

令和 6 年 4 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03352

研究課題名（和文）樹状突起の機能的な3D空間配置を確立する発生システムの解明

研究課題名（英文）Developmental systems establishing functional spatial configuration of dendrites

研究代表者

桑子 賢一郎（Kuwako, Ken-ichiro）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：30468475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、複雑に分岐した大きな1本の樹状突起をもつ小脳プルキンエ細胞をモデルとして、樹状突起の空間配置制御のメカニズムを解析した。まず、細胞骨格制御因子に着目した種々の解析からアクチン制御因子Arp2/3およびその活性化因子N-WASPが発生期プルキンエ細胞で高発現していることを発見した。そして、N-WASP-Arp2/3経路の機能阻害を行うと樹状突起の成熟プロセスが早期に停止し、特徴的な1本の一次樹状突起が形成されず、著しく矮小化することが明らかになった。このことから、プルキンエ細胞の樹状突起の空間配置制御においてN-WASP-Arp2/3経路が極めて重要な働きをしていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は樹状突起の基本型をつくるために必須の分子機構を解明し、これまで不明な点が多かった樹状突起の空間配置制御システムの理解に貢献したことから大きな意義をもつ。今後、本研究で得られた知見をさまざまな種類のニューロンで検証していくこと、またN-WASP-Arp2/3シグナルがどのようなメカニズムで樹状突起を制御しているのかを明らかにしていくことで、“脳をつくる”しくみの理解がさらに進むと期待される。また、本研究で得られた知見は、将来の神経再生医療において移植ニューロンの「かたち」を制御してより機能的な神経回路を再建するために重要になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the regulatory mechanisms of dendritic spatial configuration in cerebellar Purkinje cells, which have a single large, intricately branched dendrite. Based on various analyses focusing on cytoskeletal regulators, we first found that the actin regulator Arp2/3 and its activator N-WASP are highly expressed in developing Purkinje cells. Moreover, functional inhibition of the N-WASP-Arp2/3 pathway caused an early arrest of the dendritic maturation process, resulting in marked hypoplasia without the establishment of a single characteristic primary dendrite. These results indicate that the N-WASP-Arp2/3 pathway plays a pivotal role in the regulation of dendritic spatial configuration in Purkinje cells.

研究分野：神経科学

キーワード：樹状突起 発生 細胞骨格制御

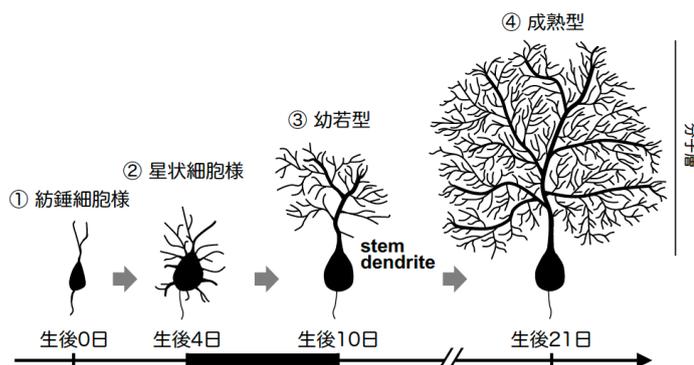
1. 研究開始当初の背景

ニューロンのタイプごとに多様な樹状突起の“かたち”は、神経回路の機能と密接に関係している。伸長や分岐などの樹状突起の基本設計にかかわる分子機構についてはこれまで多くの研究が行われ、その理解が進んできた。一方で、生体内には、小脳プルキンエ細胞や海馬歯状回ニューロンのように、厳密に制御された再現性の高い三次元構造の樹状突起をもつニューロンが数多く存在する。このような樹状突起の三次元的な空間配置は、入力回路のシナプス接続性や情報処理特性などを規定するきわめて重要な要因となる。しかし、特に哺乳類において、樹状突起の空間配置を制御する発生システムの理解は大きく遅れていた。

神経系の発生過程では、“スクラップ&ビルド”と呼ばれるリモデリング機構、つまり、発生過程で一過性の構造を過剰に構築し、その後、競合によってそれらを選別・再編成して成熟型の空間配置を確立する機構が存在する。プルキンエ細胞は、その特徴的な樹状突起の構築過程が競合的リモデリングの典型例としてよく知られている。成熟したプルキンエ細胞は、高度に分岐した大きな扇状の樹状突起を1本のみ分子層に向かって伸ばす(図1;④)。この特徴的な樹状突起構造は、平行線維との効率的なシナプス結合や階層的な情報入力、そして情報の統合機構に重要とされており、プルキンエ細胞の機能発現に欠かせない。プルキンエ細胞は生後10日間に起こる劇的なリモデリングによって成熟型の原型となる一本の樹状突起(=stem dendrite)を構築する。

特に、全方向性に多数の樹状突起をもつ星状細胞様ステージから幼若型ステージまでの6日間で(図1;②→③)、頂端側の樹状突起の1本がstem dendriteとして選定され、選ばれなかった残りすべての樹状突起は退縮する。これまでの研究で、プルキンエ細胞の樹状突起形成に関わる多様な分子群が発見されたが、その多くは幼若型から成熟型への分化機構に関わるもので(図1;③→④)、stem dendriteを形成する競合的リモデリング機構はほとんど解明されていなかった。

図1 プルキンエ細胞の樹状突起形成



星状細胞様ステージ(②)から幼若型ステージ(③)に至る6日間で、成熟型の原型となる“stem dendrite”が確立される。この過程では、樹状突起の競合的リモデリングが起きている

2. 研究の目的

特徴的な三次元構造をもつプルキンエ細胞の樹状突起をモデルとして、その空間配置の制御機構の解明を目指した。特に、リモデリング機構によって確立される1本の大きなstem dendriteの形成に関わる分子基盤を細胞骨格制御の観点から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発生期プルキンエ細胞における細胞骨格制御因子の発現解析

マウスのプルキンエ細胞において、その樹状突起が発達する生後3週の間を高発現するアクチン線維あるいは微小管の制御因子群を既存の発現データベースおよび特異抗体を用いた免疫組織化学的解析により探索した。組織学的解析では、特に樹状突起上での発現

に着目して探索を行った。

(2) 培養プルキンエ細胞における樹状突起形成の解析

初代培養プルキンエ細胞に、mCherry を融合させたアクチン制御因子サブユニット Arp3 を遺伝子導入し、樹状突起の形成過程をタイムラプス観察して Arp3 の分子動体を調べた。また、Arp2/3 およびその上流活性化因子 N-WASP や Cdc42 に対する特異阻害剤を初代培養プルキンエ細胞に添加して樹状突起の発達への影響を解析した。

(3) 生体プルキンエ細胞における樹状突起形成の解析

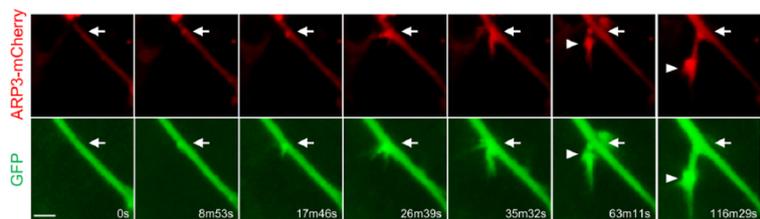
N-WASP-Arp2/3 経路がプルキンエ細胞の stem dendrite の確立 (図 1 ; ②星状細胞様ステージ → ③幼若型ステージ) に関与するかどうかを調べるために、子宮内エレクトロポレーション法によって N-WASP の機能阻害型変異体群をプルキンエ細胞に遺伝子導入して N-WASP-Arp2/3 経路を阻害し、共発現させた GFP シグナルの観察や抗体染色により生後 21 日目に樹状突起構造の解析を行った。また、逆に N-WASP-Arp2/3 経路の活性型変異体を発現させて樹状突起形成への影響を調べる実験も行った。なお、遺伝子導入の際は、DNA 量を減らして導入効率を下げることで、蛍光標識されたプルキンエ細胞の樹状突起構造の全容が観察できるようにした。さらに、N-WASP-Arp2/3 経路がプルキンエ細胞の樹状突起の伸長・分岐 (図 1 ; ③幼若型ステージ → ④成熟型ステージ) に関与するかどうかを調べるために、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて生後 10 日目以降に N-WASP の機能阻害型変異体を発現させて、生後 21 日目に樹状突起構造を解析する実験も行った。

4. 研究成果

最初に、上記「研究の方法 (1)」により発現解析を行ったところ、樹状突起形成期 (生後 6 日目および 14 日目) のプルキンエ細胞において、アクチン制御因子 Arp2 や Arp3、その活性化因子 N-WASP および Cdc42 が発達中の樹状突起で高発現していることが明らかになった。また、活性型であるリン酸化 N-WASP も発達中の樹状突起に局在していた。

そこで、次に、N-WASP-Arp2/3 経路がプルキンエ細胞の樹状突起形成に関わる可能性を検討するために、上記「研究の方法 (2)」により、発達中の樹状突起における Arp3 の分子動体を調べた。その結果、伸展中の樹状突起の先端および分岐部位に Arp3 が集積していることが明らかになった (図 2)。さらに、樹状突起形成における N-WASP-Arp2/3 経路の重要性を調べるために、特異阻害剤を用いた解析を行ったところ、Arp2/3 や N-WASP、Cdc42 のいずれの機能阻害も樹状突起の著しい低形成を引き起こした。これらのことから、N-WASP-Arp2/3 経路がプルキンエ細胞の樹状突起の構築に重要である可能性が示唆された。

図 2 発達中のプルキンエ細胞樹状突起における Arp3 の集積



初代培養プルキンエ細胞におけるタイムラプス観察。
Arp3 は、分岐直前の樹状突起 (矢印) および伸展中の樹状突起先端に集積している。

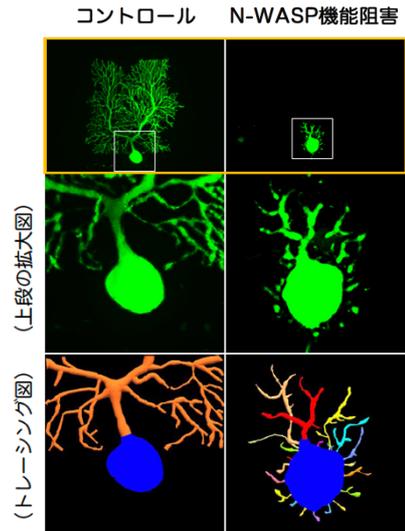
そこでさらに、上記「研究の方法 (3)」により、生体内プルキンエ細胞での検証を行った。まず、N-WASP の強力な機能阻害型変異体群を胎生期からプルキンエ細胞に発現させたところ、

プルキンエ細胞の生存や移動には影響がないものの、樹状突起形成に関しては、競合的リモデリングの異常によって stem dendrite が形成されず、星状細胞様ステージの形態のまま発生が止まることが明らかになった (図3)。このことから、N-WASP-Arp2/3 経路がプルキンエ細胞の stem dendrite の確立に必須のはたらきをしていることが強く示唆された。また、stem dendrite が形成された幼若型期以降に N-WASP-Arp2/3 経路を阻害してもその後の樹状突起の発達に異常が生じ、その構造が矮小化することが明らかになった。さらに、N-WASP-Arp2/3 経路を高度に活性化させた場合もプルキンエ細胞の樹状突起が正常に発達できなくなることもわかった。

以上の結果から、発生期のプルキンエ細胞において、N-WASP-Arp2/3 経路は樹状突起形成の広範なステップではたらいており、その活性化レベルを適切に保つことが非常に重要であることが示された。特に、プルキンエ細胞の stem dendrite の確立に関わる分子基盤はほとんど解明されてい

なかったことから、本研究成果は樹状突起の空間配置制御の理解に貢献する重要な発見であると考えられる。今後、本研究で得られた知見を多様なニューロンタイプで検証し、また N-WASP-Arp2/3 経路による樹状突起制御の分子メカニズムの詳細を明らかにしていくことで、ニューロンのかたちづくりのしくみがさらに解明されると期待される。

図3 N-WASP の機能阻害による樹状突起の異常



N-WASP-Arp2/3 経路の機能を阻害したプルキンエ細胞では stem dendrite が形成されず、樹状突起の発達が星状細胞様ステージで止まる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasegawa K, Matsui TK, Kondo J and Kuwako KI	4. 巻 149
2. 論文標題 N-WASP-Arp2/3 signaling controls multiple steps of dendrite maturation in Purkinje cells in vivo.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev201214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.201214	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 -

1. 著者名 Hasegawa K and Kuwako K	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular mechanisms regulating the spatial configuration of neurites.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seminars in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcdb.2022.02.015.	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14件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川孝一、松井健、近藤純平、桑子賢一郎
2. 発表標題 N-WASP-Arp2/3 signaling is required for the establishment of a single stem dendrite of Purkinje cells in vivo
3. 学会等名 第46回日本神経科学会
4. 発表年 2023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
研究分担者	濱 德行 (Hama Noriyuki) (60422010)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教 (15201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------