

機能的神経回路構築の分子基盤の研究

I 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

機能的神経回路網の構築原理を解明することは、高次神経・精神活動を司る脳を理解する上で極めて重要な課題のひとつである。さらに、急速な高齢化社会を迎えている我が国では、アルツハイマー病をはじめとする痴呆性疾患、神経変性疾患等の困難な脳神経疾患の克服が、社会的な問題となっている。

本提案では、シナプス機能の発現と可塑性の過程を含めた高次脳機能を担う神経回路形成過程の全体像を分子レベルで理解することを目指す戦略的研究を行う。このために、遺伝学的解析のより容易なモデル生物での解析とマウスなどの哺乳類での解析の相互乗り入れを積極的に推進し、脳細胞の発生、軸索の伸長と標的認識、回路の機能発現を制御する分子群の単離・同定とその生理機能の解明を行う。また特に哺乳動物のモデル系であるマウスを用いて、神経回路の構築制御遺伝子を、細胞、組織、個体の各レベルで操作する技術を確認する。さらにこの知見および技術を元に、重要な機能分子の発現・機能の動態を細胞レベルあるいは組織レベルで可視化し得るようなモデル動物の作製技術およびその画像解析技術を開発する。以上のような戦略的研究の集約により、脳の発生・発達過程における機能的神経回路構築の分子基盤を明らかにする。

2. 研究内容及び目標

1. 転写因子による神経回路形成制御に関する研究

脳神経系の構築過程では、多様性に富んだ神経細胞が複雑な神経回路網を形成する。この神経細胞の多様な性質の多くは転写因子によって決定されている。本研究では神経細胞の分化を制御する代表的な転写因子に注目し、神経回路形成に果たす役割を明らかにする。

(1) LIM ドメイン型転写因子による神経回路形成制御に関する研究（理化学研究所脳科学総合研究センター 岡本仁）

運動神経細胞と感覚神経細胞では、それらのサブタイプがLIMドメイン型転写因子の組み合わせ（LIMコード）によって規定される。本研究では、ゼブラフィッシュを主たる実験材料として用い、LIMドメイン因子群の神経回路形成における役割を解明する。

(2) Znフィンガー型転写因子による神経回路形成制御に関する研究（理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター 有賀純）

Znフィンガー型転写因子は初期神経系のパターン形成および神経細胞の分化に関わる。本研究では、トランスジェニックおよびノックアウトマウスを用いて、Znフィンガー型転写因子により決定される神経細胞の特異性、およびその特異化から機能的神経回路形成に至る経路を明らかにする。

(3) HLH型転写因子による神経回路形成制御に関する研究（京都大学ウイルス研究所 影山龍一郎）

哺乳動物の神経発生は多くのHLH型転写因子によって正と負に制御されると考えられるが、その詳細は未だ明らかではない。本研究では、標的遺伝子破壊法やレトロウイルス導入法を用いて、複数のHLH型因子遺伝子に異常を持つ変異マウスを作製し、神経回路形成制御機構を明らかにする。

2. 脳の分節化・特異化による回路形成制御機構に関する研究

神経系の形成過程では、前後軸および背腹軸にそった領域特異化がおり、神経細胞の配置や軸索誘導の位置情報が与えられることが示唆されている。本研究では、脳の領域特異化から神経回路網形成に至る分子機構を明らかにする。

(1) 脳分節形成と軸索誘導の分子機構に関する研究

（厚生省国立精神・神経センター神経研究所、東北大学医学部 大隅典子）

脳の分節的な構築が神経回路の形成に重要であることが示唆されているが、その詳細は明らかではない。本研究では、全胚培養下での脳組織について、細胞標識法および電気穿孔法による遺伝子導入法を駆使して、細胞分化の系譜あるいは神経軸索の走行を解析し、脳分節の形成機構、脳分節による初期回路の制御機構を明らかにする。

(2) 前脳における組織構築と回路網形成の分子機構に関する研究（東京大学大学院医学系研究科 中福雅人）

前脳は将来の大脳皮質、基底核などの高次脳機能の中核を生み出す原基であるが、その神経回路構築の分子機構については不明である。本研究では、器官・細胞培養系や全胚培養系での遺伝子操作を通じて、前脳神経板のパターン形成・領域特異化が脳の神経構築、および領域間相互の神経回路網の形成にどのように寄与するかを明らかにする。

(3) 網膜視蓋投射形成の分子機構に関する研究（東北大学加齢医学研究所 仲村春和）

網膜-視蓋間の回路形成では、視蓋は二次元的に正確な対応で網膜からの投射を受ける。本研究では、FGF8, Pax6, Otxといった因子よりなる、視蓋分化をひきおこ

す遺伝子カスケードを明らかにし、網膜-視蓋投射形成の分子機構を解明する。

3. 神経回路形成を制御する細胞間相互作用に関する研究

神経回路網は、個々の神経細胞がその標的細胞を正確に認識し、シナプス結合をつくることによって形成される。この過程は、神経細胞間の特異的な相互作用によって制御されている。本研究では、細胞間相互作用に直接関わる接着因子や軸索誘導・反発因子といった機能分子を同定し、回路形成における役割を明らかにする。

(1) 神経回路構築における細胞接着分子群の機能に関する研究（助大阪バイオサイエンス研究所，理化学研究所脳科学総合研究センター 吉原良浩）

免疫グロブリン超分子群は、神経回路の形成・維持・可塑性など様々な現象に関与することが示唆されている。本研究では、嗅覚神経系をモデルシステムとして、テレンセファリン、BIG-1、BIG-2、OCAM等の接着分子群の機能解析を進めるとともに、新規分子の探索を行い、機能的神経回路構築における細胞接着分子群の役割を明らかにする。

(2) 特異的シナプス形成の分子機構に関する研究（東京大学大学院理学系研究科 能瀬聡直）

本研究では、ショウジョウバエをモデルとして、シナプス形成時における標的細胞の認識機構を明らかにする。特に神経-筋認識分子Capriciousについて、シナプス形成初期過程におけるシグナル伝達機構を探る。また、異所発現トラップ法を用いた遺伝子スクリーニング法を用いて、新規機能分子の同定を試みる。

(3) 神経軸索の正中交差を制御する分子機構に関する研究（筑波大学基礎医学系 樹正幸）

神経軸索の選択的伸長に必要な軸索誘導因子の解析は、近年急速に進みつつある。しかしながら、軸索の正中交差の分子機構については、未だ不明な点が数多く残されている。本研究では、ショウジョウバエ遺伝子の脊椎動物相同遺伝子および底板細胞特異的な分泌因子の単離を行い、軸索の正中交差を制御する分子機構を解析する。

4. シナプスの機能発現を担う機能分子に関する研究

機能的な神経回路網は、まず遺伝的プログラムによって形成された後、外界からの入力信号により修飾・再編成され、可塑性などの動的活性を獲得してはじめて完成される。この神経活動に依存した機能的神経回路の形成機構について、発生工学、電気生理学、あるいはレーザーを利用した新たな方法を駆使して明らかにする。

(1) 発達における視皮質可塑性の分子メカニズムに関する研究（理化学研究所脳科学総合研究センター Hensch Takao）

発達期の視覚経験は、左右の眼からの入力間の競合を引き起こし、大脳新皮質の神経結合の機能的および構造上の精緻化を促進する。この神経活動に依存した神経回路網の形成と可塑性のメカニズムを、可塑性に関与する機能分子

の薬理的なブロックあるいは遺伝子欠損マウスを用いた解析により明らかにする。

(2) シナプス機能発現の分子機構に関する研究（上智大学生命科学研究所 熊倉鴻之助）

神経回路網の機能的単位であるシナプスでは、伝達物質の放出が時間的・空間的に厳密に制御されている。本研究では、細胞内機能分子のレーザー不活性化や分泌顆粒の標識操作により、伝達物質放出過程の分子機構を時空間的に解析する。

(3) 機能的神経回路形成に関わる新たな分子群の探索（岡崎国立共同研究機構生理学研究所 八木健）

非レセプター型チロシン酸化酵素 Fyn はシナプスに存在し、学習・情動行動制御に深く関わっている。本研究では、この Fyn と共役する新規分子群を探索し、遺伝子欠損マウスを用いて機能的神経回路形成における新たな機能を明らかにする。

5. 機能的神経回路形成過程の可視化技術の開発に関する研究

神経活動に依存したシナプス機能の発現にいたる過程、特にシナプスの完成期における可塑的变化は、シナプスおよび樹状突起の形態学的変化を伴う場合があるが、その詳細は不明である。本研究では、可視化分子をコードする遺伝子を導入・発現したモデル動物の作製、およびその超高度・高解像度イメージング装置を開発し、機能的神経回路の構築過程の可視化技術を確立する。

(1) 中枢神経シナプスの形成過程および機能発現に伴う構造的変化に関する研究（通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所，東京医科歯科大学医学部 岡部繁男）

シナプスの可塑的变化のメカニズムを解明するためには、生きた状態の神経細胞の突起形態を可視化し、可視的变化の前後で形態を比較する必要がある。本研究では、突起に局在する分子と発光タンパク質との融合分子を神経細胞に導入することで、シナプスの微細構造を可視化し、神経活動に依存したシナプスの可塑的形態変化を明らかにする。

(2) 超高度画像解析システムの開発に関する研究（浜松ホトニクス㈱システム事業部 神谷清）

神経回路網形成ならびに回路網の動的修飾に関与する分子群の発現様式の可視化のために、「多波長三次元タイムラプスイメージングシステム」を開発する。最新の超高度・高解像度デジタル冷却 CCD カメラに、多波長切替装置ならびに Z 軸コントローラーを組合わせて構築する。本システムを用いて、*in vitro* 系、*in vivo* 系において、神経回路構築時における機能分子等の発現動態を可視化する技術を開発する。

3. 年次計画

本プロジェクトでは、時間軸に沿って連続的に展開する機能的神経回路の構築過程の統一的理解を飛躍的に進め、

その分子的な基盤を解明することを目標とする。

第Ⅰ期では、機能的神経回路網の構築過程を解析するための新規方法論、実験技術の開発、ならびに高次脳機能を担う中枢組織を対象とした研究基盤の確立を戦略目標とする。まず、i)神経細胞、脳組織の新規培養・遺伝子操作技術、ii)ニワトリ、マウス胚脳組織への遺伝子導入技術、iii)マウス個体での遺伝子操作技術、等を開発する。また、シナプス部位での電気生理学的解析と分子生物学的解析を融合した新しい方法論として、i)パッチクランプ法によるチャンネル活性測定とPCRによる発現遺伝子の同定、ii)神経伝達物質放出過程の時間的・空間的制御とシナプス修飾の解析、を行う。シナプス部位での機能分子の発現・修飾の可視化のために、i)神経回路形成を制御する機能分子の可視化分子への修飾技術、ii)可視化分子の遺伝子

導入、iii)可視化分子発現モデルマウスの作製、iv)細胞・組織レベルでの機能分子の可視化のための画像処理、等の必要な新規技術の開発を進める。さらに、i)モデル生物(ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ)を用いた分子遺伝学、ii)differential display, subtractive library等の分子生物学的手法、iii)異種生物における相同遺伝子群の単離、等の方法論を駆使して、新規機能分子の同定を行う。

第Ⅱ期では、上記で確立した方法論、技術を基盤として、転写制御因子、細胞接着分子、軸索伸長・反発因子、シグナル伝達分子等による、神経細胞の分化制御、領域特異性の確立、軸索走行位置の決定と特異的標的認識、シナプス構造の形成と機能発現、神経活動によるシナプス機能の修飾の機構を明らかにし、機能的な神経回路が構築される分子的な機構の全体像の解明を目指す。

研究項目	10年度	11年度	12年度	13年度	14年度
1. 転写因子による神経回路形成制御に関する研究					
(1) LIMドメイン型転写因子による神経回路形成制御に関する研究	<i>Isl-1</i> の共役因子の探索	運動神経特異的遺伝子の同定	運動神経軸索伸長機構の解析	運動神経運命決定機構の解析	LIM因子の神経回路制御の解明
(2) Znフィンガー型転写因子による神経回路形成制御に関する研究	<i>Zic</i> 変異マウスの作製	変異導入マウスの表現型の解析	複合変異マウスの作製	<i>Zic</i> の上流及び下流因子の解析	<i>Zic</i> による神経回路制御の解明
(3) HLH型転写因子による神経回路形成制御に関する研究	HLH因子変異マウスの作製	HLH因子変異マウスの作製	変異マウス神経系の異常の解析	2重変異マウス個体作製と解析	HLH因子の神経回路制御の解明
2. 脳の分節化・特異化による回路形成制御機構に関する研究					
(1) 脳分節形成と軸索誘導の分子機構に関する研究	全胚培養への遺伝子導入法確立	脳分節形成に関わる分子の探索	脳分節形成に関わる分子の解析	軸索誘導に関わる分子の解析	脳分節形成と軸索誘導の解明
(2) 前脳における組織構築と回路網形成の分子機構に関する研究	前脳組織の器官培養法開発	培養胚前脳への遺伝子操作開発	前脳組織の組織構築の解析	前脳組織の回路形成機構の解析	前脳神経回路構築機構の解明
(3) 網膜視蓋投射形成の分子機構に関する研究	視蓋領域決定候補分子の探索	視蓋領域決定候補分子の機能解析	誘導異所性視蓋組織の解析	視蓋の背腹軸の決定機構の解析	網膜視蓋投射機構の解明
3. 神経回路形成を制御する細胞間相互作用に関する研究					
(1) 神経回路構築における細胞接着分子群の機能に関する研究	接着分子解析系の確立	新規接着分子群の解析	接着分子群変異マウスの作製	接着分子群の機能解析	接着分子群の機能の解明
(2) 特異的シナプス形成の分子機構に関する研究	異所発現トラップ法の実施	異所発現トラップ変異体の解析	Capriciousの下流因子の同定	シナプス関連遺伝子の機能解析	特異的シナプス形成機構の解明
(3) 神経軸索の正中交差を制御する分子機構に関する研究	軸索正中交差制御因子の同定	正中交差制御因子の機能解析	正中交差制御因子受容体の同定	正中交差制御因子受容体の解析	軸索正中交差制御機構の解明

研究項目	10年度	11年度	12年度	13年度	14年度
4. シナプスの機能発現を担う機能分子に関する研究 (1) 発達における視皮質可塑性の分子メカニズムに関する研究 (2) シナプス機能発現の分子機構に関する研究 (3) 機能的神経回路形成に関わる新たな分子群の探索	遺伝子欠損マウス可塑性解析 機能分子レーザー不活化法開発 新規回路形成制御分子の探索	視床皮質間相互作用の画像解析 分泌顆粒標識・可視化法の開発 新規分子の発現様式の解析	可塑性に伴う回路形態変化解析 時空的シナプス解析法の確立 遺伝子欠損マウスの作製	可塑性を担う分子の同定 神経伝達物質放出の時空的解析 遺伝子欠損マウスの解析	視皮質可塑性の機構の解明 神経伝達物質放出機構の解明 回路形成の新規機能分子の解明
5. 機能的神経回路形成過程の可視化技術の開発に関する研究 (1) 中枢神経シナプスの形成過程に伴う構造的変化に関する研究 (2) 超高感度画像解析システムの開発に関する研究	蛍光マーカー分子の作製 多波長三次元イメージング基本ユニット構築	蛍光マーカー分子の評価 多波長三次元イメージング拡張ユニット構築	トランスジェニックマウスの作製 多波長三次元イメージング技術の確立	スライス系および個体での解析 イメージング技術による回路構築機構の解析	シナプス機能発現機構の解明 イメージング技術による回路構築機能の解明
所要経費(合計)	188百万円	219百万円			

4. 平成11年度における実施内容と達成目標

1. 転写因子による神経回路形成制御に関する研究

(1) LIMドメイン型転写因子による神経回路形成制御に関する研究

運動/感覚神経細胞において *Islet-1,2* に共役する因子あるいはその下流因子を探索する。また、*Islet-1* エンハンサーを用いて作製した運動神経細胞で GFP を異所発現するトランスジェニックゼブラフィッシュについて神経回路形成の動態をリアルタイムで観察する技術を確立する。

(2) Znフィンガー型転写因子による神経回路形成制御に関する研究

遺伝子相同組換え法を用いて作製した *Zic2* および *Zic3* 遺伝子変異マウスにおける神経回路形成の異常の詳細を明らかにする。また既に作製した *Zic1* 遺伝子変異導入マウスとの交配により2重変異マウスを作製する。

(3) HLH型転写因子による神経回路形成制御に関する研究

促進性 HLH 型転写因子 *Math3* および抑制性 HLH 型転写因子 *Hes1* や *Hes5* の2重変異マウスを作製し、神経回路形成における異常を明らかにする。

2. 脳の分節化・特異化による回路形成制御機構に関する研究

(1) 脳分節形成と軸索誘導の分子機構に関する研究

脳分節形成に関わる新規分子を探索する。また哺乳類胚脳分節形成における細胞系譜や初期神経回路形成の様式を

知るために、全胚培養下で神経上皮細胞やニューロンの軸索を標識して解析する。

(2) 前脳における組織構築と回路網形成の分子機構に関する研究

大脳皮質、基底核などの原基である前脳について、培養組織・細胞への遺伝子導入法を開発する。遺伝子操作を加えた組織について、パターン形成及び神経回路網の形成過程を解析する。

(3) 網膜-視蓋投射形成の分子機構に関する研究

ニワトリ胚を用いて、網膜からの視神経投射の特異性を規定する視蓋の領域決定における *En-2*, *Otx2*, *Gbx2* などの遺伝子群の機能的相互作用を明らかにする。さらに各遺伝子の異所発現により、視蓋における神経回路形成にどのような異常が生ずるかを解析する。

3. 神経回路形成を制御する細胞間相互作用に関する研究

(1) 神経回路構築における細胞接着分子群の機能に関する研究

新規ゼブラフィッシュにおける免疫グロブリン超分子群遺伝子について、神経系における発現パターンの詳細を明らかにする。また、植物レクチンを用いて作製したトランスジェニックマウスを用いて機能的神経回路の可視化技術を開発する。

(2) 特異的シナプス形成の分子機構に関する研究

異所発現トラップ法を用いてスクリーニングしたショウジョウバエの複数の変異体について、神経・筋の特異的神

経回路構築過程における異常の詳細を解析する。

(3) 神経軸索の正中交差を制御する分子機構に関する研究

軸索正中交差に関わるショウジョウバエ commissureless 遺伝子の脊椎動物ホモログあるいは軸索の正中交差を制御するフロアプレート因子をコードする遺伝子群の構造を明らかにし、その機能解析を行う。

4. シナプスの機能発現を担う機能分子に関する研究

(1) 発達における視皮質可塑性の分子メカニズムに関する研究

発達期における視床一皮質間の相互作用を解析するため、解剖学的トレーサーや膜電位感受性色素を用いた高速光学的イメージング法を更に高感度、高解像度なものに発展させる。また視皮質可塑性に関与する新規機能分子の遺伝子欠損マウスを用い、眼優位的可塑性の異常の詳細を解析する。

(2) シナプス機能発現の分子機構に関する研究

蛍光色素ライソトラッカーで標識した分泌顆粒の動態を蛍光顕微鏡により可視的に測定し、定量的解析を行う技術を確認する。またクロモフォア抗体で特定化したシナプス機能発現に関わる細胞内分子をレーザー光を照射するこ

とによって不活性化し、その機能を解析する。

(3) 機能的神経回路形成に関わる新たな分子群の探索

新規に単離・同定した Fyn と結合する分子について、その発現様式及び学習・情動行動の制御過程における発現様式の時間的・空間的变化を解析する。またそのノックアウトマウスの作製に着手する。

5. 機能的神経回路形成過程の可視化技術の開発に関する研究

(1) 中枢神経シナプスの形成過程および機能発現に伴う構造的変化に関する研究

神経突起に局在する分子の遺伝子と蛍光蛋白質の遺伝子のキメラ遺伝子産物について、神経突起の形態観察のマーカー分子として機能を詳細に評価する。さらにキメラ遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの作製を行う。

(2) 超高感度画像解析システムの開発に関する研究

生きた標本内での軸索やシナプス形成を観察可能とする多波長三次元タイムラプスイメージング技術を確認するため、これまでに作製した基本ユニットを元に高感度高解像度デジタル冷却 CCD カメラ、透過照明/励起照明モジュール、データ解析装置よりなる拡張ユニットを構築する。

II 平成 11 年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
1. 転写因子による神経回路形成制御に関する研究		
(1) LIM ドメイン型転写因子による神経回路形成制御に関する研究	理化学研究所脳科学総合研究センター	岡本 仁
(2) Zn フィンガー型転写因子による神経回路形成制御に関する研究	理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター	有賀 純
(3) HLH 型転写因子による神経回路形成制御に関する研究	京都大学ウイルス研究所	影山 龍一郎
2. 脳の分節化・特異化による回路形成制御機構に関する研究		
(1) 脳分節形成と軸索誘導の分子機構に関する研究	厚生省国立精神・神経センター神経研究所	大隅 典子
(2) 前脳における組織構築と回路網形成の分子機構に関する研究	東京大学大学院医学系研究科	中福 雅人
(3) 網膜視蓋投射形成の分子機構に関する研究	東北大学加齢医学研究所	仲村 春和
3. 神経回路形成を制御する細胞間相互作用に関する研究		
(1) 神経回路構築における細胞接着分子群の機能に関する研究	奨大阪バイオサイエンス研究所	吉原 良浩
(2) 特異的シナプス形成の分子機構に関する研究	東京大学大学院理学系研究科	能瀬 聡直
(3) 神経軸索の正中交差を制御する分子機構に関する研究	筑波大学基礎医学系	榭 正幸

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
4. シナプスの機能発現を担う機能分子に関する研究 (1) 発達における視皮質可塑性の分子メカニズムに関する研究 (2) シナプス機能発現の分子機構に関する研究 (3) 機能的神経回路形成に関わる新たな分子群の探索	理化学研究所脳科学総合研究センター 上智大学生命科学研究所 文部省岡崎国立共同研究機構生理学研究所	Hensch Takao 熊倉 鴻之助 八木 健
5. 機能的神経回路形成過程の可視化技術の開発に関する研究 (1) 中枢神経シナプスの形成過程および機能発現に伴う構造的変化に関する研究 (2) 超高感度画像解析システムの開発に関する研究	通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 浜松ホトニクス(株)システム事業部	岡部 繁 男 神谷 清
6. 研究管理	厚生省国立精神神経センター・神経研究所	高坂 新一

Ⅲ リエゾン会議

委 員	所 属
○高坂 新一	厚生省 国立精神・神経センター神経研究所部長
岡部 繁 男	通商産業省 工業技術院生命工学工業技術研究所主任研究官
影山 龍一郎	京都大学 ウイルス研究所教授
熊倉 鴻之助	上智大学 生命科学研究所教授
中福 雅 人	東京大学 大学院医学系研究科助教授
榊 正 幸	筑波大学 基礎医学系教授

(注：○は研究管理統括者)