

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06701

研究課題名(和文) スパインにおけるアクチン重合因子Fhod3の機能解明

研究課題名(英文) Roles of actin polymerization factor Fhod3 in dendritic spine

研究代表者

根本 隆行 (Nemoto, Takayuki)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：90506833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳・神経細胞の樹状突起スパインは、アクチン細胞骨格の再編により形態を変化させることで効率の良い神経伝達を図っている。しかしながら、樹状突起スパインにおけるアクチン細胞骨格の制御機構については、未だ明らかでない。本研究により、アクチン重合因子Fhod3は、大脳皮質特定領域の興奮性錐体神経細胞のスパイン内部に集積していることが明らかになった。また、脳特異的Fhod3欠損マウスを用いてスパインの形態を詳細に解析したところ、スパインの成熟がコントロールマウスに比べて不十分であった。本研究により、Fhod3は大脳皮質における特定の興奮性神経細胞のスパイン形態形成に必要不可欠であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、樹状突起スパインのアクチン細胞骨格制御機構に新たな分子メカニズムを提供し得るだけでなく、スパインの形態異常を認める神経精神疾患の新たな治療法確立にむけた分子基盤となり得る。

研究成果の概要(英文)：Dendritic spines in neural cells perform efficient neurotransmission by changing their morphology with reorganizing the actin cytoskeleton. However, little is known of the regulatory mechanism of the actin cytoskeleton in dendritic spines. Our present study showed that the actin polymerization factor Fhod3 is expressed in the dendritic spines of excitatory pyramidal neurons of specific regions of the cerebral cortex. A detailed analysis of spine morphology using brain-specific Fhod3-deficient mice revealed that spine maturation was inadequate compared to control mice. These findings revealed that Fhod3 is essential for spine morphogenesis of specific excitatory neurons in the cerebral cortex.

研究分野：中枢神経系におけるアクチン細胞骨格制御

キーワード：アクチン重合因子Fhod3 樹状突起スパイン

1. 研究開始当初の背景

神経細胞のアクチン細胞骨格は、直線状および分枝状のアクチン線維が細胞周縁部に複雑に混在することで形成されており、「成長円錐の運動性」「樹状突起上に形成されるフィロポディアの伸長」「シナプス前部・後部の成熟に伴う形態的特殊化」など細胞周縁部の動的機能に重要な役割を果たしている。それら動的機能におけるアクチン細胞骨格の制御機構は長い間不明であったが、近年、成長円錐の伸展や樹状突起フィロポディア伸長におけるアクチン細胞骨格の制御機構にフォルミンなどのアクチン重合促進因子が関与していることが明らかにされてきた。神経細胞間の伝達を担うシナプスは神経軸索上のシナプス前部と樹状突起上のスパインと呼ばれるシナプス後部から構成されている。脳・神経細胞は互いの連絡部位である多数のシナプスによって伝達を行い、経験・学習・記憶など様々な刺激条件の下でそれらシナプスの数を増減あるいは形態を変化させている。興奮性シナプス後部の樹状突起スパインは、刺激により形態や機能を可塑的に変化させ、記憶・学習などの高次脳機能に重要な役割を果たしている。スパインにはキノコ型や切り株型、細長い形など様々な形が存在しており、成熟するにつれて細長い形からより神経伝達物質を受容しやすいキノコ型へと形態を変化させている。近年、精神発達遅滞やてんかんの患者脳内において、スパインが異常な形に変成していることが相次いで報告されており、スパイン形態と高次脳機能には密接な関係があると考えられている。スパイン内部の粗構造はシナプス後部肥厚とアクチン細胞骨格で構成されており、スパインの形態変化は主にアクチン細胞骨格の再編により制御されている。スパイン内部のアクチン線維は直線状・分枝状が混在した複雑な構造をとることでアクチン細胞骨格を形成し、スパインの可塑的变化を支持している。スパイン成熟に伴うアクチン細胞骨格の再編は主にアクチン結合蛋白質により制御されている。例えば、アクチン結合蛋白質の一つである Arp2/3 の複合体は、単量体アクチンが重合する際の核として提供されることで線維状アクチンの枝化を担っていることがすでに明らかにされており、スパイン内部の分枝状アクチン細胞骨格の再編成に重要な役割を果たすことで正常な神経精神状態の維持に寄与している。しかしながら、スパイン成熟に伴うアクチン線維の伸長や制御機構については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

アクチン重合制御因子のひとつとして知られるフォルミンは二量体蛋白質であり、その分子構造的特徴から自らが重合核となりアクチンの重合を促す。さらに二量体フォルミンは、重合により形成された直線状アクチン線維の伸長端に結合することによりその伸長を促進している。これまで、スパイン成熟過程におけるアクチン線維の伸長において、フォルミン蛋白質の関与を示唆する報告はいくつかある。しかし、それらは強発現による局在の同定のみにとどまっており、実際にスパイン内部でアクチン重合促進因子として機能しているかは定かでない。本研究は、スパインの細胞骨格形成における Fhod3 の役割を明らかにすることでスパインのアクチン細胞骨格の制御機構に新たな分子メカニズムを提供するだけでなく、神経精神疾患にみられるスパイン形態異常に伴うアクチン細胞骨格再編不全の分子メカニズムを解明する糸口を見いだすことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 成獣マウス脳における Fhod3 の発現および局在解析

野生型および Fhod3 ヘテロ欠損 (LacZ 発現) マウスを用いて脳における Fhod3 の発現および局在解析を行なった。具体的には成獣マウス脳をいくつかの領域 (大脳皮質、海馬、小脳など) に分け、ウェスタンブロット法により Fhod3 の発現解析を行なった。また、Fhod3 ヘテロ欠損 (LacZ 発現) マウスのスライス脳を X-gal 染色することにより、Fhod3 発現領域の局在解析を行なった。さらに大脳皮質シナプス画分 (スパイン部位) を採取し、ウェスタンブロット法により Fhod3 の発現確認を行なった。

(2) 大脳皮質培養神経細胞における Fhod3 の局在解析

生後 0 日から 1 日目の野生型マウスの大脳皮質神経細胞を単離・培養後、Fhod3-EGFP を強発現させることにより、単一神経細胞における Fhod3 の局在解析を行なった。具体的には、Fhod3-EGFP と mCherry を共発現することにより mCherry に対する Fhod3-EGFP の発現率を映像化し、詳

細な高発現部位を表現した。

(3) 脳組織 Fhod3 欠損マウスの作出と表現型解析

Cre-loxP システムを用いて、出生期に脳特異的に Fhod3 蛋白質を欠損するコンディショナルノックアウト (ck0) マウスを作出し、樹状突起スパインの形態解析を行なった。具体的には、生後 35 日前後のマウス脳をゴルジ染色 (神経細胞へのランダムな銀染色) することにより、生体における脳特定領域のスパイン形態を解析した。また、電子顕微鏡を用いて生後 35 日前後マウス脳のシナプス密度を計測した。加えて、心臓特異的に Fhod3 を発現するトランスジェニックマウス (脳組織 Fhod3 欠損) から大脳皮質神経細胞を単離・培養し、スパイン形態を解析した。具体的には蛍光蛋白質 (GFP, mCherry) やアクチン線維結合ペプチド (Lifeact-mCherry) を細胞に強制発現させた後スパインの形態を適時観察した。

4. 研究成果

(1) 成獣マウス脳における Fhod3 の発現および局在解析

野生型および Fhod3 ヘテロ欠損 (LacZ 発現) マウスを用いて脳における Fhod3 の発現および局在解析を行なった。具体的には成獣マウス脳をいくつかの領域 (大脳皮質、海馬、小脳など) に分け、ウェスタンブロット法により Fhod3 の発現解析を行なった。その結果、Fhod3 蛋白質は大脳皮質に最も多く発現していた。また、Fhod3 ヘテロ欠損 (LacZ 発現) マウスのスライス脳を X-gal 染色することにより、Fhod3 発現領域の局在解析を行なったところ、大脳皮質の運動野領域 (第 2/3 層) および感覚野領域 (第 2/3/4 層、5/6 層一部) に局在していた。その中でも、錐体細胞 (興奮性細胞) にのみ発現していた。さらに大脳皮質からシナプス画分を採取し、ウェスタンブロット法により Fhod3 の発現確認を行なった。その結果、トライトン不溶性画分 (PSD-95 陽性画分) に Fhod3 の発現が見られた。このことは、Fhod3 が大脳皮質錐体細胞の樹状突起スパインの形成に関与している可能性を示すものであった。

(2) 大脳皮質培養神経細胞における Fhod3 の局在解析

研究成果 (1) 記述のとおり、Fhod3 は樹状突起スパインに発現することが示唆されたため、生後 0~1 日目の野生型マウスの大脳皮質神経細胞を単離・培養後、Fhod3-EGFP を強発現させ、単一神経細胞における Fhod3 の局在および発現動向を検討した。Fhod3-EGFP と mCherry を共発現し、mCherry に対する Fhod3-EGFP の発現率を検討したところ、よりキノコ型に近いスパインで発現率が向上していた。このことから、Fhod3 は比較的成熟の進んだ樹上突起スパインに強く発現しており、Fhod3 がスパインの成熟に関与していることが示唆された。

(3) 脳組織 Fhod3 欠損マウスの作出と表現型解析

Cre-loxP システムを用いて、出生期に脳特異的に Fhod3 蛋白質を欠損するコンディショナルノックアウト (ck0: Fhod3^{flox/-}; Nestin-Cre+) マウスを作出し、樹状突起スパインの形態解析を行なった。具体的には、生後 35 日前後のマウス脳をゴルジ染色することにより、生体における大脳皮質運動野領域 2/3 層のスパイン形態を解析した。その結果、ck0 マウスの大脳皮質運動野第 2/3 層の樹状突起スパインは、コントロール (Fhod3^{flox/+}) に比べて、成熟したスパインが少なく、フィロポディアと呼ばれる未成熟なスパインが多く見られた。また、電子顕微鏡を用いて生後 35 日前後マウス脳のシナプス密度を計測したところ、ck0 マウスのシナプス形成がコントロールに比べて不十分であった。加えて、心臓特異的に Fhod3 を発現するトランスジェニックマウス (脳組織 Fhod3 欠損) から大脳皮質神経細胞を単離・培養し、スパイン形態を解析したところ、コントロールに比べてフィロポディアが多く、成熟スパイン (PSD-95 陽性スパイン) が少なかった。このことから、Fhod3 が大脳皮質の一部の錐体細胞のスパイン成熟に必要な不可欠であることが示された。本研究成果は、スパインの形成不全を伴うような神経精神疾患の病態理解に新たな視座を与えるものである。

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 0件）

1. 著者名 Hikmawan Wahyu Sulistomo, Takayuki Nnemoto, Toshihiko Yanagita, Ryu Takeya	4. 巻 294
2. 論文標題 Formin homology 2 domain-containing 3 (Fhod3) controls neural plate morphogenesis in mouse cranial neurulation by regulating multidirectional apical constriction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 2924-2934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.005471	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 Hikmawan Wahyu Sulistomo, Takayuki Nemoto, Yohko Kage, Hajime Fujii, Taku Uchida, Kogo Takamiya, Hideki Sumimoto, Hiroaki Kataoka, Haruhiko Bito, Ryu Takeya	4. 巻 31
2. 論文標題 Fhod3 Controls the Dendritic Spine Morphology of Specific Subpopulations of Pyramidal Neurons in the Mouse Cerebral Cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 2205-2219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cercor/bhaa355	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 根本隆行, HikmawanWahyuSulistomo, 武谷立
2. 発表標題 脳・神経細胞におけるアクチン細胞骨格制御因子Fhod3の機能解析
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 根本隆行, HikmawanWahyuSulistomo, 武谷立
2. 発表標題 アクチン細胞骨格による樹状突起スパインの形態制御
3. 学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Nemoto, Hikmawan Wahyu Sulistomo, Ryu Takeya
2. 発表標題 Actin polymerization factor Fhod3 formin protein in the mouse cerebrocortical neurons
3. 学会等名 第18回国際薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hikmawan Wahyu Sulistomo, Yohko Kage, Takayuki Nemoto, Ryu Takeya
2. 発表標題 Role of Mammalian Formin Fhod3 in Neural Tube Closure
3. 学会等名 第18回国際薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ヒクマワン ワフク スリストモ, 根本隆行, 鹿毛陽子, 藤井哉, 尾藤晴彦, 武谷立
2. 発表標題 マウス大脳皮質の樹状突起スパインの形態形成におけるフォルミン蛋白質Fhod3の役割
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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	武谷 立 (Takeya Ryu) (50335981)	宮崎大学・医学部・教授 (17601)	

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
---------	---------