

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15H02352

研究課題名(和文) 進化的に保存される脳カラム構造形成メカニズムとその機能

研究課題名(英文) Molecular mechanism of columnar formation in mammalian cortex and its function

研究代表者

下郡 智美 (Shimogori, Tomomi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：30391981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,700,000円

研究成果の概要(和文)：生後の脳発達には個体が生育する環境に適した脳機能を獲得するために、外部入力に合わせた神経細胞の形態変化と脳神経回路形成を行う事が知られている。しかし、どのようにして選択的な樹状突起の除去/伸長が行われているのかその分子メカニズムは明らかでなかった。我々はBtdb3因子が樹状突起の形態変化に重要な役割を果たしていることを元に、Btdb3が神経活動依存的にどのような分子動態を示すのかを明らかにした。神経活動のレベルに応じてBtdb3は結合する因子を選択的に変化させ、RhoまたはRacの活性を変えることによって樹状突起の除去/伸長を行なっていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発達期の樹状突起の過剰な形成/過剰な除去は自閉症または統合失調症患者の死後脳でも確認されており、樹状突起の正しい形態形成は重要なイベントである。自閉症や統合失調症患者のゲノム解析から、複数の責任遺伝子が関わっていることが示唆されているが、実際にどのようにこれらの因子が樹状突起の形態変化に関与しているのか明らかにされていない。また発達期の神経活動も樹状突起の形態変化に重要な役割を果たすとされているがその詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究ではこの2つの要素がどのように共に働き、樹状突起の形態変化につながっているのかを明らかにした。今後は病態への関与につながる可能性を持っている。

研究成果の概要(英文)：Dendrite patterning through neurite elongation, branching, pruning, self-avoidance and tiling is required for correct circuit formation. Dendritic refinement is known to operate via cytoskeletal modification and membrane-initiated activity-dependent pathways through secretion molecules including Btdb3. In this current study, we revealed that Btdb3 changes its binding partner depends on the activity level. Low activity leads Btdb3 to bind protein which has Rho activity and remove dendrite. High neuronal activity leads to bind to protein which has Rac activity and elongate dendrites. Moreover, dendrites which received very high long-lasting activity makes Btdb3 to dissociate from these proteins and translocates to cytoskeletal fibers to stabilize the structure.

Taken together, we have revealed a molecular mechanism for how dendrite-specific neuronal activity controls precise morphological remodeling during the critical period.

研究分野：神経発生

キーワード：臨界期 発達障害 神経回路形成 樹状突起

1. 研究開始当初の背景

生後の脳発達には個体が生育する環境に適した脳機能を獲得するために、外部入力に合わせた神経細胞の形態変化と脳神経回路形成を行う事が知られている。しかし、種によって生育する環境が異なる事、利用する感覚器官が異なる事から、脳内でも種特異的な脳神経回路発達を起こす分子基盤がある事が想像されていた。申請者の研究室では、この問題を明らかにするためにマウス体性感覚野に存在するパレル皮質細胞を利用して、その分子メカニズムの解明に着手した。マウスやラットはヒゲを使った触覚情報を多く活用して生活しているため体性感覚野にヒゲと同じパターンの構造を持つ神経回路が存在する。これは1本のヒゲからの入力が入力脳幹、視床と中継された後、大脳皮質の第4層に投射され、その周りに細胞が取り囲むように集まり、筒状のクラスター(パレルカラム)を作ることから形成される構造である。これは視床の後腹側核からそれぞれのヒゲからの入力を担う視床軸索の束がヒゲの位置関係を保ったまま大脳皮質に投射し、その入力の多い方に皮質神経細胞(spiny stellate 細胞:有棘星状細胞)が樹状突起を向けた方向性を持つ。この構造は生後まもなくの時期にヒゲの除去を行うなど、入力を阻害し十分な神経入力を受ける事が出来ない状況にすると樹状突起の視床軸索への方向性を失いパレルカラムの形成が起こらない。樹状突起の形成は発生中の胎児脳で行われるが、まだ外部からの情報が多く入力されないために、どちらの方向に向けて樹状突起を伸ばせば良いのか決定されていない。このため、過剰な樹状突起を形成しておき、生後に外部からの入力に依存して、過剰な樹状突起を除去する作業が行われ、この結果特有のパレルカラムが形成される。そこで、この過剰な樹状突起の除去に必要な分子メカニズムを明らかにするために、有棘星状細胞に特異的に発現する因子の探索を Allen Brain Atlas を用いて行い、Btd3(BTB/POZ (broad complex Tramtrack bric-a-brac/Pox virus and zinc finger) domain containing 3)に着目した。Btd3 はパレル構造の中でも有棘星状細胞に特異的に発現している事、生後3日目の視床軸索から入力が起こり、樹状突起の刈り取りが始まる時期特異的に発現が始まる事から注目した。そこで、その機能解析のために、Btd3 のノックダウンに必要な shRNA を設計した。マウス子宮内遺伝子導入法によってパレル領域にこの shRNA を発現させ、有棘星状細胞の樹状突起の形成を観察した結果、Btd3 が欠損すると不必要な樹上突起の除去ができなくなることが明らかになった。次に gain of function によって神経細胞が樹状突起の形態変化を起こす能力の獲得ができるのか実験を行った。マウスの視覚野には恒常的な Btd3 の発現がない事から、単眼遮へいを行って入力の強弱をつけても、視覚野での神経細胞は左右対称な樹状突起を持つ。しかし、Btd3 の強制発現を行った視覚野細胞は、単眼遮へいによる入力の変化が起こると、入力が少ない方向の樹状突起を刈り取り、より入力が多い方向に向けて樹状突起のパターンを変化させて効率的な回路を形成する事が明らかになった。これらの結果から、Btd3 は神経活性依存的に樹状突起の形態変化を起こす因子である事が明らかとなった。しかしパレルカラムはげっ歯類特有の脳内構造である事から、パレル構造を持たない動物種で Btd3 の発現を明らかにする事にした。この結果、小型の新世界サルであるコモンマーモセットとイタチ科のフェレットでは、体性感覚野の発現に加え、第一次視覚野でより強い Btd3 の発現がある事を見いだした。この事から、これらの動物種では Btd3 は視覚野細胞の神経入力依存的な樹状突起の形態変化をコントロールしている事が推測された。そこで、フェレット胎児脳に子宮内遺伝子導入法を用いて Btd3 の機能阻害を試みた。通常 Btd3 の発現があるフェレットの視覚野細胞では樹状突起が入力が高い方向に向けて樹状突起の形態を変化させる事が出来る。Btd3 の発現を低下させると樹

状突起は形態変化を起こせなくなる事から、これらの動物では、第一次視覚野で Btbd3 の発現を獲得した事が視覚情報を有効に利用し生存につなげている要因のひとつではないかと考える事が出来る。そこでこの仮説を検証するために本申請では、生後の脳発達期における樹状突起の形態変化と神経回路編成が実際に脳機能の向上に働いているのかということを明らかにする目的で以下の3つのテーマを中心に研究を遂行する。

2 . 研究の目的

外部入力に応じた樹状突起の変化には Btbd3 を介した分子メカニズムが存在する事を、申請者はマウス体性感覚野、フェレット視覚野で明らかにした。加えて、Btbd3 はコモンマーモセットの視覚野で特異的に発現している事から Btbd3 を中心にした分子メカニズムは霊長類でも保存されており、この分子基盤の全容を明らかにする事は我々ヒトを含む霊長類の脳での神経回路発達を解明につながる事が期待できる。そこで本研究計画では、以下の課題に取り組み、(1) Btbd3 が過剰な樹状突起を除去する分子メカニズムの全容解明、(2) 分散培養系を用いた樹状突起の形態変化のライブイメージングの確立、(3) 樹状突起が正常に形成しなかったマウス、フェレットでの蛍光カルシウムプローブを用いた *in vivo* の脳のイメージング、神経細胞の発達期での形態変化とそれに伴う脳機能発達の関連に迫る。

3 . 研究の方法

(1) Btbd3 が樹状突起の形態を変化させる分子メカニズムの全容解明

先行研究から Btbd3 が過剰な樹状突起の除去を行っている事が明らかとなった。さらに、神経細胞が脱分極を起こした時に、Btbd3 の細胞内での局在が細胞質から中心体に移動する事が必要である事も明らかにした。しかし、Btbd3 には RhoGAP などのチューブリン構造を破壊するような活性ドメインが存在しない事から、別のタンパクとの結合によって樹状突起の選択的な除去を行っている事が推測される。そこで、Btbd3 と結合することにより細胞骨格を変化させる事の出来る因子の単離、さらに神経活性を感知し入力が高い樹状突起を決定するセンサーとなる因子の特定を行う。

(2) 分散培養系での樹状突起の除去のライブイメージングとタンパク動態の可視化

ショウジョウバエの感覚ニューロンでは局所的な細胞内カルシウム濃度の変動が不要な神経突起を時間的および空間的に規定するシグナルとして機能していることが明らかにされている (Kanamori *et al.*, *Science*, 2013)。マウス脳内での神経細胞においても同様のシグナルと分子機構が働いている可能性を検討するには、ショウジョウバエと同様のイメージング技術の開発が必要である。生後間もなくの *In vivo* での樹状突起の形態変化の観察は確立されているもの (Mizuno *et al.*, *Neuron*, 2014)、単一の樹状突起内のタンパクの局在やカルシウム濃度の測定のためには更なる高解像度のイメージングが必要である。このために、分散培養系を利用して、ライブイメージングによる樹状突起の除去の様子、細胞内でのカルシウム動態、神経活性の推移を観察し、これらのファクターがどのようにして特定の樹状突起を除去につながるのかを明らかにする。

(3) 樹状突起が正常に形成しなかった動物の脳機能イメージング

正常な樹状突起の形成が起こらなかった場合、どのような回路形成異常がおこり、どのような脳機能の異常を引き起こすのか明らかにされていない。この事を明らかにし生後発達期における正常な細胞形態形成の重要性を計るためにも、樹状突起の形態異常を起こした脳の機能測定は必要

である。蛍光カルシウムプローブ(GCaMP3)を発現するマウスライン、膜電位感受性蛍光タンパク質 (VSFP)を発現するマウスラインを用い、これらのマウス脳へ Btbd3 の機能阻害による樹状突起の形態異常を引き起こし、成体でのイメージングを行う。さらに、子宮内遺伝子導入法とアデノ随伴ウイルスを組み合わせた二重の遺伝子導入法により、樹状突起の形態形成異常と蛍光プローブの発現を行い、フェレットの視覚野でのイメージング手法を確立する。

4 . 研究成果

生後の脳発達には個体が生育する環境に適した脳機能を獲得するために、外部入力に合わせた神経細胞の形態変化と脳神経回路形成を行う事が知られている。しかし、どのようにして選択的な樹状突起の除去 / 伸長が行われているのかその分子メカニズムは明らかでなかった。我々は Btbd3 因子が樹状突起の形態変化に重要な役割を果たしていることを元に、Btbd3 が神経活動依存的にどのような分子動態を示すのかを明らかにした。神経活動のレベルに応じて Btbd3 は結合する因子を選択的に変化させ、Rho または Rac の活性を変えることによって樹状突起の除去 / 伸長を行なっていることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kinoshita Nagatoki, Huang Arthur J.Y., McHugh Thomas J., Suzuki Sachihiko C., Masai Ichiro, Kim II Hwan, Soderling Scott H., Miyawaki Atsushi, Shimogori Tomomi	4. 巻 15
2. 論文標題 Genetically Encoded Fluorescent Indicator GRAPHIC Delineates Intercellular Connections	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 28 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1016/j.isci.2019.04.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chan Carmen, Kamiguchi Hiroyuki, Shimogori Tomomi	4. 巻 0
2. 論文標題 Spatially restricted long term transgene expression in the developing skin used for studying the interaction of epidermal development and sensory innervation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1111/dgd.12603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 12件）

1. 発表者名 Tomomi Shimogori
2. 発表標題 Input from the thalamus creates diversity of the cortical neuron
3. 学会等名 GRC Thalamocortical interaction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomomi Shimogori
2. 発表標題 Input from the thalamus creates diversity of the cortical neuron
3. 学会等名 GRC Molecular cellular neuroscience (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下郡智美
2. 発表標題 大脳皮質の興奮性神経細胞の多様性と分化・回路形成メカニズム
3. 学会等名 生理学研究所研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下郡智美
2. 発表標題 Neuronal activity dependent circuit development: Morphological changes and molecular mechanism
3. 学会等名 日本神経科学大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 下郡智美
2. 発表標題 Neuronal activity dependent circuit development: Morphological changes and molecular mechanism
3. 学会等名 第48回生理研国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Asuka Matsui
2. 発表標題 Selective dendrite removal/maintenance is controlled by activity dependent BTBD3 protein status
3. 学会等名 第39回日本神経科学会（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tomomi Shimogori
2. 発表標題 Neuronal activity dependent circuit development: Morphological changes and molecular mechanism
3. 学会等名 GRC (Molecular & Cellular and Neurobiology) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tomomi Shimogori
2. 発表標題 Neuronal activity dependent circuit development: Morphological changes and molecular mechanism
3. 学会等名 Circuit Construction in the Mammalian Brain (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松居亜寿香
2. 発表標題 Neuronal activity dependent translocation of Btbd3 to the cytoskeleton is essential for proper dendrite development
3. 学会等名 日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 木下暢暁
2. 発表標題 Development of fluorescent probe for visualization and isolation of specific neural circuit
3. 学会等名 日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 下郡智美
2. 発表標題 生後環境による神経ネットワークの形成と成熟
3. 学会等名 日本神経科学大会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Tomomi Shimogori
2. 発表標題 Btd3 and PlexinA4 interaction is essential for activity dependent unidirectional dendrite patterning
3. 学会等名 ASCONA Meeting 2015 (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Tomomi Shimogori
2. 発表標題 Thalamic input controls species specific circuit development in cortex
3. 学会等名 EMBO workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----