

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300118

研究課題名(和文) 視床皮質軸索の神経活動依存的な枝分れ形成を担う分子機構に関する研究

研究課題名(英文) A study of the molecular mechanism underlying activity-dependent thalamocortical axon branching

研究代表者

山本 亘彦 (YAMAMOTO, NOBUHIKO)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：00191429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：発達期の脳における神経回路は、感覚由来の神経活動や自発発火活動によって変化することが知られているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、視床から大脳皮質への軸索投射に着目し、神経活動に依存した軸索分岐形成について、その分子メカニズムを明らかにすることを目指した。その結果、大脳皮質側からはその神経細胞の活動度に応じてnetrin-4が分泌され、軸索分岐に対して促進的に作用することが明らかになった。また、視床軸索側の機構としては、前シナプスでの神経活動に依存したエンドサイトーシスが神経栄養因子の取り込みを増大させ、軸索分岐を促進的に作用することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：During development neural circuits are established not only by molecular cues but also neuronal activity. In the present study, we attempted to reveal the molecular mechanisms that underlie activity-dependent axon branching, focusing on the thalamocortical projection. As a result, we found that netrin-4 is expressed in cortical cells in an activity-dependent fashion and promotes branch formation of thalamocortical axons. Moreover, endocytosis in presynaptic sites, which is regulated by firing activity, promotes axon branching by increasing uptake of neurotrophic factors.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：大脳 神経活動 軸索 分岐 標的由来因子 エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

神経回路の基本構造は発生プログラムによって自律的に形成されるが、一方で発火活動やシナプス活動によって後天的に変化することが古くから知られている。この2元的な制御機構は Nature vs Nurture の問題としてしばしば取り上げられてきた。私たちは視床から大脳皮質への投射系における軸索分岐に着目し、この問題を細胞・分子レベルで解明することを目指している。視床ニューロンから発した軸索は一次感覚野の主として4層で分岐を形成し、皮質ニューロンとシナプス結合を作る。この軸索分岐パターンは哺乳類で共通であり発達初期に完成するが、生後の感覚入力により大きく変化する。これまでに私たちは、主として *in vitro* の実験系を用いて、視床皮質軸索の分岐形成が神経活動により促進されること (Uesaka et al, *JNS*, 27, 5215-5223, 2007)、さらにシナプス前細胞(視床軸索側)とシナプス後細胞(大脳皮質細胞)の両方の神経活動が必要なことも明らかにした(Yamada et al, *PNAS*, 107, 7562-7567, 2010)。次なる問題は、これらの神経活動に依存した分子機構を明らかにすることである。

2. 研究の目的

以上を踏まえて、本研究では視床から大脳皮質への投射系において、神経活動に依存して軸索分岐を制御する分子機構を明らかにすることを目指した。そのため、標的細胞である皮質側ならびに、伸長する軸索側のメカニズムに分けて研究を行った。

3. 研究の方法

標的細胞由来因子の軸索分岐作用を解析するためには、視床皮質共培養標本、遺伝子欠損動物を用いた。視床皮質共培養標本では、視床軸索を緑色蛍光タンパク質によって可視化し、*in vivo* での解析には軸索トレーサーを用いた。軸索側における標的由来分子に対する受容体同定のためには、*in situ* hybridization 法、細胞株を用いた結合実験を

行った。また、候補受容体の作用を調べるためには、視床皮質共培養標本の視床細胞に対してその遺伝子の過剰発現やノックダウン実験を行った。また、前シナプスでのエンドサイトーシスやエクソサイトーシスの役割を調べるためには、視床細胞にそれらの働きを阻害するタンパク質をコードする遺伝子の導入を行った。

4. 研究成果

これまでに、視床皮質軸索の分岐形成を担う分子機構として、ネトリンファミリーに属する Netrin-4 が発達期大脳皮質で層特異的かつ神経活動依存的に発現し、視床軸索の分岐形成を制御し得ることを示唆した。本研究では、Netrin-4 の機能を *in vivo* で明らかにすると共に、その受容体を同定し、その下流の分子機構を明らかにすることを目的として実験を行った。

まず、Netrin-4 の機能を *in vivo* で明らかにするために、*netrin-4* 欠損ラットと野生型において、皮質感覚野で4層を通過する視床軸索をトレーサーを用いて観察した。その結果、*netrin-4* 欠損ラットでは、分岐数ならびに分枝長が野生型に比べて約 2/3 にまで減少した。加えて、体性感覚野において 5-HTT (セロトニントランスポーター) に対する抗体を用いて視床軸索の終末分布を調べたところ、*netrin-4* 欠損ラットで、その染色強度が野生型に比べて有為に減少していることが示された。これらのことから、Netrin-4 が *in vivo* においても軸索分岐に促進的に働くことが示された。

第2に視床軸索の分岐形成を担う Netrin-4 の受容体を同定することを試みた。まず、その候補として、DCC, Neogenin, Unc5 が挙げられるので、それらの *in situ* hybridization を行った結果、DCC, Neogenin, Unc5B が生後発達期のラット視床に強く発現することが分かった。次に、Netrin-4 との結合性を DCC, Neogenin, Unc5B を発現させた HEK293 細胞上で調べたところ、Netrin-4 は Unc5B にのみ

強く結合することが分かった。さらに、Unc5Bの機能を調べるために、視床皮質共培養系においてRNAi法を適応し視床軸索の分岐形成を観察した。shRNAにより視床ニューロンのUnc5Bをノックダウンすると、皮質切片での軸索分岐は顕著に減少した。

以上の結果から、神経活動依存的な視床皮質軸索の分岐形成には、Netrin-4が皮質ニューロンの活動状況を反映して産生され、一方皮質内に侵入した視床軸索はUnc5Bによってnetrin-4を受容し、細胞内シグナル伝達系を介して分岐形成を促進させることが示唆された。

標的由来因子としてnetrin-4に加えて、brain derived neurotrophic factor (BDNF)が視床軸索に作用して軸索分岐を促進することも見出された。実際、視床皮質共培養にBDNFを200 ng/ml添加することにより、軸索分岐が有意に増大した。さらに、BDNFによる視床軸索への作用として、シナプス末端からの取り込みによって分岐が形成される仮説を掲げ、エンドサイトーシスの役割について解析を行った。そのため、視床ニューロンにエンドサイトーシスを阻害するAP180Cタンパクをコードする遺伝子を視床細胞に遺伝子導入した。その結果、Ap180Cの濃度に応じて分岐形成が抑制されることが示された。また、エクソサイトーシスに関わるタンパク質として知られるシナプトタグミンのミュータントの遺伝子を視床細胞に導入することによっても同様の表現型が見出されたことから、シナプス小胞のリサイクリングによるシナプス部位での取り込み機構が神経栄養因子による軸索分岐に対して重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、視床軸索側の発火活動が活発化するとリサイクリングが増大することと考え合わせると、神経活動依存的に視床軸索での神経栄養因子の取り込みが増大すると考えられ、以上の結果は神経活動依存的な軸索分岐のメカニズムとして重要なものであることが示唆される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. Granseth B, Fukushima Y, Sugo N, Lagnado L, Yamamoto N (2013) Regulation of thalamocortical axon branching by BDNF and synaptic vesicle cycling. *Front Neural Circuits* 7: 202. doi: 10.3389 査読有
2. Malyshevskaya O, Shiraiishi Y, Kimura F, Yamamoto N (2013) Role of electrical activity in horizontal axon growth in the developing cortex: A time-lapse Study using optogenetic Stimulation. *PLOS ONE* 8: e82954. doi: 10.1371 査読有
3. Arnoux I, Hoshiko M, Mandavy L, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2013) Adaptive phenotype of microglial cells during the normal postnatal development of the somatosensory "barrel" cortex, *Glia* 61:1582-1594. doi: 10.1002 査読有
4. Sato H, Fukutani Y, Yamamoto Y, Tatara E, Takemoto M, Shimamura K, Yamamoto N (2012) Thalamus-derived molecules promote survival and dendritic growth of developing cortical neurons. *J Neurosci* 32:15388-15402. doi: 10.1523 査読有
5. Hoshiko M, Arnoux I, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2012) Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J Neurosci* 32:15106-15111. doi: 10.1523 査読有
6. Yamamoto N, Lopez-Bendito G (2012) Shaping Brain connections through spontaneous neural activity. *Eur J Neurosci* 35: 1595-604. doi: 10.1111 査読有
7. Takemoto M, Hattori Y, Zhao H, Sato H, Tamada A, Sasaki S, Nakajima K, Yamamoto N (2011) Laminar and Areal Expression of Unc5d and Its Role in Cortical Cell Survival. *Cereb Cortex* 21: 1925-1934. doi: 10.1093 査読有

8. Zhao H, Maruyama T, Hattori Y, Sugo N, Takamatsu H, Kumanogoh A, Shirasaki R, Yamamoto N (2011) A molecular mechanism that regulates medially oriented axonal growth of upper layer neurons in the developing neocortex. *J Comp Neurol* 519: 834-48. doi: 10.1002 査読有
9. Fukunishi A, Maruyama T, Zhao H, Tiwari M, Kang S, Kumanogoh A, Yamamoto N (2011) The action of Semaphorin7A on thalamocortical axon branching. *J Neurochem* 118: 1008-15. doi: 10.1111 査読有
10. 星子麻記、山本 亘彦 (2013) 神経回路形成におけるミクログリアの役割 .*BRAIN and NERVE*. Vol. 65, No. 10 p. 1113-1120. 依頼執筆

〔学会発表〕(計 10 件)

海外発表

1. Hayano Y, Sasaki K, Takemoto M, Maeda Y, Yamashita T, Ohmura N, Hata Y, Kitada K, Yamamoto N (2012) Activity-dependent expression of Netrin-4 regulates thalamocortical axon branching, Society for Neuroscience 42nd annual meeting. Oct 13-17, New Orleans, USA
2. Malyshevskaya O, Shiraishi Y, Tanabe Y, E.S. Ruthazer, Yamamoto N (2012) The role of neuronal activity in cortical axon growth: A time-lapse study using optogenetic control, Society for Neuroscience 42nd annual meeting, Oct 13-17, New Orleans, USA
3. Sugo N, Morimatsu M, Arai Y, Kousoku K, Ohkuni A, Nomura T, Yanagida T, Yamamoto N (2012) Single-molecule imaging of transcription factor CREB in living cells, Society for Neuroscience 42nd annual meeting. Oct 13-17, New Orleans, USA
4. Alchini R, Sugo N, Yamamoto N, Nucleocytoplasmic translocation of the histone deacetylase 9 (HDAC9) regulates

thalamocortical axon branching, Cortical Development Meeting 2011, May 19-22, Crete, Greece

国内発表

1. 松本直之、山本 亘彦：神経活動依存的な軸索分岐に対するシナプスの役割、第7回神経発生討論会、2014.3.13-14 吹田
2. 大西 公平、菅生 紀之、山本 亘彦：大脳皮質神経細胞分化における DNA 修復酵素 DNA ポリメラーゼ β の機能に関する研究、第6回神経発生討論会、2013.3.15、和光
3. Alchini R, Sugo N, Yamamoto N “Histone deacetylase 9 (HDAC9) regulates thalamocortical axon branching by shuttling from the nucleus to cytoplasm in an activity-dependent fashion” 第34回日本神経科学大会、2011.9.14-17、横浜
4. 早野 泰史, 竹本 誠, 前田 有里枝, 北田 一博, 山本 亘彦: 感覚入力によって発現する Netrin-4 が視床皮質投射における軸索枝分かれ形成を制御している、第34回日本神経科学大会、2011.9.14-17、横浜
5. 菅生 紀之、森松 賢順、新井 由之、香束 剛章、大國 紋、野村 泰伸、柳田 敏雄、山本 亘彦 1分子イメージングによる転写因子 CREB の核内動態解析、第35回日本神経科学大会、2012.9.18-21、名古屋
6. 菅生 紀之、森松 賢順、新井 由之、香束 剛章、大國 紋、野村 泰伸、柳田 敏雄、山本 亘彦 1分子イメージングによる転写因子 CREB の動態解析、第35回日本分子生物学会、2012.12.11-14、福岡

〔図書〕(計 2 件)

1. 山本 亘彦 (2013) 神経活動依存的な神経回路形成 脳の発生学 (宮田卓樹・山本 亘彦編) pp, 京都：化学同人

2. 山本 亘彦 (2011) 視床皮質軸索の枝分かれ形成の制御機構 プレインサイエンス・レビュー (プレインサイエンス振興財団 伊藤正男・河合述史編)
pp111-125, 東京: (株)クバプロ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/neurobiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 亘彦 (YAMAMOTO, NOBUHIKO)
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号: 00191429

(2) 研究分担者

菅生 紀之 (Sugo, Noriyuki)
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
研究者番号: 20372625