

# 橋本研究ユニット

## Hashimoto Research Unit

ユニットリーダー 橋本光広  
HASHIMOTO, Mitsuhiro

当研究ユニットは、アデノウイルスベクターを用いることにより、神経細胞の発生する時期特異的に遺伝子を導入できることを初めて報告した。この技術は、神経細胞の発生・分化を解析するばかりでなく、脳の形成過程ならびに脳の機能発現の解析に新たな進歩をもたらすと考えられる。当研究ユニットでは、この技術を用い、神経発生から神経回路網形成ならびに神経機能発現までを網羅的かつ、統合的に解析することを目指す。

### 1. アデノウイルスベクターを用いた神経細胞の誕生日特異的遺伝子導入法（橋本、久野、伊藤）

発生段階の脳において、脳を構成する神経細胞は、脳室面に沿って存在する神経幹細胞より発生・分化してくる。神経幹細胞より発生した神経細胞は、いつ神経幹細胞より発生したか（神経細胞の誕生日）によって、その神経細胞がどのような性質を持ち、脳内においてどの構造体を形成するかという三次元的な位置情報が決定される。発生した神経細胞は、神経細胞の誕生日によって決定された情報を元に、脳内を移動し、特殊化した神経細胞へ分化することによって、脳の高次構造を形成していく。例えば、大脳皮質においてより早くに発生した神経細胞は、より内側の層に、より遅く発生した神経細胞はより外側の層へ移動していき、大脳皮質の層構造を形成する（inside-out パターン）。このように、脳の形態形成は、時間軸（神経細胞の誕生日）に沿って厳密に制御されていることが知られている。しかし、神経細胞の誕生日に依存した神経細胞の運命決定における分子機構は、未だ明らかになっていない。我々は、アデノウイルスベクターを用いることにより、トリチウム・チミジンや BrdU 同様、神経細胞の誕生日特異的に、神経細胞へ遺伝子を導入することができる（つまり、ウイルスを注入した日と、ウイルスが感染した神経細胞の誕生日が一致する）ことを明らかにした。アデノウイルスベクターで遺伝子が導入された神経細胞は、正常に発生・分化し、その誕生日に従って脳組織を構築する。この技術を用いれば、同一の誕生日を有する神経細胞群へ、個別に遺伝子を導入することができる。また、この技術は、今まで解析不可能であった、誕生日に依存した神経細胞の運命決定における分子機構を詳細に解析することを可能にする。

### 2. 小脳における縦縞状領域化の解析（橋本、久野、伊藤）

多くの解剖学的・生理学的・分子生物学的研究によって、小脳は、正中線を軸にして内側から外側方向へ、左右対称の縦縞状に区画化（mediolateral clusters）されていることが示唆された。例えば、下オリブ核の各副核に属する神経細胞は、ある特定領域の Purkinje 細胞群へ登上線維を投射している。それぞれの登上線維は、小脳を縦断する縦縞状の領域を形成する。また、電気生理学的研究により、登上線維が形成する縦縞状の領域には、体の運動を制御する体性感覚地図が存在することが明らかとなった。以上の研究

結果から、小脳の縦縞状の区画化は、小脳における機能区分と考えられ、小脳の神経回路網の形成と小脳の機能の発現における基礎的構造単位であると考えられるようになった。さらに、分子生物学の発達により、多くの分子が小脳で縦縞状に発現していることが明らかとなり、小脳の縦縞状区画化は、神経回路網のみならず、分子レベルでも制御されていることが示された。多くの科学者が、小脳の機能発現において、小脳の縦縞状区画化が非常に重要であることを認めているにもかかわらず、いつ、どのようにして小脳の縦縞状の領域化が確立されるかは、いまだ証明されていない。

そこで、我々は、小脳の縦縞状区画化を解明するために、アデノウイルスベクターを用いて第4脳室に面した神経幹細胞への遺伝子導入を試みた。マウス胎生 10.5 日、11.5 日、12.5 日胚の中脳脳室へ、核移行シグナルを付加した LacZ 遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを注入したところ、LacZ 遺伝子でラベルされた第4脳室の神経上皮細胞は、Purkinje 細胞に発生・分化することが判明した。さらに興味深いことに、ラベルされた Purkinje 細胞は、それぞれの誕生日特異的に、異なるパターンの縦縞状区分を形成する。以上の結果より、Purkinje 細胞による、小脳の区画化は、Purkinje 細胞の発生する時期（胎生 10.5 日から胎生 12.5 日の間の Purkinje 細胞の誕生日）に、すでに運命づけられており、さらに、縦縞状区画のパターンは Purkinje 細胞の誕生日によって規定されていることが判明した。従って、あるニューロンの移動・配置にとってその細胞の誕生日が重要な意味を持つという点で、小脳の縦縞状区画化の成立と、大脳皮質の層構造形成（inside-out パターン）は、脳組織形成における共通原理であることが判明した。

### 1. Neural-birth date specific gene transfer with adenoviral vectors

The multi-layered structure of the cerebral cortex has been studied in detail. Early-born neurons migrate into the inner layer and late-born neurons migrate into more superficial layers, thus establishing an inside-out gradient. The progenitor cells appear to acquire layer-specific properties at the time of neuronal birth; however, the molecular mechanisms of cell-fate acquisition are still unclear because it has been difficult to identify a cohort of birthdate-related progenitor cells. Using replication-defective aden-

oviral vectors, we successfully performed ‘pulse gene transfer’ into progenitor cells in a neuronal birthdate-specific manner. When adenoviral vectors were injected into the midbrain ventricle of mouse embryos between embryonic days (E) 10.5 to E14.5, the adenoviral vectors introduced a foreign gene into a specific cohort of birthdate-related progenitor cells. The virally infected cohorts developed normally into cortical neurons and formed the canonical cortical layers in an inside-out manner. This technique allows us to distinguish a cohort of birthdate-related progenitor cells from other progenitor cells with different birthdates and to introduce a foreign gene into specific subsets of cortical layers by performing adenoviral injection at specific times. This adenovirus-mediated gene transfer technique will enable us to examine the properties of each subset of progenitor cells that share the same neuronal birthdate.

## 2. Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the “birth date” of Purkinje cells

The adult cerebellum is functionally compartmentalized into clusters along the mediolateral axis (mediolateral clusters), and a variety of molecular markers are expressed in specific subsets of mediolateral clusters. These mediolateral clusters appear to be the basic structure in which cerebellar functions are carried out, but the mechanisms by which cerebellar mediolateral compartmentalization is established are still unclear. To address these questions, we examined the development of mediolateral clusters using replication-defective adenoviral vectors. The adenoviral vectors effectively introduced foreign genes into the neuronal progenitor cells of the cerebellum in a birthdate-specific manner, allowing us to observe the native behavior of each cohort of birthdate-related progenitor cells. When the adenoviral vectors were injected into the midbrain ventricle of mouse embryos on embryonic days (E) 10.5, E11.5, and E12.5, the virally infected cerebellar progenitor cells developed into Purkinje cells. Notably, the Purkinje cells that shared the same birthdate formed specific subsets of mediolateral clusters in the cerebellum. Each subset of mediolateral clusters displayed nested and, in part, mutually complementary patterns, and these patterns were unchanged from the late embryonic stage to adulthood, suggesting that Purkinje cell progenitors are fated to form specific subsets of mediolateral clusters upon their birth between E10.5 and E12.5. We represent the first such direct observation of Purkinje cell development. Moreover, we also show that there is a correlation between the mediolateral clusters established by the birthdate-related PCs

and the domains of *engrailed-2*, *Wnt-7B*, *L7/pcp2*, and EphA4 receptor tyrosine kinase expression.

## Staff

### Unit Leader

Dr. Mitsuhiro HASHIMOTO

### Technical Staff I

Ms. Rie ITO

### Technical Staff II

Ms. Yasuko HISAO

## 口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Hashimoto M.: “Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the “Birth date” of purkinje cells”, 16th Int. Congr. of the IFAA: Anatomical Science 2004 from Gene to Body, Kyoto, Aug. (2004).

(国内会議)

橋本光広: “アデノウイルスベクターによる神経細胞の誕生日特異的遺伝子導入法を用いた、小脳形成機構の解析”, 京都大学再生医科学研究所 発生分化セミナー, 京都, 7月 (2004).

橋本光広: “Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the “birth date” of purkinje cells”, 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9月 (2004).

橋本光広: “アデノウイルスベクターによる神経細胞の誕生日特異的遺伝子導入法を用いた、小脳形成機構の解析”, 国立遺伝学研究所 The 996th Biological Symposium, 三島, 9月 (2004).

橋本光広, 御子柴克彦: “小脳の縦縞状の領域化は、プルキンエ細胞の生まれる日によって規定される”, 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月 (2004).