

Title	In vivoタイムラプス観察で解明する細胞間相互作用による神経回路発達機構
Sub Title	How do cell adhesion molecules regulate dendritic morphogenesis?
Author	竹尾, ゆかり (Takeo, Yukari)
Publisher	
Publication year	2025
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2024.)
JaLC DOI	
Abstract	神経細胞は、樹状突起という枝分かれを介して他の細胞と情報伝達を行う。樹状突起は神経細胞の種類によって異なる複雑な形態を持ち、樹状突起の形成がどのように起きるかを知らずには、神経系の発達や機能のメカニズム理解に重要であると考えられている。本研究では、ユニークで美しい樹状突起形態を特徴とするマウスの小脳プルキンエ細胞という神経細胞を用い、樹状突起の枝分かれの配置がどのように決まるのかを調べた。その結果、樹状突起の表面に発現するRPTPμというたんぱく質が向かい合って接触することで、樹状突起どうしが互いを認識するシグナルを発生させることで、突起の位置や長さを制御する仕組みがあることが分かった。 Neuronal dendrites are the major site for receiving synaptic inputs and thought to be fundamental for neuronal functions. Therefore, it is important to understand how dendritic morphology is formed for better understanding the mechanism of development and function of nervous system. In this study, we examined the molecular mechanisms of dendritic morphogenesis of the cerebellar Purkinje cell. We found that RPTPμ, a cell adhesion molecule, is required for spatial arrangement of dendrites of Purkinje cells.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2021～2024 課題番号：21K06378 研究分野：神経生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21K06378seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 7 年 5 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K06378

研究課題名（和文）in vivoタイムラプス観察で解明する細胞間相互作用による神経回路発達機構

研究課題名（英文）How do cell adhesion molecules regulate dendritic morphogenesis?

研究代表者

竹尾 ゆかり（TAKEO, Yukari）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：90624320

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：神経細胞は、樹状突起という枝分かれを介して他の細胞と情報伝達を行う。樹状突起は神経細胞の種類によって異なる複雑な形態を持ち、樹状突起の形成がどのように起きるかを知らなければ、神経系の発達や機能のメカニズム理解に重要であると考えられている。本研究では、ユニークで美しい樹状突起形態を特徴とするマウスの小脳プルキンエ細胞という神経細胞を用い、樹状突起の枝分かれの配置がどのように決まるのかを調べた。その結果、樹状突起の表面に発現するRPTP μ というたんぱく質が向かい合って接触することで、樹状突起同士が互いを認識するシグナルを発生させることで、突起の位置や長さを制御する仕組みがあることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の回路構築の仕組みを知るためには、細胞内でどんなタンパク質がどう働くのかを調べるのが必須である。本研究では、RPTP μ という、細胞間で相互作用することが示唆されているタンパク質が、プルキンエ細胞という神経細胞に豊富に発現していることを見つけた。そこで、RPTP μ の働きを知るために、RPTP μ の発現を担う遺伝子の欠損マウス、および、RPTP μ タンパク質は存在するが細胞間での相互作用ができなくなるような変異を遺伝子に挿入したマウスを作製したところ、これらのマウスのプルキンエ細胞の樹状突起が異常な形態を示した。すなわち、RPTP μ タンパク質間の結合が樹状突起形成に重要であることを実証した。

研究成果の概要（英文）：Neuronal dendrites are the major site for receiving synaptic inputs and thought to be fundamental for neuronal functions. Therefore, it is important to understand how dendritic morphology is formed for better understanding the mechanism of development and function of nervous system. In this study, we examined the molecular mechanisms of dendritic morphogenesis of the cerebellar Purkinje cell. We found that RPTP μ , a cell adhesion molecule, is required for spatial arrangement of dendrites of Purkinje cells.

研究分野：神経生物学

キーワード：神経細胞 発達 脳

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、シナプスを介した情報伝達の多くを、樹状突起と呼ばれる構造において行う。樹状突起はその名の通り、樹木にも似た枝分かれの多い突起構造で、神経系の疾患でその形態異常が報告されていることから、樹状突起の形態が神経機能に重要であることが示唆されている。

しかし、どのようにして樹状突起の複雑な構造が形成・維持されるのか、そのメカニズムには不明な点が多い。

本研究では、脳内の樹状突起が形成される分子機構を解明することを目的に、小脳プルキンエ細胞に着目した。プルキンエ細胞は、マウスでは樹状突起を1本しか持たず、またその1本の突起は数百もの枝分かれを、扇形の平面状に広げた美しく特徴的な形態を見せることから(図1A)、古くから樹状突起形成機構の研究に用いられてきた。特に、枝分かれが平面に広がるためには、突起どうしが互いを認識して重なり合わずに配置される必要があるが、そのような緻密な制御がどのように起きているのかについて、多くの研究がなされてきた。

樹状突起が互いに重ならず配置される仕組みは、種を超えてあらゆる神経細胞で観察され、神経回路網においてシナプスを受け取るための「受容野」の不必要な重複を避けるために重要な仕組みであると考えられている。この現象は、同じ神経細胞から分岐した樹状突起が重なり合わない場合には「Self-avoidance (自己回避)」と呼ばれる。一方、隣接する異なる神経細胞の樹状突起が重なり合わない場合には、樹状突起の広がりを見立て、「タイリング」と呼ばれる。

樹状突起の自己回避やタイリングが起きるメカニズムとして、樹状突起どうしが接触したのち、互いを避けるための「反発」シグナルが働くことが、広く信じられている。この仮説をを支持する根拠として、プルキンエ細胞の樹状突起の自己回避が、細胞表面膜に局在し細胞外領域で接着することが知られているクラスタープロトカドヘリン(cPcdh)という遺伝子や、成長中の神経突起の方向を反らせる反発シグナルに関わることが知られる ROBO2 という遺伝子を欠損させると、阻害される。すなわち cPcdh や ROBO2 といった細胞表面膜に発現するタンパク質が、樹状突起上で、突起同士の接触やシグナル伝達を担うと考えられている。

しかしながら、cPcdh と ROBO2 のシグナル経路は異なることが報告されており、プルキンエ細胞が樹状突起の接触と反発を起こす詳しいメカニズムはいまだによくわかっていない。つまり、本当に接着依存的な反発メカニズムが働いているのかは不明であった。

2. 研究の目的

申請者は、RPTP μ という遺伝子が、プルキンエ細胞に豊富に発現していることに着目した。RPTP μ は、細胞表面膜に局在する脱リン酸化酵素であり、細胞外領域で互いに結合し合うことで細胞間接着に関与することが知られる。そこで RPTP μ の接着機能が、プルキンエ細胞の樹状突起の自己回避に関わるのではないかと考え、検証を行った。

3. 研究の方法

プルキンエ細胞の樹状突起形態形成における RPTP μ の役割を調べるため、本研究では胎児期のマウスで脳室から遺伝子導入する子宮内電気穿孔法によって、プルキンエ細胞に遺伝子導入を行った。この方法は、一部のプルキンエ細胞にまばらに遺伝子導入する方法であり、導入遺伝子に蛍光タンパク質を含めることで、蛍光顕微鏡によって一つの細胞の形態を明瞭に可視化し、樹状突起を計測できる。

また、RPTP μ の機能をより詳しく調べるために、RPTP μ 遺伝子を欠損するマウス(KO マウス)、および、RPTP μ の遺伝子に、細胞外領域で結合できなくなるような変異を挿入したマウス(2RE マウス)を作製した。これらのマウスでは、子宮内電気穿孔法でのノックダウンと異なり、すべてのプルキンエ細胞において RPTP μ が欠損あるいは変異挿入されている。これらのマウスで、プルキンエ細胞の形態にどのような違いが見られるかを調べた。

4. 研究成果

(1) RPTP μ は樹状突起自己回避に必要である

まず、野生型のマウスにおいて、子宮内電気穿孔法を用いて、一部のプルキンエ細胞でまばらに RPTP μ の発現を低下(ノックダウン)させる microRNA を発現させた。すると、正常なプルキンエ細胞では、樹状突起の枝分かれは互いに距離を取って配置され、あまり交差ししないが(図1A)、RPTP μ をノックダウンしたプルキンエ細胞では樹状突起の重なりが大きく増加することがわかった(図1B)。

次に、KO マウスにおいて、子宮内電気穿孔法で蛍光遺伝子をまばらに導入することでプルキンエ細胞の樹状突起形態を調べたところ、やはり樹状突起の重なりが増加した(図2)。

これらの結果から、RPTP μ はプルキンエ細胞で樹状突起の自己回避に必要であることが示唆された。

(2) RPTP μ は接着機能を介して樹状突起自己回避を担う

次に、2RE マウスのプルキンエ細胞形態を同様に調べたところ、KO マウスと同様の、樹状突起自己回避異常が観察された（図 2）。2RE マウスの RPTP μ は細胞外接着ができない変異体であることから、プルキンエ細胞の樹状突起自己回避には、RPTP μ を介した接着が必要であることが示唆された。

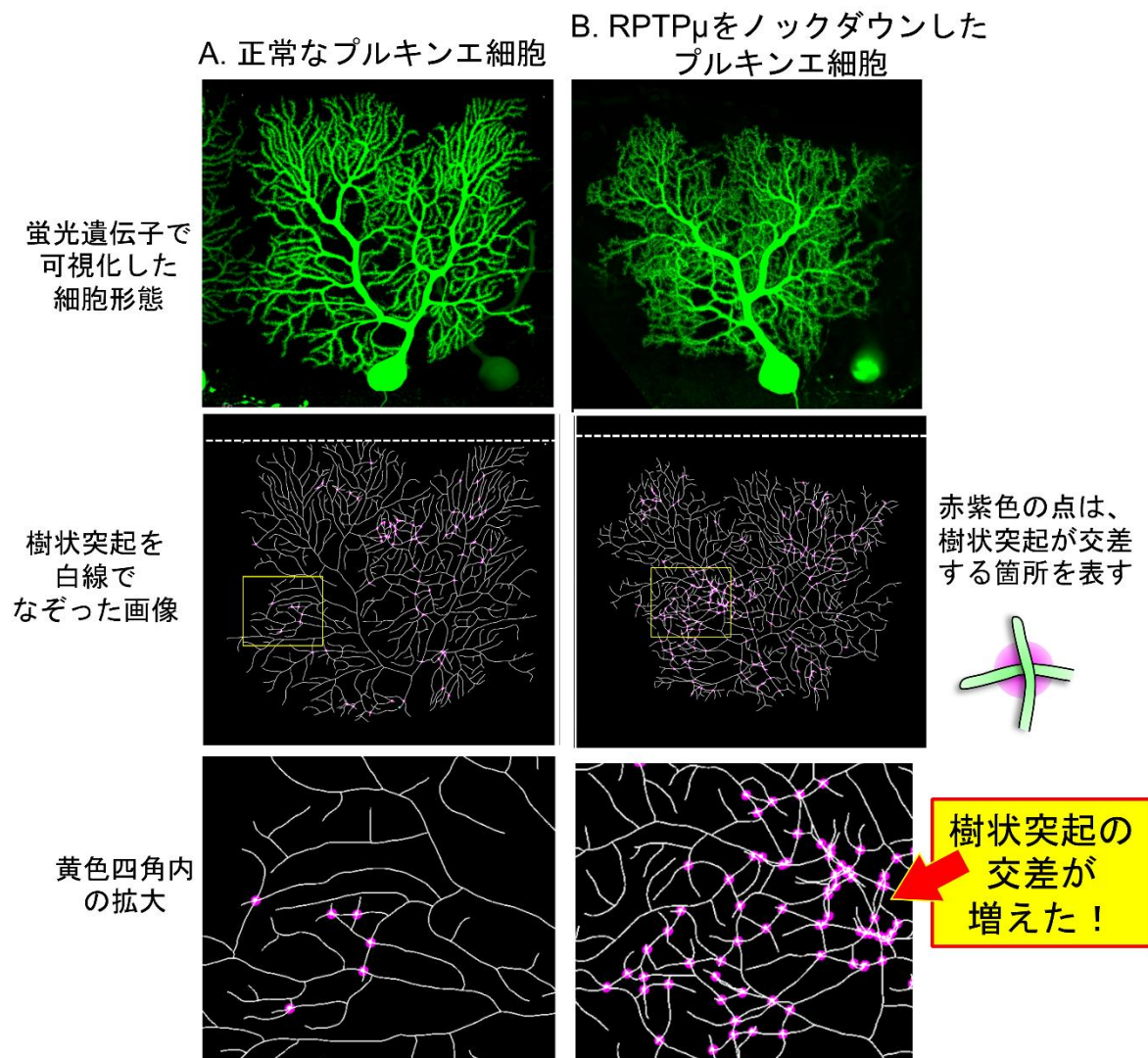


図 1. RPTP μ のノックダウンによる樹状突起自己交差増加。蛍光遺伝子を生体内電気穿孔法で発現させているため、単一の細胞の形態が蛍光顕微鏡で明瞭に可視化できる。

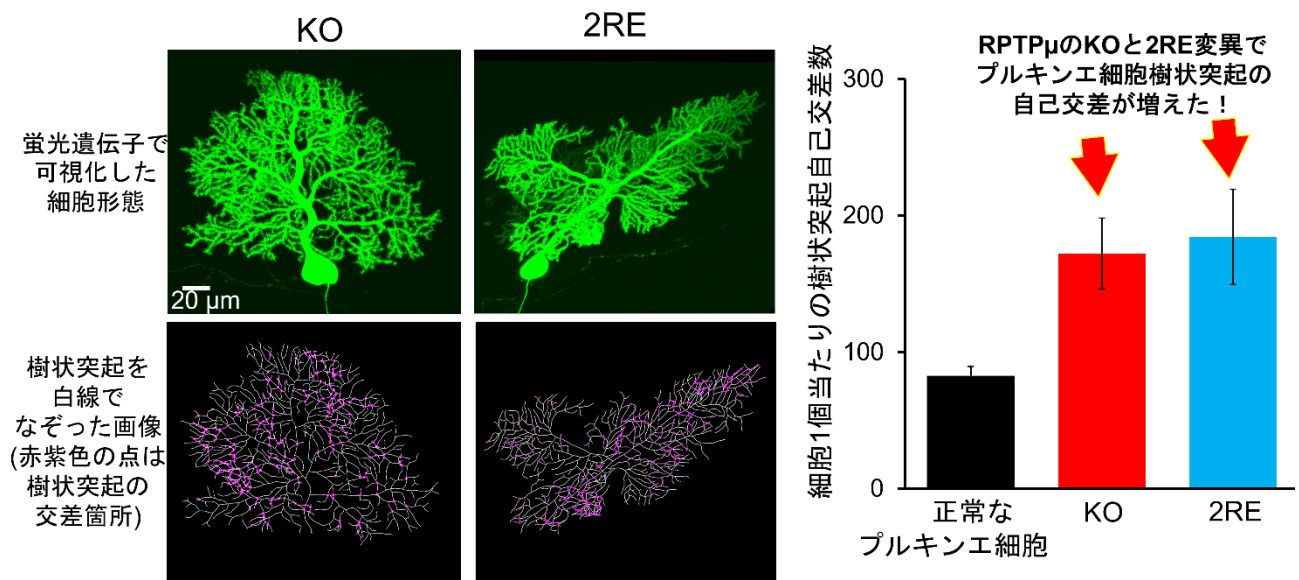


図 2. RPTP μ 欠損マウスおよび変異挿入マウスのプルキンエ細胞樹状突起。

(3) RPTP μ は樹状突起のタイリングにも必要である

これまでプルキンエ細胞樹状突起の平面形成において、多くの研究は自己回避に着目し、タイリングについてはあまり検討がされてこなかった。しかし、RPTP μ はすべてのプルキンエ細胞に発現するタンパク質であり、RPTP μ を介した接着は同じプルキンエ細胞の樹状突起どうしのみならず、隣接する異なるプルキンエ細胞の間でも起こることが予想される。

そこで、隣接するプルキンエ細胞どうしの樹状突起の位置関係が、RPTP μ を欠損することによってどのように変わるかを検討した。そのために、子宮内電気穿孔法によって蛍光遺伝子、あるいは蛍光遺伝子とともに RPTP μ をノックダウンする microRNA を遺伝子導入したプルキンエ細胞と、周囲の正常なプルキンエ細胞の樹状突起を観察した。

その結果、正常なプルキンエ細胞の樹状突起で作られる扇形の平面は、周囲のプルキンエ細胞の樹状突起が作る平面と平行で、ほぼ交わらないことが確認できた (図 3A)。すなわちプルキンエ細胞は通常、樹状突起をタイリングさせて並んでいる。ところが、RPTP μ をノックダウンすると、ノックダウンしたプルキンエ細胞の樹状突起は周囲の正常なプルキンエ細胞の樹状突起が作る平面を乗り越えて、複数の平面に侵入することが分かった (図 3B)。すなわち RPTP μ を欠損すると、タイリングが損なわれることがわかった。

これらの結果から、RPTP μ はプルキンエ細胞において樹状突起の自己回避およびタイリングに必要であり、その機能発揮には細胞外領域を介した接着が必要であることが示唆された。

本研究によって、樹状突起の正常な配置が細胞接着因子による細胞外での相互作用によって緻密に制御されることが確かめられた。本研究の成果は、神経回路構築メカニズムの分子レベルでの理解に貢献する。

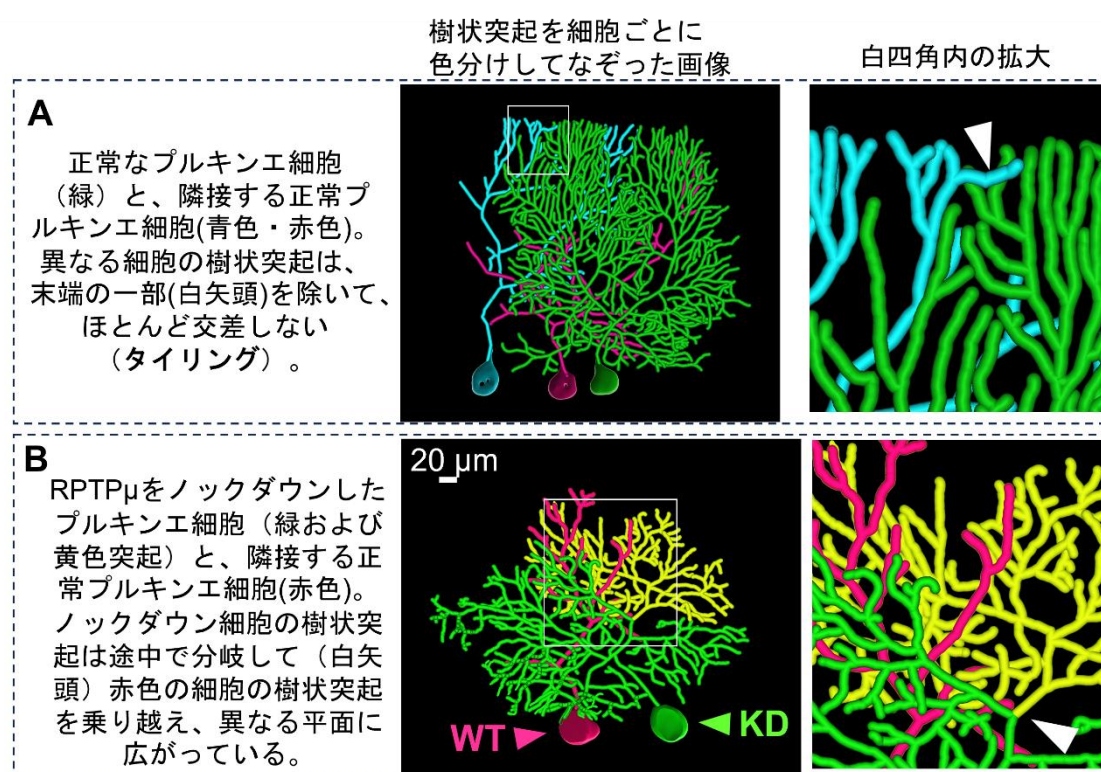


図 3. RPTP μ はプルキンエ細胞の樹状突起タイリングに必要。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 S Andrew Shuster, Jiefu Li, URee Chon, Miley C Sinantha-Hu, David J Luginbuhl, Namrata D Udeshi, Dominique Kiki Carey, Yukari H Takeo, Qijing Xie, Chuanyun Xu, D R Mani, Shuo Han, Alice Y Ting, Steven A Carr, Liqun Luo	4. 巻 110
2. 論文標題 In situ cell-type-specific cell-surface proteomic profiling in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 3882-3896
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2022.09.025	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 —

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 畠山 裕基、竹尾 ゆかり、柚崎 通介
2. 発表標題 RPTP μ regulates dendritic self-avoidance and tiling of cerebellar Purkinje cells in vivo
3. 学会等名 第102回日本生理学会（国際学会）
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 竹尾 ゆかり、柚崎 通介
2. 発表標題 Local NMDAR/CaMKII signaling regulates dendritic development of cerebellar Purkinje cells
3. 学会等名 第102回日本生理学会（国際学会）
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 竹尾ゆかり
2. 発表標題 膜蛋白質による細胞外相互作用が樹状突起の3次元配置を制御するシグナル
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------