

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04260

研究課題名(和文) 神経活動依存的な軸索分岐を担う細胞骨格制御機構

研究課題名(英文) Cytoskeleton mechanisms of activity-dependent 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) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：軸索分岐は神経回路形成の最終段階として重要な現象である。本研究では大脳皮質ニューロンの軸索分岐に対するRho guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF) の作用を研究することによって、軸索分岐の分子・細胞基盤を明らかにすることを目指した。その結果、Rho-GEFの大脳皮質における発現様式に種を越えて共通な側面があること、さらに複数のRhoGEFが内在的に発現し、RhoAを介して皮質ニューロンの軸索分岐の形成に異なる様式で貢献していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Axon branching is essential for neuronal circuit formation. In the present study, we investigated the role of Rho guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF) in axon branch formation in developing cortical neurons. The results demonstrated that multiple RhoGEFs are expressed in the mammalian cortex and are differentially involved in axon branching of cortical neurons via the RhoA pathway.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 軸索分岐 RhoGEF RhoA

1. 研究開始当初の背景

軸索分岐は神経回路形成の最終段階として重要な現象である。実際、発生期に細胞体から伸長した軸索は標的領域に到達した後、その末端が分岐して標的領域に存在する複数の細胞とシナプス結合を形成することによって、神経回路の特性を決定する。分岐の程度は標的細胞との相互作用や感覚由来や自発的な神経活動によって変化することが示されているが、それを制御する分子機構については不明な点が多い。

これまで、私たちは大脳皮質の神経回路において軸索分岐のメカニズムを研究し、標的細胞が産生する細胞表面分子や、神経活動に依存して発現する分泌性因子によって軸索分岐が制御されることを示した(Yamamoto et al., 1997; Yamamoto et al, 2000; Uesaka et al, 2005; Uesaka et al, 2007; Fukunishi et al., 2012; Malyshevskaya et al, 2013; Yamada et al, 2010; Granseth et al., 2013; Hayano et al, 2014)。一方、軸索側の分子機構としては、低分子量 GTPase Rho ファミリーの1つ RhoA の活性化型(GTP 結合型)が皮質ニューロンの軸索分岐を促進させることを報告している(Ohnami et al, 2008)。RhoA は細胞外シグナルや神経活動によって活性化されることから、軸索分岐制御の舵取り役を担う重要な分子である。興味深い点は、上流シグナルがどのようにして RhoA を活性化し、軸索分岐を制御するかである。この問題に対して、RhoA の活性化因子 Rho guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF) に着目した。RhoGEF は約 70 種類のメンバーから構成されるファミリー分子であり、Rho ファミリー分子に直接結合して作用すると共に、ガイダンス分子の受容体など各種受容体と直接結合して細胞外環境からのシグナルを受け取る。さらに、RhoGEF は、他の軸索成長関連因子に比べて分子進化が大きく、その意味においてもこれら制御因子の高等哺乳類における役割を研究することも意義深い。

2. 研究の目的

以上を踏まえて、本研究では軸索分岐に対する RhoGEF の作用を研究することによって、発達期の脳皮質における神経回路形成の

分子・細胞基盤を明らかにすることである。具体的には、RhoGEF ファミリーの中でも RhoA に作用することが知られている RhoA-GEF の発現と機能を明らかにすることである。そのために、発達期脳での発現を齧歯類や霊長類で調べ、その軸索分岐に対する機能を過剰発現とノックダウン実験を通して明らかにする。

3. 研究の方法

RhoA-GEF の発現を調べるためには、発達期ラットとマカクザル脳切片を作製し、RNA プローブを用いて in situ hybridization を行った。軸索分岐に対する RhoA-GEF の作用を調べるためには、ラット大脳皮質のスライス培養で、少数の上層ニューロンに、蛍光タンパク enhanced green fluorescent protein (EGFP) をコードする DNA を含むプラスミドベクターと各 RhoA-GEF の発現ベクターを電気穿孔法により遺伝子導入した。内在的な RhoA-GEF の役割を調べるためには、shRNA を導入した。いずれも、培養 2 週間後に固定し、標識された軸索をトレースすることによって、軸索分岐を定量的に解析した。

4. 研究成果

まず、ラット大脳皮質切片を用いて RhoA の活性化を促す RhoA-GEF 28 種類の発現を in situ hybridization により調べた。その結果、発達期ラット大脳皮質には 17 種類の RhoA-GEF の発現が認められた。特定の層に発現すると言うよりは、全層にわたって広く分布していた。RhoA-GEF の進化的様相を調べるために、生後直後のマカクザルの大脳皮質切片においても発現を調べたところ、17 種類 RhoA-GEF は齧歯類と同様に大脳皮質に発現していることが見出された。発現量は個々の RhoA-GEF でかなり異なっていたが、齧歯類脳で強い発現を示す RhoA-GEF、ABR や BCR は霊長類脳でも強い発現を示し、一方齧歯類脳で発現の低い ARHGEF5 や ARHGEF28 は霊長類でも発現が弱い、すなわち RhoA-GEF の発現量は種間で強い正の相関があることがわかった。

発達期大脳皮質で発現が認められた17種類のRhoA-GEFの軸索分岐に対する作用をラット大脳皮質の2/3層水平軸索の系を用いて、in vitro切片培養下で過剰発現法により調べた。そのために、生後1日齢のラット大脳皮質より切片を作製し14日間培養した。培養4日目、エレクトロポレーション法を用いて大脳皮質2/3層の細胞に、軸索を可視化するための蛍光タンパクのプラスミド(EGFP)と各RhoA-GEFの発現ベクターを遺伝子導入した。その結果、7種類のRhoA-GEFの過剰発現により軸索分岐が顕著に増加していることが見出された。定量的な解析の結果、RhoA-GEFメンバーのABRやBCRは軸索に沿って微細な枝分かれの形成を促進するのに対して、ARHGEF12やARHGEF18は末端での分岐形成を促進することがわかった。

RhoA-GEFの過剰発現による軸索分岐の様相から、これらの内因的な作用を調べた。そのため、ARHGEF18とABRに着目し、それぞれのshRNAを皮質上層ニューロンに導入して、それぞれをノックダウンすると、軸索分岐はコントロールよりも有意に減少した。さらに、過剰発現による軸索分岐の増加は、RhoA直下に位置するセリンスレオニンキナーゼROCK阻害剤によって著しく低下したことから、RhoA-GEFの作用はRhoA-ROCK経路を経て細胞骨格を制御することが示唆された。

以上より、RhoA-GEFの大脳皮質における発現様式に種を越えて共通な側面があること、さらに複数のRhoA-GEFが内在的に発現し、RhoAを介して皮質ニューロンの軸索分岐の形成に異なる様式で貢献していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Alchini R, Sato H, Matsumoto N, Shimogori T, Sugo N, Yamamoto N (2017) Nucleocytoplasmic Shuttling of Histone Deacetylase 9 Controls Activity-Dependent

Thalamocortical Axon Branching. Sci Rep 7, 6024. 査読有

Tsunematsu H, Uyeda A, Yamamoto N, Sugo N (2017) Immunocytochemistry and fluorescence imaging efficiently identify individual neurons with CRISPR/Cas9-mediated gene disruption in primary cortical cultures. BMC neurosci 18 (1), 55. 査読有

Onishi K, Uyeda A, Shida M, Hirayama T, Yagi T, Yamamoto N, Sugo N (2017) Genome stability by DNA polymerase β in neural progenitors contributes to neuronal differentiation in cortical development. J Neurosci, 37, 8444-8458. 査読有

Kitagawa H, Sugo N, Morimatsu M, Arai Y, Yanagida T, Yamamoto N (2017) Activity-dependent dynamics of the transcription factor CREB in cortical neurons revealed by single-molecule imaging. J Neurosci 37:1-10. 査読有

Sugo N, Yamamoto N (2016) Visualization of HDAC9 spatiotemporal subcellular localization in primary neuron cultures. Methods Mol Biol 1436:119-127. 査読有

Oishi K, Nakagawa N, Tachikawa K, Sasaki S, Aramaki M, Hirano S, Yamamoto N, Yoshimura Y, Nakajima K (2016) Identity of neocortical layer 4 neurons is specified through correct positioning into the cortex. eLife 5:10907. 査読有

Matsumoto N, Hoshiko M, Sugo N, Fukazawa Y, Yamamoto N (2016) Synapse-dependent and independent mechanisms of thalamocortical axon branching are regulated by neuronal activity. Develop Neurobiol 76: 323-336. 査読有

Sugo N, Morimatsu M, Arai Y, Kousoku Y, Ohkuni A, Nomura T, Yanagida T and Yamamoto N (2015) Single-molecule imaging reveals dynamics of CREB transcription factor bound to its target sequence. Sci Rep 5:10662. 査読有

〔学会発表〕(計 20 件)

Yamamoto, N. "Activity-Dependent

Mechanisms for Thalamocortical Circuit Formation”, The 48th NIPS International Symposium, Neural circuitry and plasticity underlying brain function, 2017. 10.31-11.2, Okazaki

山本 亘彦 神経活動依存的な視床皮質軸索の分岐制御機構, 第39回神経組織培養研究会, 2017.10.7-10.8, 名古屋

Miyasaka, Y., Miyagawa, H., Yamamoto, N. “Real-time luciferase assay reveals the effects of patterned neuronal activity on BDNF expression in the developing cortex”, The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2017.7.20-7.23, Yokohama

Sato, H., Hatakeyama, J., Iwasato, T., Yamamoto, N., Shimamura, K. “The role of thalamic afferents in the formation of area-specific laminar configuration in the developing neocortex, The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2017.7.20-7.23, Yokohama

Uyeda, A., Sugo, N., Onishi, K., Lyu, J., Hirayama, T., Yagi, T., Yamamoto, N. “The role of DNA polymerase β in postnatal cortical neuron development”, The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2017.7.20-7.23, Yokohama

Tsunematsu, H., Sugo, N., Kurosawa, A., Adachi, N., Yamamoto, N. “A study of the role of DNA polymerase β in human brain development using induced pluripotent stem cells”, The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2017.7.20-7.23, Yokohama

Chang, L. & Yamamoto, N. “Temporal sequence of contralateral corticofugal projections and gene expression in the midbrain after hemispherectomy”, The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience

Society, 2017.7.20-7.23, Yokohama

Kitagawa, H., Sugo, N. & Yamamoto, N. “The role of neuronal activity and co-factors in CREB dynamics in cortical neurons: A single-molecule imaging study”, Cortical development Conference, 2017.5.17-5.20, Chania, Crete, Greece

Hayano, Y., Araki, T., Sasaki, K., Miyasaka Y., Nakasone, T., Hata, Y. & Yamamoto, N. “A negative regulator for activity-dependent thalamocortical axon branching” Cortical development Conference, 2017.5.17-5.20, Chania, Crete, Greece

Hayano, Y., Araki, T., Sasaki, K., Miyasaka, Y., Nakasone, T., Hata, Y. & Yamamoto, N. “Kit ligand acts as a negative regulator for activity-dependent thalamocortical axon branching”, Axon Guidance, synapse formation & regeneration, 2016.9.20-9.24, Cold Spring Harbor, USA.

Sasaki, K., Arimoto, K., Kankawa, K., Terada, C. & Yamamoto, N. “ARHGAP18 regulates axon branching of cortical upper layer neurons”, Axon Guidance, synapse formation & regeneration, 2016.9.20-9.24, Cold Spring Harbor, USA.

Yamamoto, N. “Positive and negative regulation of activity-dependent thalamocortical axon branching”, The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016.7.20-7.23, Pacifico Yokohama, Yokohama, Kanagawa. (招待講演)

Onishi, K., Sugo, N., Toyoda, S., Hirayama, T., Yagi, T. & Yamamoto, N. “DNA polymerase β function in neural progenitors is required for postmitotic neuronal survival and differentiation in the developing cortex”, The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016.7.20-7.23, Pacifico Yokohama, Yokohama, Kanagawa.

Uyeda, A., Sugo, N., Ohnishi, K., Toyoda, S., Hirayama, T., Yagi, T. & Yamamoto, N. “Involvement of DNA polymerase β in postnatal development of cortical neurons”, The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016.7.20-7.24, Pacifico Yokohama, Yokohama, Kanagawa.

Miyasaka, Y., Hayano, Y., Araki, T. & Yamamoto, N. “Role of Kit ligand as a negative regulator in activity-dependent thalamocortical axon branching”, The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016.7.20-7.24, Pacifico Yokohama, Yokohama, Kanagawa.

Uyeda, A., Onishi, K., Sugo, N., Toyoda S., Hiyayama, T., Yagi, T. & Yamamoto, N. “Pol β deficiency increases DNA double-strand breaks in postnatal cortical neurons”, The 38th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2015.12.1-12.4, Kobe Convention Center, Kobe, Hyogo.

Kitagawa, H., Sugo, N. & Yamamoto, N. “Activity-dependent dynamics of CREB in cortical neurons: A single-molecule imaging study”, Society for Neuroscience, 2015.10.17-10.21, Chicago, USA.

Onishi, k., Sugo, N., Toyoda, S., Hirayama, T., Yagi, T. & Yamamoto, N. “DNA polymerase β activity in neural progenitors is required for postmitotic neuronal survival in the developing cortex”, Society for Neuroscience, 2015.10.17-10.21, Chicago, USA.

Matsumoto, N., Hoshiko, M. & Yamamoto, N. “Involvement of mitochondria in thalamocortical axon branching”, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2015.7.28-7.31, Kobe Convention Center, Kobe, Hyogo.

Sasaki, K., Arimoto, K., Kankawa, K., Terada, C. & Yamamoto, N. “Rho guanine nucleotide exchange factor Abr promotes axon branching in cortical layer 2/3 neurons”, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2015.7.28-7.31, Kobe Convention Center, Kobe, Hyogo.

〔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・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・生命機能研究科・助教

研究者番号：20372625