

令和元年6月20日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18363

研究課題名(和文)環境感知による樹状突起空間パターンニング制御機構の解析

研究課題名(英文)Mechanisms regulating spatial patterning of dendrites by environmental sensing

研究代表者

藤島 和人(Fujishima, Kazuto)

京都大学・高等研究院・特定助教

研究者番号：20525852

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)：プルキンエ細胞は組織内の同種細胞や接続相手(平行線維)を適切に認識し成長ダイナミクスを補正して、特徴的な構造を構築する。本研究ではその仕組みに関し、二つの観点より解明を試みた。(1)プルキンエ細胞は樹状突起同士の接触を認識し、その突起の退縮を引き起こす。Mtss1はアクチン骨格関連分子であり、フィロポディア長の制御を介して樹状突起との接触頻度を調整することを明らかにした。さらにMtss1がアクチン重合活性を制御する仕組みを明らかにした。(2)プルキンエ細胞樹状突起は平行線維を認識し、それとは垂直に進展する。タイムラプスにより方向制御の仕組みを明らかにし、認識に関わる分子の同定を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では小脳プルキンエ細胞をモデルとし、ニューロンが発生期において組織内環境を認識しながら適切な形態を獲得する仕組みの解析を行った。樹状突起が固有の空間配置を獲得する上で、フィロポディアによる環境認識が一定の役割を果たすことを示した。本研究によって得られた知見は、哺乳類の神経回路形成メカニズムを理解する上で重要なものであり、将来的には発生不全に伴う神経疾患などの発症メカニズムへ貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cerebellar Purkinje cells construct their characteristic dendrites during development. Their dendritic filopodia sense the environmental cues and modify their growth dynamics to attain their appropriate shapes. We attempted to clarify the mechanisms controlling the dynamics from two points of view. (1) The dendrites recognize the contact between dendritic arbors and eliminate the arbor to avoid excess crossing. We found that actin-regulator Mtss1 regulates the filopodial length and modify the frequency of contact between dendritic branches. We further demonstrated the mechanisms of how Mtss1 control the actin polymerization to modify filopodial length. (2) The dendrites recognize the parallel fiber to control their dendrite growth orientation. The dendrites grow perpendicular to parallel fibers. We performed time-lapse imaging of dendrite growth during perpendicular growth to understand the mechanisms and attempted to identify the molecule to be involved in the recognition.

研究分野：神経発生

キーワード：神経回路 プルキンエ細胞 フィロポディア アクチン骨格 樹状突起 形態形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

樹状突起の形態は細胞種依存的であり入力種やシナプス数を規定し、神経回路が機能する上で重要である。その特徴的な分岐パターンは、遺伝的に決定された成長ルールに従う一方、組織内の環境を正しく認識しルールを局所的に補正することで獲得されると考えられるが、その仕組みは殆ど明らかでない。

小脳プルキンエ細胞の樹状突起は直交する約十数万本の平行線維とシナプス結合する。その分岐は非常に複雑であるにも関わらず、交差が殆どなく、単一平面上に投射する。この平面かつ空間充填的な分岐形成は、効率的なシナプス形成など、小脳回路の形成に重要な役割を果たすと考えられる。しかしプルキンエ細胞がこの特徴的な分岐パターンを形成する仕組みは殆どわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、樹状突起の空間パターン形成機構の理解を目指し、ニューロンが組織内の同種細胞や接続相手の構造を適切に認識して成長ダイナミクスを補正することで、特徴的な三次元構造を構築する仕組みを解明する。樹状突起はフィロポディアを用い環境を認識する。申請者は予備実験でアクチン骨格制御因子群 (Mtss1、Spectrin) がフィロポディアの持つ異なる特性を制御し、その阻害が樹状突起に異なる空間パターン変化をもたらすことを発見した。環境認識や成長ダイナミクスの変化が三次元的な形態変化に波及する仕組みを解明する。

3. 研究の方法

本研究では樹状突起フィロポディアが組織内で環境を認識し成長ダイナミクスを補正する以下の二つの様式に着目して行った。

- (1) 同種突起同士の接触を認識し、その突起を退縮 (または伸長停止) させる。
- (2) シナプス接続する平行線維束を認識し、樹状突起をそれとは垂直に進展させる。

4. 研究成果

(1) フィロポディア長さ制御と樹状突起の空間充填パターンの解析

Mtss1 は小脳プルキンエ細胞に強く発現するアクチン骨格制御因子である。プルキンエ細胞特異的に発現する GluRdelta2 promoter で Cre リコンビナーゼが発現制御されるマウス (GluRdelta2-Cre) と Mtss1^{flox/flox} と掛け合わせプルキンエ細胞特異的な Mtss1 ノックアウトマウス (以後 Mtss1 cK0) を用い、Mtss1 の機能解析を行った。

(1-1) Mtss1 によるフィロポディア動態制御と接触依存的退縮

Mtss1 cK0 小脳におけるプルキンエ細胞の樹状突起は通常に比べて、樹状突起が疎になっていることを明らかにした。特に、細胞体近位の樹状突起密度が減少する傾向にあった。Mtss1 cK0 プルキンエ細胞の樹状突起の形態変化がどのようなダイナミクスの変化によって生み出されたものかを解析するために、分散培養下樹状突起の発生過程を経時的観察により追跡した。野生型と比べて Mtss1 cK0 樹状突起はより頻繁に退縮を行うことが明らかになった。

これまでに申請者はプルキンエ細胞の樹状突起が、同種の突起同士の接触により退縮が誘導されることを見出していた。また樹状突起同士の接触はフィロポディアによって感知される可能性が考えられた。そこで Mtss1 におけるフィロポディア動態制御に着目した。

Mtss1 分子の欠損した樹状突起ではフィロポディアが通常より長くなっていることを見出した。この傾向は、分散培養・生体内どちらの樹状突起においても確かめることができた。フィロポディアが長くなることは隣接する樹状突起と接触する可能性が増加することを意味する。申請者が先行研究で行ったシミュレーションを用いた樹状突起形成モデルを用いて検証を行った (Fujishima et al 2012, Development)。フィロポディアの長さは、樹状突起の退縮数と相関し、細胞体近位の突起密度に影響を与えることが確認できた。これらから、Mtss1 ではフィロポディア長が増大し、それが突起同士の接触頻度を高めることで、樹状突起の退縮を引き起こし、突起の密度を変化すると結論付けた。

(1-2) Mtss1 と formin DAAM1 の相互作用

次に Mtss1 がどのようにしてフィロポディア形成を制御するかに着目した。これまでに Mtss1 が formin である DAAM1 と結合することがアフリカツメガエルを用いた実験で示されていた。申請者の用いるマウス小脳でも相互作用があるかどうかを調べるため、免疫沈降・免疫染色を行った。免疫沈降では、Mtss1 は DAAM1 と共沈降すること示された。また免疫染色では Mtss1 が樹状突起フィロポディア内で DAAM1 と共局在(または近傍に存在)する傾向があることを確認した。さらに、プルキンエ細胞に活性化型 DAAM1 を発現させるとフィロポディアが一過的に伸長することが明らかになった。これらのことは Mtss1 が DAAM1 と結合し、負に阻害する可能性を示唆した。

(1-3) Mtss1 による DAAM1 機能制御

次に Mtss1 による DAAM1 制御を詳しく解析した。DAAM1 は formin であり、アクチン重合を促進する因子の一つである。DAAM1 によるアクチン重合を可視化するために 1 分子イメージングを行った。DAAM1 はアクチン重合の間常に成長端にとどまりフィラメントへ単量体アクチンを補給するように働くと考えられている。DAAM1 を低濃度で蛍光標識することで、アクチン重合に伴う DAAM1 の動態を解析することができる。Mtss1 存在下では非存在下に比べて重合速度が減少していることが明らかになった。この結果は生成した DAAM1 と Mtss1 を用いた無細胞観察系においても再現された。これらから Mtss1 は DAAM1 のアクチン重合活性を負に制御すると結論付けた。

(2) フィロポディアによる樹状突起方向性制御の解析

プルキンエ細胞樹状突起のフィロポディアが軸索束を認識することで進行方向の制御を行っている可能性を検討した。

まず樹状突起がどのようなダイナミクスをもって直交性形成するのか解析した。軸索束を二次元基質上で平行に並べるために平行に配列した人工ナノ繊維を用いた。これまでに軸索はナノ繊維に沿って成長すること、プルキンエ細胞はその軸索を足場として直交方向に樹状突起を形成することをこれまでに明らかにしていた。ナノ繊維培養系上で生育したプルキンエ細胞の樹状突起の形態形成過程を、タイムラプス顕微鏡を用いて追跡し、そのダイナミクスを定量解析した。プルキンエ細胞の樹状突起の成長速度は非常に

遅いため(約 0.8um/hr)、3 時間ごとに、3 日間観察を行った。仮説として、直交性は (1) 樹状突起が軸索に対して直交方向に選択的に伸長することによって形成される、または (2) 直交方向以外に伸長した樹状突起が選択的に退縮し取り除かれることによって形成される、という二種類の可能性が考えられた。タイムラプス観察により得られた画像を解析したところ、樹状突起が軸索に対して直交方向になるように伸長する様子が観察された。また退縮する突起の角度を計測したところ、その角度には有意な偏りが見られなかったことから、仮説(1)が正しいことが明らかになった。

プルキンエ細胞の樹状突起フィロポディアが結合パートナーである平行線維を認識して伸展方向を決定するメカニズムを解析するために、フィロポディアの動態をタイムラプス観察した。Spectrin beta III 欠損細胞では filopodia の伸長と退縮のサイクルが早くなっていること、また時折非常に長いフィロポディアを形成するという傾向があった。

このことより Spectrin betaIII 欠損細胞ではフィロポディアが平行線維を安定に認識できない可能性が考えられた。プルキンエ細胞と平行線維との認識・接着に関与する分子の動態が変化している可能性が考えられた。その分子を探索する方法として以下の2つの方法を用いた。

(1) ナノファイバー培養系において樹状突起の直交性がみられない顆粒細胞に当該分子を異所的に発現し平行線維と直交を示すようになるか確認する。

(2) プルキンエ細胞より当該分子の発現を阻害して、直交性の乱れを検出する。

認識分子としては、プルキンエ細胞と平行線維のシナプス形成に関与する GRID2 やその類縁分子 neuroligin1, Bai3 等に注目した。しかし GRID2 が(1)の方法論で陽性だったものの(2)では陰性であった。ほかの分子ではともに明確な陽性反応を示さなかった。GRID2 がほかの分子と協調して直交性に関与する可能性があるものの、認識分子の同定およびその機能に関しては、引き続きの解析・探索が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1, Kawabata Galbraith K, **Fujishima K**, Mizuno H, Lee SJ, Uemura T, Sakimura K, Mishina M, Watanabe N, Kengaku M. (2018) MTSS1 Regulation of Actin-Nucleating Formin DAAM1 in Dendritic Filopodia Determines Final Dendritic Configuration of Purkinje Cells. Cell Rep. 2018 Jul 3;24(1):95-106.e9.

2, **Fujishima K**, Kawabata Galbraith K, Kengaku M. (2018). Dendritic Self-Avoidance and Morphological Development of Cerebellar Purkinje Cells. Cerebellum. 17(6):701-708.

〔学会発表〕(計 5 件)

1, **藤島和人** 小脳回路における軸索束依存的な樹状突起形成メカニズム 2018 年度生理学研究所研究会 「神経発達・再生研究会」 2018 10/17-18 名古屋市立大学病院・大ホール

2, Kazuto Fujishima, Cytoskeletal control of the tree shape of neuronal dendrites in the brain

24th iCeMS International Symposium /Emerging Science for Unlocking Cell's Secrets, 3-4 September 2018, Kyoto University iCeMS

3, Kazuto Fujishima and Mineko Kengaku 小脳プルキンエ細胞の樹状突起の方向性を決定するメカニズムの解析 Cellular and molecular mechanisms regulating dendrite directionality of cerebellar Purkinje cell 第41回日本神経科学学会 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society 2018 7.26-29 神戸

4, Kazuto Fujishima, Midori Yamada, Yukiko Nishida, Junko Kurisu and Mineko Kengaku (2018) Beta III Spectrin is required for the dendrite growth guided by axonal bundles in cerebellar circuits. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience
22-25 May 2018 Nara Kasugano International Forum, Nara, Japan <poster>, Poster award

5, Kazuto Fujishima, Midori Yamada, Yukiko Nishida, Junko Kurisu and Mineko Kengaku 小脳回路における軸索束に依存した樹状突起形成メカニズム
Mechanisms of dendrite growth guided by axonal bundles in cerebellar circuits.
第40回日本神経科学大会、2017.7.20-23、幕張メッセ <口頭>

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。