

嗅球における匂い経験依存的な神経回路再編の分子機構

Molecular mechanisms that regulate the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons

(日本神経科学学会推薦)

代表研究者	奈良県立医科大学	坪井 昭夫	Nara Medical University	Akio TSUBOI
協同研究者	奈良県立医科大学	吉原 誠一	Nara Medical University	Seiichi YOSHIHARA
	奈良県立医科大学	高橋 弘雄	Nara Medical University	Hiroo TAKAHASHI

Sensory experience regulates development in a variety of species and in various brain structures, including the cortex, hippocampus and olfactory bulb (OB). Within the mammalian OB specifically, the development of dendrites in mitral cells is dependent on odor-evoked neural activity. However, little is known about the developmental role of sensory experience in the other major OB populations of GABA-releasing inhibitory interneurons, such as granule cells (GCs). In this study, by *in situ* hybridization (ISH) screenings, we newly identified a transcription factor, neuronal *Per/Arnt/Sim* domain protein 4 (*Npas4*) gene, which is expressed in a subset of OB GCs following sensory experience. Then, we performed the gain- and loss-of-function experiments for *Npas4* in OB GCs, based on lentiviral injection. *Npas4* overexpression in newborn OB GCs increased the spine density even under sensory deprivation. Conversely, both *Npas4* knockdown and knockout resulted in a significant reduction in the spine density of OB GCs. In addition, by ChIP-seq plus ISH screenings, we identified, as a novel target of *Npas4*, an oncogenic E3 ubiquitin ligase *Mdm2* gene, which is expressed at low levels in the wild-type OB but at higher levels in the *Npas4*-knockout OB. Proteomics analysis further revealed that *Mdm2* ubiquitinates and degrades a microtubule-associated protein *Dcx* to reduce the dendritic spine density of OB GCs. Taken together, our findings suggest that *Npas4* regulates *Mdm2* expression to ubiquitinate and degrade *Dcx* for shaping the dendritic spines of OB GCs after sensory experience.

研究目的

大脳皮質の視覚野や海馬で明らかにされているように、ニューロンは神経活動に応じて樹状突起の発達やシナプス形成を行うことにより、より精密化された神経回路に成熟する。また、嗅球における顆粒細胞と傍糸球細胞は抑制性の介在ニューロンで、胎生期のみならず成体期においても新生され続け、神経回路に編入されるという可塑性を持っている (図 1)。さらに、この成体における嗅球の神経回路再編は神経活動の影響を受けることも知られている。しかしながら、嗅球における匂い刺激に依存的な神経回路再編については不明な点が多い。私共はこれまでに、匂い刺激依存的に発現する転写因子 **Npas4**

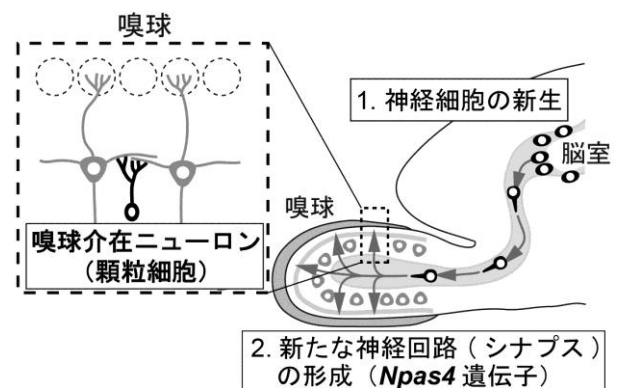


図 1 嗅球介在ニューロンの発達

抑制性の嗅球介在ニューロン (顆粒細胞) は大人になっても脳室周辺で新しく産まれて、嗅球へ移動し、新たな神経回路を形成している。

(neuronal Per/Arnt/Sim domain protein 4) を同定し、それが嗅球介在ニューロンの樹状突起におけるスパイン（棘突起）形成を制御することを示していたが（図2）、その分子機構はわかっていなかった。

そこで、本研究では、“Npas4 がどのようにして嗅球介在ニューロンの樹状突起においてスパイン形成を制御しているのか？”という機構を解明した。

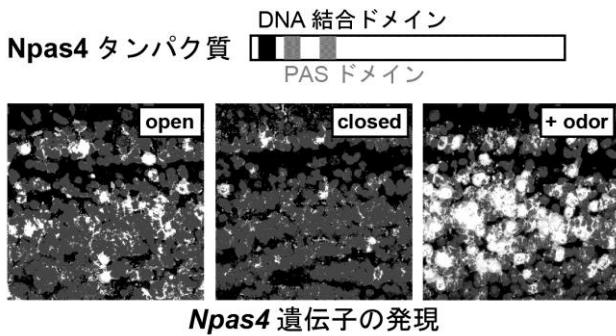


図2 Npas4 遺伝子の嗅球介在ニューロンでの発現
 (上) Npas4 は PAS ドメインを持つ転写因子であり、下流の遺伝子の発現を制御する。
 (下) 鼻を閉じて匂い刺激を遮断したマウスの嗅球では、嗅球介在ニューロン（灰色は核を示す）での Npas4 の発現（白）が顕著に減少した。逆に、匂いで刺激すると、嗅球ニューロンでの Npas4 の発現が強く誘導された。

研究経過

私共は、Npas4 が転写因子であることから、その下流にあるスパイン形成に関与する遺伝子の発現を制御していると推測した。本研究においては、まず、Npas4 蛋白質が結合する DNA 領域を同定するクロマチン免疫沈降 - シークエンシング法 (ChIP-Seq: Chromatin immunoprecipitation-Sequencing) を用いて、その下流遺伝子を探索した。得られた候補遺伝子について、嗅球介在ニューロンでの発現を調べたところ、蛋白質の分解を促進するユビキチンリガーゼの1つである Mdm2 (murine double minute 2) 遺伝子の発現が、Npas4 ノックアウトマウスでは野生型よりも増加していた (図3)。次に、Mdm2 が分解する標的蛋白質を、プロテオミクスの一つである iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) 法を用いて探索した。その結果、Npas4 ノックアウトマウスの嗅球介在ニューロンでは、Mdm2 蛋白質の増加に伴って、微小管結合蛋白質であるダブルコルチン (doublecortin: Dcx) の分解が促進されていた (図3)。また、ダブルコルチン遺伝子を嗅球介在ニュー

ロンで過剰発現させると、スパイン密度が増加することが判明した。このように本研究において、嗅球介在ニューロンでは、Npsa4 の発現量に応じて、スパイン形成に関わるダブルコルチンが Mdm2 のユビキチン化により分解され、スパイン密度が制御されていることが明らかにされた (Yoshihara et al, Cell Reports, 8, 843-857, 2014)。匂い刺激により神経活動が盛んになった嗅球介在ニューロンでは、Npas4 の発現量が増加し、それに伴ってスパイン密度が増加して、より多くの二次ニューロンと接続できるようになると推測される (図3)。私共は、実際に、嗅球介在ニューロンで特異的に Npas4 を欠損させたマウスが、構造的に類似した2つの匂い分子を弁別学習することができないことを見出しているため、匂い刺激によるスパイン密度の増加は精密な嗅覚情報処理に必須であることが示唆された (Yoshihara et al, Cell Reports, 8, 843-857, 2014)。

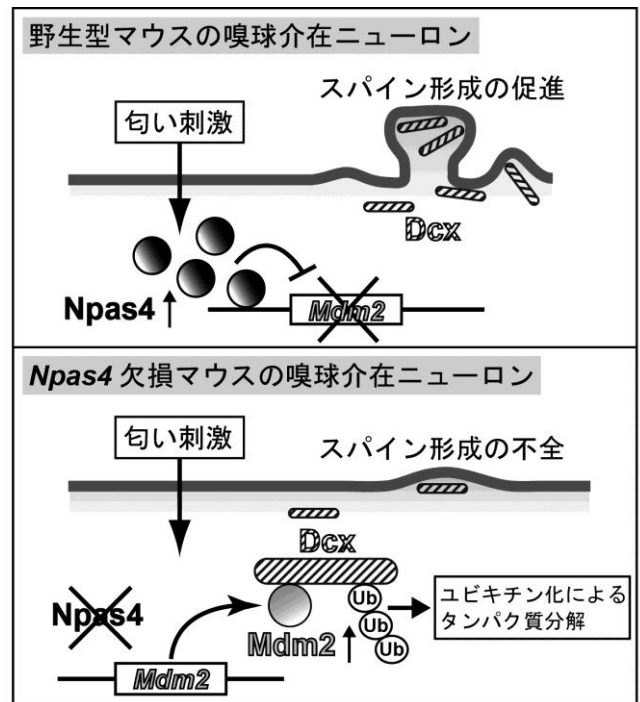


図3 Npas4 によるスパイン形成の分子メカニズム
 (上) 野生型の嗅球介在ニューロンでは、匂い刺激により Npas4 の発現量が増加し、Mdm2 の発現を抑制している。
 (下) Npas4 を欠損した嗅球介在ニューロンでは、Mdm2 の発現量が増加して、ダブルコルチン (Dcx) タンパク質の分解が促進される。Dcx はスパイン形成を促進するので、Npas4 が Dcx の量を調節することにより、新たに作られるスパインの数を制御している。

考察

今後、嗅球介在ニューロン特異的な **Npas4** ノックアウトマウスを用いて、匂い情報処理を詳細に解析することにより、新生ニューロンによる匂い刺激依存的な嗅球神経回路の再編に関する生理的意義が明らかになると期待される。また、脳梗塞モデルマウスにおいて嗅球介在ニューロンの一部は、損傷した脳の領域に移動し修復する性質を持つことが知られているので、本研究は脳梗塞などによる神経障害を回復させる再生医療における新たな治療法の開発にもつながると期待される。

研究の発表

口頭発表

1. Takahashi H, Yoshihara S, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Furukawa-Hibi Y, Nagai T, Yamada K, Tsuboi A: Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. Cold Spring Harbor Meeting: Axon Guidance, Synapse Formation & Regeneration, Cold Spring Harbor, USA (Sep. 16-20, 2014).
2. Tsuboi A, Takahashi H, Asahina R, Kinoshita M, Nishimura N, Yoshihara S: 5T4 and Npas4 regulate the sensory experience-dependent development of dendrites in newborn olfactory bulb interneurons. Keystone Symposia: Adult Neurogenesis, Stockholm, Sweden (May 12-17, 2014).
3. Yoshihara S, Takahashi H, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Furukawa-Hibi Y, Nagai T, Yamada K, Tsuboi A: Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. Cold Spring Harbor Meeting: Neuronal Circuits, Cold Spring Harbor, USA (Apr. 2-5, 2014).
4. Takahashi H, Yoshihara S, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Furukawa-Hibi Y, Nagai T, Yamada K, Tsuboi A: Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. The 12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, Kyushu University, Fukuoka, Japan (Nov. 2-3, 2014).
5. 吉原誠一, 高橋弘雄, 西村信城, 木下雅仁, 朝比奈諒, 日比陽子, 永井拓, 山田清文, 坪井昭夫: Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. 第92回日本生理学会大会, 神戸コンベンションセンター (2015年3月21-25日).
6. 高橋弘雄, 吉原誠一, 小川陽一, 朝比奈諒, 玉田喜規, 坪井昭夫: 5T4 oncofetal trophoblast glycoprotein regulates the sensory experience-

dependent dendritic development of olfactory bulb interneurons. 第92回日本生理学会大会, 神戸コンベンションセンター (2015年3月21-25日).

7. 吉原誠一, 高橋弘雄, 西村信城, 木下雅仁, 朝比奈諒, 日比陽子, 永井拓, 山田清文, 坪井昭夫: Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. 第37回日本分子生物学会大会, パシフィコ横浜 (2014年11月25-27日).
8. 高橋弘雄, 吉原誠一, 小川陽一, 朝比奈諒, 玉田喜規, 坪井昭夫: 5T4 oncofetal trophoblast glycoprotein regulates the sensory experience-dependent dendritic development of olfactory bulb interneurons. 第37回日本分子生物学会大会, パシフィコ横浜 (2014年11月25-27日).
9. 吉原誠一, 高橋弘雄, 西村信城, 木下雅仁, 朝比奈諒, 日比陽子, 永井拓, 山田清文, 坪井昭夫: Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. 第37回日本神経科学学会大会, パシフィコ横浜 (2014年9月11-13日).
10. 高橋弘雄, 吉原誠一, 小川陽一, 西村信城, 木下雅仁, 玉田喜規, 坪井昭夫: 5T4 glycoprotein regulates the sensory experience-dependent dendritic development of olfactory bulb interneurons. 第37回日本神経科学学会大会, パシフィコ横浜 (2014年9月11-13日).

誌上発表

1. Takahashi H, Yoshihara S, Asahina R, Tamada Y, Tsuboi A: Characterization of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb using postnatal electroporation. *In: Electroporation Methods in Neuroscience, Neuromethods 102* (Springer), pp.93-103, 2015.
2. Tsuboi A, Sakano H: Odorant receptor gene regulation. *In: Handbook of Olfaction and Gustation, Third Edition* (Wiley-Blackwell), in press, 2015.
3. Yoshihara S, Takahashi H, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Kitsuki M, Tatsumi K, Furukawa-Hibi Y, Hirai H, Nagai T, Yamada K, Tsuboi A: Npas4 regulates Mdm2 and thus Dcx in experience-dependent dendritic spine development of newborn olfactory bulb interneurons. **Cell Reports** 8, 843-857, 2014.
4. 吉原誠一, 高橋弘雄, 坪井昭夫: 嗅球ニューロンにおける匂い刺激依存的なシナプス形成の分子機構. **Aroma Research** 第15巻第3号 pp.248-249, 2014.
5. 高橋弘雄, 坪井昭夫: 嗅覚系における CO₂ センシングの分子機構. **化学と生物**, 第51巻, pp.437-439, 2013