

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430010

研究課題名(和文) 新生嗅球介在ニューロンの神経回路再編機構の解明

研究課題名(英文) Sensory-experience dependent development of olfactory bulb interneurons

研究代表者

吉原 誠一 (YOSHIHARA, SEIICHI)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90360669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：嗅球介在ニューロンにおいて感覚入力依存的な嗅球神経回路再編の分子機構の解明を目指した。その結果、嗅球顆粒細胞において転写因子Npas4を過剰発現すると、樹状突起のスパイン密度は増加するのに対してNpas4をノックダウンやノックアウトすると、樹状突起のスパイン密度は顕著に減少していた。さらに、Npas4はMdm2を介して、スパイン形成分子であるDcxのユビキチン化による分解を調節することで、嗅球顆粒細胞のスパイン密度を制御していることが明らかになった。またNpas4遺伝子はDcxのタンパク質合成を抑制するmicroRNAの発現を抑制的に制御していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Sensory experience regulates development in olfactory bulb (OB). Recently, we identified a transcription factor, neuronal Per/Arnt/Sim domain protein 4 (Npas4) gene, which is expressed in a subset of OB GCs following sensory experience. Npas4 overexpression in newborn OB GCs increased the spine density even under sensory deprivation. Conversely, both Npas4 knockdown and knockout resulted in a significant reduction in the spine density of OB GCs. Then, to investigate molecules that play a role in the downstream of Npas4, we searched for microRNAs (miRs), whose expression levels differed between the wild-type and Npas4-knockout OBs, and whose expression correlated with the interneurons, based on RNA-sequencing plus in situ hybridization screenings. Among ~50 miRs, we found that three novel miRs show a clear difference in expression between the wild-type and Npas4-knockout OBs.

研究分野：神経科学

キーワード：成体神経新生 嗅球介在ニューロン シナプス形成 転写因子

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質の視覚野や海馬で明らかにされているように、ニューロンは神経活動に応じて樹状突起の発達やシナプス形成を行うことで、より洗練された神経回路へと成熟していく。しかしながら、このような神経活動依存的な回路形成機構については不明な点が多い。

嗅球介在ニューロンは胎生期のみならず、成体期においても新生され続け新たな神経回路を形成している。嗅球の神経回路は成体においても常に新たな回路を作り続けている動的なものであり、これは他の神経系では見られない極めてユニークな特徴である。さらに、この嗅球神経回路形成は神経活動によって、その回路の精密化が行われていると考えられているがその機構は明らかになっていない。申請者はこれまでの解析により、神経活動依存的に発現する膜タンパク質や転写因子が嗅球介在ニューロンの樹状突起の発達やシナプス形成を制御していることを明らかにした。

そこで本研究では、嗅球介在ニューロンをモデルとして、神経活動依存的な神経回路の精密化の分子機構の解明を目指す。また本研究は、統合失調症や自閉症等の精神疾患に関する原因解明や、損傷された脳内神経回路の修復等の再生医学への応用にも繋がると期待される。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに成体期においても新生され続けるという興味深い特徴をもった嗅球介在ニューロンに注目して、そのニューロンの発達機構の解析を行ってきた。この解析を行うに当たり、遺伝子組換えマウスを複製する従来の方法よりも、より簡便で迅速に遺伝子の機能解析を行うためにレンチウイルスを用いた遺伝子導入の系を嗅球介在ニューロンに試みた。その結果、レンチウイルスを脳室に注入して感染させると新生の嗅球介在ニューロンに効率良く外来遺伝子が導入できることが申請者の実験によって明らかになった。このレンチウイルスの系を用いて嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な回路形成機構の解析に現在着手している。これまでに申請者は、神経活動は嗅球介在ニューロンの樹状突起の伸展とシナプス形成に必須であることを明らかにした。

次に、この嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な発達の分子機構を解明するために、片側の鼻孔を閉じて匂い刺激を遮断したマウス嗅球と正常な嗅球とで発現量が変動する遺伝子について DNA マイクロアレイによる探索を行った。その結果、転写因子である *Npas4* 遺伝子などの発現が匂い刺激を遮断した嗅球で減少しているという結果が得られた。ここに申請する研究では、これらの神経活動依存的な神経回路形成に関与する可能性のある遺伝子群のうち *Npas4* 遺伝子の機能

解析を、レンチウイルスの発現系を用いて行い、嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な神経回路形成機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

申請者によるこれまでの DNA マイクロアレイによる解析から、匂い刺激を遮断したマウス嗅球においてはシナプス形成を制御する転写因子である *Npas4* などの発現が変動している結果が得られた。これらの神経活動依存的なニューロンの発達に関与すると考えられる遺伝子について、後述するレンチウイルスを用いた遺伝子の *in vivo* の機能解析実験を行う。

レンチウイルスはレトロウイルスの一種であり、改変されたレンチウイルスベクターによって神経細胞を含む様々な種類の細胞に効率よく遺伝子導入できることが報告されている。申請者の実験によってレンチウイルスベクターを生後1日目のマウス脳室に感染させ1週間後に解析を行ったところ新生嗅球介在神経細胞に効率よく遺伝子導入されていることが明らかになった。レンチウイルスベクターに嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な発達に関与すると考えられる *Npas4* 遺伝子を組み込み、マウス脳室に感染させることで、その遺伝子の *in vivo* の神経回路形成における機能解析を行う。また *Npas4* 遺伝子のドミナントネガティブ型タンパク質の強制発現や RNAi を用いた遺伝子の発現阻害実験も行うことで、*Npas4* 遺伝子の嗅球介在神経細胞の発達における機能を明らかにする。

上記の実験と共に、転写因子である *Npas4* 遺伝子が制御する遺伝子の探索を、*Npas4* 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) Seq 法を用いて行う。上記の探索実験により、*Npas4* 分子の下流に位置する分子が得られた場合には、それらの分子の嗅球介在ニューロンの発達における機能を前述したレンチウイルスの系を用いて明らかにする。これらの嗅球介在ニューロンの発達を制御する分子の同定及びその分子の発達における機能を明らかにすることで、嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な発達の分子メカニズム解明に向けてさらに大きな進展が得られると考えられる。

4. 研究成果

ニューロンは一般的に大人になってから新生されることはないが、匂い情報を処理する嗅球における抑制性介在ニューロンは、例外的に大人になっても産生されて、新しい神経回路を形成し続けている。我々は、嗅球介在ニューロンにおいて神経活動依存的な発現を示す遺伝子の探索と機能解析を通して、感覚入力依存的な嗅球神経回路再編の分子機構の解明を目指した。まず、*in situ hybridization* スクリーニングにより、PAS ド

メインを持つ転写調節因子である **Npas4** 遺伝子を同定し、その発現が嗅球顆粒細胞において匂刺激による神経活動依存的に制御されていることが分かった。嗅球顆粒細胞において **Npas4** を過剰発現すると、樹状突起のスパイン密度は増加するのに対して **Npas4** をノックダウンやノックアウトすると、樹状突起のスパイン密度は顕著に減少していた。次に、クロマチン免疫沈降シーケンス法 (ChIP-Seq) を用いて、**Npas4** の下流遺伝子を探索したところ、E3 ユビキチンリガーゼである **Mdm2** 遺伝子を見出し、**Npas4** がその発現を抑制的に制御していることが分かった。さらに、**Mdm2** が分解する標的タンパク質をプロテオミクス解析により探索したところ、微小管結合タンパク質であるダブルコルチン (**Dcx**) を同定し **Npas4** を欠損した嗅球介在ニューロンでは、**Mdm2** の発現が増加して、**Dcx** の分解を促進していた。以上の結果から、**Npas4** は **Mdm2** を介して、スパイン形成分子である **Dcx** のユビキチン化による分解を調節することで、感覚入力依存的な嗅球顆粒細胞のスパイン密度を制御していることが明らかになった。さらに **Npas4** 遺伝子はいくつかの **microRNA** の発現を抑制的に制御していることが明らかになった。**microRNA** のなかには **Dcx** のタンパク質合成を抑制する働きのあるものが含まれていた。

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 3 件)

1. Kaneko-Goto T, Sato Y, Katada S, Kinameri E, Yoshihara S, Nishiyori A, Kimura M, Fujita H, Touhara K, Reed RR and Yoshihara Y.
Goofy coordinates the acuity of olfactory signaling. **The Journal of Neuroscience** 33, 12987-12996 (2013)
2. Yoshihara S*, Takahashi H*, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Kitsuki M, Tatsumi K, Furukawa-Hibi Y, Hirai H, Nagai T, Yamada K and Tsuboi A. (*co-first authors)
Npas4 regulates **Mdm2** and thus **Dcx** in experience-dependent dendritic spine development of newborn olfactory bulb interneurons. **Cell Reports** 8, 843-857 (2014)
3. Yoshihara S, Takahashi H and Tsuboi A.
Molecular mechanisms regulating the dendritic development of newborn olfactory bulb interneurons in a sensory experience-dependent manner. **Front. Neurosci.** 9, 514 (2016).

[学会発表](計 11 件)

1. Yoshihara S, Takahashi H, Kinoshita M, Nishimura N and Tsuboi A. Sensory input regulates the dendritic development of specific neuronal subtypes in the mouse olfactory bulb. **Cold Spring Harbor Asia Conference, Francis Crick Symposium on Neuroscience: The Changing Brain**, Suzhou, China (2013).
2. 吉原誠一, 高橋弘雄, 木下雅仁, 西村信城, 永井拓, 山田清文, 坪井昭夫. **Npas4** transcription factor regulates the sensory experience-dependent dendritic spine development of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb. **第36回日本神経科学学会大会**, 京都(2013).
3. 吉原誠一, 高橋弘雄, 木下雅仁, 西村信城, 坪井昭夫. **Npas4** regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in olfactory bulb granule cells. **神経の再生と分化に関する国際シンポジウム Neurogenesis 2013**, 松島 (2013).
4. 吉原誠一, 高橋弘雄, 西村信城, 木下雅仁, 永井拓, 山田清文, 坪井昭夫. **Npas4** regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in olfactory bulb granule cells. **第36回日本分子生物学会年会**, 神戸 (2013).
5. Yoshihara S, Takahashi H, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Furukawa-Hibi Y, Nagai T, Yamada K and Tsuboi A. **Npas4** regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. **Cold Spring Harbor Meeting: Neuronal Circuits**, Cold Spring Harbor, USA (2014).
6. 吉原誠一, 高橋弘雄, 西村信城, 木下雅仁, 朝比奈諒, 日比陽子, 永井拓, 山田清文, 坪井昭夫. Transcription factor **Npas4** regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. **第37回日本神経科学学会大会**, 横浜 (2014).
7. 吉原誠一, 高橋弘雄, 西村信城, 木下雅仁, 朝比奈諒, 日比陽子, 永井拓, 山田清文, 坪井昭夫. Transcription factor **Npas4** regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. **第37回日本分子生物学会年会**, 横浜 (2014).
8. 吉原誠一, 高橋弘雄, 西村信城, 木下雅仁, 朝比奈諒, 坪井昭夫. **Npas4** and **5T4** regulate the sensory experience-dependent development of dendrites in newborn olfactory bulb interneurons. **成体脳ニューロン新生懇談会**, 東京 (2014)
9. 吉原誠一, 高橋弘雄, 西村信城, 木下雅仁, 朝比奈諒, 日比陽子, 永井拓, 山田

清文，坪井昭夫． Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. **第92回日本生理学会年会**，神戸 (2015)．

10. 吉原誠一，高橋弘雄，木下雅仁，朝比奈諒，坪井昭夫． MicroRNAs downstream of Npas4 that regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. **第38回日本神経科学大会**，神戸 (2015)．

11. 吉原誠一，高橋弘雄，木下雅仁，朝比奈諒，坪井昭夫． MicroRNAs downstream of Npas4 that regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. **第38回日本分子生物学会年会**，神戸 (2015)．

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

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)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~amrc-lab1/>

6．研究組織

(1)研究代表者

吉原 誠一 (YOSHIHARA SEIICHI)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：90360669

(2)研究分担者

高橋 弘雄 (TAKAHASHI HIROO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20390685

(3)連携研究者

坪井 昭夫 (TSUBOI AKIO)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20163868