

# 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、高次の精神・神経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、高齢化を迎えた我が国で現在大きな社会問題となっている、痴呆性疾患、神経変性疾患等の困難な脳神経疾患の克服のためには、脳の構造と機能に関する理解の進展が不可欠である。本研究では、機能的神経回路の構築過程の全体像を分子レベルで理解することを目標に、神経細胞の分化、軸索の伸長と標的認識、神経回路の機能発現と可塑性、等の過程を制御する遺伝子を単離・同定し、その生理機能を解明する。このための戦略として特に、遺伝学的解析の容易なモデル生物であるショウジョウバエ、ゼブラフィッシュを用いた研究と高等動物での研究の相互乗り入れを積極的に推進する。また、ニワトリ、マウス等を用いて、神経回路の構築制御に関わる遺伝子の発現や機能を細胞、組織、個体の各レベルで操作する新規技術を確立する。さらに、重要な機能分子について、神経活動に伴う発現、局在、機能のダイナミックな変化を、細胞・組織のレベルで生きたまま可視化する技術を開発する。このような戦略的研究の集約により、機能的神経回路構築の分子基盤を解明する。

### 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

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着目し、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

(理化学研究所脳科学総合研究センター 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Zic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こり、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

(東北大学大学院医学系研究科 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枢を生み出す原基であるが、その神経回路構築の機構については不明である。本研究では、器官・細胞培養系や胚培養系での遺伝子操作を通じて、前脳の領域特異化および細胞分化の詳細を解析し、その組織構築と回路網形成の分子機構を明らかにする。

#### (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、シナプス結合す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 (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、神経回路形成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明らかにする。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、新規機能分子を同定する。

#### (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 (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である。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明らかにする。

### 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争を引き起こし、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科 熊倉鴻之助)

神経回路の機能的単位であるシナプスでは、神経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、伝達物質放出の分子機構を明らかにする。

#### (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リン酸化酵素 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成、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

(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、可塑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

(浜松ホトニクス株式会社システム事業部 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 系あるいは 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、時間的・空間的にダイナミックに進行する神経回路網の構築と機能発現の過程について、分子レベルでの理解を飛躍的に進めることを目標とする。

第 I 期では、特に神経回路網の構築を解析するための新規の方法論、実験技術を開発し、これまで困難とされてきた高次機能中枢を対象とした研究を展開するための基盤を確立することを戦略目標とする。このために、i) 神経組

織の新規培養・操作技術, ii) 神経組織への新規遺伝子導入技術, iii) ニワトリ, マウス個体での遺伝子操作技術, iv) マイクロ CALI 法を用いた神経伝達物質放出の時間的・空間的制御の解析技術, 等を開発する。さらに, 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, 神経活動に伴うシナプス部位での機能分子の発現・修飾のダイナミズムを可視化する技術を開発する。また, 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, 新規の機能分子を同定する。

第Ⅱ期では, 上記で確立した方法論・技術を基盤として, 既知あるいは新規の転写制御因子, 細胞接着分子, 軸索伸長・反発因子, シグナル伝達分子, 等の機能分子の生理機能の解析を進める。これによって, 神経細胞の分化, 領域特異化, 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, 等の過程を理解し, 機能的神経回路構築の分子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	Isl-1の共役因子の探索	運動神経特異的遺伝子の同定	運動/感覚神経分化の分子解析	運動/感覚神経分化の遺伝解析	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	Zic変異マウスの作製	変異導入マウスの表現型の解析	新規Zic条件変異マウスの作製	複合変異マウスの作製と解析	Zicによる神経回路制御の開明
(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成	HLH因子変異マウスの作成	変異マウスや強制発現の解析	2重変異マウス個体作成と解析	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	前脳組織の領域特異化の解析	前脳組織の神経軸索形成の解析	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	Enが制御する分子の同定	En下流分子の機能解析	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	Capriciou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	軸索交差制御遺伝子の発現解析	軸索交差制御遺伝子の機能解析	軸索正中交差機構の解明
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	遺伝子欠損マウスの可塑性解析	視床皮質間相互作用の画像解析	高速光学的イメージ法確立	抑制性神経回路の形態的解析	視皮質可塑性の機構の解明
(2) シナプス機能発現の分子機構に関する研究	機能分子レーザー不活化法開発	分泌顆粒標識・可視化法の開発	分泌顆粒動態と開口頻度の解析	顆粒供給と貯蔵制御因子の解析	神経伝達物質放出機構の解明
(3) 機能的神経回路形成に関わる新たな分子群の探索	新規回路形成制御分子の探索	新規分子CNRの発現様式の解析	CNR遺伝子欠損マウスの作製	CNR遺伝子欠損マウスの解析	新規分子CNRの機能の解明

研究項目	10年度	11年度	12年度	13年度	14年度
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	シナプスへの受容体集積の解析  多波長三次元イメージング技術の確立	マーカー発現マウスの解析  イメージング技術応用による回路構築の解析	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	220百万円		

#### 4. 平成12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

ゼブラフィッシュの運動・感覚神経細胞に特異的な因子を同定し、Islet-2との関係を解析する。また、Islet-1発現制御機構を探る。更に、Islet-1エンハンサー制御下に運動神経細胞で特異的にGFPを発現するシステムを用い、軸索伸展機構をリアルタイムで解析する。

###### (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

Zic1/Zic2複合変異マウスにみられる神経回路形成異常の詳細を明らかにする。また、Zic3、新規Zic遺伝子について、遺伝子相同組換え法を用いて条件変異を導入したマウスを作製する。これらのマウスを解析して、特定の発生時期、組織におけるZicファミリーの役割を明らかにする。

###### (3) HLH型転写因子による神経回路形成制御に関する研究

促進性HLH遺伝子Math3とMash1の2重変異マウスおよび抑制性HLH遺伝子Hes1とHes5の2重変異マウスにおける神経回路形成の異常を調べる。さらに、他のHLH遺伝子についても、レトロウイルスを用いた強制発現実験によりその生理機能を解析する。

##### 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

哺乳類脳分節形成過程における転写因子Pax6と細胞接着分子カドヘリン群の役割について、神経板期および脳胞期における遺伝子導入系を用いて解析する。また超音波ガイド子宮内手術法を用いて、後期哺乳類胎児脳に対する遺伝子導入の系を確立する。

###### (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

領域特異的に発現する種々の転写制御因子を前脳に異所発現させる。異所発現胚における脳のパターン形成および

軸索の走行を解析し、前脳の神経回路形成機構を明らかにする。また、前脳の領域特異化と細胞分化に関わる新規因子を同定し、その生理機能を明らかにする。

###### (3) 網膜-視蓋投射形成の分子機構に関する研究

ニワトリ胚を用いた解析から、視蓋誘導を上位で制御する転写抑制分子Enが、その下流で分泌性シグナル分子Fgf8を誘導するに至る過程に、新規抑制分子の関与が想定された。En強制発現視蓋と正常視蓋との間のcDNAのサブトラクション法を用いてこの分子を同定し、網膜視蓋投射の形成メカニズムを明らかにする。

##### 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

免疫グロブリン超分子群遺伝子について、遺伝子変異マウスを作製する。ゼブラフィッシュにおいては、新たな機能分子を探索する。また、植物レクチントランスジーンと蛍光蛋白質遺伝子の融合による機能的神経回路の蛍光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

免疫共沈降法、遺伝学的手法を用い神経-筋認識分子Capriciousの下流因子を同定し、特異的シナプス形成過程における情報伝達機構を明らかにする。

###### (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

脊椎動物で軸索の正中交差の制御に重要な役割を果たしている底板細胞に特異的に発現している遺伝子群の単離と構造解析、発現パターンの解析、遺伝子産物の生化学的・細胞生物学的解析を行う。また遺伝子導入動物作成の準備を始める。

##### 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

発達期の視床と視皮質間の相互作用を解剖学的トレーサー、或いは組織学的マーカーを用いて解明する。特に、抑制性ニューロンによる皮質活動の空間的パターンと眼優位的可塑性の制御機構を明らかにする。

(2) シナプス機能発現の分子機構に関する研究

シナプスにおける神経伝達分子の分泌顆粒の可視化測定により顆粒動態の時空的特性を明確にし、細胞内標的分子のレーザー不活性化等の影響を定量的に解析する。また、単一細胞からの開口頻度測定から、複数の分泌顆粒プール成分の存在とその役割を明らかにする。

(3) 機能的神経回路形成に関わる新たな分子群の探索

Fyn と結合する分子として新規に同定した CNR ファミリー分子群について、各種のターゲティングベクターを作製し、マウス胚幹細胞にて相同遺伝子組換え体を単離する。得られた相同組換え体をマウス胚に移植したキメラマウスを作製し、交配により CNR 遺伝子欠損マウスを得る。

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

シナプスの形態形成、神経伝達物質受容体およびシナプス後肥厚部構成蛋白の集積を蛍光マーカー分子を用いて生きた状態で経時観察し、シナプスの形態形成と機能発現の間の相関関係を明らかにする。

(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ため、これまでに構築した基本ユニットと拡張ユニットより、多波長三次元タイムラプスイメージングの技術的側面を確立する。その際、本技術を生体試料に適用し、その結果を技術的側面の確立に反映させる。

II 平成12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	理化学研究所脳科学総合研究センター	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	厚生省国立精神・神経センター神経研究所	
(1) 脳分節形成と軸索誘導の分子機構に関する研究	東北大学大学院医学研究科	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	理化学研究所脳科学総合研究センター	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	樹 正幸
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	理化学研究所脳科学総合研究センター	Hensch Takao
(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
(3) 機能的神経回路形成に関わる新たな分子群の探索	文部省岡崎国立共同研究機構生理学研究所	八木 健

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
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	東京医科歯科大学医学部	岡 部 繁 男
(2) 超高感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(株)システム事業部	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
大 隅 典 子	東北大学 大学院医学系研究科教授
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 生命科学研究科教授
中 福 雅 人	東京大学 大学院医学系研究科助教授
榎 正 幸	筑波大学 基礎医学系教授

(注：○は研究管理統括者)