

発表日：平成26年 8月 1日
所 属：公立大学法人奈良県立医科大学
担 当：研究推進課（吉岡、藤谷）
電 話：0744-22-3051 内線：2555、2553

においによって神経細胞どうしのつながりが促進される 分子メカニズムを世界で初めて解明！

—「セルリポーツ」誌に論文を発表—

本学 先端医学研究機構 生命システム医科学分野 脳神経システム医科学(坪井昭夫教授)の研究グループは、匂いの情報処理を行っている神経細胞（ニューロン）が発達する際に、**NPAS4**（エヌパス4）というタンパク質が、匂い刺激の強さに応じて産生されることにより、神経細胞どうしの接続（シナプス：スパインと同義語）の数を調節していることを、マウスを使った実験で突き止めました。この研究成果は、再生医療にもつながる画期的なもので、今後、脳卒中などによって神経細胞が死滅した際に、神経細胞を損傷部位に移植することで神経障害を回復させるというような治療法への応用が期待されます。

この成果をまとめた論文が、米国科学雑誌『**Cell Reports**』（7月31日付）のオンライン版に掲載され、『**Cell Reports**』（8月7日号）の表紙として取り上げられます。

<概要>

私達の脳の中では、神経細胞どうしが複雑につながり合っています。匂いの情報を処理する嗅球における介在ニューロンは、匂い刺激によって活性化される神経細胞ほど、より多くの神経細胞とシナプスを介して接続して、情報伝達の効率を上げています。今回、坪井教授らの研究グループは、**NPAS4**を通常より過剰に発現させたマウスの神経細胞では、シナプスの数が増加していることを見出しました。逆に、**NPAS4**の機能を失った神経細胞では、匂い刺激の強弱に関係なく、シナプスの数が著しく減少していることを見出しました。さらに生化学的に詳しく調べると、**NPAS4**の機能を失った嗅球介在ニューロンでは、シナプスを形成するタンパク質であるダブルコルチン（**DCX**）のユビキチン化が促進され、分解されているので、結果的にシナプスの数が減少することがわかりました。従って、嗅球介在ニューロンでは、**NPAS4**タンパク質の量に応じてシナプスの数を調節することにより、脳内情報処理の効率化を行っていると考えられます。嗅球介在ニューロンの幹細胞は、マウスのみならずヒトにおいても例外的に大人になっても新しく生まれて、神経回路を作り続けている神経細胞です。今回の研究成果は、脳卒中などによって神経細胞が死滅した際に、新しい神経細胞を損傷部位に移植して新しい回路を作ることで、神経障害を回復させるという再生医療への応用にもつながると期待されます。

<背景>

ほとんどの神経細胞(ニューロン)は大人になってからは新しく生まれることはありませんが、匂いの情報を処理する嗅球の介在ニューロンと呼ばれる神経細胞は、例外的に大人になっても生まれて新しい回路を作り続けていることが近年の研究から明らかになってきました(図1, 図2)。このように、大人になってから新しく作られる神経回路は、外界からの刺激に応じて環境に適応した神経回路へと作り変えられることが知られていますが、その仕組みは分かっていませんでした。

今回、坪井教授らの研究グループは、外界からの匂い刺激に応じて発現量が変化する遺伝子に着目して、新しい神経回路が作り変えられる仕組みについて詳しく調べました。

<研究手法>

最初に、嗅球の介在ニューロンが外界からの匂い情報の入力を受けて、発達していく様子に注目しました(図3A, B)。鼻の片側を閉じると、閉じた側では匂い情報の入力なくなり、神経活動が低下します(図3C)。そこで、鼻を閉じて匂い刺激が減少している側でのニューロンの発達の様子を詳しく調べたところ、嗅球介在ニューロンの樹状突起(木の枝のような突起構造)に存在するスパイン(他のニューロンと接続を行う棘(トゲ)状の突起)の数が減少していました(図3D)。このことから匂い情報の入力は嗅球介在ニューロンによる正常な神経回路の形成に必要であることがわかりました。

このような匂い情報の入力が神経細胞同士の接続を制御する仕組みを明らかにするために、DNA マイクロアレイという手法を使って、匂い情報の入力によって神経細胞で発現量が変化する遺伝子を探索しました。その結果、DNA に結合する転写因子と呼ばれるタンパク質である **NPAS4** は、鼻の穴を閉じて匂い刺激による神経活動を低下させると、嗅球介在ニューロンでの発現量が低下することが明らかになりました。また逆に、匂いをかがせて神経活動を活性化させると、嗅球介在ニューロンにおける **NPAS4** の発現量は顕著に増加しました(図4)。そこで次に、**NPAS4** 遺伝子を過剰に発現させた場合と **NPAS4** 遺伝子を欠損させた場合で、嗅球介在ニューロンにおけるスパインの数を詳細に調べました。さらに、嗅球介在ニューロンで **NPAS4** 遺伝子を欠損させたマウスを用いて、匂いの識別などの学習行動に異常が見られるかを調べました。

<研究成果>

NPAS4 遺伝子を過剰に発現させた神経細胞では、他の神経細胞と接続するスパインの数が増加していることがわかりました。また逆に、**NPAS4** 遺伝子を欠失させた神経細胞では、スパインの数が通常よりも減少していることがわかりました(図5)。このことから、嗅球介在ニューロンでは、**NPAS4** タンパク質の量に応じて神経細胞のスパイン数の増減が制御されていることが明らかになりました。さらに、**NPAS4** を欠失させた神経細胞と通常の神経細胞について、生化学的に詳しく調べました。興味深いことに、**NPAS4** を欠失させた神経細胞では、本来産生が抑制されている **MDM2** (エムディーエム2) というユビキチン化タンパク質が増加しており、スパインを形成するタンパク質であるダブルコルチン (**DCX**) のユビキチン化が促進され、分解されているので、結果的にスパインの数が減少することがわかりました(図6)。要約すると、神経細胞のスパインの数が増加すると、より多くの他の神経細胞と接続できるようになります。従って、神経活動の活発化した神経細胞では、**NPAS4** タンパク質の産生量が上昇して、より多くの神経細胞と接続して情報伝達効率を上げていると考えられます(図7)。

さらに興味深いことに、嗅球介在ニューロンにおいて **NPAS4** の機能を失ったマウスでは、構

造の似通った匂い分子をかぎ分けられないことがわかりました (図 8)。このマウスでは、匂い刺激によって嗅球介在ニューロンのスパイン数が増えないために、他の神経細胞とあまり接続できなくなり、似通った匂い分子に関する情報処理ができない状態であると推測されます。

<今後の展望>

嗅球の介在ニューロンは大人になっても新しく生まれるだけでなく、損傷した脳の部位へ移動して、神経回路を修復する性質も持っていることが明らかになっています (図 9)。今後、新しく生まれたニューロンが神経回路に適切に組み込まれる仕組みが、さらに詳しく解明されることによって、脳卒中などにより神経細胞が死滅した際に、**iPS** 細胞由来の神経細胞を損傷部位に移植して、新しい回路を作ることで、神経障害を回復させるという再生医療への応用にもつながると期待されます。

<用語説明>

嗅球: 匂い分子を感知する嗅細胞の接続先であり、匂い情報についての情報処理を行う脳の領域。ここに存在する介在ニューロンは、大人になっても例外的に新しく生まれる性質を持っており、再生医学的に注目されている。

介在ニューロン: 他の神経細胞と接続して、情報のやり取りを行う神経細胞。

DNA マイクロアレイ: スライドガラス上に数万種類の遺伝子を高密度に配置したものを使用することで、細胞における数万種類の遺伝子の発現を一度に分析できる装置。

NPAS4 (エヌパス 4) タンパク質: 細胞の核内に存在して DNA に結合する性質を持ち、他の遺伝子の発現を調節するタンパク質の一種。

MDM2 (エムディーエム 2) タンパク質: タンパク質をユビキチン化する酵素で、タンパク質の分解を促進する作用がある。

ダブルコルチン (DCX) タンパク質: 細胞内の微小管に結合するタンパク質。細胞の移動を制御することが知られていたが、今回の私共の解析から、シナプス形成を促進する機能を持つことが新たに明らかにされた。

樹状突起: 他の神経細胞と接続して情報のやり取りを行う木の枝のような突起構造。

シナプス: 神経細胞の樹状突起や軸索に存在し、他の神経細胞と接続して情報を伝達する部位。神経細胞の樹状突起は、**スパイン**と呼ばれる棘 (トゲ) 状の突起を持つことが多い。

<論文名>

『**Cell Reports**』誌 2014 年 7 月 31 日付 (米国東部標準時正午) オンライン版掲載

Npas4 Regulates Mdm2 and thus Dcx in Experience-Dependent Dendritic Spine Development of Newborn Olfactory Bulb Interneurons

(エヌパス4タンパク質はMdm2を介してDcxの産生を制御して、新生される嗅球介在ニューロンの経験依存的な樹状突起スパインの発達を促進する)

<論文著者>

吉原誠一^{1,4}、高橋弘雄^{1,4}、西村信城¹、木下雅仁¹、朝比奈諒¹、橘木美智子¹、辰巳加奈¹、日比陽子²、平井宏和³、永井拓²、山田清文²、坪井昭夫^{1,*}

1：奈良県立医科大学 先端医学研究機構 脳神経システム医科学

2：名古屋大学大学院 医学系研究科 医療薬学

3：群馬大学大学院 医学系研究科 神経生理学

4：共同筆頭著者

*：責任著者

<問い合わせ先>

坪井昭夫

奈良県立医科大学 先端医学研究機構 生命システム医科学分野 脳神経システム医科学

電話：0744-29-8959 (直通)

FAX: 0744-29-4746

E-mail: atsuboi@naramed-u.ac.jp

<研究グループ一覧>

奈良県立医科大学 先端医学研究機構 脳神経システム医科学

坪井 昭夫 (教授・責任著者)

吉原 誠一 (助教・共同筆頭著者)

高橋 弘雄 (助教・共同筆頭著者)

西村 信城 (医学部6年生)

木下 雅仁 (医学部5年生)

朝比奈 諒 (医学部4年生)

橘木 美智子 (技術補佐員)

辰巳 加奈 (技術補佐員)

名古屋大学大学院 医学系研究科 医療薬学

日比 陽子 (助教)

永井 拓 (准教授)

山田 清文 (教授)

群馬大学大学院 医学系研究科 神経生理学

平井 宏和 (教授)

<研究助成>

本研究は、文部科学省 科学研究費助成事業 基盤研究 (B)、基盤研究 (C) 及び、挑戦的萌芽研究などの助成を受けて行われました。

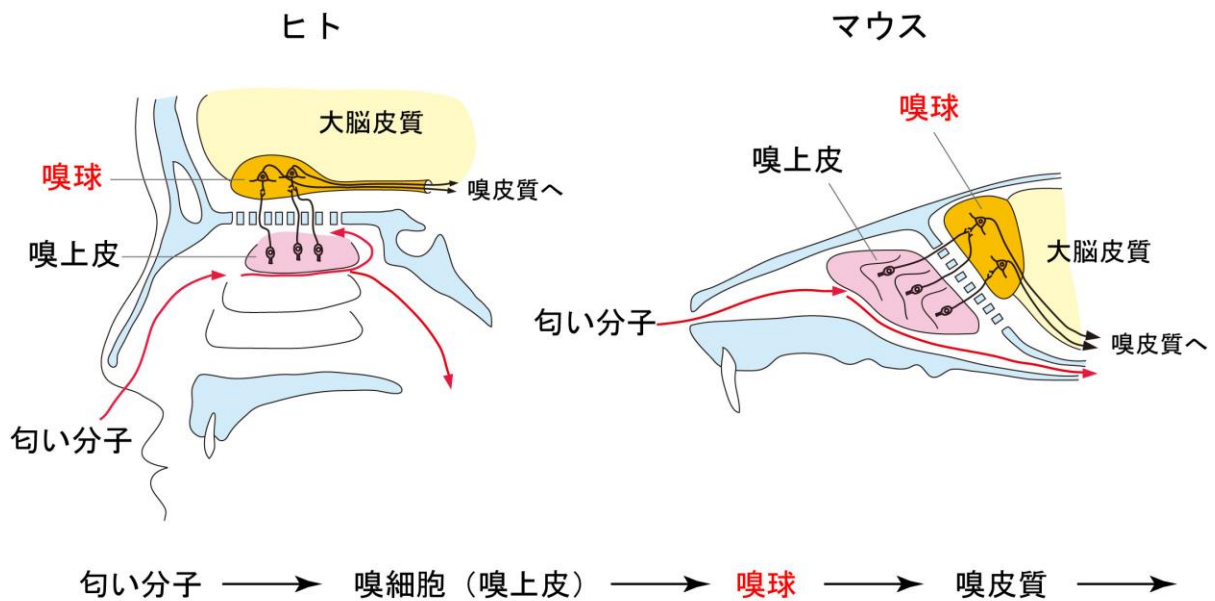


図1 匂いを感じる仕組み

匂い分子は嗅上皮に存在する嗅細胞で感知されます。匂いの情報は嗅細胞から嗅球に送られ、嗅球で情報処理されてから、さらに嗅皮質という脳の奥の領域へと伝えられます。

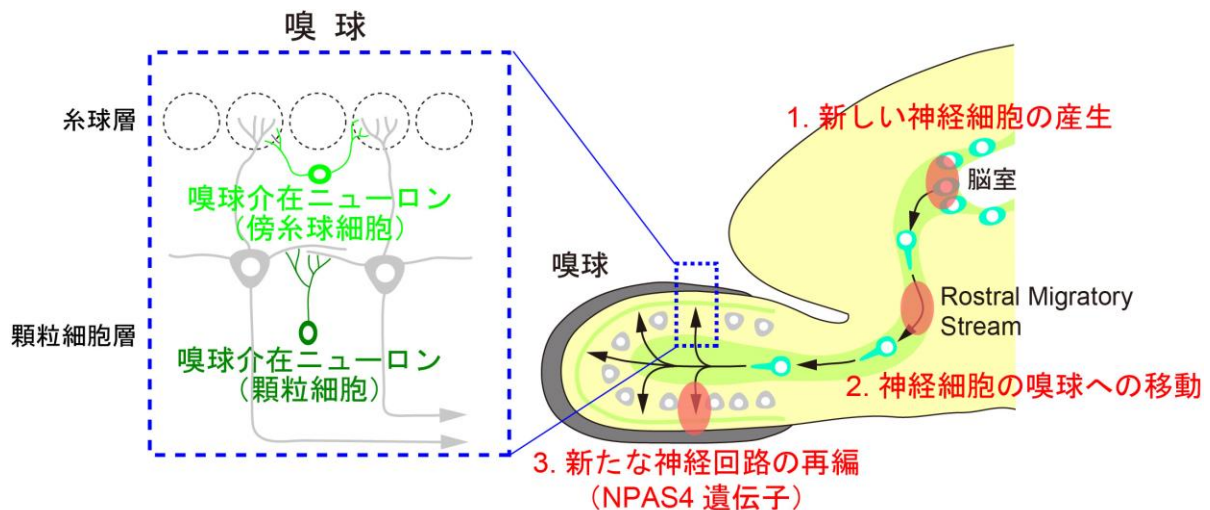


図2 嗅球における介在ニューロン

嗅球介在ニューロン（傍糸球細胞・顆粒細胞）は、大人になっても脳室周辺で新しく産まれて、rostral migratory stream と呼ばれる経路を移動して嗅球へと移動し、新しい嗅球の神経回路を形成し続けています。

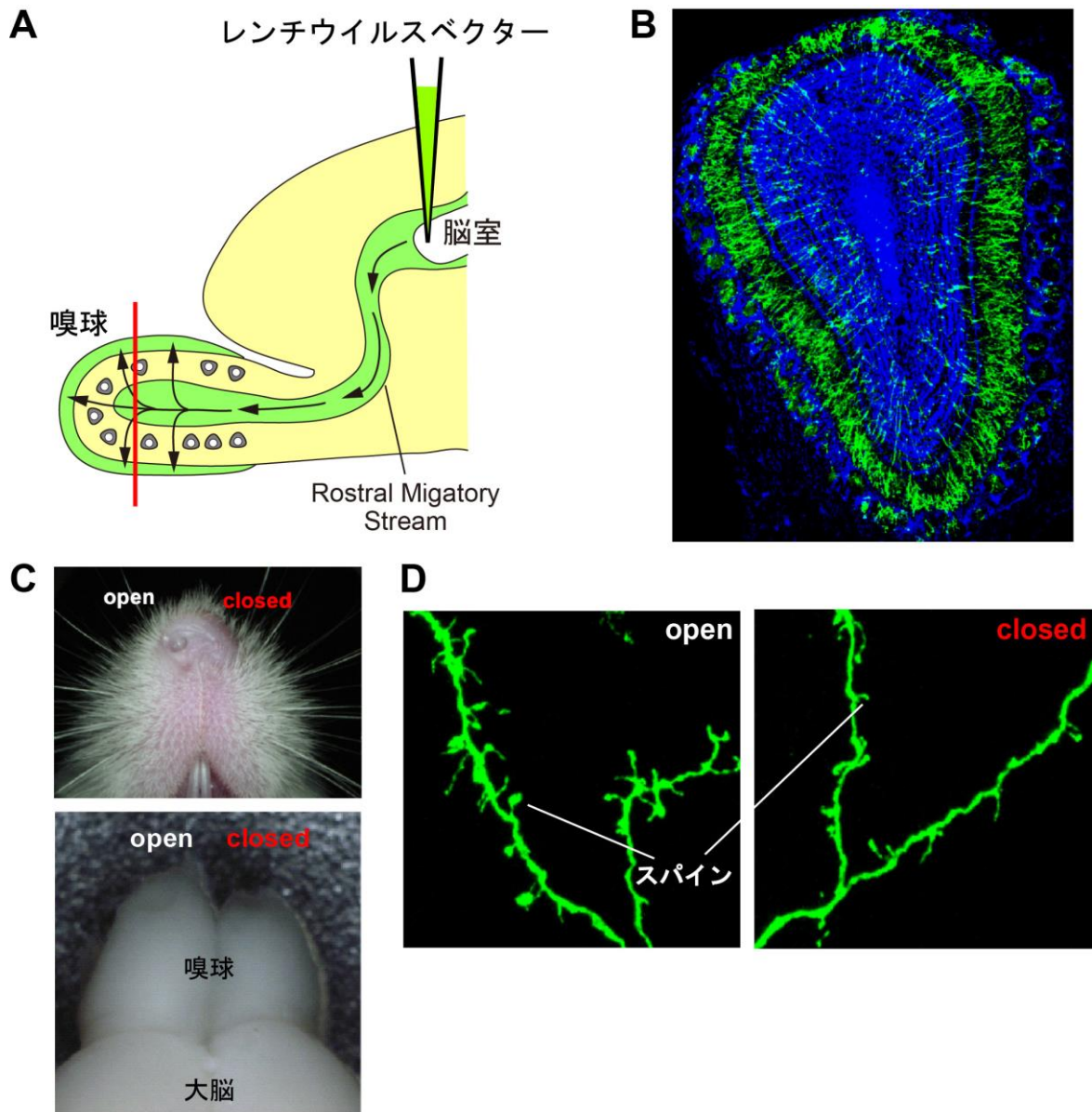


図3 嗅球において新たに産生される介在ニューロン

- (A) GFP 遺伝子をもったレンチウイルスベクターを脳室周辺に注入することにより、新たに生まれた嗅球介在ニューロンを可視化できます。
- (B) 嗅球介在ニューロンを GFP で可視化すると、樹状突起と呼ばれる構造（写真では緑色に見える）が伸びている様子が観察できます。
- (C) 片鼻を閉じて、匂い刺激による神経活動を低下させると嗅球が小さくなります。このことから、匂い刺激による神経活動が嗅球の正常な発達に必要であることがわかります。
- (D) 片鼻を閉じた場合に、嗅球介在ニューロンを観察すると、鼻を閉じた側の神経細胞のスパイン（棘突起）の数は開いている側のものと比べて減っていました。

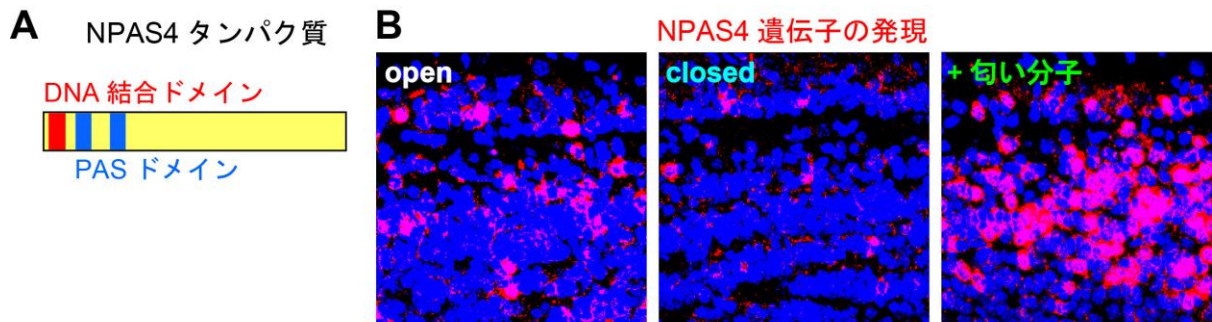


図4 NPAS4 タンパク質は嗅球介在ニューロンの核に存在する

- (A) NPAS4 タンパク質の模式図. NPAS4 は嗅球介在ニューロンの核に存在し, 特定の DNA 領域に結合して転写を調節するタンパク質の一種です.
- (B) NPAS4 遺伝子の嗅球における発現 (写真中の赤色のシグナルが NPAS4 遺伝子の発現を示します). 鼻を閉じた側では, 開いている側と比べて NPAS4 遺伝子の発現量が減少していました. 一方, 匂いをかがせて 30 分後の嗅球では, NPAS4 遺伝子の発現量が顕著に増加していました.

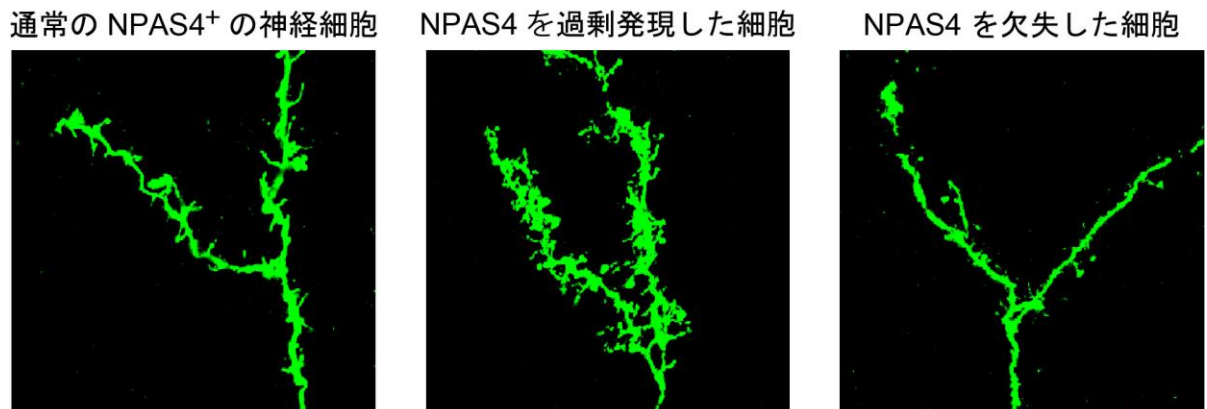


図5 NPAS4 を過剰発現した神経細胞と欠失した神経細胞のスパイン (棘突起) NPAS4 を過剰に発現したものではスパインの数が増加し, NPAS4 を欠損したものでは減少していることがわかりました. NPAS4 タンパク質の産生量に応じて, 嗅球介在ニューロンでのシナプス数の増減が制御されていることが明らかになりました.

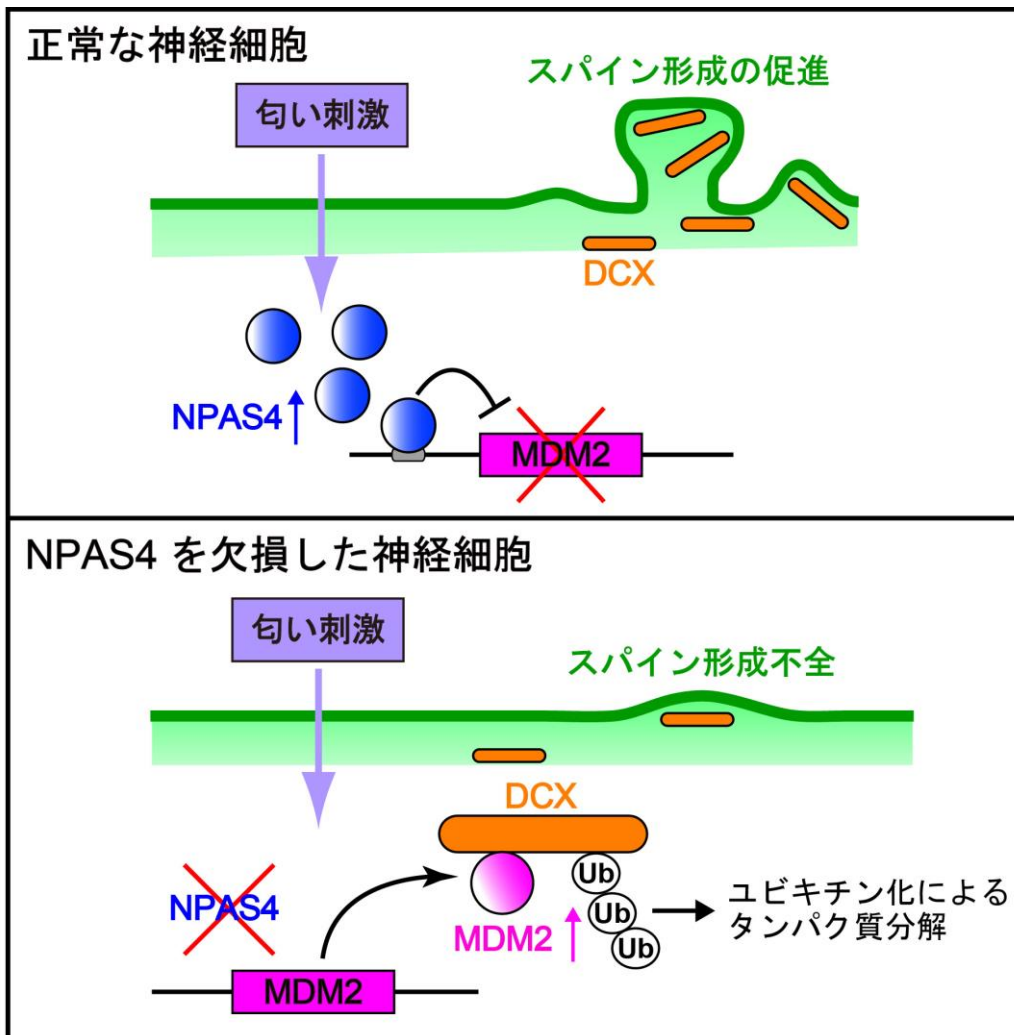


図6 NPAS4によりスパイン（棘突起）が形成される仕組み

正常な神経細胞では、匂い刺激による神経活動によってNPAS4タンパク質の産生量が増加します。しかしながら、NPAS4を欠損した神経細胞では、NPAS4タンパク質が作られないために、産生が止められていたMDM2タンパク質が増加して、ダブルコルチン（DCX）タンパク質を分解するように指示します。ダブルコルチンには、スパインの形成を促進する働きがありますので、NPAS4を欠損した神経細胞では、スパインの形成が抑えられます。従って、NPAS4タンパク質は、ダブルコルチンの産生量を調節することによって、新たに作られるスパイン数の増減を制御していることがわかりました。



図7 今回の研究成果のまとめ

匂い刺激により活動が盛んになった神経細胞では、NPAS4 タンパク質の量が増加して、スパインの数も増加することが明らかになりました。このように神経細胞は、そのスパインの数が多くなるほど、多くの他の神経細胞と接続できるようになり、情報の伝達効率を上げていていると考えられます。

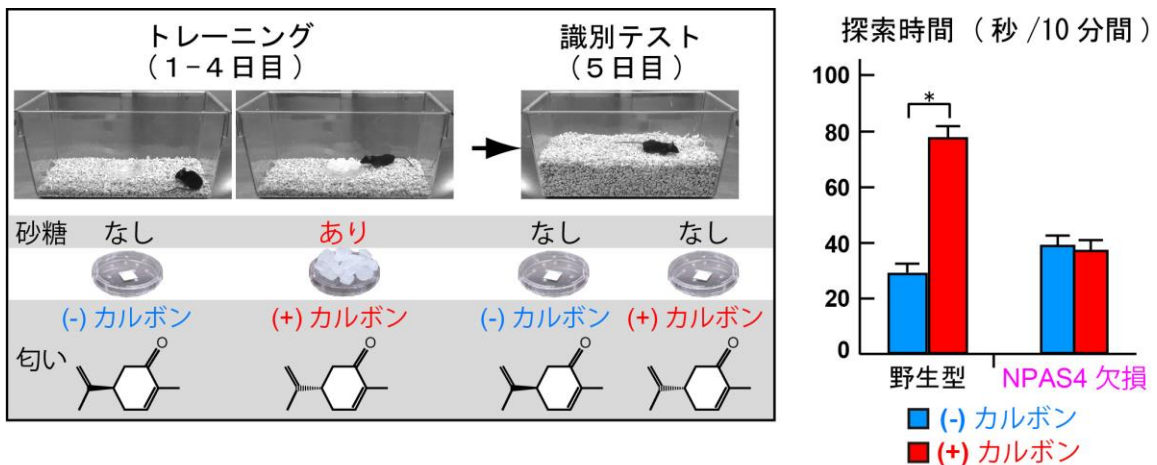


図8 NPAS4 遺伝子を欠損したマウスは匂いに鈍感になる

嗅球介在ニューロンで NPAS4 遺伝子を欠損させたマウスに関して、(+) カルボンと (-) カルボンという構造のよく似た2つの匂い分子のうち、片方の匂い分子 ((+) カルボン) と砂糖という報酬を関連付けた学習を行いました。野生型マウスは2つの匂いをかぎ分けることができましたが、NPAS4 欠損マウスはかぎ分けることができませんでした。匂いの刺激によって、嗅球介在ニューロンでスパインの数を増やすことができないために、よく似た2つの匂い分子を識別する情報処理をうまく行えなくなると推測されます。

NPAS4遺伝子の人為的活性化

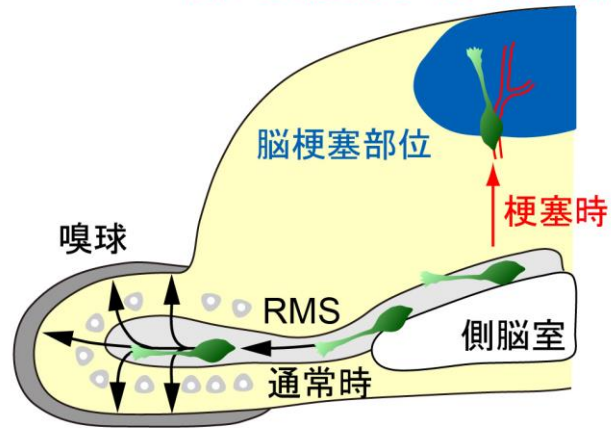


図9 嗅球介在ニューロンの脳梗塞の修復に向けた臨床応用

脳梗塞モデルマウスにおいて、側脳室で生まれた嗅球介在ニューロンの一部は、損傷した脳の領域へと移動して神経回路を修復する性質を持っています。この際にNPAS4遺伝子の発現を人為的に活性化することができれば、新たな治療法の開発につながることを期待されます。