

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とする。

この目標の達成に向けた本研究の第I期では、特に遺伝学的解析に優れたモデル生物を用いた研究を推進し、神経回路形成に関わる多くの新規分子の同定に成功した。また、組織・個体レベルでの新規の遺伝子操作技術を確立した。さらに、神経活動に伴う機能分子のシナプス部位でのダイナミックな変化を生きたまま可視化する技術の開発に成功した。これらは、脳科学委員会による中間評価において高い評価を受けた、本研究班の大きな成果である。

これを受けて第II期では、これまでの研究をさらに発展させることにより、機能的神経回路構築の分子基盤の解明を目指す。特に、脳科学委員会によるアドバイスを元に、第I期で大きな進展の見られた「転写因子によるニューロンの領域特異化と分化」が、それに引き続く「ニューロンの移動と軸索伸長」、「標的認識とシナプス形成」、さらには「シナプスの機能発現」にいかに関がっていくのか、という問題に焦点をあてた研究を推進する。このために、各過程を制御する重要な遺伝子の同定を進めるとともに、その生理機能を解明する。さらに、班員間の共同研究を積極的に推進することにより、神経系の発生から機能発現に至る複雑な過程を、統一的に理解することを目標とする。

2. 研究内容及び目標

1. ニューロンの分化と特異化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領域特異的に分化し、複雑な回路網を形成する。このニューロンの分化と領域特異化は、転写因子によって決定されている。本研究ではニューロンの分化と特異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) HLH型転写因子による神経細胞分化の制御に関する研究(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、神経回路形成の制御機構を明らかにする。

(2) ホメオドメイン型転写因子による領域特異化の制御に関する研究(東京大学大学院医学系研究科 中福雅人)

ニューロンの領域特異化には多くのホメオドメイン型転写因子が重要な機能を果たすとされているが、その詳細は未だ明らかではない。本研究では、ニワトリ胚神経系への遺伝子導入法や神経幹細胞の培養系を用いた遺伝子操作法を用いて、ホメオドメイン型転写因子による神経回路形成の制御機構を明らかにする。

(3) LIMドメイン型転写因子による細胞分化の制御に関する研究(理化学研究所脳科学総合研究センター 岡本仁)

脊髄の運動ニューロンと感覚ニューロンでは、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によって規定される。本研究では、ゼブラフィッシュを用いて、LIMドメイン因子の神経回路形成における役割を解明する。

2. 細胞移動と特異的標的認識による神経回路形成制御に関する研究

領域特異的に分化したニューロンは、特異的な部位への細胞移動、特定の部位での軸索伸長、標的細胞の認識とシナプス形成を経て、最終的に複雑な神経回路網を形成する。

本研究では、これらの過程に関わる機能分子を同定し、神経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、ニューロン間の特異的な相互作用を担う細胞接着・認識分子である。本研究では、臭覚神経系をモデルとして、これまでに同定したTLCL、BIG-1、BIG-2などの分子群の機能を明らかにする。また、新規の細胞接着・認識分子を探索する。

(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、神経-筋シナプス形成過程における標的細胞の認識機構を明らかにする。特に異所発現トラップ法を用いた遺伝子スクリーニング法により、新規に同定した分子の機能を明らかにする。

(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(筑波大学基礎医学系 樹正幸)

神経回路の形成過程では特定の神経軸索が正中で交差するが、その機構の詳細は未だ不明である。

本研究では、この正中交差の制御に重要な底板細胞に特異的に発現する新規分子の機能を明らかにする。

(4) 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2次元的に正確な対応で網膜からの軸索投射を受ける。本研究では、ニワトリ胚の遺伝子操作法を用いて、この網膜-視蓋投射の特異性を制御する遺伝子カスケードを明らかにする。

(5) 特異的細胞移動による神経回路形成の制御に関する研究(京都大学大学院理学研究科 見学美根子)

哺乳動物の小脳皮質は、ニューロンが移動して規則正しく配置することにより特徴的な層構造を形成する。本研究では、培養系および個体への遺伝子導入系を用いて、小脳顆粒細胞の特異的な細胞移動を制御する機能分子を同定し、神経回路形成における役割を明らかにする。

(6) 特異的軸索走行を制御する分子機構に関する研究(国立遺伝学研究所 平田たつみ)

終脳外側には、嗅球から嗅皮質へと投射する嗅索と呼ばれる著明な軸索束が存在する。lot細胞は、この嗅索が形成される位置を決定する特異的なニューロン群である。本研究では、終脳半球のスライス培養系等を用いて、このlot細胞の発生、細胞移動、ならびに嗅索神経軸索の走行制御における役割を明らかにする。

3. 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、シナプス可塑性などの動的活性を獲得してはじめて完成される。本研究では、この神経活動に依存した神経回路の形成・修飾機構を明らかにする。

(1) 新たなカドヘリン分子群CNRの機能に関する研究(大阪大学細胞生体工学センター 八木健)

シナプスに局在するチロシン酸化酵素Fynとの結合を指標として新たに同定したカドヘリン分子群CNRは、染色体上で多重遺伝子クラスターとして存在する。本研究では、多様なニューロン間のシナプス形成、機能発現におけるCNRの役割を明らかにする。

(2) 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)

シナプスの可塑的変化のメカニズムを解明するためには、生きた状態のシナプス形態を可視化する必要がある。本研究では、シナプスに局在する分子と発光タンパク質との融合分子をニューロンに導入し、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。

(3) 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。

(4) シナプス機能発現に関わるシグナル伝達分子に関する研究(京都大学大学院医学研究科 渡辺大)

神経回路の機能発現と可塑的変化には、シナプス局部における特異的なシグナル伝達が重要な役割を担っている。本研究では、小脳の介在ニューロンであるゴルジ細胞におけるグルタミン酸受容体の発現あるいは機能を部位特異的に阻害する手法を用いて、中枢シナプスのシグナル伝達機構を明らかにする。

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Ⅱ期では、第Ⅰ期で確立した方法論、実験技術を駆使して、これまでに同定した転写制御因子、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を解析するとともに、さらに未知の機能分子の検索を進める。これによって、ニューロンの分化と領域特異化に引き続いて起こる細胞移動、軸索形成と特異的標的認識、シナプス構造の形成と機能発現、等の過程を連続性をもって理解し、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	13 年 度	14 年 度
1. ニューロンの分化と特異化による神経回路形成制御に関する研究 (1) HLH 型転写因子による神経細胞分化の制御に関する研究 (2) ホメオドメイン型転写因子による領域特異化の制御に関する研究 (3) LIM ドメイン型転写因子による細胞分化の制御に関する研究	HLH 因子遺伝子変異マウスの作成と異所発現実験 ニワトリ胚および神経幹細胞でのホメオドメイン因子の機能阻害および異所発現実験 ゼブラフィッシュ LIM 因子の機能阻害および異所発現実験	HLH 型転写因子の機能の解明 ホメオドメイン型転写因子の機能の解明 LIM ドメイン型転写因子の機能の解明
2. 細胞移動と特異的標的認識による神経回路形成制御に関する研究 (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 (2) 特異的シナプス形成の分子機構に関する研究 (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 (4) 網膜-視蓋投射形成の分子機構に関する研究 (5) 特異的細胞移動による神経回路形成の制御に関する研究 (6) 特異的軸索走行を制御する分子機構に関する研究	接着分子遺伝子変異マウスの作成と解析および新規細胞接着分子の探索 ショウジョウバエ神経-筋シナプスの特異的認識機構の解析 底板特異的遺伝子サルファターゼ FP 1/2 のマウス, ゼブラフィッシュを用いた機能解析 ニワトリ胚の網膜-視蓋投射形成の遺伝子カスケードの解析 小脳顆粒細胞の移動動態の解析と制御分子の探索 嗅索形成を制御する lot 細胞の分化と細胞移動の解析	免疫グロブリン型接着分子の機能の解明 特異的シナプス形成の分子機構の解明 軸索正中交差の分子機構の解明 網膜-視蓋投射形成の分子機構の解明 小脳皮質形成における細胞移動の分子機構の解明 嗅索回路の特異的軸索走行機構の解明
3. シナプスの機能発現を担う分子機構に関する研究 (1) 新たなカドヘリン分子群 CNR の機能に関する研究 (2) 中枢神経シナプスの機能発現に伴う構造的変化に関する研究 (3) 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 (4) シナプス機能発現に関わるシグナル伝達分子に関する研究	カドヘリン超分子群 CNR 遺伝子変異マウスの作成と解析 蛍光タンパク質を用いたシナプス構造の動的変化の解析 視皮質可塑性における抑制介在ニューロンの発生と機能の解析 小脳ゴルジ細胞におけるシナプス機能発現に関わるシグナル伝達機構の解析	シナプス機能発現における CNR の機能の解明 シナプス機能発現に伴う構造的変化の解明 視皮質可塑性の分子機構の解明 シナプス機能発現に関わるシグナル伝達機構の解明
4. 研究管理	班会議の開催, 個別課題の進捗状況の評価と指導, 共同研究の促進	研究全体のとりまとめ
所 要 経 費 (合 計)	202 百万円	

4. 平成13年度における実施内容と達成目標

1. ニューロンの分化と特異化による神経回路形成制御に関する研究

本研究では、ニューロンの領域特異化と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) HLH型転写因子による神経細胞分化の制御に関する研究（京都大学ウイルス研究所 影山龍一郎）

新規HLH型転写因子Hes3, Hesr, Math6について、標的遺伝子破壊法を用いた変異マウスを作製する。また、網膜あるいは大脳皮質でのレトロウイルスを用いた異所発現実験を行い、神経回路形成における機能を明らかにする。

(2) ホメオドメイン型転写因子による領域特異化の制御に関する研究（東京大学大学院医学系研究科 中福雅人）

Irx3, Pax6, Nkx6.1などのホメオドメイン型転写因子について、神経系における発現パターンを解析する。また、ニワトリ胚の神経系あるいは培養神経幹細胞を用いてホメオドメイン型転写因子を異所的に発現させ、ニューロンの特異性決定における機能を明らかにする。

(3) LIMドメイン型転写因子による細胞分化の制御に関する研究（理化学研究所脳科学総合研究センター 岡本仁）

ゼブラフィッシュの1次感覚ニューロンには、LIMドメイン型転写因子であるIslet2が特異的に発現する。本研究では、その下流遺伝子の候補であるPlexinA2とTrkClについて、個体レベルでの異所発現、機能阻害などの解析を通じて、軸索形成における機能を明らかにする。

2. 細胞移動と特異的標的認識による神経回路形成制御に関する研究

本研究では、ニューロンの特異的な細胞移動、軸索伸長、標的細胞の認識とシナプス形成に関わる機能分子を同定し、神経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）

遺伝子変異マウスを作製し、これまでに同定した免疫グロブリン超分子群接着分子であるTLCL, BIG-1, BIG-2の生理機能を明らかにする。また、マウスおよびゼブラフィッシュ嗅覚神経系に発現する新規の細胞接着分子を探索する。

(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 能瀬諭直）

ショウジョウバエの運動ニューロン-筋シナプスの形成を制御するcapriciousおよび新規分子2種類について、異所発現実験あるいは遺伝子欠損個体の解析を通じて、特異的標的認識における機能を明らかにする。

(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（筑波大学基礎医学系 樹正幸）

神経軸索の正中交差を制御する底板に特異的に発現する新規分子サルファターゼFP1およびFP2について、マ

ウスおよびゼブラフィッシュを用いて遺伝子欠損動物を作製し、その神経回路形成における機能を明らかにする。

(4) 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）

ニワトリの網膜-視蓋投射の特異性を制御する転写因子であるEnおよびGrg4について、サブトラクション・スクリーニング法を用いて、その下流で機能する遺伝子を同定する。また下流候補遺伝子の異所発現実験により、神経回路形成における機能を明らかにする。

(5) 特異的細胞移動による神経回路形成の制御に関する研究（京都大学大学院理学研究科 見学美根子）

小脳顆粒細胞の特異的な細胞移動の動態を再現する培養系を用いて、アクチンおよび微小管細胞骨格系の変化や細胞内カルシウム濃度の変化を、タイムラプス顕微鏡下に解析する。また、differential display法を用いて、移動細胞の極性変化の前後で発現の変化する遺伝子を同定する。

(6) 特異的軸索走行を制御する分子機構に関する研究（国立遺伝学研究所 平田たつみ）

スライス培養系の顕微鏡観察により、大脳の嗅球から嗅皮質へと投射する嗅索をガイドするlot細胞の発生、細胞移動を詳細に解析する。さらにlot細胞あるいは嗅索形成部位で特異的に発現する分子を同定し、スライス培養での異所発現系を用いてその生理機能を明らかにする。

3. シナプスの機能発現を担う分子機構に関する研究

本研究では、神経活動に依存したシナプスの形成・修飾機構に関わる分子を同定し、その機能を明らかにする。

(1) 新たなカドヘリン分子群CNRの機能に関する研究（大阪大学細胞生体工学センター 八木健）

シナプスに局在するカドヘリン超分子群CNRについて、遺伝子欠損マウスを作製し、その機能を明らかにする。また、染色体上で多重遺伝子クラスターとして存在するCNRの体細胞レベルでの高頻度の遺伝子変異の機構とシナプス機能の関連について解析する。

(2) 中枢神経シナプスの機能発現に伴う構造的変化に関する研究（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 岡部繁男）

シナプス突起に局在するPSD-95と発光タンパク質GFPとの融合分子を発現するトランスジェニックマウスを作製し、神経活動に依存したシナプスの可塑的形態変化を2光子励起レーザー顕微鏡を用いて明らかにする。またPSD-95以外のシナプス局在タンパク質とGFPとの融合分子をニューロン特異的に発現する系を確立する。

(3) 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）

スライス培養系を用いて、大脳新皮質視覚野における可塑性を制御するPV陽性の抑制性ニューロンの発生とシナプス形成過程を可視化する。また抑制性ニューロンの発生・

発達を制御する遺伝子を探索し、視皮質可塑性における機能を明らかにする。

(4) シナプス機能発現に関わるシグナル伝達分子に関する研究 (京都大学大学院医学研究科 渡辺大)

フォトダイオードアレイ型膜電位測定装置を用いて、小脳介在ニューロンであるゴルジ細胞およびゴルジ細胞とシナプスを介して連絡している周囲の顆粒細胞の興奮性、シナプス機能発現の動態、可塑的变化の詳細を明らかにする。

II 平成13年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
1. ニューロンの分化と特異化による神経回路形成制御に関する研究		
(1) HLH型転写因子による神経細胞分化の制御に関する研究	京都大学ウイルス研究所	影山 龍一郎
(2) ホメオドメイン型転写因子による領域特異化の制御に関する研究	東京大学大学院医学系研究科	中福 雅人
(3) LIMドメイン型転写因子による細胞分化の制御に関する研究	理化学研究所脳科学総合研究センター	岡本 仁
2. 細胞移動と特異的標的認識による神経回路形成制御に関する研究		
(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	榊 正幸
(4) 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
(5) 特異的細胞移動による神経回路形成の制御に関する研究	京都大学大学院理学研究科	見学 美根子
(6) 特異的軸索走行を制御する分子機構に関する研究	国立遺伝学研究所	平田 たつみ
3. シナプスの機能発現を担う分子機構に関する研究		
(1) 新たなカドヘリン分子群 CNR の機能に関する研究	大阪大学細胞生体工学センター	八木 健
(2) 中枢神経シナプスの機能発現に伴う構造的変化に関する研究	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科	岡部 繁男
(3) 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
(4) シナプス機能発現に関わるシグナル伝達分子に関する研究	京都大学大学院医学研究科	渡辺 大
4. 研究管理	厚生労働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	厚生労働省 国立精神・神経センター神経研究所部長
岡 部 繁 男	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科教授
影 山 龍一郎	京都大学 ウイルス研究所教授
中 福 雅 人	東京大学 大学院医学系研究科助教授
梶 正 幸	筑波大学 基礎医学系教授

(注：○は研究管理統括者)