

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830011

研究課題名(和文) 樹状突起の三次元的な空間分布を決定するメカニズムの解析

研究課題名(英文) Mechanisms of regulating three dimensional distribution patterns of dendrites

研究代表者

藤島 和人 (Fujishima, Kazuto)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・助教

研究者番号：20525852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、小脳プルキンエ細胞をモデルとし、樹状突起が三次元的な空間パターンを形成する仕組みを明らかにすることを目的とした。研究成果としては以下のものが挙げられる。

1, 同種樹状突起同士の間隔防止の分子メカニズムの一端を明らかにした。2, ミトコンドリアおよびクレアチンキナーゼによる局所的なエネルギー産生が樹状突起の安定した成長に必須であることを示した。3, プルキンエ細胞の樹状突起が平行線維に対して直交して成長することを示した。生体内で平面な樹状突起を獲得するのに必要な仕組みであると考えられる。またこの成長方向決定メカニズムに関与する分子を一部同定した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the mechanisms regulating three dimensional patterns of dendrites by using cerebellar Purkinje cells as a model. Main achievements of the study are as follows: 1) We clarified the regulatory mechanisms of contact-dependent repulsion of Purkinje cells, which is important for the non-overlapping pattern of dendrites. 2) We proved that local ATP production by dendritic mitochondria and creatine shuttling are required for the stable dendrite growth. 3) By using artificial nanofibers as scaffolds, we reconstructed parallel-aligned granule cell axons and demonstrated that Purkinje cell dendrites tend to grow perpendicular to axons, which ensures flat dendrite formation in vivo. Further we identified the molecules which are crucial for the perpendicular contact between dendrites and axons.

研究分野：神経発生学

キーワード：ニューロン 形態形成 脳・発生 細胞・組織 樹状突起

1. 研究開始当初の背景

樹状突起の形態や大きさは細胞種依存的で、入力の種類やシナプス数を規定するため、神経回路が機能する上で重要である。

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。その樹状突起は非常に大きく、空間を埋めるように複雑な分岐をしているにも関わらず、突起同士の間隔がほとんどなく、単一平面上に投射する。この平面で空間充填的な分岐形成は、多数の平行線維との重複しないシナプス結合に必要なほか、小脳機能の区画化への関与が予想され、正常な小脳回路の形成に重要だと考えられる。しかしプルキンエ細胞がいかにしてこの特徴的な分岐パターンを形成するかほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

プルキンエ細胞樹状突起の特徴的な三次元分岐パターンがどのように形成されるのか、そのメカニズムについてダイナミクスレベルで理解することを目的とした。特に以下の3点に注目した。

- (1) 樹状突起同士が成長する際に自己回避を行うことで重なりのない樹状突起を形成する仕組み
- (2) 成長時、急速に拡大していく樹状突起が安定に成長するため必要なエネルギー供給システム
- (3) プルキンエ細胞が顆粒細胞軸索と直交して成長することにより、組織内で平面を形成するメカニズム

3. 研究の方法

- (1) 小脳分散培養を用いた長期タイムラプスイメージング

本研究は主にマウス小脳の分散培養を用いて実験を行った。またプルキンエ細胞への遺伝子導入にはアデノ随伴ウイルスを用いた。プルキンエ細胞は発達期においてダ

イナミックな形態変化を行う。樹状突起の分岐形成に関わる突起の形態変化の時間経過を詳細に解析するためにタイムラプス観察を行った。インキュベーター内蔵型蛍光タイムラプス顕微鏡を用いることで数十分-数時間インターバルで一週間程度樹状突起の形態変化を追跡できる。

(2) 樹状突起内の分子活性のイメージング

プルキンエ細胞の時空間的な分子活性の変動を観察するために、共焦点顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングを行った。細胞のATP濃度の測定にはATP FRET probeであるATeamを用いた。またアクチン骨格のリモデリング率を測定するために、EGFP-actinを用いて光褪色後蛍光回復法(FRAP)を行った。

(3) 樹状突起と軸索の直交性の解析、および関連因子の同定

エレクトロスピンニング法で様々な方向づけられたナノ繊維を利用し、そのうえで小脳細胞を培養することで、顆粒細胞軸索である平行線維の方向性を人工的に操作した。平行線維はナノ繊維に沿って成長する性質をもち、それを利用している。さらにプルキンエ細胞をこの培養系上で育成させ、その樹状突起の方向性を観察・定量化した。ランダムに配向した繊維上で樹状突起は特徴的な方向性は示さないが、平行に配列した繊維上ではそれに対して直交方向に樹状突起を形成する。この単純化された実験系を用い、比較的容易に組織構造に依存した突起形成過程の観察が可能になった。また薬剤処理・RNA干渉法等を用いることで直交性に関与する分子の特定を行った。

4. 研究成果

- (1) 接触依存的な退縮・伸長停止のメカニズム

接触感知を担う候補分子としてホモフィリ

ックな接着分子の関与が考えられる。これまでにクラスター型プロトカドヘリン分子(cPcdh)が樹状突起の自己回避に関与するという報告があったが、その作用機序の詳細は分かっていない。本研究ではcPcdhに注目し、ブルキンエ細胞樹状突起の接触依存的な退縮・伸長停止メカニズムの解析を行った。培養下における当該分子のノックアウト細胞では突起同士のカロスオーバーや束化が増加する傾向にあった。一方、接触依存的な退縮の結果起こることが確認されている細胞体近位の分岐密度の低下は、野生型と大差なく正常であった。従ってcPcdhは接触によって引き起こされる退縮ではなく、伸長停止に関与していることが示唆された。さらにcPcdhの下流分子として考えられているFAKの機能阻害により、突起の複雑化が確認された。FAKは分岐を負に制御している可能性が考えられる。cPcdhとFAKの機能相関に関してより詳細な解析を行っている。

(2) 複雑な分岐を安定して形成するためのエネルギー供給メカニズム

発達過程において樹状突起は伸長と分岐を繰り返すことで、複雑な形態を獲得する。このダイナミックな成長過程を維持するにはミトコンドリアの樹状突起への輸送およびクレアチン・シャトリングと呼ばれる局所的エネルギー輸送機構が必要であることを示した。

ミトコンドリアの樹状突起への侵入を妨げると、突起の安定的な成長が妨げられた。その際、樹状突起におけるATP濃度が減少していることをFRETイメージングにより明らかにした。さらに樹状突起のエネルギー維持にはミトコンドリアだけでは不十分であり、クレアチンキナーゼによる局所的なエネルギー産生(クレアチン・シャトリング)が連動して働いていることを明らかに

した。クレアチンキナーゼ阻害下ではATP濃度の減少が引き起こされるほか、樹状突起の伸長が阻害される。

ミトコンドリアの輸送阻害とクレアチンキナーゼ阻害において生じるエネルギー枯渇状態はアクチン制御因子コフィリンのリン酸化状態の低下などより、アクチン代謝の低下が引き起こされ、その結果樹状突起の成長が減速することが明らかになった。

(3) ブルキンエ細胞樹状突起が平行線維と直交して成長するメカニズム

ニューロンは三次元組織の中で、周囲の物理的構造に影響を受けて形態形成を行う。小脳ブルキンエ細胞は平行線維に対して直交して樹状突起を形成することにより平面な突起を獲得することが示唆されている。

平行線維とブルキンエ細胞樹状突起間の直交性を再現する実験系を開発した。具体的には、人工ナノ繊維上で顆粒細胞を生育させることで平行線維の形成方向を操作した。平行線維はナノ繊維上を走行するため、その方向性はナノ繊維と等しくなる。平行に配列したナノ繊維を用いることで、平行線維の配向を二次元的に再現することが可能となった。さらにこの上でブルキンエ細胞を成長させると、樹状突起はナノ繊維/平行線維に直交したパターンを示した。ブルキンエ細胞と平行線維は直交することがこの系においても確認された。この結果は、ブルキンエ細胞の樹状突起の成長方向が、平行線維の配列に依存することを示唆する。しかし、多くのニューロンは発達過程において大規模なリモデリングを行って、精巧な突起パターンを獲得する。ブルキンエ細胞-平行線維間の直交性もまた、正しく配向した樹状突起以外が刈り込まれることによって形成される可能性がある。インキュベーター内蔵型タイムラプス顕微鏡を用い、突起の成長過程を解析したところ、直交パ

ターンは選択的な退縮ではなく樹状突起の進行方向が限定されることにより形成されることが明らかになった。

このナノ繊維培養系を用い、これまでに平面性への関与が示されていた Spectrin beta III 分子を起点とし、直交指向性に関する分子をさらに探索した。この結果として、平行線維とプルキンエ細胞樹状突起間の接着に関する分子が候補として得られ、現在解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Fukumitsu K, Fujishima K, Yoshimura A, Wu Y, Heuser J, and Kengaku M (2015). Synergistic action of dendritic mitochondria and creatine kinase maintains ATP homeostasis and actin dynamics in growing neuronal dendrites. 査読有
Journal of Neuroscience 35(14) 5707-5723

[学会発表](計 2 件)

藤島和人、見学美根子 プルキンエ細胞樹状突起の空間パターン決定メカニズム 日本細胞生物学会 2014 年 6 月 11-13 日、奈良

Kazuto Fujishima and Mineko Kengaku. Mechanisms regulating growth orientation of cerebellar Purkinje cells. 18th iCeMS International Symposium/ 15th International Membrane Research Forum. 2015 年 3 月 2-4 日, 京都

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
藤島 和人 (Fujishima Kazuto)

研究者番号：20525852

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：