

「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

これまで我々は後脳展開標本を用い、底板の誘引・反発活性が中脳後脳の神経管における背腹軸方向に投射する神経回路形成に中心的な役割を果たすことを示した。昨年度の研究では前脳における神経回路形成に脈絡叢による反発性軸索ガイドが重要な働きをしていることをしめした。さらに前庭神経節 - 小脳投射をモデル系として用いておこなった研究で、神経管の吻尾軸にそった軸索走行のを規定する要因として短距離作動性の因子が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

またそのほか大脳皮質への層特異的視床線維の投射の形成に GPI 結合型タンパクや NCAM に結合するポリシアル酸が関与すること、反発性軸索ガイド分子セマフォリンが、神経成長円錐のみならず、軸索輸送促進、肺分岐形成制御に関わること、低分子量 GTPase を介するシグナル伝達系が軸索パターン形成に必須であること等を明らかにした。

2. 研究実施内容

神経管における基本神経回路は碁盤の目のような構造をしており、吻尾軸に沿ったものと背腹軸に沿ったものに大別することができる。そこでこれまでの研究では神経回路形成の基本原則を明らかにするために吻尾軸に沿う投射と背腹軸に沿う投射の機構をいくつかのモデル系を用いて研究してきた。また層状構造に依存する神経回路形成の機構を解明を進めてきた。

1) 背腹軸に沿う神経投射の機構

脈絡叢による反発性軸索ガイドの研究

底板は間脳の後部までしかその存在が確認できない。いっぽう背腹軸に沿った交叉性、非交叉性軸索は当然終脳にも多数存在する。脈絡叢は側脳室、第3および第4脳室内に存在する組織であり、胎生期に終脳・間脳境界部、間脳蓋板および後脳蓋板の脳室内への陥入により生じる。我々は胎生期ラットの脈絡叢上皮組織が拡散性分子を分泌して視床上部の手綱核の軸索を反発する作用を持ち、この軸索のガイドに関与する可能性をまず証拠をみいだした。またこの脈絡叢由来拡散性軸索反発分子の同定を試みている。現在のところ Sema3F が有力な候補と

して挙がっている。

2) 吻尾軸にそった軸索走行の機構

前庭神経節 - 小脳投射の形成機構の研究

後根神経節や延髄の感覚神経節由来の軸索の多くは脳または脊髄の進入後前後軸にそって走行し、標的に到達する。その機構の解明のため前庭神経節由来の求心性投射をモデル系としてもちいて研究をおこなった。なかでも前庭神経節由来の繊維の上行枝は小脳に最初に到達する苔状線維であるため同定が容易である。そのため、前庭神経節 - 小脳投射に着目して研究をおこなった。その結果、前庭神経節 - 小脳投射形成全ての局面が延髄及び小脳原基の基質に存在する極性を持たない局所的なガイドキューによって説明できることが明らかになった。

3) 背腹軸にそった走行から吻尾軸に沿った走行への変化

底板における反応性の変化と前後軸に沿った軸索の走行

底板を通過し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。このシステムを用いて後脳の交差性ニューロンの挙動を調べたところ、正中線近傍の基板に存在する長軸方向に分布するキューがこの方向転換に関与していることが明らかになった。興味深いことに成長円錐は正中線に到達するまではこのキューに反応せず、底板を越えてからはじめて反応するようになる。すなわちこのことは前項の場合とは異なり、成長円錐は底板と遭遇することにより反応性を獲得することを意味している。

4) 大脳皮質の神経回路形成機構

大脳皮質の神経回路における基本構造の一つに層特異性が挙げられ、脳の特異的な神経回路の形成機構を明らかにする上で非常に有用な系である。中でも視床から大脳皮質への結合については形態学的・生理学的な研究から詳細な記述がなされ、視床ニューロンの軸索は大脳皮質の4層で主として枝分かれを作りシナプス結合を作ることが知られている。これまでに、発生学的な研究や我々による *in vitro* 標本での研究から、この特異的な投射パターンが視床軸索による標的認識の機構によって作り出されることが明らかになってきたが、分子機構についてはほとんど知られていなかった。そこで、スライス培養法、タイムラプス法、生化学的な酵素処理を用いて大脳皮質への層特異的視床線維の投射パターンの形成を担う分子機構の特性を明らかにすることを目的として研究を行った。特に、4層で生ずる軸索の停止や枝分かれを制御する膜結合型の因子の特性を明らかにするために、化学的に一旦固定した大脳皮質切片上で視床組織片を培養し、視床からの軸索伸長ならびに枝分かれ形成について調べた。

まず神経成長活性に層特異性の有無を調べるために、視床軸索を層と平行に侵入させたところ、視床ニューロンの軸索は5、6層から白質にかけて成長が著しかった。ところが、固定皮質切片をあらかじめ PI-PLC によって処理すると、深層での成長は変化しないのに対して浅層での伸長が有意に増加した。また、ノイラミニダーゼ処理によって深層での軸索伸長が若干減少した。分枝については、固定皮質切片上においても標的である4層で特異的に枝分かれが生ずることが分かった。皮質切片をあらかじめノイラミニダーゼあるいは endoN で処理しておくことで枝分かれの個数が有意に増加し、標的層特異性は弱まること示された。以上の結果から、皮質浅層に分布する GPI アンカー型の分子が軸索伸長に抑制的に働いて層特異的な視床軸索の終止に貢献していること、並びにシアル酸自身あるいはそれを含む分子が軸索伸長には促進的に逆に分枝形成には抑制的に作用して層特異的な枝分かれの形成に関与している可能性が示唆された。加えて、電気生理学的な研究により、皮質ニューロンの分化やシナプス形成における層特異的な分子発現の様式が明らかになった。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Wada, T., Kagawa, T., Ivanova, A., Zalc, B., Shirasaki, R., Murakami, F., Iemura, S., Ueno, N. and Ikenaka, K.: Dorsal spinal cord inhibits oligodendrocyte development. *Dev. Biol.* 227, 42-55 (2000)

Song, W.-J., Baba, Y., Otsuka, T. and Murakami, F.: Characterization of Ca²⁺ channels in rat subthalamic nucleus neurons. *J. Neurophysiol.* 84, 2630-2637 (2000)

Yamamoto, N., Inui, K., Matsuyama, Y., Harada, A., Hanamura, K., Murakami, F., Ruthazer, E. S., Rutishauser, U. and Seki, T.: Inhibitory mechanism by polysialic acid for lamina-specific branch formation of thalamocortical axons *J. Neurosci.* 20, 9145-9151 (2000)

Tashiro, Y., Miyahara, M., Shirasaki, R., Okabe, M., Heizmann CW., and Murakami F : Local Nonpermissive and Oriented Permissive Cues Guide Vestibular Axons to the Cerebellum. *Development* 128, 973-981 (2001)

Ijichi, H., Tanaka, T., Nakamura, T., Yagi, H., Hakuba, A. and Sato, M.: Molecular cloning and characterization of a human homologue of TBPIP, a BRCA1 locus-related gene. *Gene*, 248 : 99-107 (2000)

Nagano, T., Nakamura, A., Konno, D., Kurata, M., Yagi, H. and Sato, M.: A2 Pancortins (Pancortin-3 and -4) are the dominant Pancortins during neocortical development. *J. Neurochem.*, 75 : 1-8 (2000)

Keng, V. W., Yagi, H., Ikawa, M., Nagano, T., Myint, Z., Yamada, K., Tanaka, T.,

Sato, A., Muramatsu, I., Okabe, M., Sato, M., and Noguchi, T.: Homeobox gene Hex is essential for onset of mouse embryonic liver development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1276(3): 1155-1161(2000)

Takemoto T, Sasaki Y, Hamajima N, Goshima Y, Nonaka M and Kimura H : Cloning and characterization of the *Caenorhabditis elegans* CeCRMP/DHP-1 and -2 ; common ancestors of the CRMP and dihydropyrimidinase. *Gene*, 261, 259-267(2000)

Aizawa H, Wakatuki S, Ishii A, Moriyama K, Sasaki Y, Ohashi K, Sekine-Aizawa Y, Sehara-Fujisawa A, Mizuno K, Goshima Y and Yahara I.: Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin3A-induced growth cone collapse. *Nature Neurosci.* 4, 367-373(2001)

Iwawaki, T., Kohno, K., and Kobayashi, K.: Identification of a potential Nurr1 response element that activates the tyrosine hydroxylase gene promoter in cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274(3), 590-595(2000)