

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14944

研究課題名(和文) 自発神経活動の脱同期による樹状突起の接続特異性決定機構

研究課題名(英文) Mechanism of spontaneous activity-dependent discrete circuit formation

研究代表者

藤本 聡志 (Fujimoto, Satoshi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：50586592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：嗅球において、僧帽細胞は1本の主樹状突起を介して嗅神経細胞からの嗅覚受容体特異的な情報を受け取る。この特異性が匂い識別の基盤となっているが、発達期においてどのように特異的な回路が形成されるのか明らかではなかった。本研究では、嗅神経細胞からの入力ではなく、僧帽・房飾細胞間のネットワークにより生成されるグルタミン酸作動性の自発神経活動が、樹状突起の刈り込み機構を介した回路形成に必要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発達期における感覚入力に依存しない内在性の自発神経活動は嗅球だけではなく多くの脳領域で観察されているが、未だにその意義や役割については不明な点が多い。本研究により神経回路の接続特異性決定の一端を担う役割が明らかになったとともに、脳の自己組織化における自発神経活動の重要性を示唆する結果が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：In the mouse olfactory bulb, each mitral cell extends a single primary dendrite toward the single glomerulus and receives olfactory receptor-specific inputs from olfactory sensory neurons (OSNs). This specific circuitry is the basis for odor discrimination. However, it remained unclear that how this discrete connection is established during development. In this study, we revealed that spontaneous network activity that is generated by glutamatergic synaptic transmission among mitral/tufted cells but not from OSNs is essential for dendrite pruning mediated circuit formation.

研究分野：神経科学

キーワード：自発神経活動 神経回路形成 樹状突起 嗅球

1. 研究開始当初の背景

機能的な脳を構築するためには、個々の神経細胞が適切な接続性を獲得することが必要である。そのためには発達期に軸索や樹状突起を伸ばす過程に加え、過剰に伸びた神経突起を刈り込むことで神経細胞同士が特異的な接続を作り、回路を精緻化する過程が重要である。これらの過程は軸索ガイダンス遺伝子などの内在性の遺伝的プログラムにより制御されていることが古くから知られている一方、近年、特に生後発達期において神経活動依存的に制御されていることが運動ニューロン、骨格筋、登上線維、プルキンエ細胞、視神経、外側膝状体などのモデルから明らかとなっている。しかし、神経活動のいかなる要素が刈り込みを制御するのかはよくわかっていない。

マウスの嗅覚 1 次投射神経細胞である嗅神経細胞には、約 1000 種類存在する嗅覚受容体のうち 1 種類が発現しており、におい分子に対して選択性の高い軸索投射パターンを示すことが知られている。また、そこから入力を受ける僧帽細胞の主樹状突起は生後 1 週間以内に 1 本を残して刈り込まれ、1 つの糸球体のみ接続することが知られているが、どのようにして 1 本のみが選択されるのかは未解明であった。これまでの研究で、研究代表者は僧帽細胞の神経活動を抑えると樹状突起の刈り込みが起こらなくなることを見出した。また、視覚系や聴覚系の場合と異なり、僧帽細胞は感覚器官に由来しない固有の自発的ネットワーク活動を有していることも明らかにした。さらに、生後 1-2 日目には自発的な神経ネットワーク活動が複数の糸球体間で同期的なパターンを示すが、生後 3 日目以降、糸球体間の活動が非同期的になることを見出した。また、薬理学的実験からグルタミン酸を介した興奮性伝達が必要であることがわかった。しかし依然として、(1)発達期の僧帽細胞のどこにどのようなタイミングでシナプスが形成されるのか、(2)感覚器官(嗅神経細胞)からの入力は樹状突起刈り込みに必要なのか、(3)だとすればグルタミン酸はどこから放出され、自発神経活動はどこで生成されるのか、(4)自発神経活動の結果どのような細胞内シグナル伝達機構が駆動され、結果として刈り込みが起こるのかについては不明であった。

2. 研究の目的

- (1) 発達期の僧帽細胞のシナプス形成過程について
- (2) 樹状突起の刈り込みにおける嗅神経細胞からの入力の必要性について
- (3) 自発神経活動の生成されるメカニズムについて
- (4) 自発神経活動によって駆動される細胞内シグナルについて

3. 研究の方法

- (1) 僧帽細胞に GFP を融合させた PSD95 Δ 1.2PDZ コンストラクトを発現させて、発達期における後シナプス構造の形成を観察した。
- (2) 人工哺乳下での嗅神経細胞特異的テタヌス毒素発現マウスにおける僧帽細胞の主樹状突起刈り込み解析を行った。
- (3) 僧帽・房節細胞特異的にテタヌス毒素を発現させたマウスにおける僧帽細胞の主樹状突起刈り込みの解析を行った。
- (4) 僧帽細胞に CRISPR/Cas9 ベクターや候補遺伝子の導入を行い、刈り込み解析を行った。

4. 研究成果

(1) 僧帽細胞の発達は 2 ステップで起こる
主樹状突起の刈り込みが起こる前の生後 3 日目の時点で、僧帽細胞の主樹状突起のタフト構造には PSD95 の集積を伴う後シナプス構造が見られる。また、鼻孔閉塞により刺激依存的な嗅神経細胞の神経活動を遮断した条件下において、僧帽細胞の後シナプス構造は形成される。さらに、Kir2.1 を僧帽細胞に過剰発現させて神経活動を抑制した条件下でも僧帽細胞の後シナプス構造は形成される。これらのことから僧帽細胞はまず神経活動非依存的にシナプスを形成した後に、神経活動依存的に樹状突起刈り込みを行うことがわかった。この結果は僧帽細胞の発達が神経活動に依存的でない過程と神経活動依存的な過程の 2 ステップで起こることを示唆している。

(2) 嗅神経細胞からの入力は樹状突起の刈り込みに必要ではない。
これまでに、嗅神経細胞特異的にテタヌス毒素を発現させたマウスにおける僧帽細胞の主樹状突起刈り込みの解析を行っていた。このマウスは嗅神経細胞からの神経伝達が完全に遮断されており匂いを嗅ぐことができない。その結果、母乳を適切に摂取することができず成長不全を起こすという問題があった。このため、このマウスで観察される生後 6 日後には刈り込み異常が見られるものの、生後 14 日目までには野生型のマウスと同程度に刈り込みが起こるという結果が、嗅神経由来の入力の遮断によるものか、成長不全によるものか結論が出ていなかった。そこで、研究代表者らはこの変異マウスと同腹のコントロールマウスに対して人工哺乳を行い、コントロール群との成長差が出ない条件下で刈り込み解析を行ったところ、生後 6 日目の時点で成長不全を起こした変異マウスで見られた刈り込み異常が回復したことから、嗅神経細胞からの入力は樹状突起の刈り込みに必要ではないと結論付けることができた。

(3) 僧帽・房節細胞間でのグルタミン酸を介した興奮性伝達が樹状突起の刈り込みに必要である。

嗅神経細胞からの入力には樹状突起の刈り込みが必要ないが、ではどこからこの自発神経活動が生成されているのかは不明であった。これまでに薬理学的な実験から、自発神経活動はイオンチャンネル型グルタミン酸受容体が必要であることや、NMDA 受容体の必須サブユニットである NR1 を欠損した僧帽細胞の刈り込みが阻害されることが観察されていた。グルタミン酸の供給源としては嗅神経細胞以外に僧帽・房飾細胞が考えられるため、僧帽・房飾細胞特異的にテタヌス毒素を発現させたマウスにおける僧帽細胞の主樹状突起刈り込みの解析を行った。このマウスにおいて刈り込みの抑制が見られたことから、おそらくシナプスあるいは拡散性伝達を介したグルタミン酸の情報伝達が樹状突起刈り込みに必要であることが示唆された。

(4) 樹状突起の刈り込みを制御する細胞内分子メカニズム

樹状突起の接続特異性を決める細胞内シグナル分子については僧帽細胞に CRISPR/Cas9 ベクターや候補遺伝子の導入を行うことにより、樹状突起刈り込みに関与する分子をいくつか特定することができた。特にアクチン骨格系の制御が刈り込みに重要であることが示唆されたため、引き続きこれらの細胞内シグナルカスケードおよび、神経活動との関連性を明らかにしていく。また、依然として複数の樹状突起から「勝ち」「負け」を決定し、1本の主樹状突起を形成する機構は不明であり今後の解決されるべき課題である

5. 主な発表論文等

[学会発表](計10件)

(1) Takeshi Imai, Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito
Spontaneous activity and formation of discrete connectivity in the olfactory bulb
50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
May 13, 2017, Tokyo [Tower Hall Funabori]

(2) Takeshi Imai, Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito
Formation of discrete olfactory circuits by spontaneous activity
第40回日本神経科学大会
2017.07.22, 千葉市(幕張メッセ)

(3) Yusuke Terada, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai, Keiji Miura
Developmental circuit reorganization reduces synchronous activities in OB
第40回日本神経科学大会
2017.07.22, 千葉市(幕張メッセ)

(4) Marcus Leiwe, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai
Spontaneous Network Activity in the Neonatal Mouse Olfactory Bulb Regulates Dendrite Pruning of Mitral Cells
第16回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」(ISMNTOP/YRUF/AISCRIB2017)
2017.11.04, 福岡市東区(九州大学馬出キャンパス コラボステーション II)

(5) Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai
Developmental change of spontaneous network activity regulates dendrite pruning of mitral cells to establish discrete connectivity
第16回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」(ISMNTOP/YRUF/AISCRIB2017)
2017.11.04, 福岡市東区(九州大学馬出キャンパス コラボステーション II)

(6) 藤本 聡志
発達期の嗅球における自発神経活動依存的な神経回路形成
第69回西日本生理学会
2018.10.05-06, 北九州市小倉北区(北九州国際会議場)

(7) Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai
Spontaneous Activity-Dependent Discrete Circuit Formation in the Developing Olfactory Bulb
第17回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」(ISMNTOP/YRUF/AISCRIB2018)
2018.11.30-12.02, 福岡市東区(九州大学馬出キャンパス コラボレーションセンターI 2階視聴覚ホール・コラボステーション 1階コミュニティラウンジ)

(8) Marcus Leiwe, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai
Spontaneous network activity in the awake neonatal mouse olfactory bulb
第17回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」(ISMNTOP/YRUF/AISCRIB2018)
2018.11.30-12.02, 福岡市東区(九州大学馬出キャンパス コラボレーションセンターI 2階視

聴覚ホール・コラボステーション 1階コミュニティラウンジ)

(9) Marcus Leiwe, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai
Spontaneous and Evoked Activity in the Developmental Olfactory Bulb
Japan-UK Neuroscience Symposium 2019
2019.02.09-11, 千葉県木更津市 (かずさアカデミアホール)

(10) Satoshi Fujimoto
Spontaneous Activity-Dependent Discrete Circuit Formation in the Developing Olfactory Bulb
KOB・OBT 合同国際シンポジウム
2019.03.2-3, 福岡市東区 (九州大学歯学部)

〔図書〕(計 1件)

藤本 聡志、柯 孟岑、坂口 理智、今井 猛
透明化試薬 SeeDB2 を用いた深部高解像蛍光イメージング
羊土社 実験医学 37(6) 963-969 2019 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：ルーウィー マーカス
ローマ字氏名：(LEIWE, Marcus)

研究協力者氏名：藍原 周平
ローマ字氏名：(AIHARA, Shuhei)

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。