

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06886

研究課題名(和文) 自発神経活動依存的な樹状突起の「勝ち」「負け」決定機構

研究課題名(英文) Mechanisms of spontaneous activity-dependent synaptic competition in dendrite remodeling

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)：発達期において神経活動は樹状突起のリモデリングに重要な役割を果たしている。しかし、神経活動がどのようなメカニズムで単一の入力を受けるシナプスを安定化し、残りのシナプスを刈り込むかについてよくわかっていない。シナプス間での競合により「勝者」と「敗者」を決定する機構が想定されるが、実態は不明であった。本研究では、僧帽細胞をモデルとして、NMDA受容体-RhoAシグナルに依存したシナプスの局所的な保護機構と側方抑制がシナプス競合の実体であり、神経細胞の受容野形成の普遍的な原理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

正しい回路が「作られる」仕組みは多く研究されてきたが、不要な回路の「刈り込み」の原理は長年の謎であった。発達期のシナプス再編成は脳のいたるところで起こっており、本研究で明らかとなったRhoAを介したシナプス競合と神経突起の刈り込み機構は、神経回路再編成における普遍的な原理であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：During development, neuronal activity plays an essential role in dendritic remodeling. However, the mechanism stabilizing synapses that receive a strong input and prunes the remaining synapses is poorly understood. A mechanism that determines "winners" and "losers" through synaptic competition has been postulated, but the mechanism is unknown. In this study, using mitral cells as a model, we show that an NMDA receptor-RhoA signaling-dependent local protection and lateral inhibition control synaptic competition and a general principle of neuronal receptive field formation.

研究分野：神経科学

キーワード：神経回路形成 樹状突起 自発神経活動 嗅球 シナプス刈り込み Rho GTPases

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、回路発達初期の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。我々は嗅覚神経回路をモデルとして特に刈り込み過程について研究を行っている。

マウスの嗅神経細胞は約 **1000** 種類存在する嗅覚受容体のうち **1** 種類を発現し、におい分子に対し選択性の高い軸索投射パターンを示す。嗅上皮に存在する嗅神経細胞は嗅球へと軸索を伸ばし、軸索終末は糸球体という構造体を形成する。糸球体では主樹状突起を 1 本だけ持つ僧帽細胞に感覚情報を伝達する。この単一糸球体への選択的な接続は、発達期のリモデリングによって形成されることが知られている。発達過程において、僧帽細胞はまず複数本の樹状突起を複数の糸球体に向けて伸ばした後、枝を減らしつつ複数の糸球体とシナプスを形成する。その後 **1** 本を残して刈り込み、最終的に **1** つの糸球体に接続する。

発達期において、神経活動は樹状突起のリモデリングに重要な役割を果たしている。僧帽細胞の単一主樹状突起形成における神経活動の役割を検討するために、**Kir2.1** を僧帽細胞に発現させて神経活動を抑制すると、樹状突起の刈り込みに異常が起こることを以前見出していた。また、カルシウムイメージングを行い、僧帽細胞が感覚器からの入力に依らない自発的神経ネットワーク活動を有することを見出した。薬理学的実験と破傷風毒素を僧帽・房飾細胞に発現する遺伝子改変マウスを用いた実験から、僧帽・房飾細胞間でのグルタミン酸の伝達が自発神経活動に必要であることも明らかにした。僧帽細胞において **NMDA** 受容体をノックアウトすると刈り込みが起こらなくなることも明らかにしていたが、依然として、神経活動がどのようなメカニズムで複数本の主樹状突起を刈り込み、単一の主樹状突起を形成するかについては不明であった。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では以下の **3** 点を明らかにすることを目的として研究を行った。

- (1) 神経活動の下流で樹状突起の刈り込みを行う分子の探索
- (2) 単一の主樹状突起のみを安定化し残りを刈り込むメカニズム
- (3) 僧帽細胞において見出されたメカニズムの普遍性を検証

3. 研究の方法

(1) 神経活動の下流で樹状突起の刈り込みを行う分子の探索

CRISPR-Cas9 と子宮内エレクトロポレーション法を組み合わせることにより僧帽細胞特異的に遺伝子をノックアウトする手法を確立した。さらに得られた脳組織に対して **SeeDB2G** を用いて組織透明化処理を行うことにより、ハイスループットに僧帽細胞の形態を可視化し定量することが可能となった。あらかじめ候補として挙げていた遺伝子(約 **40** 種類)をノックアウトし、形態スクリーニングを行うことで、樹状突起の刈り込みに関わる分子の探索を行った。

(2) 単一の主樹状突起のみを安定化し残りを刈り込むメカニズム

(1)において探索を行った結果、**Rho** ファミリー低分子量 **G** タンパク質の **RhoA** 刈り込みに必要な因子として挙げてきたため、これらの遺伝子の強制発現実験を行った。また、**FRET** イメージングを行うことで、時空間的な **RhoA** の活性を明らかにすることを試みた。

(3) 僧帽細胞において見出されたメカニズムの普遍性を検証

マウスにおいてバレル皮質の第 **4** 層ニューロンは発達期の **NMDA** 受容体依存的なリモデリングを介して、ヒゲ特異的な樹状突起の配向性を確立することが知られている。この第 **4** 層ニューロンに対して、子宮内エレクトロポレーション法による **CRISPR-Cas9** ノックアウトを行い、僧帽細胞の見出されたメカニズムが、発達期の活動依存的なリモデリングに普遍的なメカニズムであるかどうかを検証した。

4. 研究成果

(1) 神経活動の下流で樹状突起の刈り込みを行う分子の探索

Rho ファミリー **G** タンパク質の活性が樹状突起の形態形成を制御することは古くから知られている。形態スクリーニングの結果、神経突起の退縮に関与することが知られている **Rho** サブファミリー遺伝子群(**RhoA**, **RhoB**, **RhoC**)を全てノックアウトすると僧帽細胞の主樹状突起刈り

込みが阻害された。また、**NMDA** 受容体の必須サブユニットである **NR1** をロックアウトすると主樹状突起の刈り込みが起こらなくなるが、そこに **RhoA** を過剰発現させると刈り込みの異常がレスキューされることが分かった。この結果から神経活動の下流では **NMDA** 受容体 **RhoA** を介したシグナルが樹状突起の刈り込みに必要であることが明らかとなった。

(2) 単一の主樹状突起のみを安定化し残りを刈り込むメカニズム

NMDA 受容体 **RhoA** を介したシグナルが刈り込みに必要ではあるが、それだけでは単一の主樹状突起が安定化しそれ以外を刈り込むことが説明できない。興奮性シナプスはタフトを持つ強い主樹状突起に多く局在するため、強い入力を受ける主樹状突起ほど多くの **NMDA** 受容体が活性化されるはずである。しかし、刈り込みはそれ以外の樹状突起で選択的に生じる。すなわち、**NMDA** 受容体による **RhoA** の活性化は将来的に安定化される主樹状突起「以外」で選択的に起こる必要がある。この刈り込みの選択性の基盤を理解するため、**RhoA** の **FRET** センサーを僧帽細胞に導入し、嗅球の急性スライスを用いて **RhoA** 活性の時空間パターンを解析した。

テトロドトキシン存在下で活動電位を抑制しつつ **NMDA** の灌流刺激を行うと、僧帽細胞の細胞体を含む多くの部分で **RhoA** の活性上昇が見られた。一方、興奮性シナプスが豊富な主樹状突起のタフト内では局所的に **RhoA** 活性が低下することが判明した。高濃度カリウム溶液による脱分極刺激では主樹状突起のタフトを含む僧帽細胞全体で **RhoA** が活性化した。これらの結果は、**NMDA** 受容体への入力は局所的に **RhoA** の活性を抑制し、その樹状突起を刈り込みから保護する一方で、その後の脱分極シグナルはニューロン全体で **RhoA** を活性化し、保護されていない樹状突起の刈り込みを促進させる可能性を示唆する。

さらにこの可能性を直接的に証明するために、複数ある主樹状突起の **1** つを **NMDA** によって活性化した際にそれ以外の主樹状突起でのみ **RhoA** の活性化が生じるかどうかを検証した。タフトを持つ主樹状突起とタフトを持たない主樹状突起を持つ僧帽細胞のみに着目して解析を行うと、**RhoA** の活性はタフトのある主樹状突起で低下する一方、タフトのない主樹状突起では上昇することが観察された。対照的に、タフトを持つ主樹状突起を **2** 本有する僧帽細胞において同様の実験を行うと、どちらの主樹状突起においても **RhoA** の活性低下が見られた。つまり、**RhoA** 活性が上昇するか低下するかは **NMDA** 受容体による局所シグナルと脱分極シグナルのバランスによって決まると言える。

(3) 僧帽細胞において見出されたメカニズムの普遍性を検証

バレル皮質の第 **4** 層ニューロンにおいて、**NMDA** 受容体を欠損させるとバレル特異的な樹状突起の配向性に異常が見られることが知られている。同様に、第 **4** 層ニューロンにおいて **Rho** サブファミリー遺伝子群 (**RhoA**, **RhoB**, **RhoC**) をすべてロックアウトすると、樹状突起の配向性が確立できないことが判明した。また **RhoA** を過剰発現すると、**NMDA** 受容体欠損ニューロンにおける樹状突起の刈り込み不全がレスキューされるものの、配向性の回復は見られなかった。**NMDA** 受容体 **RhoA** シグナルが働かないと、同期した強い入力を受けるバレルからの入力に基づいてそれ以外の樹状突起に側方抑制シグナルを生じることができない。よって、選択的な刈り込みを行うことができず、特定のバレルに対する配向性を獲得することができないと考えられる。

以上の結果から、**NMDA** 受容体 **RhoA** シグナルを介した側方抑制のメカニズムが樹状突起の「勝ち」「負け」を決定する機構であることが明らかになった。また、このメカニズムは嗅覚経路形成にとどまらず、バレル皮質の第 **4** 層ニューロンなど他の感覚系の回路形成にも普遍的に作用している可能性を示した。本研究により発達期のシナプス競合の分子実体を初めて明らかにできたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Satoshi Fujimoto, Marcus N Leiwe, Shuhei Aihara, Richi Sakaguchi, Yuko Muroyama, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai	4. 巻 -
2. 論文標題 Activity-dependent local protection and lateral inhibition control synaptic competition in developing mitral cells in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2023.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aihara Shuhei, Fujimoto Satoshi, Sakaguchi Richi, Imai Takeshi	4. 巻 35
2. 論文標題 BMPR-2 gates activity-dependent stabilization of primary dendrites during mitral cell remodeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109276 ~ 109276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Leiwe Marcus N., Fujimoto Satoshi, Imai Takeshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Post hoc Correction of Chromatic Aberrations in Large-Scale Volumetric Images in Confocal Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnana.2021.760063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aihara Shuhei, Fujimoto Satoshi, Sakaguchi Richi, Imai Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 BMPR-2 gates activity-dependent stabilization of dendrites during mitral cell remodeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.10.30.358861	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujimoto Satoshi、Leiwe Marcus N.、Aihara Shuhei、Sakaguchi Richi、Muroyama Yuko、Kobayakawa Reiko、Kobayakawa Ko、Saito Tetsuichiro、Imai Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Activity-dependent lateral inhibition signals for synaptic competition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/625616	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 1件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 藤本 聡志
2. 発表標題 シナプス競合による樹状突起刈り込みのメカニズム
3. 学会等名 第5回これからの神経回路研究の会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 2.Satoshi Fujimoto, Marcus Leiwe, Shuhei Aihara, Richi Sakaguchi, Yuko Muroyama, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai.
2. 発表標題 Activity-dependent lateral inhibition signals for synaptic competition
3. 学会等名 EMBO Workshop - Mechanisms of neuronal remodelling, (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satoshi Fujimoto.
2. 発表標題 Activity-dependent lateral inhibition signals for synaptic competition
3. 学会等名 IRCN-iPlasticity International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Shuhei Aihara, Richi Sakaguchi, Yuko Muroyama, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai
2. 発表標題 Activity-dependent competition within a neuron ensures the discrete wiring of mitral cell dendrites
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 CJK第1回国際会議(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Aihara, Satoshi Fujimoto, Richi Sakaguchi, Takeshi Imai
2. 発表標題 BMPR-2 gates activity-dependent stabilization of dendrites during mitral cell remodeling
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 CJK第1回国際会議(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武島光里, 藤本聡志, 稲垣成矩, 今井猛
2. 発表標題 腸内感覚を担う迷走神経のin vivo カルシウムイメージング
3. 学会等名 第72回西日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Shuhei Aihara, Richi Sakaguchi, Yuko Muroyama, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai
2. 発表標題 Activity-dependent competition within a neuron ensures the discrete wiring of mitral cell dendrites
3. 学会等名 CSHL Meeting Molecular Mechanisms of Neuronal Connectivity(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuhei Aihara, Satoshi Fujimoto, Richi Sakaguchi, Takeshi Imai
2. 発表標題 Selective dendrite stabilization is controlled by BMP2 in developing mitral cells
3. 学会等名 CSHL Meeting Molecular Mechanisms of Neuronal Connectivity (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Fujimoto
2. 発表標題 Activity-dependent competition within a neuron ensures the discrete wiring of mitral cell dendrites
3. 学会等名 遺伝研研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本聡志
2. 発表標題 生後発達期の嗅球における自発神経活動依存的な回路形成
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Shuhei Aihara, *Takeshi Imai
2. 発表標題 Spontaneous activity and olfactory circuit development
3. 学会等名 中国神経科学学会第13回全国技術会議 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 解析方法、解析装置およびプログラム	発明者 今井猛、マーカス ルーウィ、藤本聡志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-122029	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------