神経構築様式であるが、大脳の新皮質において特に発達し、最も特徴的に示されている。また、皮質半球の接線方向には数多くの特徴的な構造をもった領野が存在する。こういった大脳皮質における層形成 領域形成が、発生 発達段階において、どのような細胞内因的 外因的パターン形成機構により調節されているのか、皮質投射ニューロンを中心に、それが層特異性 領域特異性といった「個性」を獲得するまでの（いわば細胞社会の中での）「生まれと育ち」に関して、最近の我々の知見を中心に議論させていただきたい。

参考文献：

1. Takiguchi-Hayashi K, Sekiguchi M, Ashigaki S, Takamatsu M, Hasegawa H, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Nakanishi S, Tanabe Y. Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. J Neurosci. 24, 2286-95, 2004.
2. Hasegawa H, Ashigaki S, Takamatsu M, Suzuki-Migishima R, Ohbayashi N, Itoh N, Takada S, Tanabe Y. Laminar Patterning in the Developing Neocortex by Temporally-Coordinated FGF Signalling. J. Neurosci.24, 8711-8719, 2004.

# 脳皮質形成における Cdk5 の役割について

大島 登志男

(理研 脳科学総合研究センター 発生神経生物研究チーム)

大脳などの層の形成には、厳密にコントロールされた細胞増殖と移動・位置決定が必要で、ヒト滑脳症や変異マウスの解析から、神経細胞の移動に関与する分子がいくつか同定されている。我々はこうした分子のうち Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) を中心に研究を進めている。Cdk5 はセリン・スレオニンキナーゼのひとつで、Cdk ファミリーの一つに分類されるが、他の Cdk が細胞周期のコントロールに関与するのに対し、Cdk5 はその活性化サブユニット p35, p39 が神経細胞特異的に発現し、神経細胞の特異的な機能に関与している。我々はこれまでに、Cdk5 及び p35 のノックアウトマウスの作成と解析を通じて、Cdk5/p35 キナーゼが脳の形成に大変重要な役割を果たしている事を明らかにしてきた。p35 欠損マウスでは isoform の p39 が redundant に発現しているため軽症であるが、Cdk5 欠損マウスは胎生致死で、大脳皮質、小脳、海馬などの層構造が形成されず、脳幹部でも顔面神経核や下オリーブ核の形成が異常である。また軸索走行の異常があり、Cdk5 欠損 DRG ニューロンでは神経軸索ガイダンス分子 Sema3A に対する成長円錐退縮反応が低下している。

Cdk5 の欠損がなぜ神経細胞の位置の決定に必要なのかは不明な点が多いが、ヒト滑脳症の原因分子であるダブルコルチンは Cdk5 によりリン酸化され、リン酸化が機能的に重要である事が示されている。やはりヒト滑脳症の原因分子 Lis1 と結合する Nudel や FAK1 が Cdk5 の基質である事が判っており、Cdk5 がこれらの蛋白質の機能発現に重要なリン酸化を担っている事も明らかとなってきた。また、神経細胞の位置決定に関与するいわゆるリーリンシグナルとの関係では、従来推定されていたようにシグナルの下流として機能するのではなく、両者は並列の関係であり、クロストークがある事が示唆されている。我々は、Cdk5 のリン酸化の基質となる蛋白質を検索しいくつかの蛋白質を同定したが、リーリンシグナルにより、これらの蛋白質のうちリン酸化状態が変動するものが存在する事から、両シグナルはいくつもの下流分子を共有し、移動する神経細胞の細胞骨格蛋白質のダイナミクスを制御していると考えられる。

また、Cdk5 欠損マウスが胎生致死であるため機能解析に制限があったが、Cre-loxP 系を用いたコンディショナル KO マウスを作製・解析する事で、生後における脳の発達・機能発現に至る段階における Cdk5 の役割を解明する事が可能となった。現在複数の時期・領域特異的な cre マウスを用いて、Cdk5 の機能解析を進めている。

# プルキンエ細胞の誕生・移動・配置の謎

宮田 卓樹

(名古屋大 院医 細胞生物学分野)

プルキンエ細胞は小脳皮質を構成する主要ニューロンであり小脳機能の発揮に欠かせぬ存在であるが、生い立ちについては謎が多い。(1)その誕生に関しては、胎生期のかなり早い時期(マウスでE11-13)に生じることが知られているに過ぎず、プルキンエ細胞の前駆細胞がどのような形態をしているのか、いかなるメカニズムでプルキンエ細胞を作るとの決定がなされるのかなどの知見が無い。(2)その移動に関しては、いわゆる放射状グリアによる援助が重要であるとの説が古くからあるが、その真偽が機能的に調べられたことは無い。移動中のプルキンエ細胞の形態に関する情報が欠けている。大脳皮質ニューロンに対しては今世紀に入ってスライス培養下での解析や GFP 標識による生体内での解析が進み、発生時期および移動局面に応じてニューロンがさまざまな形態をとることが分ってきた。その形態的情報が、分子レベルでのニューロン移動機構の解析を裏打ちしている。プルキンエ細胞移動の研究もぜひ(同じ小脳の顆粒神経細胞の舞台に比べてステージが早い材料が小さいなどの技術的困難はあれども)放すべきである。(3)プルキンエ細胞の配置にはリーリンが重要であることが知られている(リーラマウスの小脳ではプルキンエ細胞が小脳深部に集塊を形成してしまい皮質に配列できない)。私は1997年に小脳原基の三次元培養系を用いてリーリンの関与についての実験的証拠を報告した。しかしリーリンの具体的作用については、「誘引」「移動停止信号」「いずれでもない」などの説があるものの、依然不明である。この問題の解決にも幼若プルキンエ細胞の形態を理解することが不可欠である。一方、2002年に $\alpha$ N-cateninの欠損によってプルキンエ細胞の配置異常が生じることが報告された(竹市研およびAckerman研)。 $\alpha$ N-cateninが細胞接着ひいてはシナプス形成に果たす役割(安部氏)と脳幹および脊髄からの入力線維が胎生期から小脳原基に侵入しているという報告に基づいて、私はプルキンエ細胞の移動 --- 配置に入力線維(とシナプス形成?)が関与するかもしれないと夢想している。さらに登上線維-プルキンエ細胞からなる縦縞状機能区分の形成原理を知るためにも、胎生期における幼若プルキンエ細胞と入力線維との関係性を知ることが重要と考えている。

本発表では、胎生11-13日マウス小脳原基のスライス培養において観察した前駆細胞および幼若プルキンエ細胞の挙動、また GFP ウイルスによる標識で把握した生体内での細胞挙動、さらに前庭神経節や脊髄などからの入力線維の順行性標識結果など、プルキンエ細胞の移動・配置のメカニズムに挑む取り組みを紹介したい。

# アクチビンによるスパイン形態とシナプス可塑性の制御

井口 馨

三菱化学生命科学研究所 (MITILS)

LTP などのシナプス可塑性に伴い樹状突起スパインの形態がダイナミックに変化し、それが LTP の誘導や持続に重要な役割を果たしていることなどが近年明らかになりつつある。我々のグループもスパインアクチンの動態やスパイン形態が LTP の後期相 (L-LTP) に重要な役割を果たしていることを示してきた (1)。

また、L-LTP や長期記憶の成立には遺伝子の発現が必要であることから、我々は海馬の L-LTP に伴い発現が調節される多数の遺伝子群を単離しそれらの機能を明らかにしてきた。それらのうちのひとつアクチビンは TGF- $\beta$  ファミリーに属するリガンド蛋白質であり、LTP 誘発後 1 時間以上経過してから発現が誘導される。本研究では、アクチビンがスパイン形態の制御を通じて L-LTP の保持に重要な役割を果たしていることをお話しするとともに、「LTP の誘導 --- アクチビン遺伝子の発現 --- スパインアクチン動態の変化 --- シナプス形態の変化 --- L-LTP の持続」という経路が L-LTP の一つのメカニズムであることを提唱して、「シナプス可塑性」と「シナプス形態の可塑性」に関する議論の種としたい。

## 参考文献

1. Fukazawa et al. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance *in vivo*. *Neuron*, 38, 447-460 (2003).

# αN-カテニンによるシナプス結合安定性の制御

安部 健太郎、竹市 雅俊

京都大学 院・生命科学研究科、理化学研究所発生 再生科学総合研究センター

シナプスは2つの神経細胞が物理的に接触する場である。シナプス結合は新生・消失、構造変化などの構造的可塑性を示すことが知られており、この可塑性にともない、シナプスの結合構造はダイナミックに制御されると考えられるがその制御機構に関してはあまり知られていない。

シナプス膜間の接着部位には、多くの細胞で細胞間接着を担うカドヘリン-カテニン複合体存在し、そのカドヘリンの機能を阻害するとシナプスの形態、機能ともに影響が出ることが明らかになってきた。カドヘリン-カテニン複合体の構成因子の1つ αN-カテニンはアクチン結合タンパクで、カドヘリンとアクチン骨格と接続することによってカドヘリンの接着活性を大きく制御する分子である。我々は、シナプスにおけるカドヘリン-カテニン複合体の働きを調べるため、αN-カテニンのノックアウトマウスを作成し、海馬初代神経細胞分散培養系を用いてシナプスへの影響を観察した。

αN-カテニンを欠損する神経細胞は見かけ上正常なシナプスを形成したが、スパインの形態に異常が見られた。また、タイムラプスムービーにより、スパインの動きを観察した結果、αN-カテニン欠損細胞では野生型細胞に比べスパインの動きが顕著に上昇しており、スパインの消失と新生によるスパインのターンオーバーが高頻度でおこることを観察した。逆に、野生型の神経細胞に αN-カテニンを過剰発現させるとスパインの動きが抑えられ、スパインのターンオーバーも抑えられた。その結果として、スパインとシナプスの過剰形成が起きることを見出した。また、αN-カテニン部分欠損分子を用いた解析から、このスパインの過剰形成には、カドヘリンと相互作用するのに必要な αN-カテニンの N 末部位とアクチン骨格と相互作用するのに重要な C 末部位が必須であることが分かった。これらの観察は αN-カテニンにはカドヘリンを介してスパインの安定性を制御する働きがあることを示唆している。

スパインの安定性は神経活動によって制御され、神経活動を長期間抑制するとスパインの形態が変化し、運動性が上昇することが知られているが、我々は、神経活動の長期抑制状態ではシナプスに集積する αN-カテニンの量が減少することを見出した。逆に神経活動を長期間上昇させるとシナプスに集積する αN-カテニンの量が増加した。また、αN-カテニンを過剰発現する神経細胞では神経伝達の長期遮断によるスパインの形態変化は観察されなかった。

これらの結果から、αN-カテニンにはスパインおよびシナプス結合を安定化する働きがあり、神経活動に応じたスパインの形態変化を制御してシナプス可塑性になんらかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

## シナプス形成と可塑性を制御する古くて新しい分子 --- デルタ受容体とシナプトトロフィン ---

**柚崎 通介、松田 恵子、飯島 崇利、幸田 和久、松田 信爾、小川 康裕**  
慶應義塾大学医学部 生理学 I

発達段階において神経細胞間に形成された特異的なシナプス結合は、その後も生涯にわたって可塑的に変化する。長期に持続する記憶は、既存のシナプスにおける機能的変化に加えて、このような神経活動に伴うシナプスの構造そのもののダイナミックに変化により担われていると考えられている。しかし、その分子の実態については未だに未解明な点が多い。近年、発達段階においてシナプス形成に関与する分子群が次々と解明されてきた。おそらく、成熟後の神経細胞においても、このような発達段階に作用する分子群が関与しているものと想像されるが、実証されている分子はほとんどない。また、これらの分子の遺伝子欠損マウスにおいても、重篤なシナプス形成異常が確認されていないものが多い。

$\delta 2$  型グルタミン酸受容体は三品らとSeeburgらにより10年前にクローニングされた。 $\delta 2$  受容体は平行線維 --- 小脳プルキンエ細胞シナプスのシナプス後膜に特異的に発現しており、 $\delta 2$  受容体欠損マウスでは、平行線維 --- プルキンエ細胞シナプスがいったん形成されたあとで、シナプスの数が著明に減少してくることを、渡辺らは発見した(J Neurosci '97)。面白いことに、成熟動物において神経活動を低下させると、異所性平行線維シナプスが新たに形成されるが、これに先立って、同部位に $\delta 2$  受容体が発現することも知られている (Morando et al., PNAS '01)。このような所見はこれまでのグルタミン酸受容体には全くみられず、 $\delta 2$  受容体は発達時のみならず成熟脳において、シナプスの形成・維持のために不可欠な、未知の役割を果たすことが示唆される。

一方、シナプトトロフィン(Stpn1)はMorganらにより、約20年前に発見されたが、その機能や信号経路は謎のままであった。私たちは、渡辺らやMorganと共同してStpn1欠損マウスを解析したところ、その表現型は、一見無関係な分子である $\delta 2$  受容体欠損マウスの所見とあまりにも酷似しているという serendipitous な発見をした(Nature Neurosci, *in revision*)。

この2つの古くてあたらしい分子は、成熟脳においても、活動依存性にシナプス可塑性(LTD)やシナプス形成に関与し、かつ遺伝子欠損マウスにおいて劇的なシナプス形成とLTDの障害が見られる。さらに、そのシナプス形態異常は、シナプス前部や後部の数や形態には影響を与えず、その接触状態のみを制御する点で特徴的であり、既知のシナプス形成分子とは異なる、新しいタイプの信号系を構成すると考えられる。私たちは、この2つの分子に注目することにより、小脳平行線維 --- プルキンエ細胞シナプスをモデルとして、成熟後の神経細胞における活動依存性シナプス形成・維持機構を解明しようと考えている。プレリミナリーなデータを中心に話し、議論の種としたい。

# 線虫 *C. elegans* における感覚情報処理の分子機構

石原 健

(九州大学大学院 理学研究院 生物科学)

動物は、環境から多数の情報を同時に受容し、その中から必要な情報を取捨選択している。また、感覚情報は、その過程で記憶などと照合して、適切な修飾を受ける場合もある。このような処理過程を非常に複雑に組み合わせ、高度な神経活動をおこない環境に適応した行動をしている。このような情報処理システムは、比較的単純な線虫のような生物でも環境に適応するために必須であると考えられる。我々は、線虫 *C. elegans* をモデル生物として用いて、このような感覚情報処理システムの分子機構や神経回路での情報処理機構の遺伝学的解析をすすめている。

我々はもっとも単純な情報処理の1つと考えられる、二つの入力から一つの出力という情報処理に着目している。我々が同定した *hen-1* 変異体は、個々の感覚刺激に対する応答は正常だが、2つの感覚情報の統合の行動測定系で異常を示す変異体として同定された。また、*hen-1* 変異体は、一種の連合学習にも異常を示すが、単純な行動の可塑性には異常を示さなかったことから、記憶の形成過程における情報の統合にも異常がある可能性がある。この変異体の原因遺伝子産物 HEN-1 は、LDL 受容体モチーフを持つ分泌タンパク質であり、2対の神経でのみ発現し、神経軸索上で点状に局在している。また、分子遺伝学的解析により、成熟した神経系において細胞非自律的に機能していることがわかった。また、HEK293 細胞で発現させた HEN-1-アルカリホスファターゼ融合タンパク質を用いて、*C. elegans* 初代培養細胞への結合実験を行ったところ、一部の細胞表面に特異的な結合が観察された。これらのことは、HEN-1 は、特異的受容体を介して神経活動の修飾に機能している可能性が考えられる。

ショウジョウバエにおける HEN-1 類似分子 *Jeb* (*Jelly belly*) は、内臓の筋肉前駆細胞の分化と細胞移動に必須の分子である。この分子の受容体は、受容体チロシンキナーゼ *Alk* (*Anaplastic lymphoma kinase*) の相同分子であり、*Jeb* と同様に内臓の筋肉の正常な発生に必須である *DAIk* であることが明らかになった。哺乳類において、*Alk* は中枢神経系で発現しているが、その機能は不明である。線虫 *C. elegans* における *Alk* 相同分子 *SCD-2* は、耐性幼虫形成制御に関わる分子として同定されているが、神経系での情報処理に関わる機能は不明である。そこで、*scd-2* 変異体について、感覚情報の統合と連合学習の表現型を解析した。その結果、銅イオンと匂い物質との統合の測定系と、NaCl と飢餓とを条件刺激として用いた連合学習のパラダイムにおいて、*hen-1* 変異体と同様の表現型を示すことが明らかになった。また、*scd-2* のプロモーター-GFP 融合遺伝子は、頭部の一部の神経で発現していた。これらのことは、*SCD-2* が *HEN-1* と同じ経路で機能していることを示唆しているとともに、*C. elegans* は *Alk* の神経系における機能を明らかにするための良いモデル系であることを示していると考えられる。

# ショウジョウバエによる加齢性記憶障害の分子機構の解析

齊藤 実

東京都神経科学総合研究所 神経機能分子治療

いかなるヒトも老化に伴って起こる学習・記憶力の低下から逃れることは出来ない。このような加齢性記憶障害(Age-related Memory Impairment, AMI)はどのような遺伝子の働き、失調により起こるのであろうか？AMIは学習による記憶情報の獲得から、その統合・安定化に至る複雑な学習記憶過程(分子機構)の非特異的な障害と考えられてきた。しかし従来の哺乳類モデルでは、例えばマウスでもその寿命が2~3年に及ぶことが障害となり、こうした仮説に対する検証をはじめ分子機構の解明は殆ど進んでこなかった。ショウジョウバエの遺伝子はその約8割が哺乳類と共通であり、哺乳類と極めてよく似た学習記憶の分子機構を持つ。何よりマウスに比べてショウジョウバエは寿命が約1ヶ月と短い。我々は寿命が短いショウジョウバエでもAMIが起こるのであれば、これを新たなモデル動物として、今まで困難であったAMIの分子機構の解析が可能と考え、AMIの行動遺伝学的解析を行ってきた。その結果AMIが、これまで考えられていたような学習記憶過程の非特異的な障害ではなく、*amnesiac (amn)*という遺伝子に依存する記憶成分(中期記憶)に対する、極めて特異的な障害に起因することを明らかにした。さらに興味深いことに若いときからAMI様の記憶障害を示す*amn*変異体は寿命が野生型と比べ約40%も延びており、逆に長命変異体の中には*amn*変異体同様の記憶障害を示すものがあった。これらのことから脳の高次機能と老化とに共役した何らかの分子機構が示唆された。

# 脳機能解析を目的とした遺伝子改変マウスの作成とその使い方

柳川 右千夫

群馬大・大学院医学系研究科 遺伝発達行動学

脊椎動物の脳には多種類の神経細胞が存在するが、特定の細胞を標的として遺伝子を発現させるのは簡単ではない。例えば、GABA ニューロン特異的に GFP を発現するマウス(GAD67-GFP ノックインマウス)を遺伝子標的法で作成したが、労力が大きかった。そこで、機能プローブを特定の細胞に容易に発現させることを目的として、以下の2種類のシステムについて、検討した。

## (1) Cre-loxP システムを利用したトランスジェニックマウス)

シナプトフルオリン(SpH ;シナプス小胞内の pH 動態をモニターする)遺伝子を組み込んだ loxP ターゲティングマウス (oxP-SpH マウス)を作成した。loxP-SpH マウスとCAG-Cre (beta-actin プロモーターの下流に Cre recombinase 遺伝子を配置した)マウスとを交配して生まれた仔の脳では、SpH の発現がほとんどすべての細胞で観察された。一方、海馬の顆粒細胞に Cre recombinase が発現する CaMKII-Cre マウスと交配して生まれた仔では、海馬の苔状線維に SpH の発現が観察された。以上の結果は、Cre-loxP システムに基づいて2種類のトランスジェニックマウスを使用することにより、機能プローブを特定の細胞に発現できることを示している。今後、様々な機能プローブを組み込んだ loxP ターゲティングマウスと様々な Cre マウスとを作成することにより、種々の神経細胞に選択的に機能プローブを発現させて解析可能にする。

## (2) Thy-1 プロモーターを利用したトランスジェニックマウス)

Thy-1 プロモーターは、神経細胞特異的に遺伝子を発現させたい場合に使用されている。実際に、Thy-1 プロモーターの下流に SpH 遺伝子を配置したトランスジェニックマウスを作成した。6ライン樹立して解析した結果、それぞれ異なる発現パターンを観察した。中でも海馬錐体細胞、小脳顆粒細胞に SpH が発現することから、これらの細胞に機能プローブを発現させたい場合には有効なシステムであることが確認された。