

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290005

研究課題名(和文) 中枢神経系ニューロンの多様な樹状突起パターン形成機構

研究課題名(英文) Principles of branch pattern formation in dendrites of CNS neurons

## 研究代表者

見学 美根子 (KENGAKU, Mineko)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：10303801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系発生過程でニューロン樹状突起が多様な分岐パターンを獲得するダイナミクスと細胞・分子機構の解析を行った。ライブ観察と画像定量解析、分子発現解析、数理解析を用いた多階層的アプローチにより、アクチン編成に関わる分子が樹状突起微細形態に影響しその蓄積により分岐パターンを決定する機構を明らかにした。また樹状突起発達過程でミトコンドリア生合成・分裂・運搬が協調的に作動し、ミトコンドリア数と樹状突起分布を増やして突起伸長に必要なATP局所産生を保證していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify the cellular and molecular bases of branch dynamics governing dendritic pattern formation in central nervous system neurons. Using live-cell observation, quantitative image analyses and computer-aided simulation, we found that a slight change in actin filament organization affects shape of fine protrusions in emerging dendrites and thereby alters branch patterns of characteristic space-filling dendrites of Purkinje cells. We also demonstrated that local ATP synthesis by dendritic mitochondria is critical for development and maintenance of the intricate dendritic branches. We demonstrated that the molecules and signals responsible for biogenesis, fission and transport of mitochondria are necessary for normal development and maintenance of dendritic arbors in Purkinje cells.

研究分野：神経科学

キーワード：発生・発達・再生神経科学 樹状突起 ライブイメージング 数理モデル 細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系ニューロン樹状突起の分岐パターンは、回路の配線と情報処理特性を規定する重要なファクターであり、ニューロン種毎に多様な分岐パターンを獲得する。樹状突起パターンは入力線維との結合特性により大別され、分枝が重複なく受容野全体の隙間を埋めるように分布する空間充填型、分岐を一定方向に配向し、一群の軸索から有効な入力を弁別するサンプリング型、ごく少数の入力を選択的に受容する選択型に分類される。樹状突起パターン形成において、その基本設計(分岐数、突起長など)は細胞種固有の遺伝的プログラム(内因性機構)により決定され、分枝の伸長方向などは脳組織内のガイダンスシグナル(外因性機構)に制御されると考えられる。先行研究で、樹状突起パターン形成に関与する遺伝子が複数明らかにされていたが、特異性と再現性の高い複雑な分岐パターンの理解には遠く及ばなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は中枢神経系ニューロン樹状突起の分岐パターン形成原理を明らかにすることを目的とする。長期ライブ観察系を用いた分子機構解析と数理モデルによる検証を組み合わせたアプローチにより、樹状突起極性決定および空間分布制御の分子・細胞機構を解明し、多様な樹状突起パターンを生み出すメカニズムに迫ることを目指した。具体的には以下3つのテーマを掲げた。

① 空間充填型樹状突起の重複回避機構の同定: ハエなどの無脊椎動物の空間充填型樹状突起では、突起間相互作用により伸長が抑制される self-avoidance (自己忌避) 機構により突起交叉を防ぐことがわかっているが、哺乳類ニューロンで詳細なメカニズムは明らかでなかった。代表者らの研究で、プルキンエ細胞の伸長中の樹状突起同士が接触すると、PKD シグナル活性化を介して分枝の退縮が誘導される結果、重複のない空間充填分布が完成することが明らかになっている。本研究で self-avoidance 機構の分子シグナルを解明し、樹状突起空間分布における意義を明らかにする。

② サンプリング樹状突起の極性配向制御機構の解析: 海馬錐体ニューロンは、涙滴形の細胞体の頂点から一本の先端樹状突起を、対極から軸索の周りを囲んで複数本の基底樹状突起を伸展させ、それぞれが反対側へ展開して異なる入力線維と結合する。先端樹状突起と基底樹状突起の分化機構および逆方向への投射を誘導するガイダンス機構については殆ど明らかでない。本研究では、錐体ニューロンの先端・基底樹状突起の極性を決定するガイダンス分子機構を解明する。

③ 複雑な樹状突起維持機構の解明: 樹状突起は絶えずイオンポンプ ATPase で能動輸送を

行うためエネルギー需要が高いが、如何に高い代謝を維持し複雑な構造を保持するのが明らかでなかった。本研究では樹状突起のエネルギーホメオスタシスにおけるミトコンドリアの機能と動態制御機構を解析する。

### 3. 研究の方法

空間充填型のプルキンエ細胞とサンプリング型の海馬錐体ニューロンをモデルとし、マウス胎児または新生児の脳から採取したそれぞれのニューロンの樹状突起形成を再構成する培養系を確立した。これらの系を用い、樹状突起発達過程の伸長・退縮・分岐などのダイナミクス素成分の特性を定量測定できる長期蛍光ライブ観察系により、分子操作や薬剤処理を組み合わせるパターン突起形成過程を制御する内・外因性機構の同定を試みた。またそれらが分岐パターンに如何に貢献するかを実測と数理モデルで検証する解析法を確立した。生体内での樹状突起パターン解析には、AAV ベクターによる分子発現系を用いた。胎生 16 日ないし生後 0 日のマウス小脳に電気穿孔法でウイルスを注入し、生後 2 週まで飼育したのち小脳組織標本を作成し、分子発現が樹状突起形態へ与える影響をレーザー共焦点顕微鏡を用いた立体再構築画像で定量的に解析した。

### 4. 研究成果

① 空間充填型樹状突起の重複回避機構の同定: 変異動物においてプルキンエ細胞の空間充填型パターン異常を伴う遺伝子の探索を行い、IBAR ドメイン分子 Mtss1 欠損動物で樹状突起の形態異常があることを見出した。欠損動物から採取したプルキンエ細胞を培養し、樹状突起ダイナミクスを観察したところ、突起間相互作用が昂進し、突起退縮が頻発するために分岐が祖になることが明らかになった。微細形態を観察したところ、Mtss1 欠損下では樹状突起フィロポディアが伸長して不安定化しており、アクチン編成に異常があることが示唆された。分子経路を解析した結果、Mtss1 はアクチン重合調節分子である formin ファミリー分子と結合し、重合活性を阻害する作用を持つことが明らかになり、Mtss1 欠損下で formin の異常活性化でアクチン重合が過剰になった結果フィロポディアが伸長し、結果として突起間の衝突回数が増えて退縮が増大することを明らかにした(図

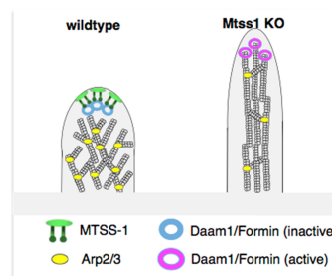


図1 重複回避機構における Mtss1 の機能

1 )

② **サンプリング樹状突起の極性配向制御機構の解析**: 錐体ニューロンは涙滴形の細胞体の頂点から一本の尖端樹状突起を、対極から複数本の基底樹状突起を伸展させ、それぞれが反対側へ展開して異なる入力線維と結合する。海馬ニューロンを初代培養し、長期ライブ観察系を用いて GFP ラベルした錐体ニューロンの樹状突起分化過程のダイナミクスを解析する系を立ち上げた。継時観察の結果、尖端樹状突起は最初から決定されているのではなく、未分化な樹状突起間の競合を経て選択され、残りの突起が基底樹状突起に分化する現象を見出した。この間最も長い一次樹状突起基部にゴルジ体と中心体が局在する傾向があり、ゴルジ体と中心体の移動と樹状突起極性の変化が相関すること、最終的にゴルジ体が局在する突起が尖端樹状突起に分化することが明らかになった。また、培養下における海馬錐体ニューロンと歯状回顆粒細胞の樹状突起形成ダイナミクスの違いを明らかにした (Wu et al., PLoS ONE 2015)。

③ **複雑な樹状突起維持機構の解明**: 小脳ニューロンの初代培養系において、プルキンエ細胞樹状突起発達中のミトコンドリアの挙動を観察した。その結果、発達中の樹状突起には活発にミトコンドリアが運搬され、ミトコンドリア輸送を阻害すると樹状突起発達が抑制された。この時突起遠位で顕著に低下する ATP を補充すると伸長が回復した。さらにプルキンエ細胞樹状突起形成において解糖系の寄与は限定的で、樹状突起に局在するミトコンドリアの局所 ATP 産生とクレアチンキナーゼによる運搬が重要であることを明らかにした。局所で産生された ATP は突起伸長を駆動するアクチン代謝の維持に必要であり、ミトコンドリア不在下ではコフィリン活性制御の停滞でアクチン重合が阻害され、突起伸長による ATP の枯渇を防ぐホメオスタシス機構が存在することが明らかになった (図 2) (Fukumitsu et al., J. Neurosci. 2015)。

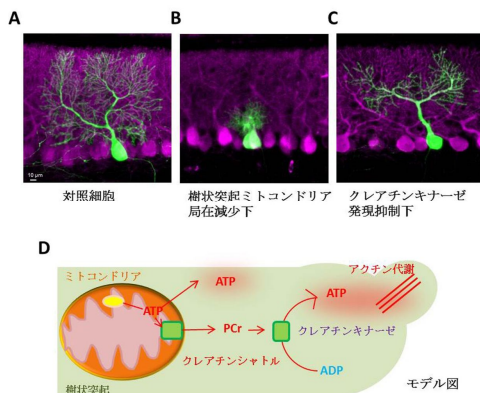


図 2 (A) 小脳プルキンエ細胞の生後 14 日目の像 (Green), Magenta は周囲のプルキンエ細胞を示す。(B,C) 樹状突起ミトコンドリアの局在減少およびクレアチンキナーゼの発現抑制により樹状突起が矮小化する。(D) モデル図。樹状突起ミトコンドリアとクレアチンシャトルが共作用的にアクチン代謝を制御する。

発達した樹状突起分枝を展開する小脳プルキンエ細胞の初代培養において、細胞体から小型のミトコンドリアが伸長中の樹状突起へ運搬される様子がライブ観察されたことから、ミトコンドリアは細胞体で分裂して増殖し、樹状突起へ運搬されると示唆された。そこでミトコンドリア分裂制御因子の Drp1 の機能阻害変異体を強制発現させたところ、樹状突起へのミトコンドリア輸送が著しく減少し、樹状突起が矮小化した。子宮内穿孔法を用いて生体内で Drp1 機能阻害変異体を強制発現させた場合においても同様に樹状突起の矮小化が観察されたことから、樹状突起伸長にミトコンドリア分裂の制御が不可欠であることが分かった。Drp1 遺伝子の欠損は活性酸素を増大し、ニューロンの細胞死を誘発するという報告があるが、抗酸化剤投与で樹状突起の矮小化は回復しなかった。一方、培養液中にクレアチンを投与し、クレアチンリン酸化酵素を活性化して ATP 産生を誘導すると樹状突起伸長が有意に回復したことから、Drp1 によるミトコンドリア分裂が樹状突起への運搬と局所 ATP 産生を促進することが樹状突起の成長に必要なことが分かった (Fukumitsu et al., Mol. Cell. Neurosci. 2016)。

ニューロン分化においてはミトコンドリア分裂のみならず、生合成も活性化していると考えられる。実際に発生中の小脳および初代培養下のプルキンエ細胞においてミトコンドリア生合成のマスター制御因子である PGC1 の発現が樹状突起形成期に上昇することが分かった。そこで PGC1 のノックダウンを行うと、分化過程でのミトコンドリア数の上昇が抑えられ、個々のミトコンドリアの活性を示す電子伝達系酵素の発現も低下するのに加え、樹状突起の伸長が顕著に抑制された。筋細胞において PGC1 の発現は甲状腺ホルモン(T3)の制御下にあり、甲状腺機能低下症でプルキンエ細胞の分化異常が伴うことが知られている。ニューロンにおける PGC1 発現制御が T3 によるものかを調べるため、無血清培養下で T3 を添加した影響を観察したところ、PGC1 の発現が上昇し樹状突起伸長が促進された。逆に T3 を除去すると PGC1 の活性、樹状突起伸長とも抑制されたことから、小脳発生において T3 分泌が PGC1 を誘導し、樹状突起形成に必要なミトコンドリア生合成を活性化させることが明らかになった (Hatsukano et al., Front. Cell. Neurosci. 2017)。

以上の結果より、ニューロンの樹状突起発達過程でミトコンドリア生合成、分裂が協調的に作動し、ミトコンドリア数と樹状突起分布を増やして突起伸長に必要な ATP 産生を保証していることが明らかになった。

## 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5件)

1. Hatsukano, T., Kurisu, J., Fukumitsu K., Fujishima, K. and Kengaku, M. Thyroid hormone induces PGC-1 during dendritic outgrowth in mouse cerebellar Purkinje cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 11:133 査読有 doi: 10.3389/fncel.2017.00133.
2. Fukumitsu, K., Hatsukano, T., Yoshimura, A., Heuser, J., Fujishima, K. and Kengaku, M. Mitochondrial fission protein Drp1 regulates mitochondrial transport and dendritic arborization in cerebellar Purkinje cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 71:56-65 査読有 doi: 10.1016/j.mcn.2015.12.006.
3. Oomoto, I., Suzuki-Hirano, A., Umeshima, H., Han, YW., Yanagisawa, H., Carlton, P., Harada, Y., Kengaku, M., Okamoto, A., Shimogori, T. and Wang, DO. ECHO-liveFISH: in vivo RNA labeling reveals dynamic regulation of nuclear RNA foci in living tissues. *Nucleic Acids Research*. 43(19):e126 査読有 doi: 10.1093/nar/gkv614.
4. Fukumitsu, K., Fujishima, K., Yoshimura, A., Wu, Y.K., Heuser, J. and Kengaku, M. Synergistic action of dendritic mitochondria and creatine kinase maintains ATP homeostasis and actin dynamics in growing neuronal dendrites. *Journal of Neuroscience*. 35(14):5707- 5723 査読有 doi:10.1523/JNEUROSCI.4115-14.2015
5. Wu, Y.K., Fujishima, K. and \*Kengaku, M. Differentiation of Apical and Basal Dendrites in Pyramidal Cells and Granule Cells in Dissociated Hippocampal Cultures. *PLoS One* 10(2) e0118482. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0118482.

〔学会発表〕(計17件)

1. Kelly Kawabata, Kazuto Fujishima and Mineko Kengaku, Neuronal morphology development mediated by MTSS1 inhibition of DAAM1. UK-Japan Spring Neuroscience Symposium 2017.03.16 京都ガーデンパレスホテル(京都府京都市)

2. Tetsu Hatsukano, Kansai Fukumitsu, Kazuto Fujishima and Mineko Kengaku, Master regulator of mitochondrial biogenesis PGC-1 $\alpha$  mediates dendritic formation induced by thyroid hormone in cerebellar Purkinje cells. Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists 2017.03.15-18 Kiel(Germany)
3. Kelly Kawabata, Kazuto Fujishima and Mineko Kengaku, Neuronal morphology development mediated by MTSS1 inhibition of DAAM1. The 15th International Student Seminar 2017.02.23-24 京都大学芝蘭会館(京都府京都市)
4. Tetsu Hatsukano, Kansai Fukumitsu, Kazuto Fujishima and Mineko Kengaku, Thyroid hormone regulates dendritic development by inducing master regulator of mitochondrial biogenesis PGC-1 in cerebellar Purkinje cells. The 15th International Student Seminar 2017.02.23-24 京都大学芝蘭会館(京都府京都市)
5. 初鹿野徹、福光甘齋、藤島和人、見学美根子 サイロイドホルモンは小脳プルキンエ細胞の樹状突起形成を PGC-1 $\alpha$  を介して誘導する。 Thyroid hormone-induced dendritic growth of cerebellar Purkinje cells is mediated by PGC-1 $\alpha$ . 第39回日本神経科学大会 2016.07.20-22 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
6. Kelly Kawabata, Kazuto Fujishima and Mineko Kengaku, Exploration of MTSS1 involvement in contact-dependent retraction of Purkinje cell dendrites. CAJAL Advanced Neuroscience Training Programme (FENS) 2016.07.11-30 Bordeaux (France)
7. Tetsu Hatsukano, Kansai Fukumitsu, Kazuto Fujishima and Mineko Kengaku, Thyroid hormone enhances dendritic growth of cerebellar Purkinje cells through induction of PGC-1 $\alpha$ . The 15th International Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology between KU-NTU-UT 2016.06.17-19 Taipei (Taiwan)
8. Mineko Kengaku, Mechanics



- underlying cell architecture formation in the developing brain. Center for Functional Connectomics Seminar, Korea Institute of Science and Technology (招待講演) 2016.04.06 Seoul (Korea)
9. Mineko Kengaku, Nuclear dynamics during neuronal migration in the developing brain. I.M.A. workshop on neural imaging in neuroscience 2016 (招待講演) 2016.03.21-22 Cambridge (United Kingdom)
  10. Kelly Kawabata, Kazuto Fujishima and Mineko Kengaku, Molecular mechanism underlying the axon-dendrite wiring topology. The 2<sup>nd</sup> Symposium of Neuroscience Network in Kobe (招待講演) 2016.02.19 神戸大学大学院医学研究科神緑会館多目的ホール (兵庫県神戸市)
  11. 見学美根子、藤島和人 小脳皮質における樹状突起-軸索接合のジオメトリー決定機構. The contact-geometry of axons and dendrites in the cerebellar cortex. 第 38 回日本神経科学大会 (招待講演) 2015.07.28-31 神戸国際会議場、神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
  12. 見学美根子、福光甘斎、藤島和人、初鹿野徹 プルキンエ細胞樹状突起の発達を支えるエネルギーホメオスタシス機構. Energy homeostasis in growing dendrites of cerebellar Purkinje cells. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会 合同大会 2015.03.21-23 神戸国際会議場、神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
  13. Mineko Kengaku, Energy homeostasis in growing dendrites. 2015 Dendrites: Molecules, Structure & Function, Gordon Research Conference (招待講演) 2015.03.15-20 Ventura, CA (USA)
  14. Mineko Kengaku, Mechanics of nuclear migration in developing neurons. The 18<sup>th</sup> iCeMS International Symposium, The 15<sup>th</sup> International Membrane Research Forum (招待講演) 2015.03.02-04 京都大学物質-細胞統合システム拠点本館セミナールーム (京都府京都市)
  15. Mineko Kengaku, Energy homeostasis in Purkinje cell dendrites - Live-imaging analysis of the formation and maintenance of dendritic tree shape in developing CNS neurons. Cerebellum Symposium 2015 OIST (招待講演) 2015.01.28-29 沖縄科学技術大学院大学 (沖縄県国頭郡恩納村)
  16. Mineko Kengaku, Mechanical basis of cell motility control in the developing brain. 25<sup>th</sup> 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2014) (招待講演) 2014.11.09-12 名古屋大学野依記念学術交流館 (愛知県名古屋市)
  17. Mineko Kengaku, Live-imaging analysis of the formation and maintenance of dendritic tree shape in developing CNS neurons. The 37<sup>th</sup> NAITO CONFERENCE (招待講演) 2014.07.15-18 ヒルトンニセコビレッジ (北海道虻田郡ニセコ町)
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
見学 美根子 (KENGAKU, Mineko)  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授  
研究者番号： 1 0 3 0 3 8 0 1