

脳の神経回路形成と可塑性の分子機構

特集 プロジェクト研究

村上 富士夫*

Molecular Mechanism of Neural Development and Plasticity

Key Words : Neural Connection Development, Plasticity, Commissural Axon Floor Plate

背景と目的

人の脳は1000億を越える神経細胞によって形成される複雑な神経ネットワークによってその機能を支えられている。学習、記憶をはじめとする、脳の様々な高次機能を担っている脳の可塑性であり、脳に於ける神経結合の可塑性は、可塑性を担う重要な要素である。したがってその分子機構の解明は、脳の機能の仕組みを知る上で極めて重要な問題である。高等脊椎動物の発達期の脳では、一側の入力への損傷により神経回路の可塑性の変化が生ずることが知られている。たとえばネコの大脳-赤核投射は健常動物では同側へのものに限られるが、大脳感覚運動野の損傷によって、健常では認められない正中線を越えて反対側の標的に向かう交差性投射が生じる。したがって、神経回路形成の中でも特に交差性神経回路形成のメカニズムの解明が重要である。

いっぽう神経結合の可塑性の変化が生じるときには軸索伸長、側枝の形成、標的認識、シナプス形成など、脳の発達期に起こる様々な減少が繰り返される(図1)。したがって神経回路形成を支える分子機構の解明は可塑性の分子機構の解明につながる可能性が高い。そこで本プロジェクトではまず以下に述べるような実験系を用いて、神経回路網形成の分子機構を明らかに、それに基づいて可塑性のメカニズムに迫ることを目的としている。

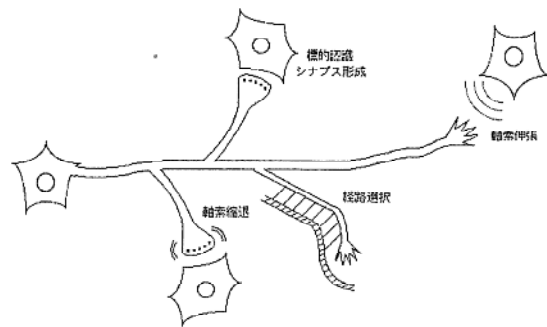


図1 脳の発達期と可塑性の変化が生ずる時に細胞レベルで起こる様子と変化

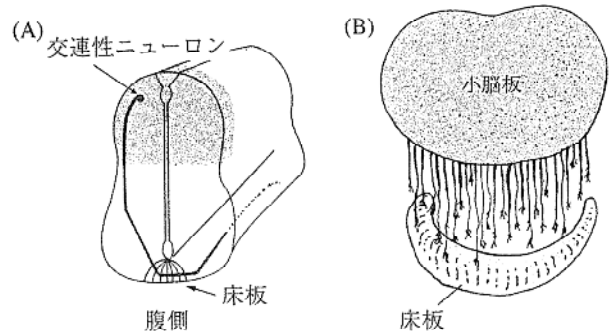


図2 交差性ニューロンの走行経路(A)と培養における底板による誘引(B)

我々は最近脳における軸索の(正中線)交差に関して以下のような発見をおこなった。脳の元基である神経管の腹側正中部にはフロアプレート(底板)と呼ばれる特殊な細胞群からなる構造があり、神経管の前後軸方向に脊髄から中脳部付近まで伸びているが(図2A)、我々は、

- 1) まず小脳元基からの出力線維の軸索が腹側正中部にあるフロアプレートを通り、対側へと投射することを明らかにした。また
- 2) ラット胚の神経細胞のコラーゲングル培養をおこない、フロアプレートが小脳遠心性線維に対して

*Fuji MURAKAMI
1948年8月19日生
昭和48年大阪大学大学院・基礎工学
研究科修士課程修了
現在、大阪大学大学院・基礎工学研
究科・基礎工学部・生物工学科・
神経生理研究室、教授、工学博士、
神経科学
TEL 06-6850-6500
FAX 06-6857-6340
E-Mail murakami@bpe.es.
osaka-u.ac.jp



軸索誘引活性を有し(図2B), その成長円錐の正中線へのガイドに寄与している可能性を示した。

3) さらにフロアプレートは中脳, 後脳, 随脳, 脊髄の全てのレベルの交連性ニューロンに対して同様な活性を示し, これらのニューロンの腹側正中線へのガイドにも寄与していることを示す証拠を得た(図3赤色矢印)。

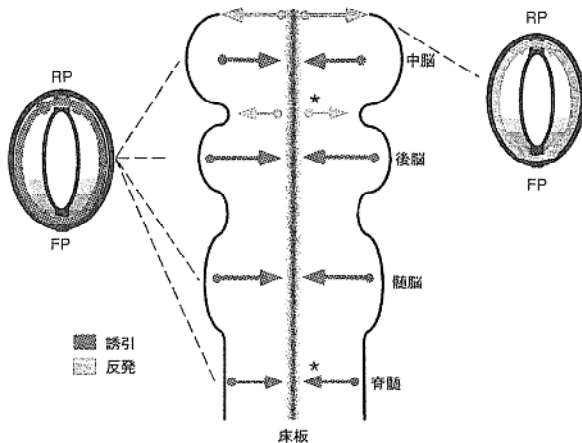


図3 床板による軸索の誘引と反発
赤は誘引、青は反発されるニューロンを示す。
ラット胚の中脳から脊髄に到る部分を背側正中線に沿って展開した標本の模式図。中央縦に走るのが床板である。

4) さらに興味深いことには, フロアプレートが軸索反発活性をも有し, これがまた中脳から脊髄にいたる多種の非交叉性のニューロンのガイドに共通に寄与していることを示すデータを得た。(図3青, 青色矢印)

5) また軸索誘引の責任分子として脊髄の交連ニューロンに対する拡散性誘引因子として同定されたネトリンが有力な候補であることがわかったが, 軸索反発活性にはネトリン以外の分子が寄与していることが明らかになった。

研究計画と研究のストラテジー

第I期

第I期では, いかなる機構によって軸索が正中線を交叉するのかという問題の解明を目指す。

具体的には以下のような問題に取り組む予定である。

i) 拡散性軸索反発因子の同定と背側正中交叉の機構の解明

我々のこれまでの研究から, 床板由来の軸索反発

活性にネトリン以外の因子が重要な寄与をしていることが明らかになっている。そこでこの因子の同定を手掛かりに, 拡散性反発因子による軸索ガイドの分子機構を明らかにする。

ii) 腹側正中線における軸索ガイドの機構

我々は, 床板由来の拡散性軸索誘引因子によって腹側正中線までガイドされた交連性ニューロンの成長円錐が正中線を通過する際, 床板由来因子への反応性を失うことを発見した。そこで, そのような成長円錐の反応性の変化がどのような分子機構によって引き起こされるのかを明らかにする。

iii) 背側正中線における交叉のメカニズム

いっぽう後交連の背側正中線における交叉の形成のメカニズムに関する知見は極めて乏しい。我々は後交連ニューロンの軸索伸長の初期過程が床板由来の軸索反発因子によることを発見した。しかし, その後のいかなる機構によって軸索が背側正中線まで導かれるのか, またいかなる機構によって正中線を越えることが出来るのかは明らかになっていない。そこで, これらの現象の基礎となる分子機構の解明をおこなう。

iv) 非交叉性神経回路形成の分子機構の解明

脳には正中線を交叉しない神経回路を多数存在する。正中線を交叉出来ない理由を知ることは, 交叉の機構の解明にとって有用な知識を与えることと思われる。

v) 成長円錐に於ける細胞内情報伝達機構の解明

全ての成長円錐ガイド因子は成長円錐上のレセプターを介して, その情報を細胞内へ伝える。その後何らかの機構を介して細胞内骨格系に変化が生じ, 成長円錐の伸長方向が変えられるものと考えられる。その具体的な分子機構は今のところ殆ど手付かずの状態である。本研究ではこの細胞内情報伝達機構の問題の解明を目指す。

第II期

第II期では第I期において得られた分子機構に関する知見をもとに, 神経結合の可塑的变化が生ずるメカニズムを明らかにする。

ストラテジー

i) 拡散性ガイド因子の活性検出にはコラーゲンゲル共培養法を, 気質や細胞膜に結合している因子の活性の検出にはコラーゲンゲル膜上での培養法を用い, バイオアッセイをおこなう。その際, 脳の中の

状態を出来る限り忠実に再現できるように全脳培養標本を用いる。

ii) 未知の拡散性反発因子の同定には、主に(a)既存の因子をもとにPCR法の適用(b)expression cloningによる探索(c)生化学的手法を用いた精製の3つの方法を適用する。

iii) 正中線における成長円錐の反応性の変化に関する研究では変化を生ずる機構としては、成長円錐の部分で局所的に起こる可能性と、情報が細胞体まで伝わる可能性とが考えられるため、まず何れが正しいかを確かめてから次のステップへ進む。

iv) 神経回路形成に寄与する分子が可塑性にも寄与しているか否かを明らかにするために、以下の3つの方法を用いる。

- (a) 可塑的变化が生ずる状況下での発現の有無
- (b) 遺伝子ノックアウト動物の作製とそのような動物での可塑性の発現の検討をおこなう。
- (c) これと並行して可塑性を発現させることの出来る *in vitro* のシステムの開発をおこない、候補遺伝子の細胞内への導入をおこない、その効果を検討する。

研究実施体制

本プロジェクトは4つの研究グループから構成される。その一つは回路形成、可塑性研究グループであり、これは研究代表者である村上を中心とする大阪大学基礎工学研究科、及び岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所の研究者を中心とするグループである。第2のグループは福井医科大学佐藤真教授を中心とするガイド因子探索グループであり、おもにPCR法、Differential Display法などによる新奇軸索ガイド因子の探索、精製をおこなう。第3のグループは横浜市立大学医学部 五嶋良郎講師を中心とするグループで、成長円錐の行動制御の細胞内信号伝達機構の解明をめざす。第4のグループは奈良先端科学技術大学院大学小林和人助教授を中心とするもので、トランスジェニック動物の作製と解析による新規ガイド因子の機能的役割の検討をおこなう。

研究実施における問題点

研究実施場所

予算が付いても、装置を置く場所、研究員の居場所、実験室がなければ、研究を遂行することが出来ない。戦略的基礎研究推進事業は原則として on campus で研究を行うことを前提としており(なぜそれにこだわるかは理解できない点であるが)、研究場所を学外に求めることは原則として認められない。そのため大学内でプレハブの建物の建設など様々な可能性を模索したが適当な方策を見いだすことは出来なかった。

幸い大阪大学では先導的オープン研究センターの建設が進んでおり、プロジェクト発足の1年後になったが約80平米の面積を借りることができることになった。しかしこれにもいくつかの問題があった。先導的オープン研究センターは廊下との仕切さえない状態で、壁やドアの取り付けや給水管や電気の工事から始める必要があった。また遺伝子実験のための許可も新たに申請を出して許可を得る必要があった。最大の問題はキャンパスが離れていることである。そのため基礎工学部の研究室との一体性を保つのは困難であり、研究機能の一部だけを映すというわけにはいかず、そこだけで完結した研究室をつくる必要に迫られた。もし先導的オープン研究センターのような施設が豊中地区にもあって利用できたならもっと有難かった。

おわりに

戦略的基礎研究推進事業で設定されるプロジェクトには5年という期限がある。立ち上げに1年間は要することや、終了時に近づくとも研究員の次のポストを見つける必要がでてくることを考えると、フルに稼働出来るのはおそらく3年位になるものと予想される。その間に成果を挙げなければならないことを考えると相当な精神的負担を感じることになるが、これをてこにして研究を発展させてゆきたい。