

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06811

研究課題名(和文)アクチン再構築による臨界期制御機構の解析

研究課題名(英文)A role of actin remodeling in cortical interneuron for critical period plasticity

研究代表者

侯 旭濱(Hou, Xubin)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：00584765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：子供の脳に現れる「臨界期」は、経験に依存して機能的な神経回路を形成し、生涯の中で回路網の可塑性が最も高まる時期である。臨界期を制御する数少ない因子の1つとして、ホメオ蛋白質Otx2が知られている。Otx2は視覚野のParvalbumin発現細胞(PV細胞)に運ばれ、PV細胞を取り囲む細胞外基質(PNN)に結合して細胞内に取込まれた後、PV細胞の成熟を促すことで臨界期を制御する。本研究は、アクチン重合の促進に不可欠なCoactosinに焦点を当て、Otx2の下流因子であるCoactosinのPV細胞における役割の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Binocular vision is established in the primary visual cortex (V1) through activity-dependent competition during early postnatal life. Ocular dominance plasticity accompanies with maturation of cortical GABA circuits. We have found that Otx2 homeoprotein regulates the critical period via promoting perineuronal nets (PNNs) formation that strengthened visual responses on parvalbumin-positive interneurons (PV-cells). Otx2-inducible actin reorganization factor, Coactosin play a constructive role in maturation of PV circuits, ultimately regulating the cortical milieu for plasticity.

研究分野：神経発生学、神経生理学

キーワード：抑制性介在ニューロン 細胞骨格 眼優位性可塑性 臨界期

1. 研究開始当初の背景

生後間もない脳には、臨界期と呼ばれる可塑性の高まる時期があり、神経回路網が自己経験により再構成される。臨界期のメカニズムの探究には、視覚が良いモデルとなる。大脳皮質視覚野には、マウスから人まで、視覚経験に依存して利き目(眼優位性)を決める臨界期がある。この臨界期に片眼を塞ぐと、開いた眼からの入力を多く受けるよう回路網が変化し、閉じた眼の視力は弱くなる(弱視)。弱視は臨界期中に治療をすれば治りやすいが、臨界期を過ぎた大人では完治しない。近年、GABA 合成酵素(GAD65)変異マウスの解析により、臨界期には皮質抑制性介在ニューロンの発達が必要であることが分かった(Hensch, 2005)。中でも Parvalbumin を発現する介在ニューロン(PV 細胞)が、臨界期に先立って発達することから、この細胞の発達が臨界期の引き金となることが推測された。

これまでの研究から、ホメオ蛋白質 Otx2 が、視覚野の PV 細胞に運ばれて、PV 細胞の成熟を促すことで臨界期を制御することが分かっている(Sugiyama et al., Cell, 2008)。さらには、PV 細胞の周囲を特異的に取り囲む細胞外基質(perineuronal net, PNN)が、Otx2 の特異的な取り込みに重要であることを明らかにした。生化学的な解析から、Otx2 が PNN の糖鎖と結合することがわかり、糖鎖転移酵素の変異マウスや、糖鎖を酵素分解したマウスでは、PV 細胞における Otx2 の取り込みが減少し、その結果、臨界期の始まりと終わりが正常に誘導されないことが分かった。一方で、Otx2 と細胞外基質がどのように PV 細胞を成熟させるのか、具体的なメカニズムは明確にされていない。胚発生期の知見から、神経細胞は細胞外基質に含まれるシグナル分子を認識し、細胞骨格系を再編することが知られている。また細胞骨格の再編は、膜分子の分布を制御し、シナプス形成や可塑性に関与すると考えられている。近年、臨界期における細胞外基質の役割が報告されているのに対し、細胞骨格の再編が臨界期に関与するのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

これまでに、申請者はニワトリ胚からアクチン結合蛋白 Coactosin を初めて同定し(Hou et al., Dev. Growth Differ. 2009)、アクチン細胞骨格の形成に寄与し、細胞突起の形成と細胞移動に関与することを示した(Hou et al., Dev. Biol. 2013)。本研究では、PV 細胞に局在する新規のアクチン結合蛋白 Coactosin に注目し、臨界期における細胞骨格再編が担うメカニズムを明らかにする。特に、PV 細胞の形態とシナプスの発達に着目し、PV 細胞の成熟が制御される仕組みを解明する。PV 細胞を始めとする抑制性介在ニューロンの機能異常は、精神疾患(統合失調症、自閉症など)を引き起こす原因の1つと考えられている。一方で、抑制性ニューロンの形態や機能に直

接働きかける機能分子のメカニズムはほとんど分かっておらず、本研究が先行研究になる。本研究の成果は、抑制性ニューロンの形態的、機能的回復を目指した薬剤や治療法の開発に貢献すると期待される。

3. 研究の方法

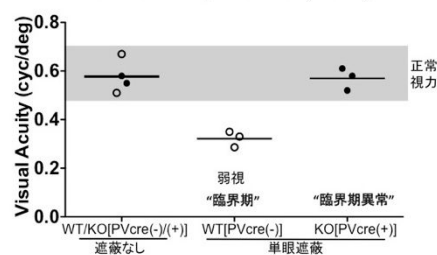
本研究は、アクチン重合の促進に不可欠な Coactosin に焦点を当て、臨界期が制御されるメカニズムを解析する。特に、眼優位性の臨界期には視覚野の PV 細胞の発達が重要であり、Coactosin は Otx2 の下流でこの細胞に特異的に発現を誘導される。まず①作成している Coactosin の KO マウスを用いて、臨界期を電気生理学的に解析する。また、②Coactosin が細胞骨格の再構築を介して、PV 細胞の形態的な成熟をもたらす、シナプス後膜分子や細胞外基質構造を安定させ、回路の可塑性に関与するのか解析を行う。さらに、PV 細胞における Coactosin の発現誘導は、Otx2 の翻訳制御に依ることが示唆されており、Otx2 は Coactosin などの下流因子を翻訳制御し、臨界期をコントロールすると推測される。③Otx2 に対する RIP-seq(RNA 免疫沈降法次世代シーケンズ解析)により、Otx2 が生体内で特定の mRNA の翻訳を制御するのかを検討する。

4. 研究成果

① アクチン細胞骨格の臨界期への関与

Coactosin flox マウスを作成し、PV 細胞特異的な Coactosin KO マウスを保有している。臨界期に片目を閉じて視覚経験を遮断すると、閉じられた目の視力が低下するが(弱視)、この変異マウスでは臨界期が活性化されず、弱視が誘導されないことが分かってきた(図 A)。今後さらに、視覚誘発電位記録法(VEP)、in vivo 単一細胞記録法を用いて、Coactosin が臨界期と視覚の機能の発達にどのように関与するのかを明らかにする。

A Visual evoked potentials (VEPs)



② PV 細胞の形態発達への関与

臨界期において Parvalbumin (PV) の抗体染色を行うと、Coactosin を欠損した PV 細胞の神経突起形成が未熟であることが推測された。Coactosin は細胞骨格を再編させ、PV 細胞の形態の発達に直接関与する可能性がある。Coactosin のように PV 細胞に局在するアクチン重合/脱重合因子はこれまで知られておらず、PV 細胞特有のアクチン細胞骨格と形態を作る可能性が示唆される。そこで、in

utero エレクトロポレーション法により PV 細胞に GFP を強制発現させ、PV 細胞の樹状突起と軸索を観察した。GFP の発現が弱い場合には、抗 GFP 抗体による増強(図 B)や Supernova system (Mizuno et al., Neuron 2014) を応用する。PV 細胞の形態は Neurolucida (ニューロントレーシング)に取り込み、解析を行う。さらに、テトラサイクリン投与による時期特異的な強制発現システム (Hou et al., Dev. Growth Differ. 2011)を用いて、PV 細胞の形態形成時に Coactosin の過剰発現を行い、PV 細胞の突起形成への影響を解析する。錐体細胞をコントロール対象として、一連の解析を行うことで、Coactosin の PV 細胞の形態発達における役割を明らかにする。

(3) Coactosin のシナプス形成と PV 細胞成熟への関与

アクチン骨格の編成はアンカーや受容体などのシナプス機能分子の局在(チャネル分子、接着因子、トランスポーター等)に関与する。Coactosin は PV 細胞に投射するシナプスの形成や可塑性に関与し、PV 細胞の活動依存的な発達を支える可能性がある。Coactosin KO マウスや強制発現マウスにおいて、シナプスや膜分子の局在の異常などを解析し、PV 細胞の機能成熟を支える分子機構を明らかにする。

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) Hou X, Yoshioka N, Tsukano H, Sakai A, Miyata S, Watanabe Y, Yanagawa Y, Sakimura K, Takeuchi K, Kitagawa H, Hensch TK, Shibuki K, Igarashi M and Sugiyama S: Chondroitin Sulfate within Perineuronal Nets Is Required for Onset and Offset of Critical Period Plasticity in the Visual Cortex.

Scientific Reports Oct 3;7(1):12646, 2017

- (2) Sakai A, Nakato R, Ling Y, Hou X, Hara N, Iijima T, Yanagawa Y, Kuwano R, Okuda S, Shirahige K, Sugiyama S: Genome-wide Target Analyses of Otx2 Homeoprotein in Postnatal Cortical Interneuron.

Frontiers in Neuroscience 11:307, 2017

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) Sugiyama. S and Hou X. Experience-dependent maturation of inhibitory circuits in ocular dominance plasticity. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 20-22 Jul, 2016 in Yokohama, Japan 招待講演
- (2) 侯旭濱, 凌一葦, 酒井 晶子, 奥田 修二郎, 杉山 清佳 Identification of Otx2-eIF4E

targetome in cortical plasticity with RNA immunoprecipitation-sequencing(RIP-seq)
第 39 回日本神経科学学会 2016 年 7 月 20 日-22 日 横浜

- (3) 侯旭濱, 崎村 建司, 杉山 清佳 Coactosin, an actin-remodeling factor promotes maturation of parvalbumin-positive cells for cortical plasticity 第 10 回神経発生討論会(招待講演)(国際学会) 2017 年 3 月 10-11 日宮城県仙台市
- (4) 侯旭濱, 國見順子, 崎村 建司, 杉山 清佳 臨界期における抑制性介在ニューロンのアクチン再構築の役割 第 40 回日本神経科学学会 2017 年 7 月 20-23 日 千葉県幕張
- (5) 侯旭濱, 國見順子, 崎村 建司, 杉山 清佳 A role of actin remodeling in cortical interneuron for critical period plasticity 次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム 2017 年 12 月 21-22 日 東京都
- (6) 侯旭濱, 國見順子, 崎村 建司, 杉山 清佳 Cellular morphology in cortical interneuron for critical period plasticity 第 8 回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム 2018 年 2 月 10-11 日 新潟

○ 出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○ 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/contents/research/shinryou/shinkei.html>

<https://f1000.com/prime/thefaculty/member/999995421947260>

https://www.researchgate.net/scientific-contributions/16233079_Xubin_Hou

6. 研究組織

(1) 研究代表者

侯 旭濱 (HOU XUBIN)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教
研究者番号 : 00584765

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし