

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：15KK0263

研究課題名（和文）進化的に保存される脳カラム構造形成メカニズムとその機能（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Evolutionary conserved columnar structure in mammalian brain: formation and function (Fostering Joint International Research)

研究代表者

下郡 智美 (Shimogori, Tomomi)

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・チームリーダー

研究者番号：30391981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：仔マウスのin vivoでの2光子顕微鏡を用いたライブイメージング技術を開発するために、ニューヨーク大学Wenbiao Gan教授との共同研究を行った。遺伝子導入のための子宮内遺伝子導入法のセットアップを行い、ほぼ毎回安定して遺伝子導入が行えることを確認したのちにイメージング技術の開発を開始した。人工保育の方法を開発し、生後2日目から5日目までの生存を可能にした。仔マウスの頭を固定する金属の開発も行い、自由に動けるような重さ形状になるような工夫を行った。これらの技術を用いて、生後2日から5日目までの長期イメージングを行い、ダイナミックな樹状突起の形態変化を単一の細胞で観察することを可能にした。

研究成果の概要（英文）：To reveal dynamic dendritic morphology change that is controlled by early life experience, we tried to develop two photon imaging technique on early postnatal mouse brain. The most difficult step for this experiment is (1) to keep animal survive without mother (artificial raring), (2) remove skull without damaging brain, (3) develop all tools that fits to small mouse head. Collaboration with Dr. Wenbiao Gan (NYU), who is a world expert of two photon imaging, we developed all procedure for early postnatal mouse brain imaging. First, we developed the most efficient procedure for artificial raring (feed goat milk) which kept the animal developing as normal rate. Next we discovered how to remove thin skull and also developed the device fits for small animal head for imaging. As a result, we succeeded to image single neuron from postnatal (P) day 2 to P5 and revealed dynamic dendritic morphology change.

研究分野：神経発生

キーワード：イメージング 樹状突起

1. 研究開始当初の背景

これまでに当研究室では生後の発達期に、環境や経験によって受ける様々な入力があるように脳の神経回路編成を起こすのか、またその分子メカニズムを明らかにする目的で研究を行ってきた。

これまでの成果で Btbd3 は神経活動依存的に PlxnA4 と選択的に結合して RhoA の活性を上昇させ、樹状突起の除去を行っていることを明らかにした。PlxnA4 が RhoA の活性を上昇させるには、2 両体を形成する必要があることがすでに報告されていることから、様々な Btbd3 の変異体を用いてプルダウンアッセイを行い、PHR ドメインを介して PlxnA4 と結合した Btbd3 が、BTB ドメインを介して Btbd3 の二両体を形成し、結果として PlxnA4 が 2 両体を形成することを明らかにした。通常、PlxnA4 の二両体の形成には細胞外で Sema が結合することが必要とされているが、我々の結果では Sema のシグナルを介さずに RhoA の活性をコントロールしていることが示唆された。このことを検証するために、PlxnA4 ノックアウトマウスに細胞外ドメインを欠損した PlxnA4 を導入した結果、樹状突起の形態異常がレスキューされ、細胞内の Btbd3 が直接 PlxnA4 の二両体化と RhoA の活性をコントロールしていることを明らかにした。次に、神経活動がさらに上昇すると、Btbd3 と PlxnA4 の結合が乖離することが明らかになり、この結果高レベルの神経活動下では RhoA の活性が抑制されて、樹状突起の除去も抑制されることを明らかにした。加えて、PlxnA4 と乖離した Btbd3 は Cadps2 という因子と結合し、これによって Rac1 の活性を上昇させることを明らかにした。神経活動の低い樹状突起は Btbd3-PlxnA4 コンプレックスによる RhoA の上昇で除去され、神経活動の高い樹状突起は Btbd3-Cadps2 コンプレックスによる Rac1 の活性上昇によって枝分かれと伸長が促進されるという、樹状突起選択的な形態変化の分子メカニズムを明らかにすることができた。

そこで、このことをさらに生体内で証明する目的で、生後発達期の仔マウスを用いた in vivo 2 光子イメージングを立ち上げる必要が生じた。生後のマウスのイメージングは成体と異なり、技術的な高いハードルが幾つかあるため、これまであまり成功していない。特に母マウスの食殺による、仔マウスの喪失、頭蓋骨の除去の難しさ、個体が小さいことによる麻酔の調節や手術の難しさが上げられる。そこで、効率的に技術開発が行えるように若いマウスでの 2 光子イメージングの経験のある Wenbiao Gan 教授と共同研究を行い、技術開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

生後発達期の神経細胞の形態変化は神経回

路の形成を大きく変化させ、脳機能に影響を与える。この形態変化を起こす分子メカニズムの詳細はこれまでに明らかにしているが、実際に in vivo でこれらの分子メカニズムを用いて形態変化が行われているのかを明らかにするためには 2 光子顕微鏡でのイメージングを用いる必要がある。さらに、これまでの初代培養系を用いた実験では、RhoA や Rac1 の活性を可視化することはできたがそれに伴うダイナミックな樹状突起の形態変化を観察することが難しかった。これは、培養皿に神経細胞が強く接着していることから形態変化を起こすのが難しいと考えられる。実際に、樹状突起が形態変化を起こし始めるものは細胞死を起こすという傾向がみられている。このことから樹状突起の形態変化とその分子メカニズムは間接的に証明しているものであり、直接証明することができていない。そこで、生体内のイメージングが必要不可欠となる。

成体のイメージングは一般的に行われているが、生後直後の仔マウスのイメージングには技術的なハードルが高く、あまり行われていない。そこで仔マウスの効率的なイメージングを行うための技術開発を行うために若いマウスでの 2 光子イメージングの経験のある Wenbiao Gan 教授と共同研究を行い、技術開発に取り組んだ。

3. 研究の方法

マウス脳内の神経細胞を蛍光タンパクであらかじめラベルするために、子宮内遺伝子導入法を用いて、蛍光タンパクをコードする遺伝子を含むプラスミドを導入した。胎生 13 日目に遺伝子導入を行うことにより、視床軸索が入力する大脳皮質第 4 層に効率的に遺伝子導入を行うことができる。これらのマウスが出生した際に、蛍光顕微鏡で蛍光タンパクが発現している個体をスクリーニングしておく。次に仔マウスの頭にイメージング用のヘッドギアの装着を行う手術を行う。ここで、手術を行った仔マウスに対して母親マウスは食殺を行う傾向が強いため、人工保育による仔マウスの飼育法の開発を行った。さらに、人工保育には 3 時間ごとの授乳など、人手を多く必要とすることから、長時間自力で生きながらえる環境を作成して、最長 5 時間の自力での生存を可能にした。これには様々なミルクと哺乳瓶を試し、最適な条件を導き出した。次に、成体より頭の大きさが小さい仔マウスのために、ヘッドギアを開発し、イメージングの際に頭を安定して固定する方法を開発した。さらに、仔マウスの薄い頭骨を、出血や脳へのダメージなく除去する方法の開発を行った。

4. 研究成果

仔マウスの in vivo での 2 光子顕微鏡を用い

たライブイメージング技術を開発するために、ニューヨーク大学 Wenbiao Gan 教授との共同研究を行った。遺伝子導入のための子宮内遺伝子導入法のセットアップを行い、ほぼ毎回安定して遺伝子導入が行えることを確認したのちにイメージング技術の開発を開始した。人工保育の方法を開発し、生後2日目から5日目までの生存を可能にした。仔マウスの頭を固定する金属の開発も行い、自由に動けるような重さ形状になるような工夫を行った。これらの技術を用いて、生後2日目から5日目までの長期イメージングを行い、ダイナミックな樹状突起の形態変化を単一の細胞で観察することを可能にした。

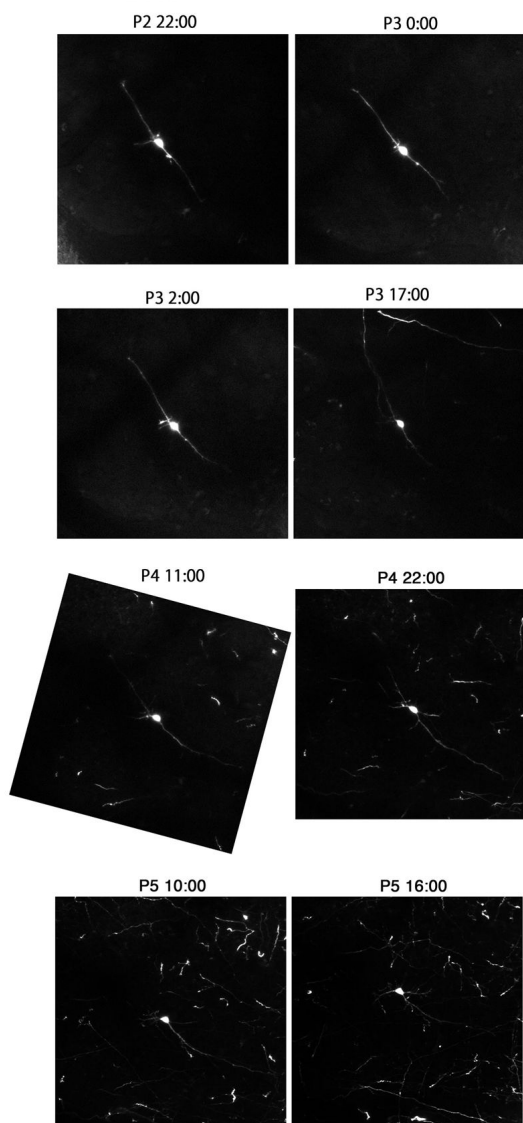


図1、生後2日目から5日までの単一神経細胞のイメージングの結果。同じ細胞に繰り返し戻ってイメージングを行っている様子。

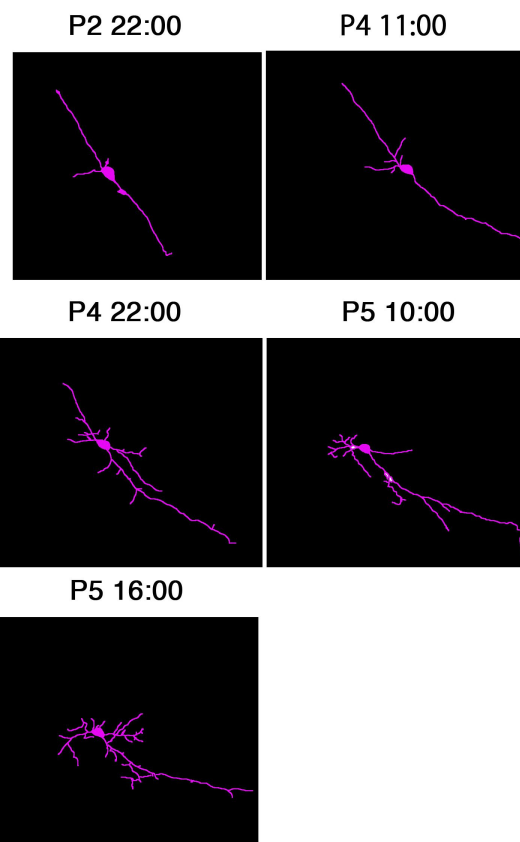


図2、図1のデータをトレーシングした結果。樹状突起がダイナミックに形態変化を起している様子がわかりやすく見える。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Peng J, Fabre PJ, Dolique T, Swikert SM, Kermasson L, Shimogori T, Charron F. (2018) Sonic Hedgehog Is a Remotely Produced Cue that Controls Axon Guidance Trans-axonally at a Midline Choice Point. *Neuron*.97:326-340.e4.doi:10.1016/j.neuron.2017.12.028. 査読有り

2. Shimogori T, Abe A, Go Y, Hashikawa T, Kishi N, Kikuchi SS, Kita Y, Niimi K, Nishibe H, Okuno M, Saga K, Sakurai M, Sato M, Serizawa T, Suzuki S, Takahashi E, Tanaka M, Tatsumoto S, Toki M, U M, Wang Y, Windak KJ, Yamagishi H, Yamashita K, Yoda T, Yoshida AC, Yoshida C, Yoshimoto T, Okano H. (2018) Digital gene atlas of neonate common marmoset brain. *Neurosci Res*.128:1-13.doi:10.1016/j.neures.2017.10.009. 査読有り

3. 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. 20:6024.doi: 10.1038/s41598-017-06243-7. 査読有り

4. Kawata M, Taniguchi Y, Mori D, Yano F, Ohba S, Chung UI, Shimogori T, Mills AA, Tanaka S, Saito T. (2017) Different regulation of limb development by p63 transcript variants. PLoS One. 12:e0174122. 査読有り

5. Watson C, Shimogori T, Puellas L. (2017) Mouse Fgf8-Cre-LacZ lineage analysis defines the territory of the postnatal mammalian isthmus. J Comp Neurol. doi: 10.1002/cne.24242. 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 下郡智美 Neuronal activity dependent circuit development: Morphological changes and molecular mechanism 日本神経科学会 (招待講演)(国際学会) 2017 7 月幕張

2. 下郡智美 Neuronal activity dependent circuit development: Morphological changes and molecular mechanism 第48回生理研国際シンポジウム (招待講演) (国際学会) 2017 年 11 月岡崎

〔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：
出願年月日：
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
下郡 智美 (SHIMOGORI Tomomi)
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・チームリーダー
研究者番号： 30391981

(2)研究協力者
〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕
Dr. Wenbiao Gan
Skirball Institute of Biomolecular
Medicine, Molecular
Neurobiology・Department of Physiology
and Neuroscience・Professor

〔その他の研究協力者〕
()