

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14327

研究課題名(和文)自発発火のタイミングが決定する樹状突起の接続特異性

研究課題名(英文)Formation of discrete connectivity by the timing of spontaneous activity

研究代表者

藤本 聡志 (Fujimoto, Satoshi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：50586592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚系において、嗅球における特異的回路形成がにおい認識の要である。僧帽細胞が生後発達期に主樹状突起の刈り込みを介して1つの糸球体へのシナプス接続を行うことは知られており、以前に僧帽細胞の自発神経活動が樹状突起の刈り込みに必要であることを示したが、自発神経活動の実態については明らかでなかった。そこで本研究では生体あるいは単離した嗅球を用いてカルシウムイメージングを行い、発達に従って、同期的な自発神経活動が糸球体特異的なパターンへと変化することを明らかにし、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体とギャップ結合が自発神経活動に必要なことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the olfactory system, discrete map formation in the olfactory bulb (OB) is essential for odor discrimination. It has been known that mitral cells prune all but one primary dendrite during development. Previously we found that dendrite pruning is perturbed by the over-expression of Kir2.1 or NMDAR knockout in mitral cells, and also regulated by spontaneous neuronal activity produced in the OB but not sensory-evoked activity. In this study, pharmacological experiments revealed that gap junctions and ionotropic glutamate receptors are required for the spontaneous network activity in the OB. This spontaneous activity was highly correlated among glomeruli at an early stage (P0-2); however, the pattern of the activity became decorrelated and glomerulus-specific just prior to the pruning, suggesting that this developmental transition promotes the formation of discrete connectivity in the OB.

研究分野：神経科学

キーワード：神経回路形成 自発神経活動 嗅球 カルシウムイメージング 僧帽細胞

1. 研究開始当初の背景

生後発達期において、神経細胞は過剰に伸長した軸索や樹状突起を刈り込むことで成熟した神経回路を形成する。これまでに運動ニューロン、骨格筋、登上線維、プルキンエ細胞、視神経、外側膝状体など数多くの軸索投射のモデルから、シナプス入力軸索の刈り込みが必要であることが明らかにされてきた。一方、体性感覚皮質ニューロンや網膜神経節細胞の樹状突起も生後の神経活動依存的に刈り込まれることが知られているが、神経活動がどのように刈り込みを制御するのかは不明である。

マウスの嗅覚 1 次投射神経細胞である嗅神経細胞は、約 1000 種類存在する嗅覚受容体のうち 1 種類が発現しており、におい分子に対して選択性の高い軸索投射パターンを示すことが知られている。また、そこから入力を受ける僧帽細胞の主樹状突起は生後 1 週間以内に 1 本を残して刈り込まれることが知られているが、どのようにして 1 本のみが選択されるのかは未解明である。以前の研究から、におい刺激を受けることのできない CNGA2 ノックアウトマウスや鼻孔閉鎖したマウスでも刈り込みは起こることは知られていたが、申請者は Kir2.1 の過剰発現により神経活動を抑制した僧帽細胞では主樹状突起の刈り込みが抑制されることを見出していた。また、予備的な実験で僧帽細胞に GCaMP3 を発現する生後 2 日齢のマウスから嗅球を単離し、カルシウムイメージングを行うと僧帽細胞を伝播するウェーブ状の規則的な自発活動が観察されたことから、僧帽細胞の自発活動が樹状突起の刈り込みに必要であると考えられる。しかしながら、自発活動のいかなる要素が樹状突起の刈り込みを制御しているのかは不明であり、この問いは他の神経細胞モデルにおいても未解明のままである。

2. 研究の目的

本研究では生後発達期の自発神経活動に注目し、接続特異性の高い回路を構築するマウス嗅球を用いて、発達期の嗅球上をグローバルに伝播する自発神経活動の計測、定量を行う。さらに、樹状突起の刈り込みを介した神経回路の精緻化と自発神経活動との関係性を解明し、これまでに生理的意義が不明であった発達期での自発神経活動の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 2 光子顕微鏡を用いた嗅球を伝播する自発神経活動の計測、定量化。
2 光子顕微鏡下、Ai38;Pcdh21-Cre マウスおよび Thy1-GCaMP6f マウスから単離した嗅球をチャンバーに設置し ACSF で灌流を行った

状態で、僧帽細胞の神経活動を計測した。得られたデータを自作の MATLAB プログラムを用いて解析した。

(2) 自発神経活動を生み出す機構の解明。
薬理学的手法によるカルシウムウェーブ生成因子の網羅的探索と遺伝学的手法による樹状突起刈り込みに対する嗅球内の抑制回路、修飾回路の関与について解析を行った。上述の *in vitro* での嗅球カルシウムイメージングを用いて様々な薬剤を投与し、何が自発神経活動に必要なのかを解析した。また、GAD67KO マウスや DAT プロモーター特異的にテタヌトキシンを発現するマウスにおいて正常な樹状突起刈り込みが起こるかどうかを解析した。

(3) 自発神経活動と樹状突起刈り込みとの関係。

自発神経活動のパターンと「勝者」となる樹状突起の選択との相関、因果関係について光遺伝学的ツールを用いて解明を試みた。また、自発神経活動の下流、特にカルシウムシグナルの下流で主樹状突起の「勝者」「敗者」を決める分子機構について網羅的に機能的スクリーニングを行った。

(4) *in vivo* での自発神経活動の計測および樹状突起刈り込みの解析。

覚醒下での幼若マウス嗅球の *in vivo* 2 光子カルシウムイメージング法を確立し、*in vitro* でのデータとの比較を行うとともに生後 1 週間以内のマウス嗅球でのカルシウムシグナルの活動パターンを詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) 2 光子顕微鏡を用いた嗅球を伝播する自発神経活動の計測、定量化。

単離した嗅球の僧帽細胞では生後間もなくから感覚入力に依存しない自発神経活動が観察された。また、パターンに注目すると生後発達初期(生後 1 日から 2 日)には嗅球全体で僧帽細胞の神経活動が同期的であったのに対し、生後 3 日以降には同期的な神経活動ではなく、糸球体特異的なパターンへと変化することが観察された。

(2) 自発神経活動を生み出す機構の解明。
薬理的な実験により、生後 2 日令のマウス嗅球に NMDA 受容体のアンタゴニストである APV、AMPA 受容体のアンタゴニストである CNQX を投与すると、自発神経活動が抑制された。また、ギャップ結合の抑制剤である carbenoxolone、octanol を加えることでも自発神経活動が抑制された。これにより、自発神経活動にはイオンチャネル型グルタミン酸受容体とギャップ結合が必要であることがわかった。また、糸球体固有のパターンへと変化した後の嗅球に GABA-A 受容体のアンタゴニストである Bicuculline、Gabazine を投与すると糸球体固有の活動パターンが再び同期的なパターンへと戻ることが観察された。これは、GABA シグナルが自発神経活動

の脱同期に必要であることを示唆している。GAD67 KO マウスにおいては、野生型と比較して樹状突起刈り込みが1日程度遅延することから、活動パターン変化が樹状突起刈り込みを制御する可能性が浮上するが、さらなる多面的な解析が必要である。

(3) 自発神経活動と樹状突起刈り込みとの関係。Chr2を発現するマウスを用いて、生後すぐに嗅球上にLEDを埋め込み、その後数日間同期的な光刺激を与えることで、人工的に糸球体間の同期的な神経活動を維持する状態を作り、その後樹状突起の刈り込みについて解析を行う実験デザインを計画していた。しかし、本当に効果的な光刺激を与えることができているのか、カルシウムイメージングや電気生理学的解析を駆使し最適化しようとしたが、条件検討する段階で難航しており最適化を行う必要がある。

カルシウムシグナルの下流で主樹状突起の「勝者」「敗者」を決める分子機構については、僧帽細胞に発現が認められる受容体や膜タンパク質、これまでにLTP,LTDに関与しているという報告があるタンパク質をコードする遺伝子に対するgRNAを設計しCRISPR/Cas9ベクターとともに子宮内エレクトロポレーション法を用いて、ノックアウトを行い、いくつか樹状突起の刈り込みに関与している可能性のある遺伝子を特定した。今後それぞれの遺伝子の関与を詳細に調べていく必要がある。

(4) in vivoでの自発神経活動の計測および樹状突起刈り込みの解析。

覚醒下での幼若マウス嗅球においても、嗅神経細胞(プレシナプス)での自発神経活動が見られないが、僧帽細胞(ポストシナプス)での自発神経活動が見られた。また、発達に伴うパターンの変換も観察された。単離した嗅球で見られた現象は、生理的条件下においても同様に起こる現象であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Meng-Tsen Ke, Yasuhiro Nakai, Satoshi Fujimoto, Rie Takayama, Shuhei Yoshida, Tomoya S. Kitajima, Makoto Sato, Takeshi Imai
Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent. Cell Reports Volumes 14, Issue 11, Pages 2718-2732 March 22, 2016 doi:10.1016/j.celrep.2016.02.057

(2) Aya Murai, Ryo Iwata, Satoshi Fujimoto, Shuhei Aihara, Akio Tsuboi, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, Kazunori Nishizaki, Takeshi Imai

Distorted coarse axon targeting and reduced dendrite connectivity underlie dysosmia after olfactory axon injury. eNeuro 3(5) e0242-16.2016 1-13, October 5, 2016

DOI: 10.1523/ENEURO.0242-16.2016

〔学会発表〕(計20件)

(1) Satoshi Fujimoto, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai.
生後初期の自発神経活動が嗅覚僧帽細胞の樹状突起刈り込みに必要である
第38回日本神経科学大会 Neuroscience 2015
2015.07.28 神戸市 (神戸国際会議場、神戸国際展示場)

(2) Takeshi Imai, Satoshi Fujimoto, Marcus Leiwe, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito
嗅球神経回路の生後発達を制御する自発神経活動
第38回日本神経科学大会 Neuroscience 2015
2015.07.30 神戸市 (神戸国際会議場、神戸国際展示場)

(3) Satoshi Fujimoto, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai
Spontaneous neuronal activity is required for dendrite pruning of olfactory mitral cells in early postnatal development
AXON2015, Sep 20-22. 2015, Klosterneuburg, Austria

(4) Satoshi Fujimoto, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai
Spontaneous neuronal activity is required for dendrite pruning of olfactory mitral cells in early postnatal development
Neuroscience 2015, Oct 17-21. 2015, Chicago, USA

(5) Satoshi Fujimoto, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai
Spontaneous neuronal activity is required for dendrite pruning of olfactory mitral cells in early postnatal development
第13回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」
2015.11.02-03 福岡市(九州大学馬出キャンパス コラボレーションセンター)

(6) Satoshi Fujimoto, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai
Spontaneous neuronal activity is required for dendrite pruning of olfactory mitral cells in early postnatal development
遺伝研研究会 哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム

2015.12.06-07 静岡県三島市 (国立遺伝学研究所)

(7) Marcus Leiwe, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai

Spontaneous Network Activity in the Neonatal Mouse Olfactory Bulb is Required for Dendrite Pruning of Mitral Cells

CSH-Asia Conference: Development, Function & Disease of Neural Circuits
May 17. 2016, Suzhou, China

(8) Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Yuko Muroyama, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai

Spontaneous activity governs the dendrite pruning of mitral cells to establish discrete connectivity

17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016)

2016.06.06-06.08 横浜市 (パシフィコ横浜)

(9) Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Yuko Muroyama, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai

僧帽細胞樹状突起の刈り込みと接続特異性を制御する発達期の自発神経活動

第39回日本神経科学大会

2016.07.20 横浜市 (パシフィコ横浜)

(10) Marcus N. Leiwe, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai

Spontaneous Network Activity in the Neonatal Mouse Olfactory Bulb Regulates Dendrite Pruning of Mitral Cells

International Symposium 2016 - Circuit Construction in the Mammalian Brain

2016.08.09 大阪府吹田市 (大阪大学吹田キャンパス 生命システム棟 2階セミナー室)

(11) Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Yuko Muroyama, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai

Developmentally-regulated spontaneous network activity governs dendrite pruning of mitral cells to establish discrete connectivity

CSHL Meeting: Axon Guidance, Synapse Formation & Regeneration

September 20-24. 2016, NY, USA

(12) 藤本 聡志

発達期の嗅球における自発神経活動パターンの変化と回路形成

日本発生生物学会 秋季シンポジウム 2016

2016.10.19 静岡県三島市 (三島市民文化会館)

(13) M. N. LEIWE, S. FUJIMOTO, Y. MUROYAMA, R. KOBAYAKAWA, K. KOBAYAKAWA, T. SAITO, T. IMAI

Intrinsic spontaneous network activity in the neonatal mouse olfactory bulb is required for dendrite pruning of mitral cells

Society for Neuroscience 2016

November 12-16. 2016, San Diego, CA USA [San Diego Convention Center]

(14) Marcus N. Leiwe, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai

Spontaneous Network Activity in the Neonatal Mouse Olfactory Bulb Regulates Dendrite Pruning of Mitral Cells.

Wiring and Functional Principles of Neural Circuits

November 17-18. 2016, San Diego, CA USA [NSB Auditorium, University of California]

(15) Marcus N. Leiwe, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai

Spontaneous Network Activity in the Neonatal Mouse Olfactory Bulb Regulates Dendrite Pruning of Mitral Cells.

The UK-Japan Spring Neuroscience Symposium

March 15-16. 2017, Kyoto [Kyoto Garden Palace Hotel]

(16) Takeshi Imai, Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito

Spontaneous activity and formation of discrete connectivity in the olfactory bulb

50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists

May 13. 2017, Tokyo [Tower Hall Funabori]

(17) Takeshi Imai, Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito

Formation of discrete olfactory circuits by spontaneous activity

第40回日本神経科学大会

2017.07.22, 千葉市 (幕張メッセ)

(18) Yusuke Terada, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai, Keiji Miura

Developmental circuit reorganization reduces synchronous activities in OB

第40回日本神経科学大会

2017.07.22, 千葉市 (幕張メッセ)

(19) Marcus Leiwe, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai
Spontaneous Network Activity in the Neonatal Mouse Olfactory Bulb Regulates Dendrite Pruning of Mitral Cells
第 16 回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」(ISMNTOP/YRUF/AISCRIB2017)
2017.11.04, 福岡市東区 (九州大学馬出キャンパス コラボステーション II)

(20) Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai
Developmental change of spontaneous network activity regulates dendrite pruning of mitral cells to establish discrete connectivity
第 16 回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」(ISMNTOP/YRUF/AISCRIB2017)
2017.11.04, 福岡市東区 (九州大学馬出キャンパス コラボステーション II)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 聡志 (FUJIMOTO, Satoshi)
九州大学医学研究院・助教
研究者番号：50586592

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし