

シナプス分子機構研究チーム

Laboratory for Neurobiology of Synapse

チームリーダー 吉原良浩

YOSHIHARA, Yoshihiro

シナプス、それはニューロンからニューロンへと情報の伝達が行われる場であり、特異的シナプス結合を介してのニューロン間の配線パターンが脳の情報処理機構の基本原則となっている。従って脳を理解するためには、選択的かつ機能的神経回路網の詳細な知識を得ることが不可欠である。我々は、古くから用いられている神経解剖学的トレーシング技術と、最新の発生工学的技術を融合させて、経シナプスの特異的神経回路網を可視化する新手法を開発した。今後この手法をより詳細な機能的神経回路の解析へと発展させ、脳の神経回路網形成・維持・可塑的变化の分子メカニズムの解明さらには新たな概念・法則の発見をめざし、特に嗅覚神経系に焦点を絞って研究を行う。

また、発達期および成体期のシナプスにおけるニューロン間相互作用を司る細胞認識分子群に注目し、それらの構造・発現・機能の解析を分子・細胞・神経回路および個体レベルで行う。さらには嗅覚神経系における新規シナプス機能分子の体系的な探索も行う。

1. WGAトランスジェニック技術による機能的神経回路形成・維持・可塑性の分子機構の解明(宮坂, 川崎, 斉藤, 木下, 半野, Hartman, 三津井, 佐藤, 松野^{*1}, 吉原)

古くから神経解剖学においてニューロン間の連絡様式を研究する目的で、様々な植物レクチンが経シナプス性トレーサーとして利用されてきた。特に小麦胚芽レクチン(WGA: wheat germ agglutinin)は最も効率良く一次ニューロンから二次ニューロンへとシナプスを介して輸送され、神経系のあらゆるシステムにおいてその力を発揮してきた。私たちはWGA cDNAをトランスジェニックとし、発生工学的手法を用いて特異的プロモーターの制御下にニューロンの限局したサブセットにWGAタンパク質を発現させるという、新たな手法を開発した。この方法により、特異的プロモーターが機能してWGAを発現する一次ニューロン、および経シナプス性にWGAを取り込む二次ニューロン、さらにその終末部をラベルすることができ、選択的かつ機能的神経回路網を可視化できた。またこの方法で発現するWGAタンパク質はその動物にとって内在性物質として認識されるため、免疫反応を起こすことがなかった。さらに各種プロモーターの支配下にWGAを発現するトランスジェニックマウスラインを作製するために、これまでのWGAタンパク質注入実験となっていた個体間のばらつきなどの問題点も克服することができた。

現在までにWGAトランスジェニックを用いることによって小脳遠心性経路(小脳プルキンエ細胞特異的L7プロモーターを利用)、嗅覚経路(嗅細胞特異的OMPプロモーターを利用)、視覚経路(網膜双極細胞特異的プロモーターを利用)の可視化に成功し、各神経回路を選択的にラベルされた

トランスジェニックマウスを作製してきた。また、WGA発現アデノウイルスベクターの開発にも成功し、簡便なWGAトランスジェニックの発現誘導が可能となり、さらにはトランスジェニック技術が確立されていない動物種にもWGAトランスジェニックを応用することができるようになった。また本年度についてはCre/loxPシステムによってコンディショナルにWGAトランスジェニックの発現を誘導できるマウスの作製に成功した。

以上のようなWGAトランスジェニックの技術を駆使することによって、機能的神経回路形成・維持・可塑性の分子メカニズムの解析を行っている。例えば標的遺伝子導入法によって、ある特定の匂い分子受容体遺伝子座へWGAトランスジェニックをノックインしたマウスを作製し、嗅覚神経系の機能的神経回路の可視化への応用を試みた。このWGAノックインマウスにおいて、特定の匂い分子受容体が発現する嗅細胞でのみWGAを発現させることができ、嗅上皮から嗅球までの軸索集束を観察することができた。しかしながら発現レベルの低さのために嗅球二次ニューロンまでのWGAの移行を検出することができず、現在新たな戦略に取り組んでいる。

2. 細胞間相互作用を司るシナプス機能分子に関する研究(久保田, 西依, 林, 川崎, 半野, 船木, 宮崎, 三津井, 藤田, 佐藤, 吉原)

神経回路網は個々のニューロン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。このような標的認識/シナプス形成過程はニューロン間の直接的な相互作用によって制御されている。本研究テーマでは神経回路形成における細胞間相互作用に関わるシナプス機能分子群(細胞認識・接着分子, シグナル伝達分子など)に焦点をあて、その構造・発現・機能の解析を行っている。これまでに我々はテレンセファリン(TLCN), BIG-1, BIG-2, OCAMという4種の新規細胞接着分子を発見してきた。これら4分子はすべて免疫グロブリン超分子群に属する。また、それらの発現は脳の領域特異的、細胞タイプ特異的および発達ステージ特異的に厳密に制御されており、特異的神経回路の形成・維持・可塑性に重要な役割を果たすと推定されている。

TLCNは大脳皮質、海馬、嗅球、扁桃体、線条体などを含む終脳セグメントのニューロンの細胞体および樹状突起膜のみに限局して発現する分子であり、他の細胞に対して終脳セグメントであるという空間的情報を与えるアドレス分子であると予想される。本年度においては小脳プルキンエ細胞をモデルニューロンとして、TLCNの樹状突起特異的ソーティング機構を解析した。L7プロモーターを用いてTLCNをプルキンエ細胞に発現するトランスジェニックマ

ウスを作製したところ、終脳ニューロンと同様に TLCN タンパク質は選択的にブルキンエ細胞の樹状突起にソーティングされた。一方、細胞内ドメイン約 50 アミノ酸を欠失した TLCN を発現させた場合には、樹状突起とともに軸索および神経終末にも TLCN タンパク質が検出された。これらのことから TLCN タンパク質の樹状突起特異的のソーティングシグナルが細胞内ドメインの約 50 アミノ酸中に存在することが明らかとなった。

OCAM は嗅覚神経系のゾーン構造に対応した発現パターンを示す分子であり、その構造は免疫グロブリン 超分子群の中でも特に脊椎動物の NCAM、アメフラシの apCAM およびショウジョウバエのファシクリン II に類似している。これら 3 分子は特異的神経回路の形成、神経活動に伴うシナプスの可塑的形態変化などで重要な役割を果たすことが報告されている。ゼブラフィッシュにおいて OCAM ホモログ分子の探索を行ったところ、NCAM、OCAM に加えて新規分子 PCAM を発見した。本年度においてはこれら 3 分子の発現パターンを詳細に解析し、各々の分子が神経系発達の早い時期から成体に至るまで領域特異的・時期特異的・細胞タイプ特異的に特徴的な局在を示すことを見いだした。

3. ゼブラフィッシュ嗅覚神経系への遺伝学的・分子生物学的アプローチ (宮坂, 船木, 吉原)

ゼブラフィッシュを用いて嗅覚神経系の Forward Genetics を行う準備として、嗅細胞特異的に発現する遺伝子の探索を行い、2 種の候補遺伝子を得ることができた。本年度についてはこれら遺伝子の嗅覚神経系発達に伴う発現パターンを詳細に解析し、嗅細胞特異的発現を確認するとともに、ゲノム DNA のクローニング・構造解析を行った。

*¹ ジュニア・リサーチ・アソシエイト

誌 上 発 表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Tian L., Nyman H., Kilgannon P., Yoshihara Y., Mori K., Andersson L. C., Kaukinen S., Rauvala H., Gallatin W. M., and Gahmberg C. G.: "Intercellular adhesion molecule-5 induces dendritic outgrowth by homophilic adhesion", *J. Cell Biol.* **150**, 243–252 (2000). *

Nagao H., Yoshihara Y., Mitsui S., Fujisawa H., and Mori K.: "Two mirror-image sensory maps with domain organization in the mouse main olfactory bulb", *NeuroReport* **11**, 3023–3027 (2000). *

Mori K., von Campenhausen H., and Yoshihara Y.: "Zonal organization of the mammalian main and accessory olfactory systems", *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **355**, 1801–1812 (2000). *

(総説)

吉原良浩: "WGA トランスジェンによる選択的神経回路可視化技術", *Clin. Neurosci. 別冊* **18**, 992–993 (2000).

(単行本)

吉原良浩, 齊藤美智子: "トランスジェニックマウス", *脳神経科学イラストレイテッド*, 森寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛 (編), 羊土社, 東京, pp. 331–338 (2000).

(その他)

Yoshihara Y., Nagao H., and Mori K.: "Sniffing out odors with multiple dendrites", *Science* **291**, 835–837 (2001).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Murate M., Hashikawa T., Yoshihara Y., and Mori K.: "Localization of a membrane glycoprotein telencephalin in asymmetric synapses of hippocampal pyramidal cells in the rat", *Forum of European Neuroscience 2000*, (Federation of European Neuroscience Societies), Brighton, UK, June (2000).

Yoshihara Y.: "A novel genetic approach to visualization of multisynaptic neural pathways using WGA transgene", *2nd Korea-Japan Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (NBNI-2000)*, Kyongju, Korea, Nov. (2000).

(国内会議)

吉原良浩: "WGA トランスジェンを用いた選択的シナプス経路可視化技術の開発とその応用", *国立遺伝学研究所セミナー*, 三島, 4 月 (2000).

吉原良浩: "WGA トランスジェンによる機能的神経回路の選択的可視化", *第 22 回日本生物学的精神医学会シンポジウム「神経回路網のダイナミクス」*, 東京, 4 月 (2000).

吉原良浩: "WGA トランスジェンを用いた嗅覚神経回路の解析", *日本生化学会関東支部シンポジウム「化学受容研究の最近の進歩」*, 横浜, 4 月 (2000).

齊藤美智子, 吉原良浩: "OMP-WGA トランスジェニックマウスにおける嗅覚神経回路形成過程の解析", *第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会*, 横浜, 9 月 (2000).

木下名菜子, 水野剛夫, 吉原良浩: "WGA 発現アデノウイルスベクターを用いたマウス嗅覚経路の可視化", *第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会*, 横浜, 9 月 (2000).

半野陽子, 吉原良浩: "WGA トランスジェンを用いたマウス視覚経路の選択的可視化", *第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会*, 横浜, 9 月 (2000).

宮崎晴子, 吉原良浩: "マウス嗅覚神経系発達過程における細胞接着分子 BIG-1 および BIG-2 の発現解析", *第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会*, 横浜, 9 月 (2000).

Research Subjects and Members of Laboratory for Neurobiology of Synapse

1. Elucidation of Molecular and Cellular Mechanisms Underlying Formation, Maintenance, and Plasticity of Functional Neural Circuitry Using WGA Transgene System
2. Analysis of Synaptic Functional Molecules Involved in Cell-Cell Interactions
3. Forward Genetics and Molecular Biological Approach

to Zebrafish Olfactory System

Laboratory Head

Dr. Yoshihiro YOSHIHARA

Research Scientists

Dr. Nobuhiko MIYASAKA

Dr. Koji KUBOTA

Dr. Atsushi NISHIYORI

Dr. Ken HAYASHI

Technical Staffs

Ms. Miwa KAWASAKI

Ms. Michiko SAITO

Ms. Nanako KINOSITA

Ms. Yoko HANNO

Ms. Atsuko FUNAKI

Ms. Haruko MIYAZAKI

Mr. Isamu Z. HARTMAN

Ms. Sachiko MITSUI

Ms. Yuki SATO

Ms. Hiroko FUJITA

Assistants

Ms. Izumi YOSHIDA

Junior Research Associates

Ms. Hitomi MATSUNO

Visiting Members

Dr. Takeo MIZUNO (Osaka Med. Coll.)

Dr. Akihito YASUOKA (Univ. Tokyo)