

八木 健

大阪大学大学院生命機能研究科・教授

神経細胞の個性がつくる神経回路とセルアセンブリ

## §1. 研究実施体制

### (1) 八木グループ

① 研究代表者: 八木 健 (大阪大学大学院生命機能研究科、教授)

② 研究項目

- ・ cPcdh- $\beta$ の個々の神経細胞での発現解析
- ・ cPcdh のランダムな発現による神経細胞の個性についての数理的解析
- ・ cPcdh 多様性減少マウスの作製と解析
- ・ 興奮性神経細胞での CTCF 欠損マウス作製による cPcdh 発現制御と大脳皮質の体性感覚野バレル形成の解析
- ・ cPcdh 遺伝子全欠損マウスの作製
- ・ iPS 細胞を用いた cPcdh 発現制御の解析

### (2) 澁木グループ

① 主たる共同研究者: 澁木 克栄 (新潟大学脳研究所、教授)

② 研究項目

- ・ フラビン蛋白蛍光イメージングと2光子顕微鏡を用いた大脳皮質高次感覚野の解析

### (3) 平林グループ

① 主たる共同研究者: 平林真澄 (生理学研究所、准教授)

② 研究項目

- ・ cPcdh 遺伝子全欠損マウス由来 iPS 細胞及び野生型 iPS 細胞からのキメラマウス作製
- ・ キメラマウスを用いた大脳皮質の局所神経回路の電気生理学的解析

## § 2. 研究実施内容

### (2-1) 研究のねらい

クラスター型プロトカドヘリン (cPcdh) 分子群による神経細胞の個性化メカニズムと標的認識による神経回路形成メカニズムを明らかにし、これを操作することにより、発生プログラムにおいて形成される神経回路の特性を捉え、経験依存的に形成される機能的なセルアセンブリの形成や動作原理を明らかにし、統合された脳機能をもたらす新たな仕組みを明らかにする。本年度は、神経細胞において個性的に発現している cPcdh 分子群の遺伝子制御機構、cPcdh 多様性の脳機能における役割、神経回路形成、多様性の数理的な解析について成果があった。

### (2-2) 研究実施内容

#### 1) cPcdh 分子群の遺伝子制御機構の解析

これまでに cPcdh- $\alpha$ 、cPcdh- $\gamma$  について個々の神経細胞でのランダムな個性的発現が認められていたが、cPcdh- $\beta$  については不明であった。本年度は、cPcdh- $\beta$  クラスターにある 22 のメンバーについての解析を行った。その結果、cPcdh- $\beta$ 1 以外の全てのメンバーがランダムな発現をしていることが明らかとなった<sup>1)</sup>。また、このランダムな制御が CTCF により制御されていることを、興奮性神経細胞のみで CTCF を欠損させたマウスを作製することにより明らかにした<sup>2)</sup>。CTCF はランダムに発現する cPcdh- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\gamma$  メンバーの全てのプロモーター領域に結合し、また、以前に我々が明らかにしたエンハンサー領域にも結合していることが明らかとなっている。また、この CTCF 欠損マウスでは感覚入力依存的に形成される皮質体性感覚野バレル構造が形成されていなかった。このマウスでの層構造や脳領域での異常が認められないことから、CTCF は感覚入力依存的な神経回路形成機構に関わることが示唆された。以前、我々は cPcdh- $\beta$  メンバーのランダムな発現制御に関わるエンハンサー領域を欠損させたマウスにおいて皮質体性感覚野バレル構造の異常を観察していることから (Yokota et al., 2011)、cPcdh のランダムな発現制御と神経活動依存的な神経回路形成との関連性があるのではないかと考えている。

#### 2) cPcdh 多様性の脳機能における役割の解析

本年度、cPcdh- $\alpha$  クラスターにあるメンバー数を変換したマウスを遺伝子操作法により作製した。その中で、 $\alpha$ 1のみを残し他のメンバーを欠損させたマウス ( $\alpha$ 1マウス) では、野生型マウスではランダムに発現している  $\alpha$ 1 が全ての神経細胞で発現する様になった<sup>3)</sup>。また本年度、澁木グループにより cPcdh- $\alpha$  クラスターでランダムに発現する 12 種類のうち、 $\alpha$ 2 から  $\alpha$ 11 までが欠損し、 $\alpha$ 1 か  $\alpha$ 12 のどちらかが発現するマウス ( $\alpha$ 1/12 マウス) の解析を行った。このマウスは見た目健康で野生型マウスを全く見分けがつかないが、高次脳機能における異常が認められた。即ち、ヒゲ入力と視覚入力の空間情報が食い違う時生じる視覚野抑圧がこの  $\alpha$ 1/12 マウスでは阻害されていた。視覚野抑圧には後部頭頂連合野 (PPC) が重要な働きをすることが判っているので、PPC が関わる空間情報の作動記憶を担う機能について T 字迷路実験により解析した結果、この  $\alpha$ 1/12 マウスでの障害が

明らかになった。また、本年度は cPcdh- $\alpha$ 全欠損でのヒゲ入力による視覚野抑圧の異常を確認するとともに、このマウス大脳皮質の神経回路再編成における異常を明らかにし発表した<sup>4)</sup>。

また、全ての cPcdh 遺伝子を欠損した遺伝子改変マウスを作製した結果、このマウスは生後直後に全く動かずに死亡することが明らかとなった。昨年度は、平林グループによりこのマウスから iPS 細胞を樹立し、キメラマウス(cPcdh 全欠損キメラマウス)を作製し、大脳皮質の急性スライス標本から電気生理学的解析を行った結果、cPcdh 全欠損細胞において機能的シナプスが形成されていることが明らかになった。しかし、バレル皮質4層において2個の星状細胞(興奮性神経細胞)から同時ホールセル記録を行った結果、野生型マウス由来 iPS 細胞の神経細胞間では、双方向にシナプス結合がみられるペアが70%であった。この結果から、同じ progenitor 由来の神経細胞同士は高い確率で双方向性シナプス結合を形成していることが明らかになった。一方、cPcdh 全欠損 iPS キメラにおける iPS 細胞間でのシナプス結合確率は野生型キメラマウスとほぼ変わらないのに対して、双方向性シナプス結合確率は33%と有意に減少し、代わりに一方向性のシナプス結合が増加していた。次に皮質内における網羅的なシナプス機能解析を行うためにレーザースキャン光刺激法を用いて cPcdh 欠損細胞に投射する興奮性細胞の空間配置およびシナプス入力数を調べたところ、広域の興奮性入力範囲は野生型と cPcdh 全欠損キメラマウスの間に差は見られなかったが、記録細胞が存在する同一バレル内からの入力が有意に高いことが明らかとなり、ランダムに発現している cPcdh が大脳皮質における局所的神経回路の形成で機能していることが示唆された。

### 3) 個々の神経細胞でランダムに発現する cPcdh 多様性の数理的解析

これまでの cPcdh の発現解析より、単一神経細胞では、12種の $\alpha$ メンバーから2つ、22種の $\beta$ メンバーから4つ、19種の $\gamma$ メンバーから4つがランダムな組み合わせで発現していることが明らかとなってきた。これらの結果により、cPcdh は神経細胞に  $3 \times 10^{10}$  の多様性を与えることが可能となることが計算される。また、発現した cPcdh はタンパク質レベルでヘテロ4量体を形成し、ホモフィリックに結合することが示唆されている。単一神経細胞では、恒常的に発現する5種の cPcdh を加えて15種の cPcdh タンパク質がランダムな組み合わせで発現していることが想定され、結果、神経細胞あたり約1万種類のヘテロ4量体ができることが考えられる。このヘテロ4量体は、発現している cPcdh 種が15個全て同一であれば神経細胞同士で100%同じヘテロ4量体をもつことになるが、興味深いことに15種のうち1種異なるだけで76% ( $14/15^4$ ) となり、15種の内5種が一致していても1.2% ( $5/15^4$ )しかヘテロ4量体は一致しないことになる。この様に cPcdh のランダムな発現とヘテロ4量体により、神経細胞の個性が指数関数的関係となることが考えられる<sup>5)</sup>。大脳皮質や海馬での局所回路では long-tail なシナプス負荷の分布が知られており、これらとの関係を考えると、興味深い。

また、クラスター型プロトカドヘリンについての総説を執筆した<sup>6)</sup>。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ● 論文詳細情報

1. Hirano K, Kaneko R, Izawa T, Kawaguchi M, Kitsukawa, and T, Yagi T (2012). Single-neuron diversity generated by Protocadherin- $\beta$  cluster in mouse central and peripheral nervous systems. *Front. Mol. Neurosci.* 5: 90. (DOI: 10.3389/fnmol.2012.00090)
2. Hirayama T, Tarusawa E, Yoshimura Y, Galjart N, and Yagi T. (2012) CTCF is required for neural development and stochastic expression of clustered Pcdh genes in neurons. *Cell Reports* 2: 345-357. ( DOI: org/10.1016/j.celrep.2012.06.014 )
3. Hasegawa S, Hirabayashi T, Kondo T, Inoue K, Esumi S, Okayama A, Hamada S, and Yagi T. (2012) Constitutively expressed Protocadherin-a regulates the coalescence and elimination of homotypic olfactory axons through its cytoplasmic region. *Front. Mol. Neurosci.* 5: 97. (DOI: 10.3389/fnmol.2012.00097)
4. Yamashita H, Shanlin C, Komagata S, Hishida R, Iwasato T, Itohara S, Yagi T, Endo N, Shibata M, and Shibuki K. ( 2012 ) Restoration of contralateral representation in the mouse somatosensory cortex after crossing nerve transfer. *PLoS One* 7: e35676. (DOI:10.1371/journal.pone.0035676)
5. Yagi T. (2012) Molecular codes for neuronal individuality and cell assembly in the brain. *Front Mol Neurosci* 5: 45. (DOI: 10.3389/fnmol.2012.00045)
6. Hirayama T, Yagi T (2013) Clustered Protocadherins and Neuronal Diversity. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 116: 145-167. (DOI: 10.1016/B978-0-12-394311-8.00007-8)