

令和元年5月30日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07001

研究課題名(和文)小脳をモデルに*in vivo*で解き明かす、神経回路形成のシナプスを介した制御機構

研究課題名(英文)How synapses regulates neuronal wiring?: activity-dependent development of Cerebellar circuit

研究代表者

竹尾 ゆかり (Takeo, Yukari)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特別研究員(PD)

研究者番号：90624320

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文): 脳の神経細胞が回路を形成するメカニズムを理解するため、本研究では、生きたマウスの小脳プルキンエ細胞を使って、神経細胞樹状突起が形成される過程を2光子顕微鏡を使って観察することに成功した。その結果、樹状突起が完成する前には多くの不要な樹状突起が退縮することが明らかになった。さらに、この樹状突起退縮過程には神経活動と、NMDA型グルタミン酸受容体およびCaMK2キナーゼ蛋白質が、必要であることも見出した。NMDA型グルタミン酸受容体は脳のあらゆるシナプスで多くの機能を果たすことが知られている。本研究は回路形成において神経活動やシナプス伝達が必要であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞はシナプスによって神経回路内で情報を伝達する。神経回路は神経細胞の軸索と樹状突起がシナプス結合することで形成される。多くの神経細胞は胎児期から生後の早い時期にかけて神経回路を形成するが、回路形成中においてシナプスを介した情報伝達がどんな役割を持つのは不明であった。本研究ではマウスの小脳プルキンエ細胞を使って、成熟したシナプスにおいて脳機能に非常に大切であることが知られる、NMDA型グルタミン酸受容体が、発達中の樹状突起の形成に必要であることを発見した。この発見は、発達中のシナプスによる相互作用が回路形成を促すことを示す、脳の発達機構において重要な知見である。

研究成果の概要(英文): How neural circuit is formed precisely during development is unclear especially in mammalian brains. To understand the mechanism, we observed single neuron developing their dendritic morphology by *in vivo* two-photon imaging of murine cerebellar Purkinje cells. We found that immature Purkinje cells retract many immature dendrites before establish a single mature dendritic tree. Interestingly, this dendritic retraction required neural activities. Furthermore, we found that NMDAR and CaMK2 is required for this process, which is a an outstanding finding because it had been unclear if NMDAR had any roles in Purkinje cells despite the fact that NMDAR and CaMK2-dependent downstream signaling mechanisms play various important roles in other neuron types. Our findings suggest that dendritic morphology is regulated in an activity-dependent manner, and thus are highly intriguing in respect of mechanisms of circuit development as well as roles of immature neural activities.

研究分野：発達生物学

キーワード：神経細胞 樹状突起 発達 神経活動

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は細胞の種類や脳の領域に応じて特有の形態を取る。特に、シナプスを受容する主な場である樹状突起の形態は、どのような情報を受け取り、またそれらをどのように処理するのか、すなわち神経細胞の機能の発現に大きく関係すると考えられる。しかし、このような神経細胞の種類に応じた樹状突起形態の形成メカニズムは、驚くほど不明である。理由の一つとして、神経細胞の樹状突起の3次元形態は、多くの場合、培養系では維持が難しいため、in vivoでの観察が必要であるということが挙げられる。しかし発達中の神経細胞をin vivoで観察することはまた多くの場合困難である。なぜなら、このためには、後述するように、「注文の多い」困難な遺伝子導入法が必要となるからである。研究代表者はそれまでの研究で、小脳プルキンエ細胞を用いてこれらの「注文」を満たした遺伝子発現系を習得してきた。本実験系は、樹状突起形態形成のメカニズムを解明するのに非常に適した実験系である。そこで研究代表者はこのユニークで強力な実験系でなければ明らかにできない重要な課題「すなわち樹状突起がin vivoでどのように形成されるか、を解明しようと考えた。

2. 研究の目的

神経細胞は互いにシナプスを通じて神経回路を形成することで機能を発揮する。神経回路形成の発達時期は、樹状突起の形成時期と重なるため、発達途中の樹状突起はそこへ投射してくる軸索とシナプス形成をしながら成長すると想像される。しかしシナプス形成やシナプス入力に樹状突起形成をどう変化させるのかについてはほとんどわかっていない。そこで研究代表者はin vivoでのシナプス形成及び入力、樹状突起および軸索の形態形成をどのように制御するのかを、プルキンエ細胞樹状突起をモデルに解明しようと考えた。

3. 研究の方法

発達中の神経細胞において形態を可視化しつつさまざまな遺伝子操作を行うには、最低でも以下の二つの条件が必要である。一つ目は、遺伝子導入はまばらに、ごく一部の細胞にのみ行われなければならない。なぜなら、辺り一面にすべての細胞がラベルされてしまうと、個々の細胞の形態を明瞭に観察することは非常に難しいからである。しかして多くの場合、遺伝子導入される細胞の割合を低く保とうとすると、発現量も低下してしまうため、目的の操作がうまく行かないことが多い。二つ目の条件は、同時に複数の遺伝子を導入することである。細胞の形態を可視化しつつ、さまざまな遺伝子操作(機能分子の発現、遺伝子発現ノックダウンなど)を行うためである。要約すると、樹状突起形成機構の解明には、幼若マウスにおいて「まばら」かつ「発現量が多く」かつ「複数の遺伝子を導入できる」遺伝子発現が必要である。哺乳類神経細胞においてこのような条件を満たす実験系は非常に困難であるが、研究代表者が習得してきた小脳プルキンエ細胞への子宮内電気閃光法は、これらの条件を満たす高効率の遺伝子導入系である。本手法を用いて遺伝子導入すると、小脳プルキンエ細胞の形態が非常に特異的に、明瞭に可視化でき、また同時に多くの遺伝子(研究代表者は4種類のプラスミドベクターを同時に発現することを確かめている)を発現できる。研究代表者は本手法を生かして、マウス小脳プルキンエ細胞への遺伝子導入、および2光子顕微鏡を用いたin vivoライブイメージングによって、樹状突起の形成過程を観察しそのメカニズムを解明しようとして着想した。

また、シナプス入力に樹状突起形成を制御するかどうかを明らかにするため、プルキンエ細胞樹状突起へシナプス形成する平行線維・登上線維への遺伝子導入と可視化を行い、これらの軸索がシナプスを形成しながら樹状突起・軸索が互いに形態を完成させるメカニズムを解明しようと考えた。

4. 研究成果

(1)プルキンエ細胞に蛍光蛋白質EGFPを発現させてin vivo2光子ライブイメージングにより観察を行った結果、未熟な複数の樹状突起が大胆に退縮することによって成熟した樹状突起が完成するということが明らかになった。(図)

(2)プルキンエ細胞に内向き整流性カリウムチャネルKir2.1を過剰発現させると、上記のような樹状突起の大胆な退縮が阻害されることから、プルキンエ細胞の神経活動が樹状突起形成に必須であることが明らかになった。そこで、続いて以下のようにシナプス入力の役割を検討した。

(3)プルキンエ細胞樹状突起へシナプス形成する主な軸索の一つである登上線維が樹状突起形成をどう制御するか検討した。登上線維に特異的に黄緑色蛍光蛋白質を発現する遺伝子改変マウスにおいて、プルキンエ細胞へまばらに赤色蛍光蛋白質を発現させ、1本の登上線維とそれが投射するプルキンエ細胞の形態を観察したところ、登上線維はプルキンエ細胞が樹状突起の大胆な退縮を終えた後に樹状突起上へシナプスを形成することが分かった。すなわち、登上線維とのシナプスを介した相互作用は樹状突起の形成には影響しないのではないかと考えられた。

(4)そこで、プルキンエ細胞樹状突起へ投射するもう一つの主な入力である平行線維に着目した。平行線維 プルキンエ細胞間のシナプス形成には、平行線維から分泌されるCbln1が必須であることが知られている。Cbln1欠損マウスでは、平行線維シナプスが半数以下に低下する。そこで、平行線維シナプスの必要性を検討するため、Cbln1欠損マウスのプルキンエ細胞にEGFP

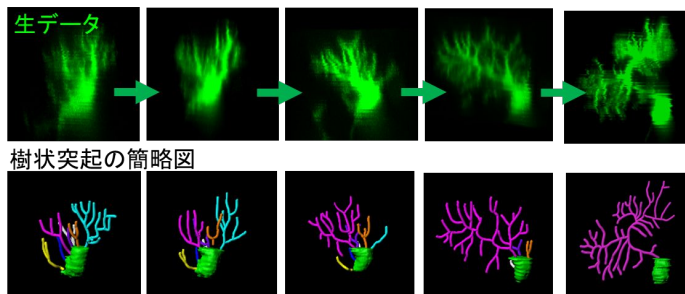
を発現させ、樹状突起形態を観察したところ、Cbln1 欠損マウスではプルキンエ細胞の樹状突起の退縮が起こりにくいことが分かった。つまり、平行線維シナプスの形成あるいは入力が樹状突起形成に必要であることが示唆された。

(5)神経活動あるいは平行線維シナプス入力に樹状突起に大胆な退縮をどのように促進するのか、その分子メカニズムを解明するため、NMDA 型グルタミン酸受容体に着目した。NMDA 受容体は、大脳皮質などにおいて、神経活動依存的な樹状突起の退縮に必要であることが報告されている。この実験は当初の計画にはなかったものであるが、(1)(2)の結果からこの新たな仮説に着眼し、実行に至った。NMDA 受容体の機能に必須のサブユニットである GluN1 の flox マウス、あるいは GluN1 のノックダウンベクターをそれぞれ用いて、プルキンエ細胞において GluN1 の発現を低下させたところ、驚くことに、プルキンエ細胞の樹状突起の退縮が阻害された。NMDA 受容体は多くの脳領域で回路発達やシナプス可塑性において重要な役割を果たす分子であるものの、これまでプルキンエ細胞における NMDA 受容体の役割はほとんど不明であった。そのため、この発見は神経科学一般において大きなインパクトのある結果である。そこで、プルキンエ細胞樹状突起形成における NMDA 受容体の役割についてより詳しい分子メカニズムを追求することとした。

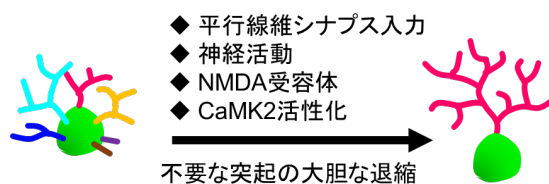
(6)プルキンエ細胞樹状突起形成における NMDA 受容体の役割には、神経活動やシナプス入力に関与するのであろうか？この点を明らかにするため、カルシウム透過能を欠いた変異型 GluN1 を用いて、神経活動依存的な NMDA 受容体によるカルシウム流入が必要かどうか検討した。すると、GluN1 のカルシウム透過能が無いと、樹状突起の退縮が起きないことが明らかになった。すなわち、NMDA 受容体によるカルシウム流入が必要であることが明らかになった。

(7)NMDA 受容体は、カルシウム流入によって、CaMK2 を局所的に動員・活性化させることで、細胞内シグナルを伝達することが、シナプス可塑性における分子機構として報告されている。そこで、プルキンエ細胞樹状突起形成においても CaMK2 が必要であるかどうか調べたところ、CaMK2 をノックダウンしたプルキンエ細胞や、CaMK2 の活性低下型変異体を発現するプルキンエ細胞では、樹状突起の退縮が阻害させることが明らかになった。

図① in vivo ライブイメージングで明らかにされた
プルキンエ細胞樹状突起の大胆な退縮



図② 樹状突起の神経活動依存的な退縮



以上の結果から、プルキンエ細胞の樹状突起形成に神経活動依存的な退縮が必要であること、神経活動による NMDA 受容体・CaMK2 活性化が樹状突起退縮を担うシグナルメカニズムを伝達すること、また樹状突起の局所的な形態形成制御には平行線維シナプス形成が関わっている可能性が高いこと、が明らかになった。(図)

本研究成果は、in vivo での樹状突起形成過程をライブイメージングにより記述したうえで、神経活動、さらにはこれまでベールに包まれていた NMDA 受容体の役割を明らかにしたことから、非常に充実した内容であると考えている。近いうちに雑誌論文として報告した際には、大きな注目を集め、また長く参考にされる文献になることと期待している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

(1) Kazuya Nozawa, Ayumi Hayashi, Junko Motohashi, Yukari H. Takeo, Keiko Matsuda, Michisuke Yuzaki. Cellular and Subcellular Localization of Endogenous Neuroligin-1 in the Cerebellum. *Cerebellum* Dec;17(6):709-721,2018 査読有

(2) Satake T, Yamashita K, Hayashi K, Miyatake S, Tamura-Nakano M, Doi H, Furuta Y, Shioi G, Miura E, Takeo YH, Yoshida K, Yahikozawa H, Matsumoto N, Yuzaki M, Suzuki S. MTCL1 plays an essential role in maintaining Purkinje neuron axon initial segment. *EMBO J* 36:1227-1242, 2017. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

(1)Yukari Takeo, In vivo dendritic development of cerebellar Purkinje cells, Society for Neuroscience, 2017

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。