

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830024

研究課題名(和文)ほ乳類大脳皮質における神経活性依存的な樹状突起の形態制御に関わるメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of activity dependent morphological change of dendrites in mammalian cortex

研究代表者

松居 亜寿香(Matsui, Asuka)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：30599684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスのバレル皮質では、生後に第4層神経細胞はヒゲからの刺激に応じて樹状突起の形態を変化させる。これまでの研究でバレル皮質に特異的に発現するBtd3が神経活性依存的な樹状突起の形態制御に必要であることを明らかにした。

本研究では、Btd3が神経活性依存的にリン酸化され、Plexinと共にRho活性を上昇させることを明らかにした。またBtd3はさらに神経活性を受けると、細胞内局在を変え、細胞骨格へ移動することも見出した。

以上の結果から、Btd3は神経活性によって異なる状態をとり、この状態の違いが樹状突起の除去または維持の選択性に重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that BTBD3 (BTB/POZ domain containing 3) is essential for dendrite patterning of spiny stellate neurons in mouse somatosensory barrel cortex. Dendrites with less input are removed by BTBD3, however, dendrites with higher input were resistant for BTBD3 dependent dendrite elimination. This suggests that BTBD3 determines dendrite specificity for removal/maintenance through sensing the difference of neuronal inputs. However, it remains unknown how BTBD3 senses neuronal inputs and controls dendrite morphology. This present study revealed that BTBD3 phosphorylation triggers Rho activation through BTBD3-plexin interaction. We also found that neuronal activity induces BTBD3 translocation to intermediate filaments, suggesting that BTBD3 binding to intermediate filaments stabilizes these high input dendrites even more. These results suggest that the different state of BTBD3 determines dendrite specificity for removal/maintenance.

研究分野：神経科学

キーワード：樹状突起 バレル 神経活性依存的 大脳皮質

## 1. 研究開始当初の背景

生後直後の赤ん坊の脳内では、大人よりもたくさんの樹状突起とスパインが形成され、神経細胞同士の接続も過剰に存在する。これは生後の環境によって、外界からのどんな刺激にも機敏に対応し、生育環境に適した神経回路へと再編成するための効率の良い方法と考えられる。しかし、過剰な樹状突起やスパインの除去が外部入力に応じて正確に行われないと、その後さらに形成される神経回路において、接続ミスや回路の混線を起こす原因となりかねない。

我々はこれまでに、マウス第一次体性感覚野のバレル皮質をモデル系とし、研究を行っている。バレル皮質の spiny stellate 細胞は生後 1 週目にヒゲからの刺激をもとに過剰な樹状突起を除去し、ある特定の方向にのみ樹状突起を伸ばすことが知られている。我々はこれまでにバレル皮質に特異的に発現する遺伝子 Btbd3 (BTB/POZ domain containing 3) を見出し、この分子がバレル皮質の spiny stellate 細胞の不要な樹状突起の除去に関わることを明らかにした。しかしながら Btbd3 を介した樹状突起の形態制御に関わる詳細な分子メカニズムは不明である。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに神経活動依存的な樹状突起の除去に関わる因子 Btbd3 (BTB/POZ domain containing 3) を同定している。しかしながら、Btbd3 が神経活動に応じてどのように除去する樹状突起を選択し、またどのような分子メカニズムで樹状突起の形態を制御するのかは不明である。本研究では Btbd3 を介した、神経活動依存的な樹状突起の形態変化の詳細な分子メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) Btbd3 の樹状突起の制御に必要なドメインの同定

Btbd3 は 3 つのドメイン (BTB/POZ, BACK, PHR) を持つ。それぞれのドメインを欠損した変異型 Btbd3 を発現するベクターを作製し、Btbd3KD ベクターと共にマウス脳に発現させ、spiny stellate 細胞で Btbd3 を KD した際に生じる樹状突起の形態異常をレスキューできるかを調べる。これにより神経活性依存的な樹状突起の除去に必要なドメインを明らかにする。

### (2) Btbd3 と共に樹状突起の形態制御に関わる分子の同定

Btbd3 は樹状突起の形態を直接制御するドメインを持たないことから、パートナー分子が必要であると予想された。パートナーとなりうる候補分子は、過去の知見から Btbd3 と相互作用することが報告されている分子に加え、protein-protein chip 法を用いて得られた、Btbd3 と相互作用する可能性がある分

子、さらに樹状突起の形態制御に関わる分子を対象とした。

まずは in situ Hybridization (ISH) 法を用いて、バレル皮質での発現解析を行う。発現が確認できた遺伝子について、さらにバレル皮質で樹状突起の形態変化が起こる時期での発現変化について解析する。

### Btbd3 と相互作用する分子の同定

発現解析の結果から得られた候補遺伝子について、Btbd3 と相互作用するかを免疫沈降法 (IP) により確認する。

候補分子が spiny stellate 細胞の樹状突起の形態制御に関わるかを調べる

上記の実験で Btbd3 と相互作用する候補分子について、実際に spiny stellate 細胞での樹状突起の形態制御に必要であるか、in vivo にて調べる。子宮内遺伝子導入法 (IUE 法) にて E13.5 日目に候補分子を大脳皮質に導入し、候補分子の過剰発現 / 発現抑制を行う。その後、生後 6 日目に脳を取り出し、切片を作製し、コンフォーカル顕微鏡を用いて樹状突起の形態を観察する。

## 4. 研究成果

### (1) 樹状突起の形態制御に必要なドメインの同定

Btbd3 が持つ各ドメインを欠損させた変異型 Btbd3 を用いてレスキュー実験を行った。その結果、野生型 Btbd3 と Btbd3KD ベクターを共発現させた場合、樹状突起は過剰な樹状突起が通常通り除去され、正常な形態を示した。しかし BTB/POZ ドメイン、PHR ドメインを欠損させたものを共発現させた場合は過剰な樹状突起が残されたままであった。

この結果から、BTB/POZ ドメインと PHR ドメインが樹状突起の形態制御に必要であることがわかった。

### (2) Btbd3 と共に樹状突起の形態制御に関わる分子の同定

ISH 法による発現解析で複数の遺伝子がバレル皮質で発現することがわかった。その中で Plexin ファミリーに着目した。その理由は、過去の研究で、Btbd3 は plexinB3 の細胞内ドメインと結合することが報告されているためである。しかし PlexinB3 はバレル皮質で発現していないので、構造が類似している、他の Plexin ファミリーの大脳皮質での発現解析を行い、複数の Plexin が発現していることを確認した。それらの中で我々は plexinA4 に着目した。その理由は PlexinA4 K0 マウスではバレルの形成異常が報告されているためである。PlexinA4K0 マウスでの spiny stellate 細胞の樹状突起の形態を観察したところ、Btbd3 を KD した場合と同様に不要な樹状突起が除去されず残っていた。次に Btbd3 と PlexinA4 が相互作用するか IP 法を用いて調べた。その結果、Btbd3 と PlexinA4

は相互作用することがわかった。  
以上の結果から、Btbd3 は plexinA4 と共に樹状突起の除去を行うことが示唆された。

(3) PlexinA4 と Btbd3 による樹状突起の除去のメカニズム

次に PlexinA4 と Btbd3 が結合することにより、どのようにして樹状突起の形態制御をしているのかについて調べた。

我々のこれまでの研究で、Btbd3 は神経活動依存的な樹状突起の形態制御に関わることを示した。その分子メカニズムの一端として、Btbd3 が神経活動依存的に発現量やタンパク量が変わる可能性を考え、大脳皮質での神経活動が抑制されたマウス(大脳皮質特異的 NR1 ノックアウトマウス)を用いて mRNA 量、総タンパク量を調べた。その結果、mRNA 量及び総タンパク量は変化していなかった。そこで次にタンパク質修飾について調べた。その結果、Btbd3 が神経活性依存的にリン酸化され、Rho 活性を上昇させることを見出した。過去の研究で、海馬の神経細胞では RhoA 活性が上昇することで樹状突起が除去されることが報告されている。

Btbd3 には Rho 活性を直接制御するドメインがないため、small GTPase を制御できる PlexinA4 と PHR ドメインを介して結合し、Rho 活性を制御することで樹状突起の形態を変化させることが示唆された。実際に(1)の実験で、PHR ドメインは in vivo で過剰な樹状突起の除去に必要であることを証明している。

加えて、大脳皮質神経細胞の初代培養系を用いて、神経活性の上昇が長く続くと Btbd3 は細胞骨格へと移行することがわかった。

以上の結果から、Btbd3 は神経活動の強弱によって、タンパク質の修飾状態(リン酸化の状態)を変化させ、PlexinA4 と共に Rho 活性を上昇させる。そしてさらに神経活動が上昇すると PlexinA4 と離れて細胞内骨格へ移行し、樹状突起の安定かに寄与するという仮説を新たに立てた。この Btbd3 タンパク質の状態の違いこそが樹状突起が除去されるか維持されるかを決定する要因となると考えられ、今後の研究では、ライブイメージング等の技術を用いて説明する。

これまで神経活動が樹状突起の維持や除去に関わることは報告されてきたが、神経活動がどのようなメカニズムを介して樹状突起の要・不要を決定し、樹状突起の形態の選択性を制御しているのか、その詳細な分子メカニズムに踏み込んだ研究は皆無である。本研究の成果はそのメカニズムの解明につながる重要な知見となりうる。

#### 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 件)

[学会発表](計 5 件)

松居 亜寿香、Timothy R Young, 禹 麻美、吉田 彩、下郡 智美、Selective dendrite removal/maintenance is controlled by activity dependent BTBD3 protein status、第39回日本神経科学大会、2016年7月22日(発表確定)、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

松居 亜寿香、Timothy R Young, 禹 麻美、吉田 彩、下郡 智美 Transition of BTBD3 protein status controls proper dendrite development、第9回神経発生討論会、2016年3月18-19日、東京医科歯科大学(東京都、文京区)

松居 亜寿香、禹 麻美、吉田 彩、下郡 智美、Neuronal activity dependent translocation of Btbd3 to the cytoskeleton is essential for proper dendrite development、第38回日本神経科学大会、2015年7月29日、神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)

松居 亜寿香、Neuronal activity dependent translocation of Btbd3 to the cytoskeleton is essential for proper dendrite development、Neuronal circuits, Development and plasticity of the early visual system、2015年7月27日、神戸ポートピアホテル(兵庫県、神戸市)

松居 亜寿香、禹 麻美、吉田 彩、下郡 智美、神経活性依存的な BTBD3 の細胞骨格への移行は適切な樹状突起の発達に重要である、2015年3月19-20日、九州大学(福岡県、福岡市)第8回神経発生討論会

[図書](計 1 件)

松居 亜寿香、下郡智美、日本評論社、こころの科学 増刊 2016、5 ページ(1~5 ページ、印刷中)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松居 亜寿香 (MATSUI, Asuka)  
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総  
合研究センター・研究員  
研究者番号：30599684

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：