

令和元年6月20日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0171

研究課題名(和文) 指向的相互作用による自律的皮質回路形成メカニズムの解析

研究課題名(英文) Cerebellar circuit formation mediated by the geometrical interaction between axon and dendrite

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ニューロンのもつ自律的な神経回路形成メカニズムに着目し、小脳プルキンエ細胞樹状突起が顆粒細胞軸索に対して直交方向に進展することで秩序だった回路を形成する仕組みの解明を目指した。本研究を行った結果、スペクトリンbeta III分子が樹状突起で整然とした配列を形成し、それが微小管の動きの制限に重要な役割を果たすことが明らかになった。この分子を欠損するとフィロポディア運動が活発化し、樹状突起方向性制御が乱れることが明らかになり、自律的な神経回路メカニズムの一端が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により明らかになった知見は、軸索と樹状突起が協調して小脳神経回路形成を行う仕組みの一端を明らかにするものである。軸索と樹状突起が幾何学的に相互作用し、適切な回路を形成するというものでその仕組みはほとんど明らかにされていなかった。本研究で得られた結果は、哺乳類神経回路形成メカニズムを理解するうえで新たな考え方を提供する。また本研究で着目したSpectrin beta IIIは神経疾患の原因因子として知られており、今後の展開は疾患の発症メカニズムの理解に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the mechanisms regulating the autonomous neuronal circuit formation, especially focusing on the orthogonal interaction between Purkinje cell dendrites and granule cell axons in the cerebellar circuits. We showed that Spectrin beta III is essential for the perpendicular dendrite formation with respect to axonal fibers. The molecule forms regular periodic structures in the Purkinje cell dendrites and their filopodial base by using super-resolution microscopy STED. We also found that Spectrin beta III regulated the microtubule dynamics in the dendritic area. In the absence of Spectrin beta III, microtubule polymerized into the filopodial region more frequently than control, which resulted in the abnormal extension of filopodia in the wrong direction. Our results demonstrated that Spectrin beta III plays a pivotal role in the regulation of dendritic growth orientation during cerebellar circuit formation.

研究分野：神経発生

キーワード：小脳 プルキンエ細胞 樹状突起 スペクトリン 神経回路形成

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

1. 研究開始当初の背景

神経回路の空間的秩序は、予め厳密に定められるのではなく、個々の細胞が環境を正しく認識し、固有のルールに従って成長することで自己組織的に形成されるものと考えられている。古くより神経組織は縦糸と横糸からなる織物に喩えられており、神経突起からなる線維が直交するパターンが複数報告されている。このような軸索・樹状突起の直交した連結は、単に整然とした構造の確立に関与するだけでなく、効率的なシナプス形成など機能的な回路形成に重要な役割を持つことが示唆されている。小脳回路はその典型例であり、プルキンエ細胞の樹状突起は約十数万本の平行線維(顆粒細胞軸索)と直交して接続し、シナプス結合する。軸索-樹状突起の直交パターンは、小脳機能の区画化への関与が予想され、正常な小脳機能に重要だと考えられる。しかしこの高度に秩序化した回路構造がどのような仕組みで構築されるのか、明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では非常に秩序立った構造を持つ小脳回路が形成される仕組みを明らかにすることを目的とした。プルキンエ細胞の樹状突起と小脳顆粒細胞の軸索である平行線維の直交性が回路レベルでの秩序形成に重要であると考え、その仕組みを分子レベルで明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

研究代表者はこれまでに人工ナノファイバーを基盤とした軸索-樹状突起の二次元的な直交性を再現するモデル系を開発し、骨格関連分子 Spectrin betaIII や myosin IIB を含む直交性制御因子を複数同定していた。本研究では樹状突起内細胞骨格の規則性などの物理的特性に着目し、それが軸索束との相互作用の際に法則として顕在化し、自律的に整然とした直交回路を構築するに至ると仮定し、その仕組みを解明する。

4. 研究成果

直交性を制御する樹状突起形成ダイナミクス

これまでに人工ナノファイバーを用いた研究で、プルキンエ細胞の樹状突起が平行に配列した軸索に対して直交に進展することが明らかになっていた。この実験系では、顆粒細胞軸索がナノファイバーに沿って成長する性質を持つことを利用しており、ナノ繊維の向きが顆粒細胞軸索の向きと一致する。平行に配列したナノ繊維上では顆粒細胞の軸索は平行に並ぶことになる。プルキンエ細胞の樹状突起はこの平行に配列した軸索に対して直交する方向に進展する。

樹状突起成長端に存在するフィロポディアのダイナミクス観察したところ Spectrin betaIII 欠損細胞では樹状突起成長端付近に存在するフィロポディアの運動性が増加していることを見出した。この細胞ではフィロポディア形成異常が方向性のある樹状突起成長を妨げる可能性が考えられた。

さらに In utero electroporation を用いて Spectrin beta III のノックダウンベクターをプルキンエ細胞に導入し、生体内における Spectrin beta III の機能欠損が樹状突起構造にどのような影響を与えるか解析した。冠状切片を用いてプルキンエ細胞樹状突起の扇形を横から見ると、樹状突起が側部に顆粒細胞軸索と平行になるようにフィロポディア(または

シナプス構造であるスパイン)を形成するが、Spectrin betaIII 欠損細胞はこのフィロポディアの密度が減少していることが分かった。しかし、中にはフィロポディアが異常に長く発達したものが存在する。そのフィロポディアの異常な伸長により、樹状突起が本来伸長する平面から外れて形成される可能性が考えられた。

Spectrin beta III 分子の樹状突起内構造

次に Spectrin beta III がどのようにしてフィロポディア形成に関与しているか明らかにする目的で、この分子の局在を精査した。Spectrin beta III はプルキンエ細胞樹状突起に非常に強い局在を示す。共焦点顕微鏡による観察の結果、Spectrin beta III 分子は樹状突起の細胞表面特にフィロポディア起始部に強い局在を示す傾向にあった。

これまでに Spectrin ファミリー分子が神経突起内でアクチンと協調して反復構造を形成することが示されていた。スペクトリン-アクチンによる樹状突起の膜を裏打ちする強固な構造が、フィロポディアを安定化することが方向性のある樹状突起形成に必要である可能性が考えられた。

超解像度顕微鏡(STED)を用いてプルキンエ細胞における、Spectrin beta III の微細構造を観察した。この結果、プルキンエ細胞の樹状突起やフィロポディア起始部において Spectrin betaIII がおよそ 190nm の反復性の梯子構造またはメッシュワーク構造を形成することが確認できた。アクチン骨格の可視化も試みたが、アクチン骨格はフィロポディア先端に非常に強く、樹状突起シャフト部またはフィロポディア起始部でのシグナルは逆に弱く観察するのが難しかった。

これらの結果から、Spectrin beta III はおそらく比較的少量のアクチン骨格と協調して樹状突起シャフト部またはフィロポディア起始部の細胞膜でメッシュワーク上の構造物を形成していると考えられた。

Spectrin beta III 分子による微小管ダイナミクスの制御

細胞膜におけるアクチン骨格は一般に微小管の動態を制限することが知られる。スペクトリン分子も樹状突起細胞膜近位でメッシュワーク上の骨格構造を形成することで微小管動態を制限する可能性が考えられた。Spectrin beta III 欠損により微小管がよりたやすくフィロポディアに侵入するまたは細胞膜を押すことで、フィロポディアの動きが活発化しているという可能性を検討するために、微小管プラス端結合タンパク質である EB3 を用いて、微小管の重合を可視化・解析した。

コントロール細胞の樹状突起フィロポディアを観察したところ、EB3 は特に樹状突起成長末端においてフィロポディア内に侵入することが確認された。より細胞体に近い領域では EB3 のフィロポディア・スパイン内への侵入の頻度は比較的に低かった。

Spectrin beta III をノックダウンした細胞においては、樹状突起の成長末端・細胞体近位どちらにおいてもコントロールと比較してより高頻度で EB3 がフィロポディア内に侵入する傾向にあった。これらの結果から、Spectrin beta III は樹状突起において微小管によるフィロポディア侵入を制限する性質があることが示唆された。

Spectrin beta III 分子と myosin IIB の機能的な相互作用

神経細胞軸索において、微小管のフィロポディアへの侵入はアクトミオシンによって制御

されていることが知られている。小脳プルキンエ細胞では myosin IIB が優位に発現している。これまでの予備実験から myosin IIB 阻害が、プルキンエ細胞の顆粒細胞軸索に対する直交性や組織内での平面分岐構造を形成するのに必要な分子であることを示していた。Spectrin beta 分子がアクチンと協調して微小管のダイナミクスを制限することで直交性を制御機能している可能性が考えられた。

Spectrin beta III 共と myosin IIB の相互作用を調べるために共免疫沈降によるアッセイを行ったところ、myosin IIB 重鎖の myh10 が Spectrin beta III と共沈降することを確認した。また、免疫染色によると、myh10 は Spectrin beta III と完全に一致したパターンは示さないものの、一部両者が近位に局在することを確認した。両者の機能が一部オーバーラップする可能性が示唆された。現在、myh10 の阻害が微小管ダイナミクスに影響を及ぼすかどうか確認するところである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

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

〔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、The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
2017.7.20-23、幕張メッセ <口頭発表>

〔図書〕(計 件)

〔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：
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：
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。