

「脳を知る」

平成9年度採択研究代表者

村上 富士夫

(大阪大学大学院基礎工学研究科 教授)

「脳の神経回路形成と可塑性の分子機構」

1. 研究実施の概要

神経結合の可塑性は、学習、記憶をはじめとする、脳の様々な高次機能を担っている。したがってその分子機構の解明は、脳の機能の仕組みを知る上で極めて重要な問題である。神経結合の可塑的变化が生じるときには軸索伸長、側枝の形成、標的認識、シナプス形成など、脳の発達期に起こる様々な現象が繰り返される。したがって神経結合の可塑性の分子機構の解明をおこなうためには、神経回路形成の分子機構を明らかにし、それを手掛かりに研究を進めてゆくことが有効な方法である。本研究ではまず神経回路形成の分子機構の解明を進め、その成果をふまえ、神経結合の可塑的变化の分子機構の解明を目指す。神経結合の可塑的变化のうち最も代表的なものとして、lateralityの変更が挙げられる。そこでこの問題に焦点を絞り、まず軸索の正中交差の分子機構の解明をおこなった後、lateralityの変更を伴うような可塑性のメカニズムを解明することを最終目標として研究をおこなった。

2. 研究実施内容

1. フロアプレートにおける反応性の変化と前後軸に沿った軸索の走行

神経管の腹側正中線にあるフロアプレートを通じた軸索はその後直角に曲がって吻側及び尾側に向かって走行を始める。どのような機構でこのような方向転換が起こるのかは神経発生の基本的課題の一つである。我々はこの問題にアプローチする事を可能にするin vitroのシステムの開発に成功した。現在このシステムを用いて研究を進めている。

2. 前後軸方向への軸索の伸長方向を規定するメカニズムに関する研究

管状の構造をしている発生初期の脳（神経管）において、軸索が伸長し標的に投射する為に必要な軸索の伸長方向成分は、単純化すると背腹軸方向と前後軸方向の2成分と考えることができる。これまで背腹軸方向への軸索の伸長方向を規定するメカニズムに関しては研究が進んできた。しかし、前後軸方向への軸索の伸長方向を規定するメカニズムに関しては殆ど研究が進んでいなかった。中脳ドーパミン作動性ニューロン（MDN）は、成体では標的領域が、細胞体が存在する中脳より前側に存在しており、上述の前後軸方向への問題を解明するのに適し

た系であると考えられる。そこで"前後軸方向への軸索の伸長方向を規定するメカニズムを明らかにする"ということを目的に、MDNの軸索が前方向に伸長することを決定する時期の軸索投射パターンをin vivoで明らかにし、更にMDNの軸索投射パターンを再現する培養系を確立し、その培養系を用いてメカニズムの解析を行った。

そのために神経管の前後軸及び背腹軸と軸索投射パターンの位置関係を正確に知ることができるラット脳の2次元展開標本を作製し、MDNの特異的なマーカーである抗チロシン水酸化酵素抗体を用いてin vivoのMDNの軸索投射パターンを解析した。その結果、中脳の腹側部で誕生したMDNは、胎生12日目（E12）正午の標本で軸索が前方向に伸長する傾向が見られ始め、E13の標本では全ての軸索が前方向に向かって伸長していることが観察された。以上のin vivoの結果を受け、MDNの軸索が前方向に伸長することを決定し始める時期であるE12正午の標本を以下の培養実験に用いた。

E12正午の2次元展開標本を1日培養すると、培養系でin vivoのE13様にMDNの軸索が前方向に伸長することが再現できた。そこでMDNが存在する中脳以外の領域がそのメカニズムに寄与しているかを検討する為、中脳の後側に位置する峽や前側に位置する間脳を除去した標本を作成し培養を行った。その結果中脳のみの標本においても、MDNの軸索が前方向に伸長することが再現できた。更に、MDNが軸索を前方向に伸長する為に必要な"前後軸に関する極性"を保持しているのが、細胞体自身なのか、それとも軸索が伸長していく神経管の基質なのかを明らかにする為、左脳由来のMDNの軸索を、細胞体自身の本来の前後軸とは180度反転した前後軸を持つ右脳の神経管上に伸長させる実験を行った。その結果左脳のMDNの軸索は、左脳の神経管内を伸長する時は左脳の神経管の前方向に向かって伸長するが、一旦右脳の神経管内に侵入すると、伸長方向を変化させ右脳の神経管の前方向にむかって伸長する様子が観察された。この結果は神経管の基質が前後軸に関する何らかの極性を有しており、その極性が中脳ドーパミン作動性ニューロンの軸索を前方向に伸長する事を規定するメカニズムであることを示唆している。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Yamada, K., Yamamoto, N. and Toyama, K. : Development of membrane properties of rat neocortical neurons studied in organotypic cocultures. *Neurosci. Lett.*, 275, 65-68 (1999)
- Tashiro, Y., Endo, T., Shirasaki, R., Miyahara, M., Heizmann, C.W. and Murakami, F. : Afferents of cranial sensory ganglia pathfind to their target independent of the site of entry into the hindbrain. *J. Comp. Neurol.*, 417, 491-500 (2000)

- Yamamoto, N., Matsuyama, Y., Harada, A., Inui, K., Murakami, F. and Hanamura, K.: Characterization of factors regulating lamina-specific growth of thalamocortical axons. *J. Neurobiol.*, 42, 56-68 (2000)
- Goshima Y, Hori H, Sasaki Y, Tao Y, Kagoshima-Maezono M, Chaxia Li, Takenaka T, Nakamura F, Takahashi T, Strittmatter SM, Misu Y and Kawakami T: Growth cone neuropilin-1 mediates collapsin-1/Sema III facilitation of antero- and retrograde axoplasmic transport. *J. Neurobiol.*, 39, 579-589 (1999)
- Nakayama T, Goshima Y, Misu Y and Kato T: Role of cdk5 and tau phosphorylation in heteromeric G protein-mediated retinal growth cone collapse. *J. Neurobiol.*, 41, 326-339 (1999)
- Sasaki, Y, Noda, M, Goshima, Y, Shimonaka, M, and Misu, Y: Possible involvement of tyrosine kinase in collapsin-1-induced growth cone collapse. *Jpn. J. Pharmacol.*, 79, Suppl. 261P (1999)
- Kobayashi, K., and Nagatsu, T.: Mutant mice lacking the tyrosine hydroxylase gene and transcomplementation with the human genome: Ongoing prospects for human genetherapy. *Biogenic Amines*, 15, 1-20 (1999)
- Kobayashi, K., and Sano, H. : Dopamine deficiency in mice. *Brain Dev.*, 21, 1-6 (1999)
- Kobayashi, K., Noda, Y., Matsushita, N., Nishii, K., Sawada, H., Nagatsu, T., Nakahara, D., Fukabori, R., Yasoshima, Y., Yamamoto, T., Miura, M., Kano, M., Mamiya, T., Miyamoto, Y., and Nabeshima, T. : Modest neuropsychological deficits caused by reduced noradrenaline metabolism in mice heterozygous for a mutated tyrosine hydroxylase gene. *J. Neurosci.*, 20, 2418-2426 (2000)