

小脳プルキンエ細胞の樹状突起形成
に関わる甲状腺ホルモンシグナル
経路の研究

京都大学大学院 生命科学研究所

初鹿野 徹

目次

要旨.....	2 頁
第一章 序論.....	4 頁
第二章 結果.....	16 頁
第三章 考察.....	38 頁
実験方法.....	43 頁
参考文献.....	48 頁
謝辞.....	55 頁

要旨

神経系を構築するニューロンの樹状突起は、その機能に応じて多様な形態を獲得する。甲状腺ホルモン (3,3',5-Triiodo-L-thyronine ; T3) は、神経系の発達に重要であり、小脳プルキンエ細胞の樹状突起形成を促進することが知られているが、その制御メカニズムは不明な点が多い。一方、樹状突起の形成および維持には大量の ATP を必要とするためミトコンドリアは増殖していく必要がある。プルキンエ細胞の樹状突起形成過程においてこれらの現象には関連があると考え、T3 の標的遺伝子の一つでありミトコンドリア生合成の制御因子である peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 α (PGC-1 α)に着目し、T3 によって誘導される樹状突起形成と PGC-1 α の機能を調べた。

まず、*in vitro* および *in vivo* で T3 によって促進される樹状突起形成と PGC-1 α の発現に関連があるのか調べた。その結果、小脳分散培養において、T3 処理によりプルキンエ細胞の樹状突起形成が促進されるのと並行してミトコンドリアの活性と PGC-1 α の発現が増加することがわかった。一方、T3 非存在下の小脳分散培養では、樹状突起形成は阻害され、ミトコンドリアの活性と PGC-1 α の発現は増加しなかった。さらに、小脳皮質の正常発生においてプルキンエ細胞の PGC-1 α の発現は樹状突起伸長期に上昇するが、甲状腺ホルモン低下症モデルマウスにおいて、プルキンエ細胞の樹状突起形成が阻害され、PGC-1 α の発現開始が遅延し、発現量が低下した。これらの結果より、PGC-1 α の発現は、プルキンエ細胞の樹状突起形成時に T3 によって誘導されることが示唆された。次に、樹状突起形成における PGC-1 α の機能を調べた。T3 存在下の小脳分散培養において、プルキンエ細胞の樹状突起形成とミトコンドリア生合成は、PGC-1 α ノックダウンにより抑制された。さらに、PGC-1 α が補因子として結合しミトコンドリア生合成を制御する転写因子 NRF1 のドミナントネガティブ変異体を過剰発現すると、プルキンエ細胞の樹状突起形成が阻害された。また、PGC-1 α とは逆に T3 シグナルの下流遺伝子の転写を抑制することが知られている転写抑制補因子 RIP140 の過剰発現は、プルキンエ細胞の樹状突起形成を阻害した。これらの結果は、T3 によって誘導されるプルキンエ細胞の樹状突起形成において、PGC-1 α

の発現が必要であることを示している。最後に、PGC-1 α の発現が T3 の樹状突起形成促進効果を補完するのに十分であるかどうか検証した。T3 欠乏下ではプルキンエ細胞の樹状突起は、ほとんど伸長しない。しかし T3 非存在下の小脳分散培養において PGC-1 α の過剰発現を行うと樹状突起形成とミトコンドリアの生合成が引き起こされた。以上の結果より、T3 によって引き起こされるプルキンエ細胞の樹状突起形成は、少なくとも PGC-1 α の発現を介して起こることが明らかになった。

第一章

序論

中枢神経系の神経回路を構成する最小単位であるニューロンやグリアは、それぞれの機能や結合様式に応じて特有の形態を獲得する。ニューロンは、信号の出力に関わる軸索と入力に関わる樹状突起を有する。樹状突起の形態は、細胞種や機能によって様々であり、その多様性はそれぞれの組織における神経回路の機能の構築に密接に関わっている。しかしどのように細胞特異的な樹状突起が形成されていくのか不明な点が多く存在する。本研究では、中枢神経系において最も複雑な分岐を形成する小脳プルキンエ細胞を用いて、その樹状突起形成を制御する分子メカニズムの理解を目指して解析を行った。

小脳皮質の発達

小脳は運動や姿勢の制御の中枢として知られているが、情動や感情の制御、認知そして記憶に関与することも近年明らかになりつつある。小脳の機能障害は、自閉症などの精神疾患とも関わりがあることが報告されている。また、ヒトの場合、大脳の 10%ほどの重量であるにもかかわらず、大脳よりもはるかに多くのニューロンが存在する。

小脳は、3層の細胞層から成る小脳皮質と軸索が集中する白質からなる。小脳は結合組織である軟膜に覆われており、成熟した小脳皮質は、その表面から深部へ順に分子層、プルキンエ細胞層そして内顆粒層で構成されている。

層形成を含む小脳の発生は、出生前後にダイナミックに行われる。特徴的なのが脳で最も多く存在するニューロンである小脳顆粒細胞の増殖、分化そして移動である。マウス小脳において顆粒細胞前駆細胞は、発達期に一時的に小脳表面に現れる外顆粒層 (external granule layer; EGL)を形成する。EGLの顆粒細胞前駆細胞は、増殖を繰り返し P0 (postnatal day 0) から徐々に細胞分裂を終え、小脳顆粒細胞に分化する。小脳顆粒細胞は、バークマングリアの突起に沿って小脳の深部へ移動し内顆粒層 (internal granule layer; IGL)を形成する。この移動は P14 までにほぼ完了し、EGLは消失する(Figure 1-1)。

一方、小脳皮質の主要なニューロンであるプルキンエ細胞も小脳皮質の発達に伴って形態を変化させていく。プルキンエ細胞は、マウスにおいて E12 頃に

バークマングリアの突起に沿って小脳原基の神経上皮から皮質板へ放射状に移動が始まる。この移動は P0 までに終了する。この時、プルキンエ細胞は、概して紡錘形の細胞体に双極性の突起を有している。その後、細長く分岐のほとんどない尖端突起を伸ばした形態をとる (“fusiform stage”)。そして P2 から P4 においてプルキンエ細胞は、新たな発生段階に入り、多極性の細長い突起を有するようになる (“stellate cells stage”)。P7 頃から複数の突起のうち、一つが選択され樹状突起として軟膜表面に向かって急速に伸長する。同時に、その他の樹状突起は退縮する (“young Purkinje cells stage”) (Armengol and Sotelo, 1991; Sotelo and Dusart, 2009) (Figure 1-2)。さらにこの樹状突起は、分子層において IGL の顆粒細胞から伸びた平行線維とシナプスを形成する。また、プルキンエ細胞の軸索は、P2 から P6 の間に IGL を通り白質へ伸長し深部小脳核とシナプスを形成する。このようにプルキンエ細胞の細胞極性は、小脳皮質の発達に伴って獲得される。

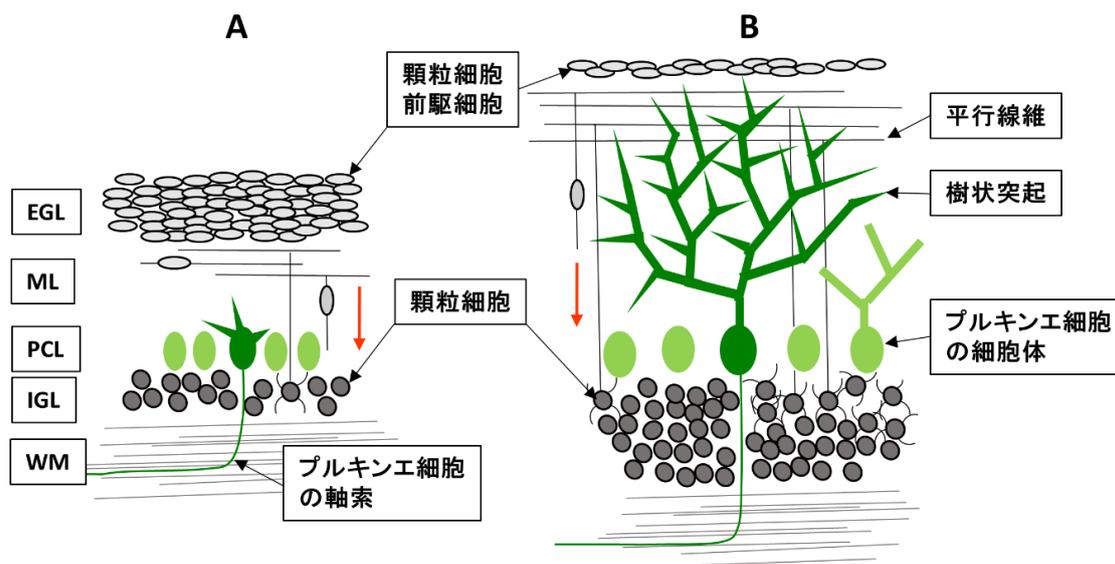


Figure 1-1. 小脳皮質の形成

(A) P5 頃の小脳皮質の矢状断面図。増殖を終えて分化した顆粒細胞は、EGL から IGL へ移動する。(B) P14 前後の小脳皮質の矢状断面図。顆粒細胞の移動は、P14 頃にはほぼ終了し EGL は消失する。プルキンエ細胞の樹状突起は、分子層で形成され、顆粒細胞から伸ばした平行線維とシナプスを形成する。EGL (external granule layer; 外顆粒層)、ML (molecular layer; 分子層)、PCL (Purkinje cell layer; プルキンエ細胞層)、IGL (internal granule layer; 内顆粒層)、WM (white matter; 白質)

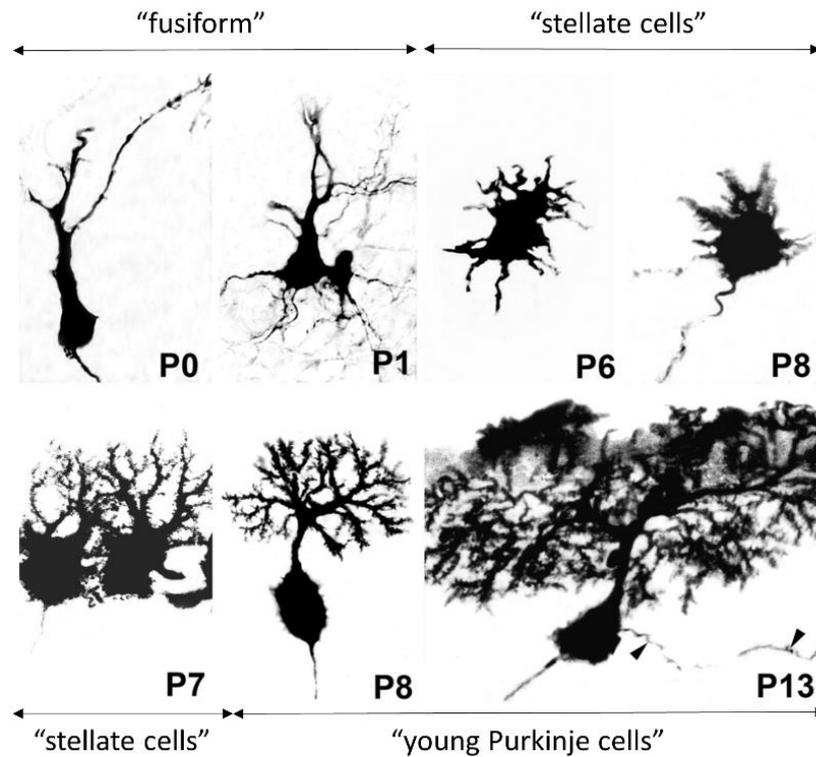


Figure 1-2. 小脳プルキンエ細胞の形態変化

(Sotelo and Dusart, 2009)を元に改変。生後小脳皮質においてプルキンエ細胞の形態変化の開始時期は以下の通りである。fusiform stage (P0~), stellate cells stage (P2-P4~), young Purkinje cells stage (P8~)その後、樹状突起の形成はP30頃にほぼ完了する。

神経系の発達と甲状腺ホルモン

甲状腺ホルモン Thyroid hormone (TH; 3,5,3',5'-tetraiodo-L-thyronine, T4 または 3,5,3'-triiodo-L-thyronine, T3)は、様々な組織の発達や代謝に関わる。特に哺乳類の中樞神経系は、その主要な標的器官である。例えば大脳皮質の発達段階において 500-1000 の遺伝子が、TH の影響を受けることが知られている(Chatonnet et al., 2015)。その中には細胞接着分子ラミニン、軸索伸長や移動に関わる TAG-1 (transient axonal glycoprotein-1)、層形成に関わる reelin、小胞輸送に関わる rabconnectin 3、ポストシナプスに局在する neurogranin、ニューロンの配置に関わるアダプタータンパク質である Dab-1 (disabled 1)そして前駆細胞の増殖に関わる Sonic hedgehog (Shh)などがある。(Farwell and Dubord-Tomasetti, 1999; Alvarez-

Dolado et al., 1999; Alvarez-Dolado et al., 2001; Dowling et al., 2000; Desouza et al., 2011)。また、胎盤を介した母親由来の TH が、甲状腺が未発達な胎児の脳発育に重要な影響を与える。ヒトの場合、妊娠 13~28 週 (second trimester) に、ラットでは E17.5~18.0 に胎児の甲状腺の機能が始まるが、これ以前は母親由来の TH に依存している。生後のマウスにおいて TH 血中濃度は、P2 から P4 頃は低いままであるが、P4 頃から急激に上昇し始め P6 から P10 で一定の濃度に達する。その後、P15 でピークを迎え、生後 3 週目以降は P6 から P10 程度の濃度に維持される (Figure 1-3)。この特徴的な TH の発生段階的な濃度変化は様々な動物種で確認されており、新生仔における TH の濃度上昇が嗅球、側脳室、海馬歯状回そして小脳において細胞分裂を抑えるという報告もある (Hadj-Sahraoui et al., 2000)。興味深いことにこの TH の血中濃度変化は、プルキンエ細胞の形態変化のタイミングに類似しており、TH の濃度上昇が、目的遺伝子の転写を制御し細胞および組織の発生に関与していると考えられる。

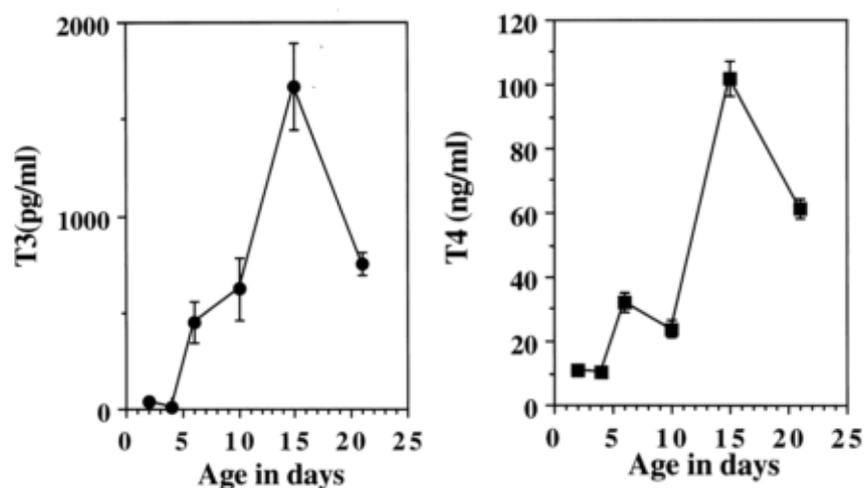


Figure 1-3. マウス新生仔における TH の血中濃度変化 (Hadj-Sahraoui et al., 2000 より抜粋)

TH/TR シグナル経路

TH は、核ホルモンレセプターファミリーの一つである Thyroid hormone receptors (TRs)のリガンドとして働くことが知られている。主な TRs のサブタイプとして TR α 1 および TR β 1 が挙げられる。その遺伝情報は、それぞれ THRA 遺伝子および THRB 遺伝子に由来し、それらの isoform の発現は、選択的 RNA スプライシングやプロモーターによって制御されている (Yen, 2001; O'Shea and Williams, 2002)。TRs の発現は、ヒト胎児では、妊娠 8~10 週目以降に始まる。ラット胎児では TR mRNA は、神経管において E11.5 までに、間脳や菱脳の一部で E12.5 までに確認できる。

TRs は、その目的遺伝子の標的配列 thyroid hormone response element (TRE) に特異的に結合する。そして TRE 上で retinoid X receptor (RXR)と二量体を形成する。TH 非存在下では TR-RXR 複合体は、co-repressor complex と相互作用し、下流遺伝子の転写が抑制される。一方、TH 存在下では co-activator complex などからなる転写活性因子複合体と相互作用し下流遺伝子の転写が促進される (Figure 1-4)。また、TH/TR シグナル経路の co-factor である nuclear receptor corepressor (NcoR) mRNA あるいは steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) mRNA は、発生段階および成体の脳で発現が見られるが、TH 依存的にその mRNA 量に変化することが知られている (Iannacone et al., 2002)。また thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP220) mRNA も胎生脳から成体脳に至るまでの発生段階でその発現パターンが異なる (Galeeva et al., 2002)。つまり発生段階における組織、細胞特異的な TRs と co-factors の発現パターンの違いが、TH の対する応答性を変化させることで各細胞の発生を制御していると考えられる。従って TH/TR シグナル経路の異常は、正常な細胞、組織の発達を阻害する。

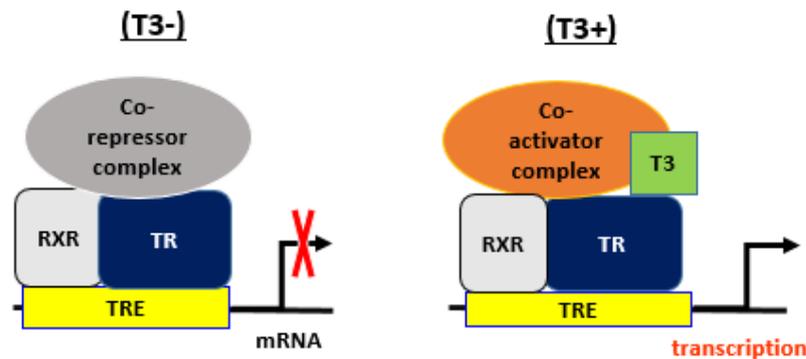


Figure 1-4. TH は目的遺伝子の転写に関わる。

T3 非存在下(T3-)では co-repressor 複合体によって RNA polymerase などの作用を阻害し、T3 の標的遺伝子の転写が阻害される。一方、T3 存在下(T3+)では co-activator 複合体により、促進される。

甲状腺ホルモン低下症 (hypothyroidism)

前述してきたように、TH/TR シグナル経路は、出生前後にかかわらず神経系の発生に重要である。マウス小脳においては生後2週間が、特にTHの影響を受ける時期である(Koibuchi et al., 2003)ため、新生仔の甲状腺ホルモン低下症(hypothyroidism)は、小脳組織の発生に深刻なダメージを与える。例えば、hypothyroidism は、プルキンエ細胞の樹状突起とシナプスの形成を阻害する。(Nicholson and Altman, 1972a; Nicholson and Altman, 1972b; Oppenheimer and Schwartz, 1997; Kimura-Kuroda et al., 2002; Heuer and Mason, 2003)。また、THの主要な受容体であるTR α 1 またはTR β 1 の変異は、プルキンエ細胞の樹状突起形成や小脳顆粒細胞、バークマングリアの成熟および小脳皮質の発達を阻害することが知られている(Morte et al., 2002; Heuer and Mason, 2003; Fauquier et al., 2014; Portella et al., 2010; Yu et al., 2015) (Figure 1-5)。このように小脳の正常な発達にはTH/TR シグナルが不可欠である。しかしどのような分子メカニズムによってプルキンエ細胞をはじめとする神経系の発達が制御されているのか不明な点が多い。

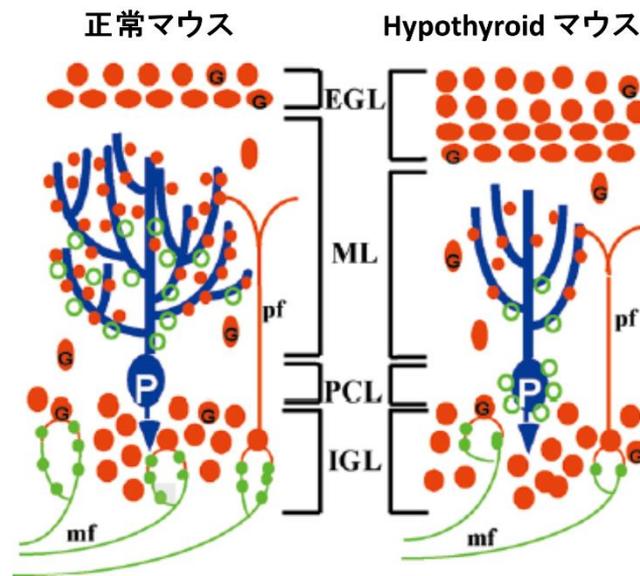


Figure 1-5. 甲状腺ホルモンは、小脳皮質やプルキンエ細胞の発達に密接に関わる。
 (Koibuchi N et al., 2003)を元に改変。Hypothyroid マウスにおいてプルキンエ細胞の樹状突起伸長およびシナプス形成が阻害される。さらに顆粒細胞の分化、移動が遅延し EGL の消失が遅延する。EGL (external granule layer; 外顆粒層)、ML (molecular layer; 分子層)、PCL (Purkinje cell layer; プルキンエ細胞層)、IGL (internal granule layer; 内顆粒層)、G (cerebellar granule cells; 小脳顆粒細胞)、pf (parallel fiber; 平行線維)、mf (mossy fiber; 苔状繊維)

ニューロンにおけるミトコンドリアの機能

ミトコンドリアは、細胞内のおよそ 90% の ATP を酸化的リン酸化によって産生している(Harper and Seifert, 2008)。ミトコンドリア DNA には 37 遺伝子が含まれるが、ミトコンドリア内で作用するおよそ 1200-1500 の遺伝子産物の大半は、核 DNA によってコードされている(DiMauro and Schon, 2003; Schmidt et al., 2010)。ミトコンドリアの機能は、細胞の成長や恒常性の維持に密接に関わっている。その機能は、酸化的リン酸化による ATP 産生だけでなく、細胞内 Ca^{2+} の制御、アポトーシスの制御、 β 酸化、熱産生など多岐にわたる。

ニューロンの樹状突起の発達過程において、ミトコンドリアは、分裂と融合を繰り返し遠位部に輸送される。そのため、プルキンエ細胞の樹状突起中にミトコンドリアは密に存在している。ミトコンドリアは、モータータンパク質の kinesin

によって樹状突起遠位部に輸送されるが、哺乳類ではその輸送を仲介するアダプタータンパク質として Trak1/2 が知られている。この Trak2 の機能阻害は、プルキンエ細胞でミトコンドリアの移動を阻害するだけでなく樹状突起の伸長を妨げることが共同研究者の解析で明らかになった(Fukumitsu et al., 2015)。さらに輸送されたミトコンドリアによる局所的な ATP 供給が、伸長する樹状突起のアクチン代謝に重要であることが証明された(Fukumitsu et al., 2015)。ミトコンドリアの分裂には Dynamin related GTPase (Drp1) が関わるということが知られている (Bleazard et al., 1999; Smirnova et al., 2001)。Drp1 の機能阻害は、正常なミトコンドリアの増殖を阻害し、樹状突起におけるミトコンドリア量が減少するため、樹状突起の伸長が妨げられることがわかっている(Fukumitsu et al., 2016) (Figure 1-6)。これらの研究により、樹状突起局所へのミトコンドリアの輸送と局在が、樹状突起の伸長に重要であることがわかる。しかし、これらの研究はミトコンドリアの機能や遺伝子発現の制御について言及しているわけではなく、樹状突起の発達により急激に増大する細胞容積全体に ATP を供給するにはミトコンドリア量と活性の上昇が必要と考えられるが、プルキンエ細胞においてミトコンドリア生合成の制御経路は、ほとんど明らかになっていない。

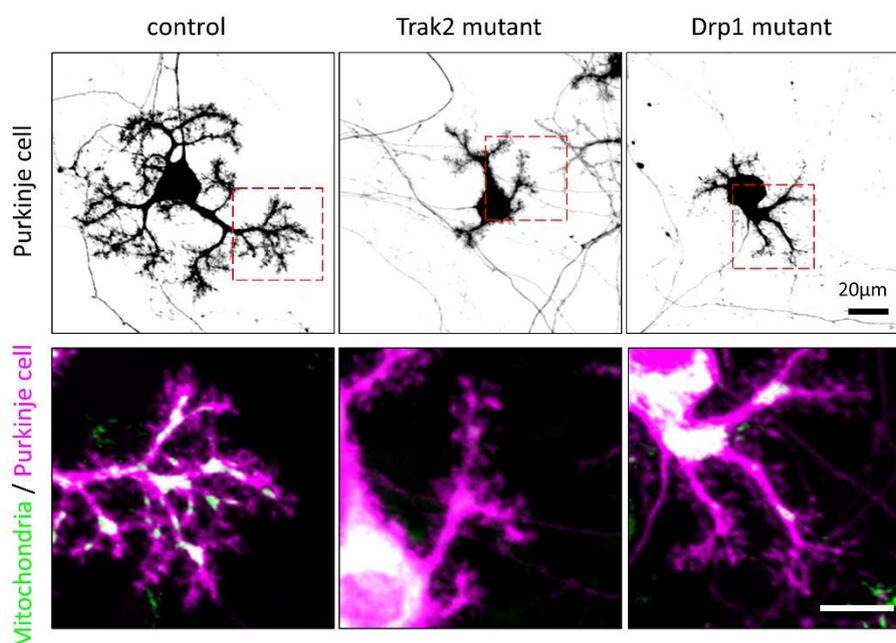


Figure 1-6. ミトコンドリアの輸送と分裂の阻害は、樹状突起形成を阻害する。
(Fukumitsu et al., 2015; Fukumitsu et al., 2016)を元に改変。ミトコンドリアの移動が阻害され

たプルキンエ細胞(TRAK2 mutant)および分裂が阻害されたプルキンエ細胞(Drp1 mutant)では樹状突起の成長が抑制される(上)。このとき樹状突起中のミトコンドリアが減少している(下;ミトコンドリアを mito-EGFP で標識し、プルキンエ細胞を Calbindin 抗体で標識している)。

ミトコンドリア生合成の制御因子

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) co-activator 1 α (PGC-1 α) は、ミトコンドリア生合成のマスター活性化補因子として知られている。PGC-1 α は転写因子である nuclear respiratory factors (NRF1/2) (Wu et al., 1999; Gleyzer et al., 2005; Ryan and Hoogenraad, 2007)や核受容体である estrogen related receptors (ERRs) (Huss et al., 2002; Schreiber et al., 2003) などと結合して活性化させ、下流遺伝子の転写を促進させる。この下流遺伝子には、ミトコンドリア DNA の転写開始を制御する mitochondrial transcription factor A (TFAM) や電子伝達系に関わる COX (cytochrome C oxidase) family や Mitochondrial Complex I-V などミトコンドリアの機能に関わる多くのタンパク質が含まれる。実際に PGC-1 α は、大量のエネルギーを必要とする心筋細胞、骨格筋細胞そしてニューロンなどに強く発現が見られる。

マウス海馬において PGC-1 α の発現は、マウス海馬先端突起中のミトコンドリア密度および ATP 量を制御するだけでなく樹状突起スパインの形成にも関わっていることが知られている(Cheng et al., 2012)。また、ラット大脳皮質ニューロンにおいて PGC-1 α の発現は、ミトコンドリア量と ATP 量を制御し、軸索の伸長に関わることも知られている(Wareski et al., 2009; Vaarmann et al., 2016)。そしてプルキンエ細胞でも PGC-1 α は、ミトコンドリア生合成を制御し、その正常な成長に関わる可能性が考えられる。

TH/TR シグナル経路が制御するミトコンドリア関連因子

TH は、ミトコンドリアの生合成に影響を与えることが知られている。T3 および T4 の目的遺伝子の発現は、核内で TH/TR が直接作用するものと中間分子によって間接的に転写が促進されるものがある。その中間分子に転写因子である NRF1/2、核レセプターの一つである peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) そして転写補因子 PGC-1 α/β などがある(Weitzel and Alexander Iwen, 2011)。PGC-1 α 遺伝子のプロモーター領域には TRE 配列が含まれ、ラット肝臓や下垂体で PGC-1 α の転写は、TH 処理後 6 時間で劇的に上昇する(Wulf et al., 2007; Wulf et al., 2008)ことが報告されている。一方で中間体によって転写が制御されている遺伝子は、24-48 時間以内に上昇する(Weitzel et al., 2003)。このように TH は、複数の経路でミトコンドリアの活性を制御している(Figure 1-7)。

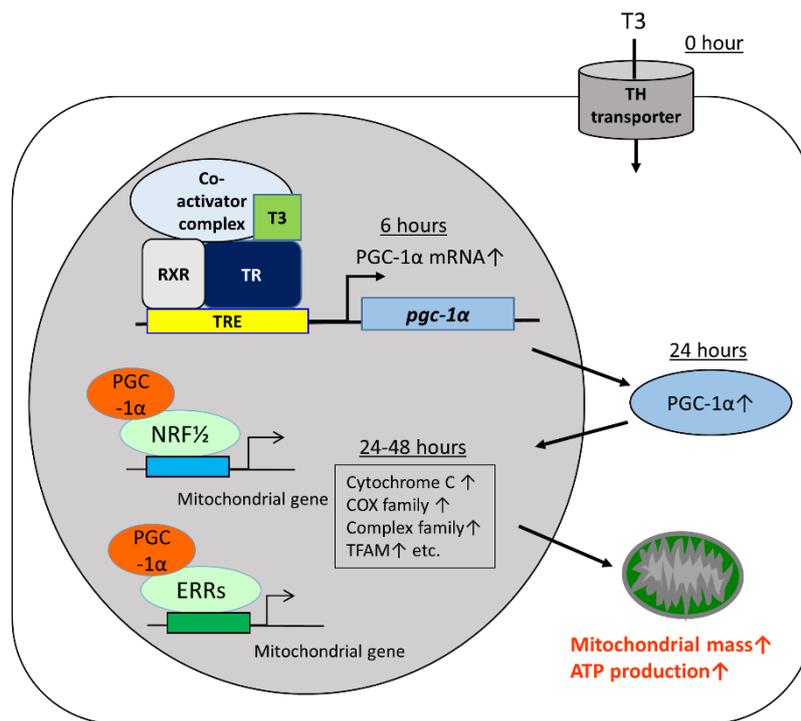


Figure 1-7. TH/TR シグナル経路が制御するミトコンドリア関連因子

T3 が取り込まれた後、6 時間で T3 の目的遺伝子(PGC-1 α)の転写が活性化される。PGC-1 α の発現は 24 時間で上昇する。その後、PGC-1 α は NRF1/2 や ERRs と相互作用し、ミトコンドリア生合成を促進させる。

(目的)

本研究では、甲状腺ホルモン(T3)による小脳プルキンエ細胞の樹状突起形成に焦点を当て、どのような中間因子によって樹状突起形成が制御されているのか調べた。T3は、プルキンエ細胞の樹状突起形成を促進することが報告されているが、どのような中間因子が関わっているのか明らかになっていない。過去に本研究室では、樹状突起を形成していく過程で大量のATPを安定的に供給するためにミトコンドリアが増殖する必要性を論じてきた。本研究では、ミトコンドリアの増殖および活性を制御するPGC-1 α に焦点を当て、T3によって促進される樹状突起形成とPGC-1 α の機能を調べた。

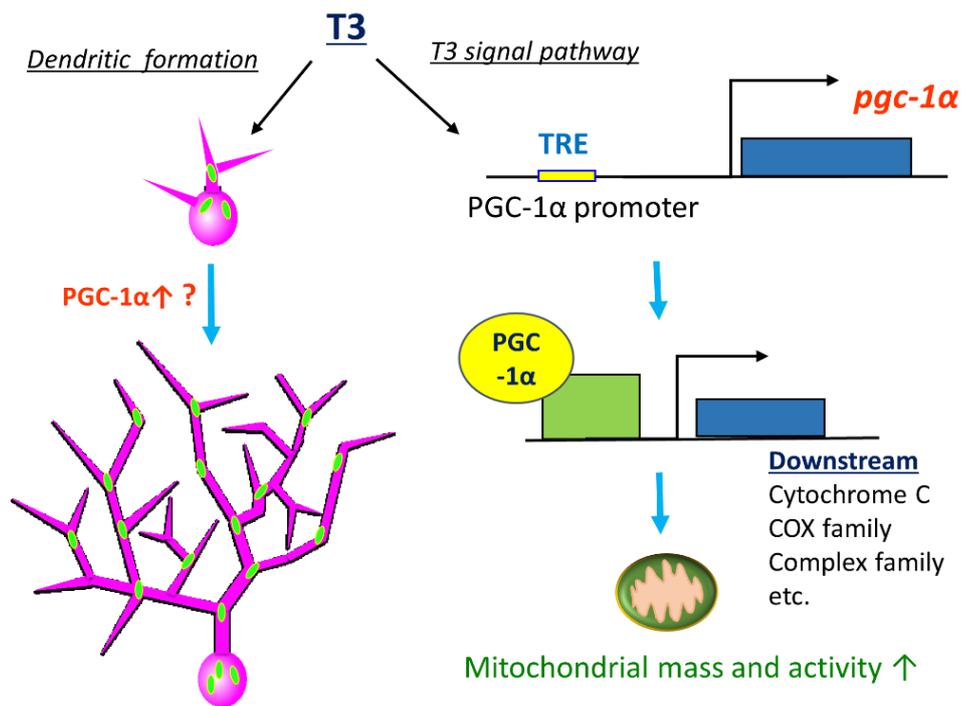


Figure 1-8. 樹状突起形成過程において PGC-1 α はどのように機能するのか。

プルキンエ細胞の樹状突起形成過程においてミトコンドリアは増殖していくと考えられるがその中間因子は不明な点が多い。T3の標的遺伝子の一つでありミトコンドリアの生合成を制御するPGC-1 α が、プルキンエ細胞の樹状突起形成に関わっている可能性を調査した。

第二章

結果

T3 は、プルキンエ細胞の樹状突起形成とミトコンドリア生合成を促進させる。

甲状腺ホルモン(T3) が、神経系の発達に重要であることはすでに知られている(reviewed by Wirth and Meyer, 2017)。しかしどのような制御因子が関わっているのか不明な点が多い。本研究室の過去の研究において、プルキンエ細胞の樹状突起が発達する過程でミトコンドリアが分裂を経て樹状突起へ輸送され、樹状突起の成長に必要なエネルギーを供給することを示した(Fukumitsu et al., 2015)。しかし、樹状突起全長へミトコンドリアを供給するには、分裂と輸送のみでなくミトコンドリアの新規生合成も必要と考えられる。T3 はプルキンエ細胞の樹状突起形成を促進することが報告されており(Nicholson and Altman, 1972a; Nicholson and Altman, 1972b; Oppenheimer and Schwartz, 1997; Kimura-Kuroda et al., 2002; Heuer and Mason, 2003)、またミトコンドリアの機能に影響を与えることが知られているが(Weitzel and Alexander Iwen, 2011)、二つの機能にどのような関連があるのかは明らかでない。そこで筆者は、小脳の分散培養系を用いて、T3 がプルキンエ細胞の樹状突起形成とミトコンドリアの生合成に与える影響を調べた。

まず、T3 未添加の無血清培地 (T3-) と様々な濃度の T3 を添加した培地 (T3+) で培養し、この分散培養系における T3 の樹状突起形成促進効果を調べた。プルキンエ細胞の標識には Calbindin 抗体を用いて、樹状突起の全長および分岐の数を計測・定量化した。T3- では樹状突起の伸長や分岐はほとんど起こらなかった。一方で T3+ では過去の報告にあるように樹状突起の伸長と分岐が促進され(Kimura-Kuroda et al., 2002; Heuer and Mason, 2003)、その効果は 10 nM の時最大となった (Figure 2-1 A,B)。以後の実験では 10 nM の T3 を用いた。

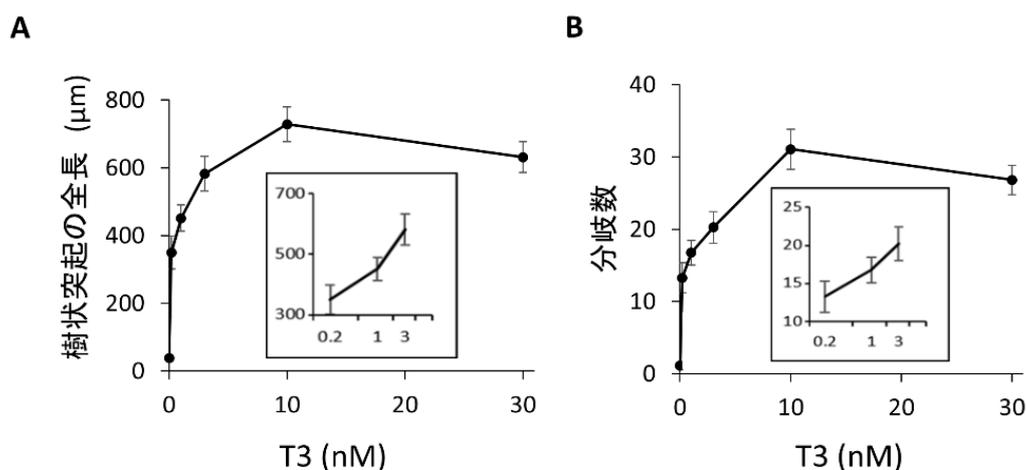


Figure 2-1. T3 は、プルキンエ細胞の樹状突起形成を促進する。

T3 濃度とプルキンエ細胞の樹状突起形成の関係。P0 のマウス小脳を用いて初代培養を行った。様々な濃度の T3 を添加した培地で培養し 10 日目に固定した。(A) 樹状突起の全長。

(B) 樹状突起の分岐数。 $N=30$ for all data points. Data represent mean \pm SEM.

次に、T3 がプルキンエ細胞においてミトコンドリアの増殖や機能を活性化するかどうか調べた。プルキンエ細胞におけるミトコンドリアの分布を可視化するためにアデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus; AAV) をベクターとして Mito-EGFP (Rizzuto et al., 1995) を発現させ、ミトコンドリア量を調べた。その結果、T3-で培養されたプルキンエ細胞に比べて、T3+で培養されたプルキンエ細胞では、ミトコンドリアが樹状突起先端部まで存在し (Figure 2-2A)、細胞全体のミトコンドリア含量が有意に増加していることがわかった (Figure 2-2B)。同時に、ミトコンドリアの活性を調べるために酸化的リン酸化活性の指標となるピルビン酸脱水素酵素抗体 (Pyruvate dehydrogenase; PDH) を用いて免疫染色した (Figure 2-2A)。その結果、T3+のプルキンエ細胞における PDH シグナルは、有意に上昇することがわかった (Figure 2-2C)。従って、T3 は、プルキンエ細胞の樹状突起の伸長だけでなくミトコンドリアの増殖や活性を促進することが示された。

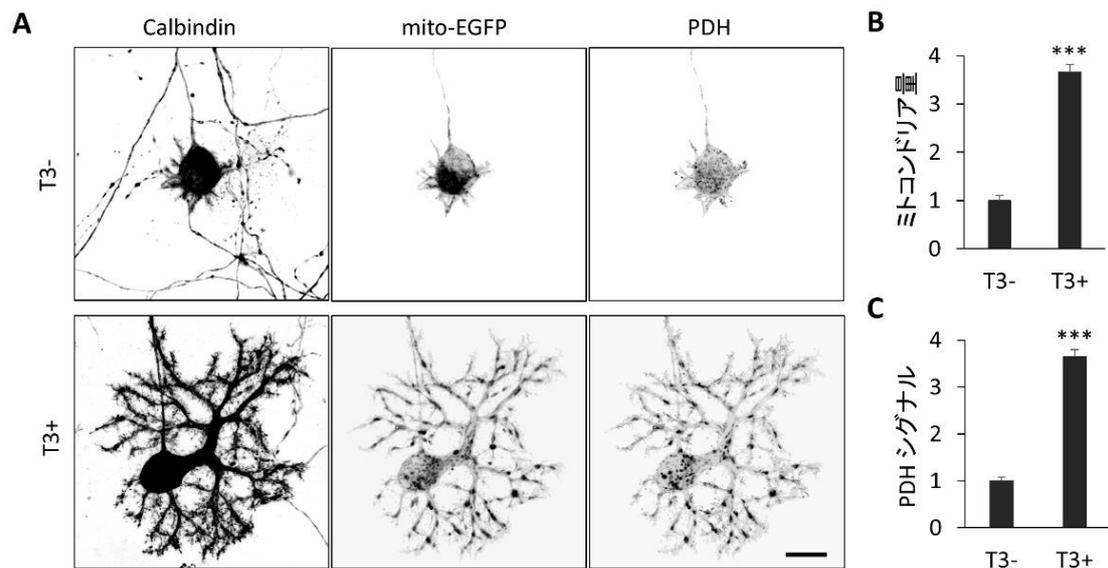


Figure 2-2. ミトコンドリア生合成は T3 によって促進される。

(A) T3 未処理(T3-)で培養したプルキンエ細胞と T3 処理(T3+)で培養したプルキンエ細胞(培養 10 日目)。プルキンエ細胞の標識には Calbindin 抗体を用いた。ミトコンドリアを可視化するために AAV-Mito-EGFP を培地に添加して感染・発現させた。(B,C) T3-または T3+(10 nM)のプルキンエ細胞におけるミトコンドリア分布 (B) と PDH の発現 (C) の定量解析の結果。シグナル強度は、T3-を 1 として計算した。Scale bar, 20 μ m. $N=30$ for all data points. Data represent mean \pm SEM; *** $p<0.001$, Student's t test.

PGC-1 α の発現は、プルキンエ細胞の樹状突起形成時に T3 によって誘導される。

PGC-1 α は、神経細胞においてミトコンドリアの増殖を制御していることが知られている(Wareski et al., 2009; Cheng et al., 2012; Vaarmann et al., 2016)。出生後の小脳においてプルキンエ細胞の成熟と PGC-1 α の発現との関連を調べるために様々な発生段階の小脳の矢状断切片を作製し、Calbindin 抗体および PGC-1 α 抗体を用いて免疫染色した。P3 と P5 においてプルキンエ細胞は、多極性の細長い突起を有し (Figure 1-2, “stellate cells stage”)、P7 以降では分子層に向かって扇状の樹状突起を形成していた(Figure 1-2, “young Purkinje cells stage”)。一方、小脳皮質における PGC-1 α の発現は、“stellate cells stage”にあたる P3 と P5 においては不明瞭であったが、“young Purkinje cells stage”にあたる P7 以降においてプルキ

ンエ細胞の細胞体と樹状突起の近位部に見られるようになった。P30 においては過去の報告のとおりプルキンエ細胞だけでなく分子層や顆粒細胞層の一部のインターニューロンでも発現が見られた (Cowell et al., 2007) (Figures 2-3A,B)。

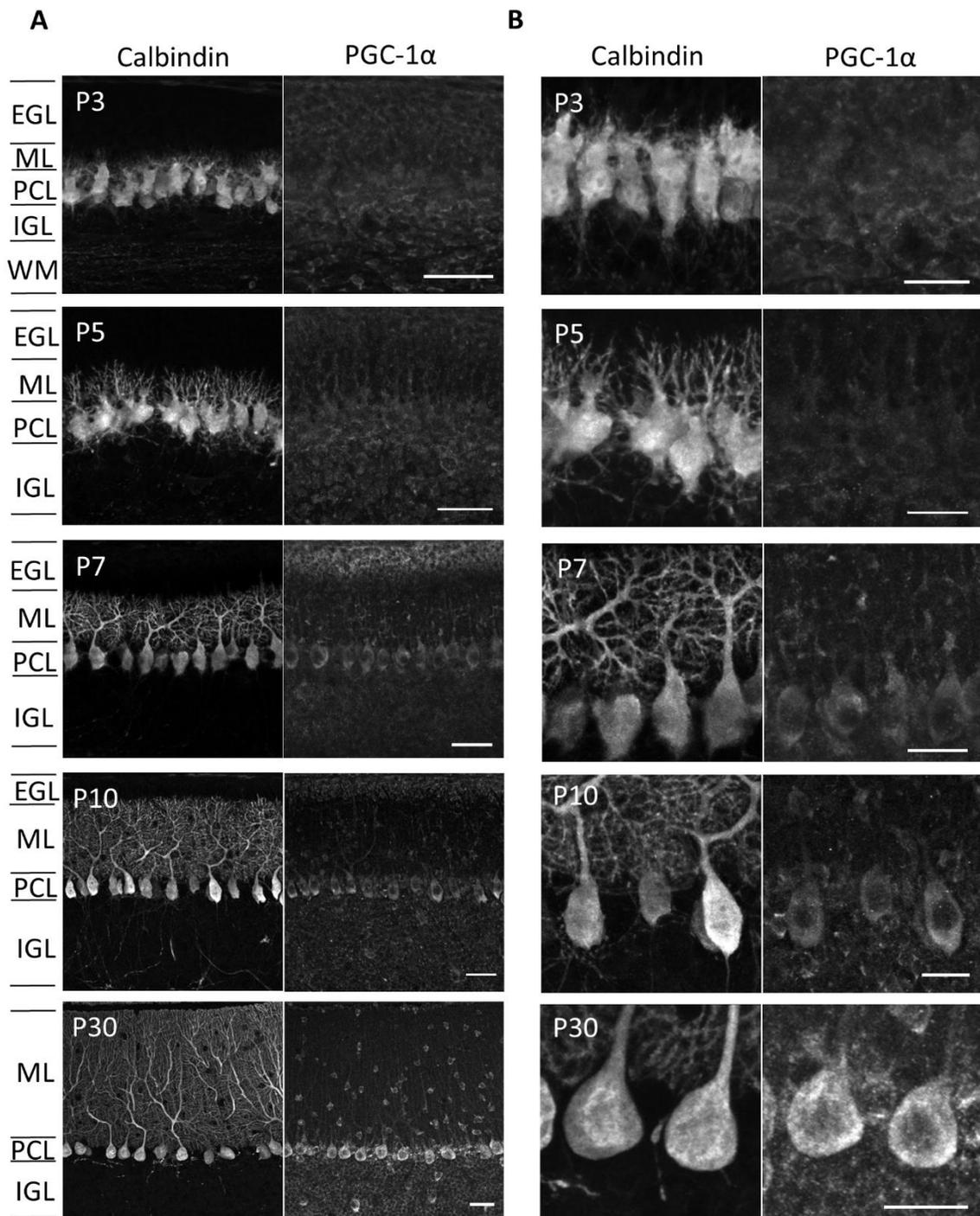


Figure 2-3. 小脳皮質における PGC-1 α の発現

(A,B) 生後日数ごとに小脳皮質の矢状断スライスを作製し、PGC-1 α 抗体および Calbindin 抗体で免疫染色した。(A) 低倍率 (B) 高倍率 Scale bars, 40 μ m (A), 20 μ m (B). EGL, external granule layer (外顆粒層); ML, molecular layer (分子層); PCL, Purkinje cell layer (プルキンエ細胞層); IGL, internal granule layer (内顆粒層); WM, white matter (白質)

次に、薬剤処理により甲状腺ホルモン低下症 (hypothyroid) マウスを作製し、発達途上の小脳皮質における T3 の影響と PGC-1 α の発現の関係性について調べた。Hypothyroid マウスの作製は、甲状腺ホルモン阻害剤である 2-Mercapto-1-methylimidazole (MMI) および Perchlorate monohydrate (PM) を用いた。これらの薬剤を妊娠 18.5 日目から母マウスに飲み水を介して与えた。これらの薬剤は、出産後に母乳を介して新生仔に伝播される。hypothyroid マウスは、正常マウスに比べ成長の遅延が見られた (Figure 2-4)。



Figure 2-4. 生後 14 日目の hypothyroid マウス (右) と正常マウス (左)。

さらに、それぞれのマウスにおいて小脳の矢状断切片を作製し、Calbindin 抗体および PGC-1 α 抗体で免疫染色した。その結果、過去の報告と同様に小脳皮質において EGL の消失やプルキンエ細胞の樹状突起形成に遅延が見られた (Nicholson and Altman, 1972a; Nicholson and Altman, 1972b; Morte et al., 2002)(Figure 2-5)。そして、PGC-1 α の発現は、すべての発達段階で hypothyroid マウスでは正常マウスに比べ有意に低かった。この結果より、T3 はプルキンエ細胞における

PGC-1 α の発現を誘導する可能性が示唆された。しかし、hypothyroid マウスにおいてプルキンエ細胞における PGC-1 α の発現は、P7 から P14 で徐々に増加し (Figure 2-5A-D)、樹状突起伸長が徐々に促進されていた。このことは小脳内で T3 以外の別の因子が PGC-1 α の発現を促進し、樹状突起形成を促進した可能性が考えられる。

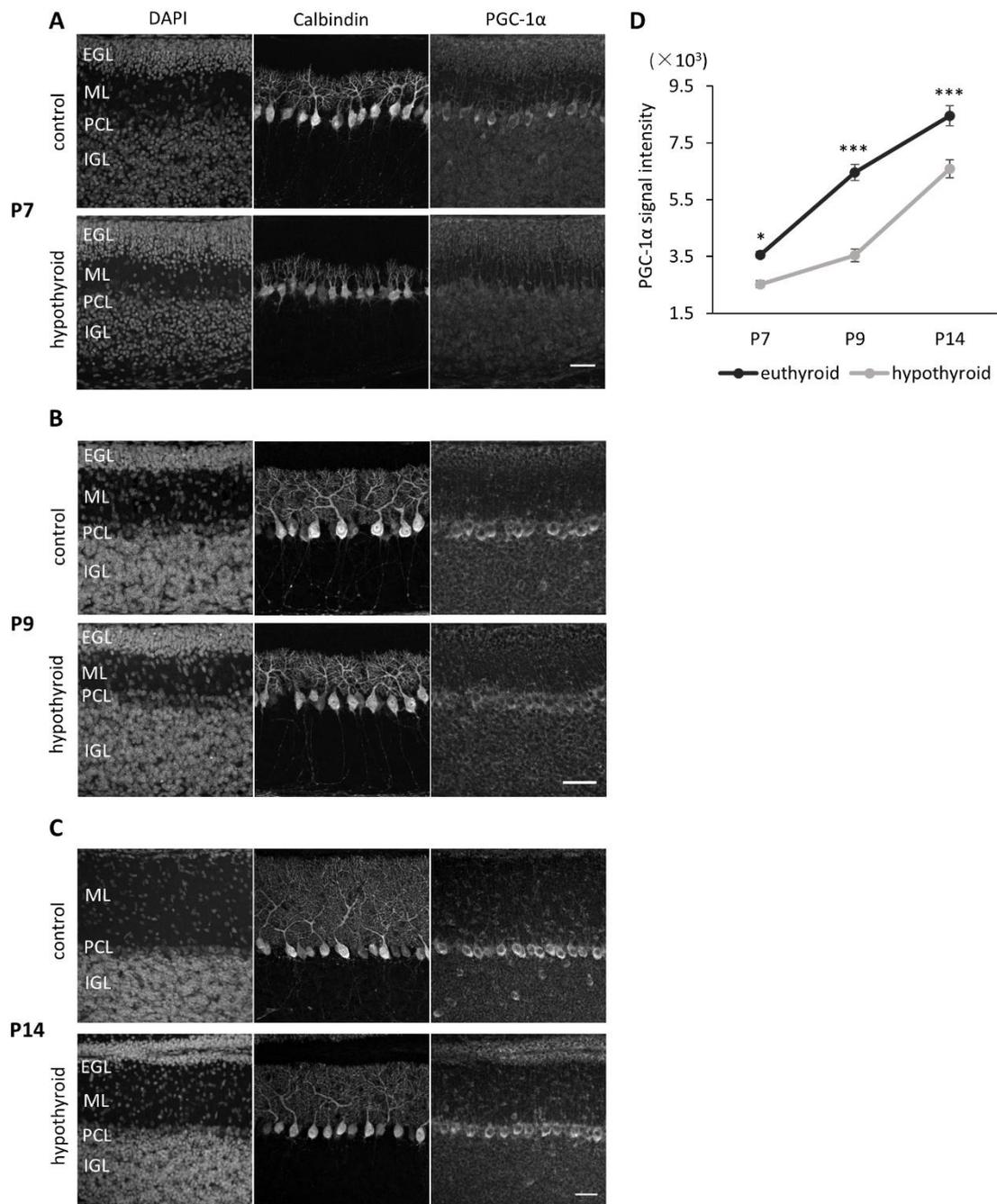


Figure 2-5. hypothyroid マウスのプルキンエ細胞では PGC-1 α の発現が減少する。

(A-C) 生後日数ごとに小脳皮質の矢状断スライスを作製し、PGC-1 α 抗体および Calbindin 抗体で免疫染色し、DAPI で核染色した。PGC-1 α の発現を生後日数ごとに比較した。(A) 7 日目 (B) 9 日目 (C) 14 日目。hypothyroid マウスのプルキンエ細胞において樹状突起形成が抑えられる。Scale bars, 40 μ m. (D) PGC-1 α 発現強度 は hypothyroid で有意に減少する。N=15 for all data points. Values are mean \pm SEM; * p <0.05, *** p <0.001, two-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* analysis.

さらに、小脳の分散培養系を用いて、プルキンエ細胞を T3-または T3+の条件で培養し、T3 の影響と PGC-1 α の発現の関係について調べた。T3+で培養したプルキンエ細胞において、樹状突起は 10 DIV (10 days in vitro ; 培養後 10 日)までに伸展を開始し、14DIV で発達した分枝構造が観察された (Figure 2-6A)。この時、樹状突起の発達に伴って PGC-1 α の発現に顕著な増加が見られた (Figure 2-6A,B)。一方、T3-のプルキンエ細胞では、PGC-1 α の発現は、培養日数と共に僅かに上昇するものの、10DIV および 14DIV において、T3+のものに比べて有意に低かった (Figure 2-6B)。このことから vivo 同様 vitro においても T3 がプルキンエ細胞における PGC-1 α の発現を誘導している可能性が示唆された。

次に、小脳の分散培養系において T3 による PGC-1 α の発現の活性化が他の細胞種でも見られるかどうかを、小脳顆粒細胞で確認した。T3-または T3+の条件で培養したプルキンエ細胞および小脳顆粒細胞を Calbindin 抗体、PAX6 抗体および PGC-1 α 抗体で免疫染色した。PAX6 陽性の小脳顆粒細胞における PGC-1 α の発現に T3 添加による有意な変化は見られなかった (Figure 2-7A,B)。このことから、T3 による PGC-1 α の発現は、プルキンエ細胞において誘導されることが示された。

また、PGC-1 α の発現が、T3 によって直接誘導されるかどうか調べるために、PGC-1 α promoter-luciferase をプルキンエ細胞に導入し T3 添加前後における発光強度の変化を調べた。しかし個々の細胞における発現振動が大きく、一細胞あたりの発光強度の変化を捕捉することが難しかった (データ示さず)。そこで PGC-1 α の発現量の変化を免疫染色法によって調べた。TRE 領域を持つ T3/TR の目的遺伝子の発現の上昇は、T3 添加後 24 時間で肝臓や下垂体において確認される

(Wulf et al., 2007; Wulf et al., 2008)(Figure 1-7)。T3-の条件で9日目まで培養したプルキンエ細胞にT3(10 nM)または溶媒のみを添加した後、24時間後に固定し、PGC-1 α の発現を比較解析した。その結果、PGC-1 α の発現は、T3+のプルキンエ細胞において細胞質に強く見られ(Figure 2-8A)、有意に増加することがわかった(Figure 2-8B)。これらの結果は、T3がプルキンエ細胞の樹状突起形成期においてPGC-1 α の発現開始を制御していることを示唆している。

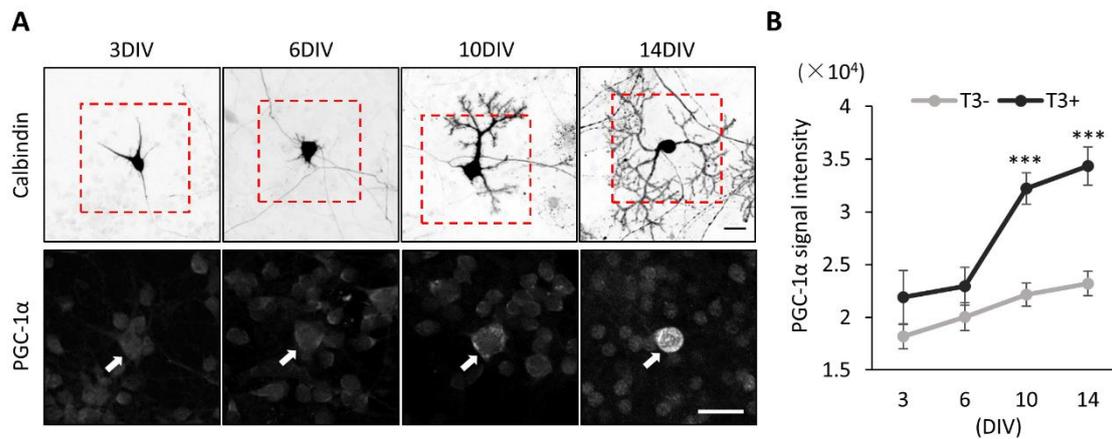


Figure 2-6. PGC-1 α の発現は、樹状突起の形成に伴って上昇する。

小脳の分散培養を行い、T3 処理した培養系(T3+)と未処理(T3-)のものをそれぞれ用意した。(A) T3 処理した分散培養系を表示した培養日数で固定し、Calbindin 抗体および PGC-1 α 抗体で免疫染色した。下図は上図の破線部を拡大したものである。プルキンエ細胞における PGC-1 α の発現 (矢印) は、培養 6 日目 (6DIV) から徐々に増加した。Scale bar, 20 μ m. (B) PGC-1 α 発現レベルの定量解析。細胞体内の PGC-1 α 発現強度の平均値を測定し比較した。N=15 for all data points. Values are mean \pm SEM; *** p <0.001, two-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* analysis.

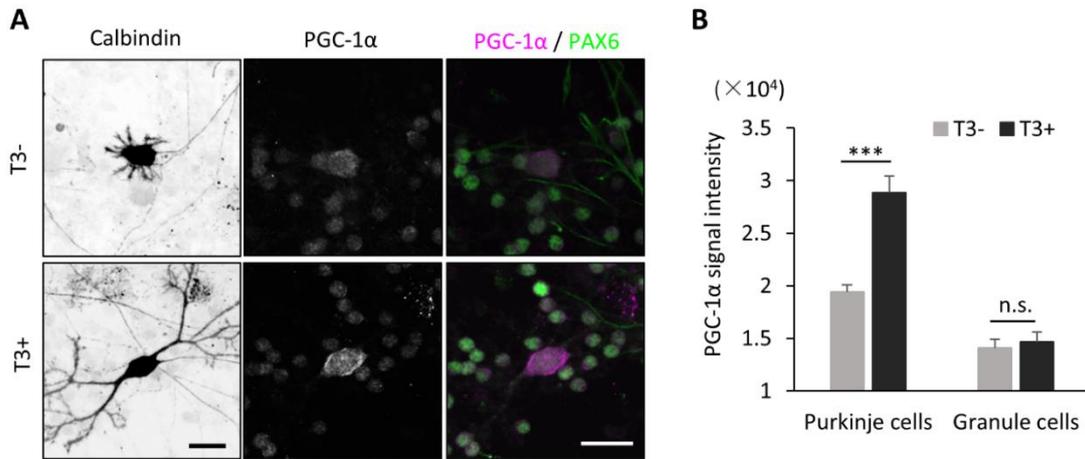


Figure 2-7. PGC-1 α の発現は、T3 処理したプルキンエ細胞において誘導される。

(A) T3-と T3+の培養系を培養 10 日目まで固定し、それぞれ Calbindin 抗体 (左)、PGC-1 α 抗体 (中、右; マゼンタ) そして PAX6 抗体 (右; 緑) で免疫染色した。Scale bars, 20 μ m. (B) T3-と T3+のプルキンエ細胞と小脳顆粒細胞(PAX6 陽性細胞)における PGC-1 α 発現レベルの定量解析。N=15 for all data points. Values are mean \pm SEM; *** p <0.001, Student's t test.

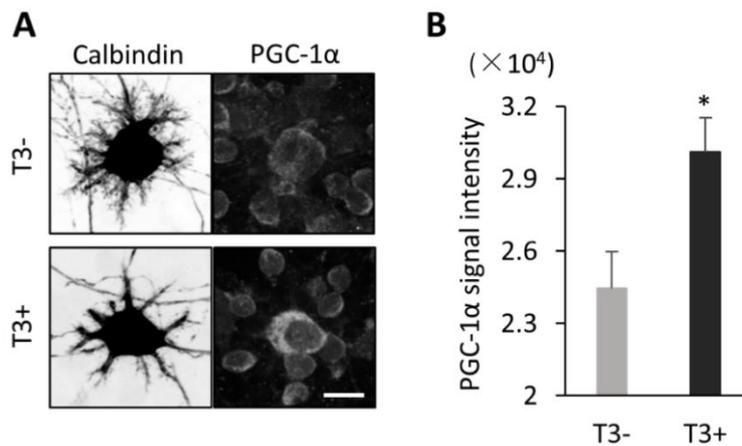


Figure 2-8. PGC-1 α の発現はプルキンエ細胞において T3 処理後 24 時間で上昇する。

(A) T3-の条件で 9 日目まで培養した。T3 処理して 24 時間後に固定し PGC-1 α の発現を調べた。Scale bar, 10 μ m. (B) T3 処理後 24 時間で PGC-1 α が有意に増加する。N=15 for all data points. Values are mean \pm SEM; * p <0.05, Student's t test.

PGC-1 α は、T3 によって促進される樹状突起形成に必要である。

前述の結果から、プルキンエ細胞において T3 は、PGC-1 α の発現を制御していることがわかった。そこで T3 による樹状突起形成に PGC-1 α の発現が関与しているのか調べるために、T3+培養下のプルキンエ細胞で PGC-1 α のノックダウンを行い、樹状突起形成に及ぼす影響を調べた。まず、HEK293T 細胞に PGC-1 α -mCherry および scramble shRNA または PGC-1 α shRNA を導入し、ノックダウンの効果をウエスタンブロッティング法により調べたところ、PGC-1 α shRNA は、強制発現させた PGC-1 α の発現を効果的に抑えることがわかった (Figure 2-9A)。次に、プルキンエ細胞に対して scramble shRNA または PGC-1 α shRNA を導入し、内在性の PGC-1 α が消失しているかどうかを免疫組織化学的に確認した。PGC-1 α shRNA を導入されたプルキンエ細胞では内在性の PGC-1 α が明らかに減少した (Figure 2-9B)。さらに、PGC-1 α の下流遺伝子の一つである COX-IV も著しく減少した (Figure 2-9C)。これらの結果より、使用した shRNA ベクターは、効果的にプルキンエ細胞における内在性 PGC-1 α の発現をノックダウンさせることがわかった。

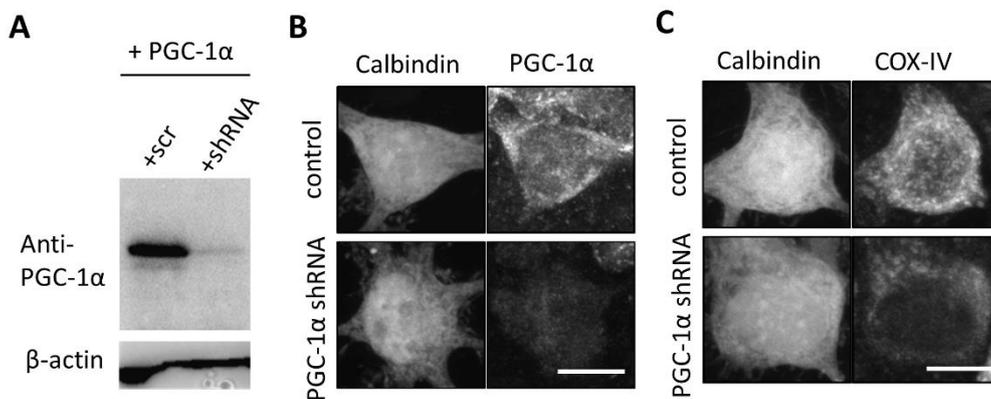


Figure 2-9. PGC-1 α shRNA は PGC-1 α の発現を抑える。

(A) HEK293T 細胞に PGC-1 α -mCherry (+ PGC-1 α) および scramble shRNA (scr) または PGC-1 α shRNA (shRNA) を導入した。PGC-1 α 抗体と β -actin 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。(B,C) scramble shRNA (control) または PGC-1 α shRNA を遺伝子導入したプルキンエ細胞を培養 10 日目で固定し、Calbindin 抗体、PGC-1 α 抗体 (B) そして COX-IV 抗体 (C) で免疫染色した。Scale bars, 10 μ m.

次に、PGC-1 α の発現が、プルキンエ細胞の樹状突起形成に必要なかどうか調べた。T3-または T3+の条件で培養したプルキンエ細胞において scramble shRNA または PGC-1 α shRNA を導入し、樹状突起形成が阻害されるかどうか検証した。また、その際のミトコンドリアの活性を確認するために PDH 抗体で免疫染色した。その結果、T3+の条件下の培養系において PGC-1 α shRNA を導入されたプルキンエ細胞では樹状突起の全長および分岐数は有意に減少し、PDH のシグナル強度も有意に減少した(Figure 2-10A-D)。さらに、これらの表現型がオフターゲットでないことを証明するために、PGC-1 α shRNA に対して抵抗性のある PGC-1 α 変異配列 (rescue) を過剰発現させた。その結果、分岐数は有意に回復しなかったが、樹状突起全長および PDH のシグナル強度は有意に回復した (Figure 2-10A-D)。

一方で、T3-のプルキンエ細胞では PGC-1 α ノックダウンしても樹状突起の全長および分岐数に差は見られなかった (Figure 2-11)。このことから T3 によって促進される樹状突起形成に PGC-1 α の発現およびミトコンドリアの活性増加が必要であることがわかった。

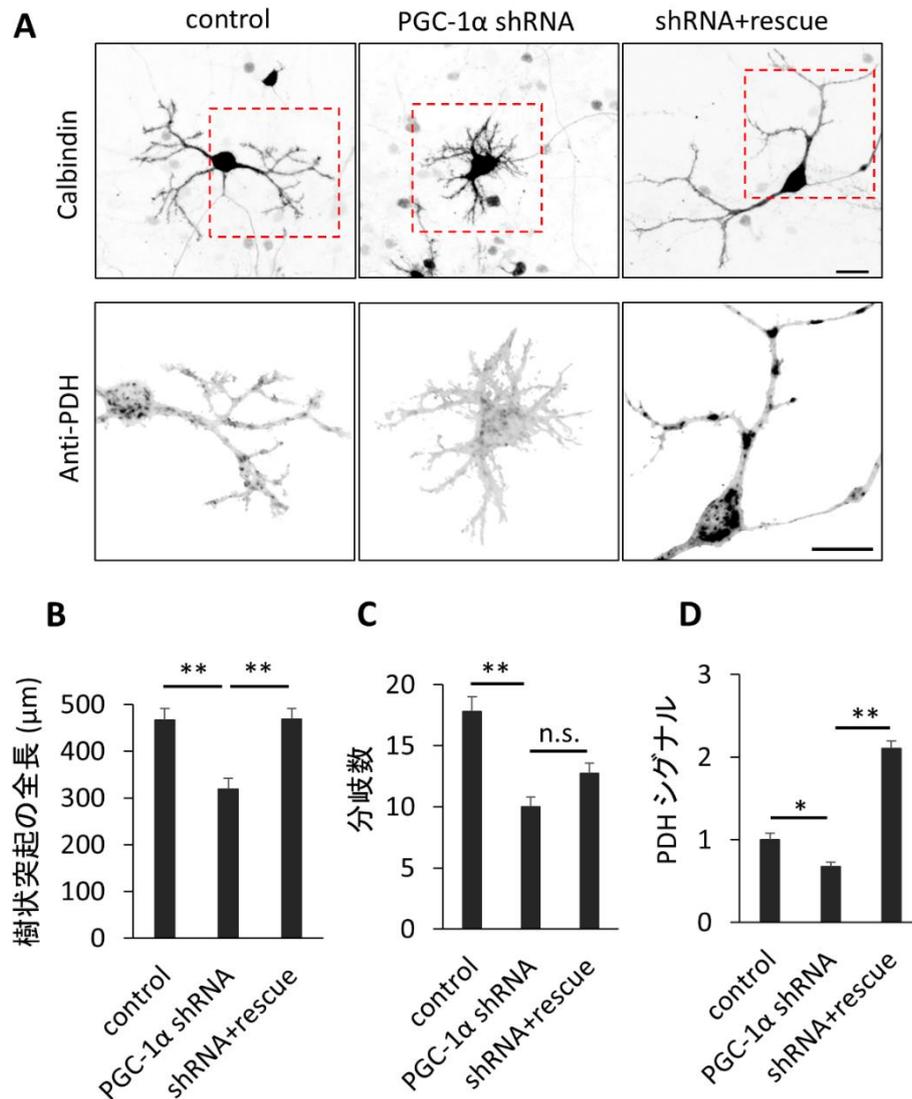


Figure 2-10. T3 により促進される樹状突起形成およびミトコンドリアの活性は、PGC-1α のノックダウンにより阻害される。

(A) PGC-1α scramble (control)、PGC-1α shRNA そして PGC-1α shRNA および PGC-1α resistant mutant (shRNA+rescue) を遺伝子導入したプルキンエ細胞を T3+で 10 日間培養し、Calbindin 抗体および PDH 抗体で免疫染色した。下図は、上図の破線部の拡大図である。Scale bars, 20μm. (B-D) 樹状突起全長 (B)、分岐数 (C) そして PDH シグナル強度 (D) の定量解析。Data represent mean±SEM, N=30 for each point, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, one-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* analysis.

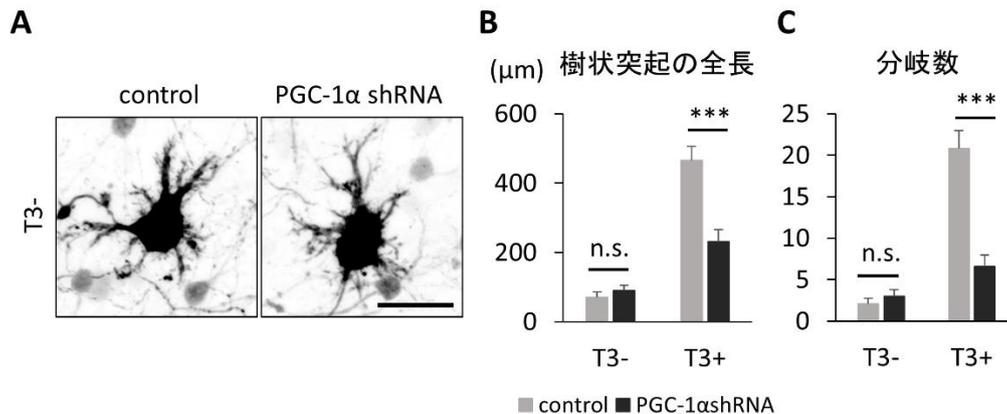


Figure 2-11. T3 非存在下では樹状突起形成に PGC-1α ノックダウンは影響しない。

(A) scramble shRNA (control) または PGC-1α shRNA を遺伝子導入したプルキンエ細胞を T3-で培養し、培養 10 日目に固定した。Scale bar, 20μm. (B,C) T3-または T3+の培養下でプルキンエ細胞の樹状突起形成に対する PGC-1α ノックダウンの影響を定量的に解析した。N=15 for all data points. Mean±SEM; *** p <0.001, Student's t test.

PGC-1α は、プルキンエ細胞の形態変化と樹状突起スパインの成熟に関与している。

正常小脳発生においても PGC-1α が樹状突起形成に必要であるかどうか調べるために、子宮内電気穿孔法を用いて E11.5 のマウス胎児の第四脳室に scramble shRNA または PGC-1α shRNA を導入後、P14 に固定した。PGC-1α shRNA を導入されたプルキンエ細胞において PGC-1α の発現の消失を確認した (Figure 2-12B)。scramble shRNA を導入した P14 のプルキンエ細胞では複雑に分岐した一つの一次樹状突起を有し、これが軟膜表面まで達していた。しかし PGC-1α shRNA が導入されたプルキンエ細胞では伸長が阻害され樹状突起は軟膜表面まで到達せず、分岐が少なく短い一次樹状突起が、複数存在した (Figure 2-12A)。この時、樹状突起全長・分岐数とも有意に低下していた (Figure 2-12C)。この表現型は、樹状突起形成前の多極性の突起を有した”stellate cells shape”(Figure 1-2)に類似しており、PGC-1α のノックダウンがプルキンエ細胞の”young Purkinje cells shape”(Figure 1-2)への正常な形態分化を阻害した可能性が考えられる。

さらに PGC-1 α の発現が、プルキンエ細胞の樹状突起スパイン（棘突起）の成熟に与える影響を調べた。未熟なスパインはフィロポディア様の細長い突起であるが、成熟したスパインではマッシュルーム様の形態を呈することが知られている。P14 のコントロールの細胞では成熟したマッシュルーム様の樹状突起スパインが数多く確認できた。一方で PGC-1 α がノックダウンされた細胞では細長い未熟なフィロポディア様のスパインが顕著になり、その密度も減少した (Figure 2-13)。このことは、PGC-1 α は、プルキンエ細胞の樹状突起形成だけでなくスパインの成熟にも関与していることを示唆している。

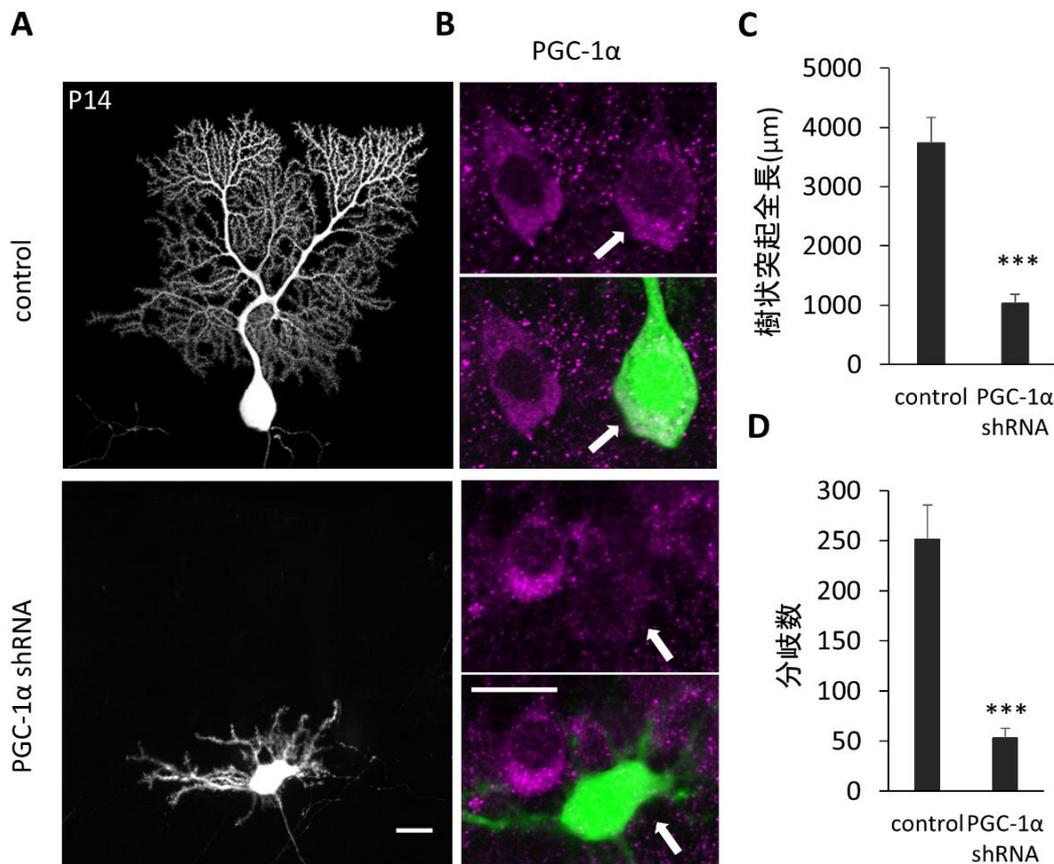


Figure 2-12. PGC-1 α のノックダウンは、プルキンエ細胞の樹状突起形成を阻害する。

(A) E11.5 のマウス胎児に子宮内電気穿孔法により scramble shRNA (control) または PGC-1 α shRNA を導入し、生後 14 日目に固定した。Scale bars, 20 μ m. (B)(A)の拡大図。プルキンエ細胞の形態は緑で PGC-1 α の発現はマゼンタで示している。(C,D) 樹状突起全長 (C) および分岐数 (D) の定量解析を行った。Data represent mean \pm SEM, N=12 cells from 3 mice, *** p <0.001, Student's t test.

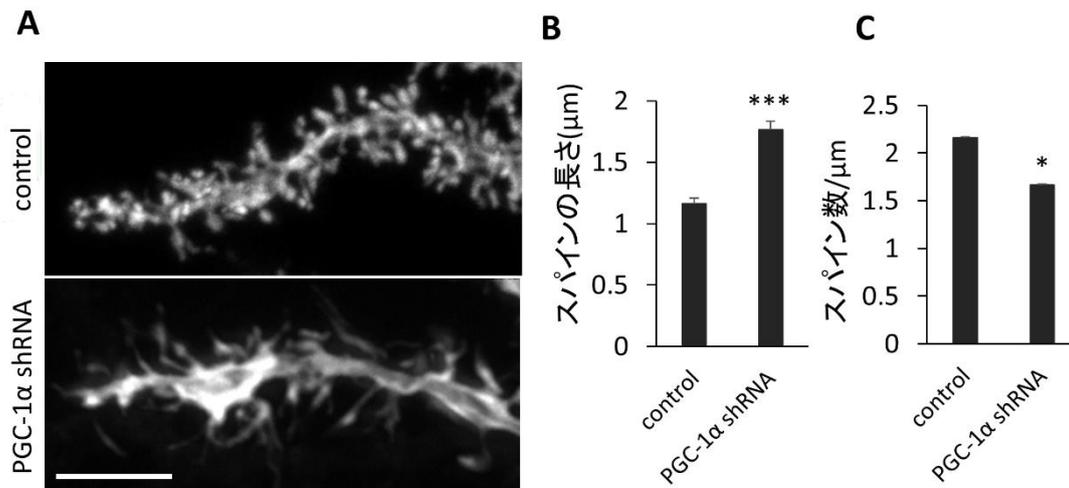


Figure 2-13. PGC-1 α ノックダウンは、樹状突起スパインの成熟を阻害する。

(A) 樹状突起先端部の拡大図。Scale bar, 5 μ m. (B,C) スパインの長さ (B) と 1 μ mあたりの数 (C) の定量解析と比較。Data represent mean \pm SEM, N=200(control) and N=259 (PGC1 α shRNA). *** p <0.001,* p <0.05, Student's t test.

PGC-1 α 関連因子とプルキンエ細胞の形態分化との関係

T3 によって促進される樹状突起形成に PGC-1 α によって活性化されるその他の因子がどのように関わっているのか調べるために転写因子 NRF1 に注目した。NRF1 は、転写補因子である PGC-1 α により活性化されミトコンドリア関連遺伝子の転写を活性化することが知られている(Wu et al., 1999; Gleyzer et al., 2005) (Figure 1-7)。NRF1 の C 末端を欠いた変異体 (NRF1DN) は、PGC-1 α と結合することができるが、その下流遺伝子の標的部位と結合することができない。NRF1DN の過剰発現は、PGC-1 α の下流遺伝子の転写を抑制しミトコンドリア密度を減少させることが報告されている (Wu et al., 1999; Vaarmann et al., 2016) (Figure 2-14A)。そこで T3+の条件下でプルキンエ細胞に EGFP (control)または NRF1DN を過剰発現させ、ミトコンドリア関連遺伝子(PDH)の発現と、プルキンエ細胞の樹状突起形成に与える影響を調べた。NRF1DN を過剰発現させたプルキンエ細胞では、コントロール細胞に比べ樹状突起の全長、分岐数および PDH

のシグナル強度が有意に減少した (Figure 2-14B-E)。この時、NRF1DN の過剰発現によって得られた表現型は、矮小ではあるが”young Purkinje cells stage”(Figure 1-2)で見られるような樹状突起が観察された。この結果より、PGC-1 α と NRF1 の相互作用は、ミトコンドリア生合成の活性化に寄与し、”young Purkinje cells stage”(Figure 1-2) 以降の樹状突起形成に必要であると考えられる。

また、転写抑制補因子 Receptor-interacting protein 140 (RIP140)は、PGC-1 α とは逆にミトコンドリア生合成を抑える効果があることが知られている (Hock and Kralli, 2009)。さらに RIP140 と PGC-1 α は、競合的に TR と結合し T3/TR シグナルの下流遺伝子の転写を制御していることも知られている (Wei and Hu, 2004)。T3+の条件下でプルキンエ細胞に RIP140 を過剰発現させ、プルキンエ細胞の樹状突起形成に与える影響を調べた。RIP140 の過剰発現は、T3+での樹状突起形成および PDH の発現を有意に抑制した (Figure 2-14B-E)。そしてその表現型は、NRF1DN の表現型と異なり、fusiform stage や stellate cell stage に観察されるものと類似した細長い神経突起が見られた。この結果は、RIP140 が、ミトコンドリアの生合成だけでなく T3/TR シグナル経路を抑制し、プルキンエ細胞の形態分化を抑制する可能性を示唆している。

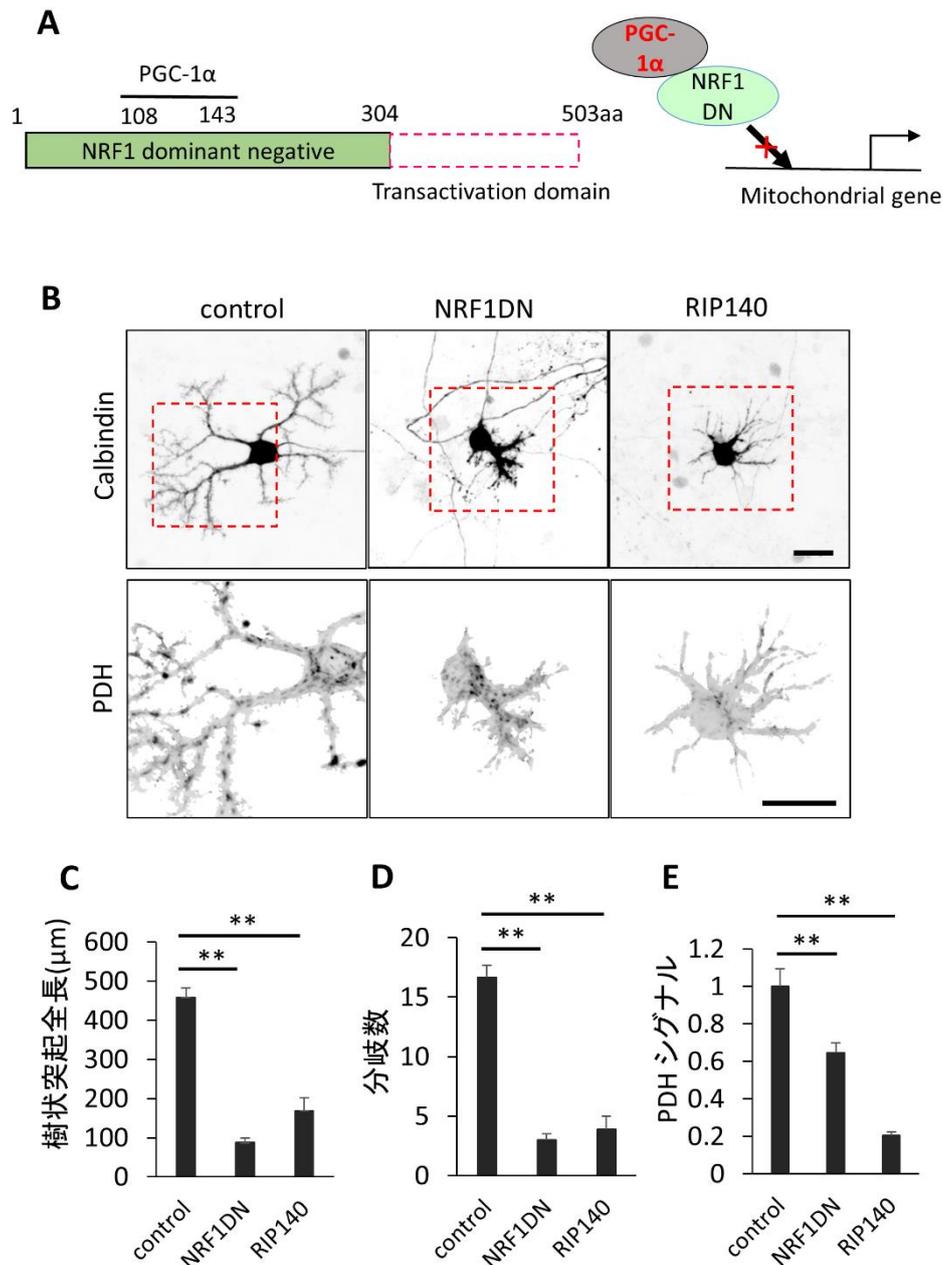


Figure 2-14. PGC-1 α 機能の阻害は、プルキンエ細胞における樹状突起形成とミトコンドリアの活性を阻害する。(A) NRF1DN は、C 末端の転写活性部位を欠く。PGC-1 α と結合しその活性化補因子としての機能を阻害する。(B) EGFP(control)、EGFP-NRF1DN (NRF1DN) または FLAG-RIP140 (RIP140) を強制発現させたプルキンエ細胞を 10 日間培養した。下図は上図破線部の拡大。Scale bars, 20 μ m. (C-E) 樹状突起全長 (C)、分岐数 (D) および PDH シグナル強度 (E) の定量解析。N=40 cells for control, 30 cells for NRF1DN and RIP140. Data represent mean \pm SEM, ** p <0.01, one-way ANOVA with Tukey Kramer HSD tests.

PGC-1 α の発現は、樹状突起伸長を促進させる。

これまで PGC-1 α の発現が、T3 によって促進される樹状突起形成に必要であることを示してきた。次に T3-の条件下で PGC-1 α が、プルキンエ細胞の樹状突起形成を誘導するのに十分かどうか調べるために、PGC-1 α の過剰発現をプルキンエ細胞に行い、T3-または T3+の条件で培養した。プルキンエ細胞に tdTomato (control) または PGC-1 α -mCherry (+PGC-1 α) を導入し、樹状突起形成が促進されるかどうか検証した。プルキンエ細胞は Calbindin 抗体および PDH 抗体で免疫染色した。興味深いことに T3-条件下のコントロールのプルキンエ細胞では樹状突起伸長がほとんど起こらないにもかかわらず、PGC-1 α を過剰発現したプルキンエ細胞では樹状突起形成が促進され、PDH シグナルも増加した (Figure 2-15A,C-E)。しかし樹状突起全長・分岐数とも T3 存在下に比べると小さかった。一方、T3+の条件下で同様の実験を行うと、PGC-1 α を過剰発現しても PDH シグナルは増加したにもかかわらず、樹状突起形成の促進は見られなかった (Figure 2-15B-E)。T3 存在下ではミトコンドリアの活性は十分であるため、それ以上の活性化によって樹状突起形成が促進されるわけではないと考えられる。以上の結果より、T3 による樹状突起伸長には、PGC-1 α の発現によるミトコンドリア生合成が必要かつ十分であることがわかった。しかし T3 による樹状突起成長効果は PGC-1 α 発現のみでは完全に回復しないことから、PGC-1 α 発現の作用は部分的で、別の下流因子も必要であることが示唆された。

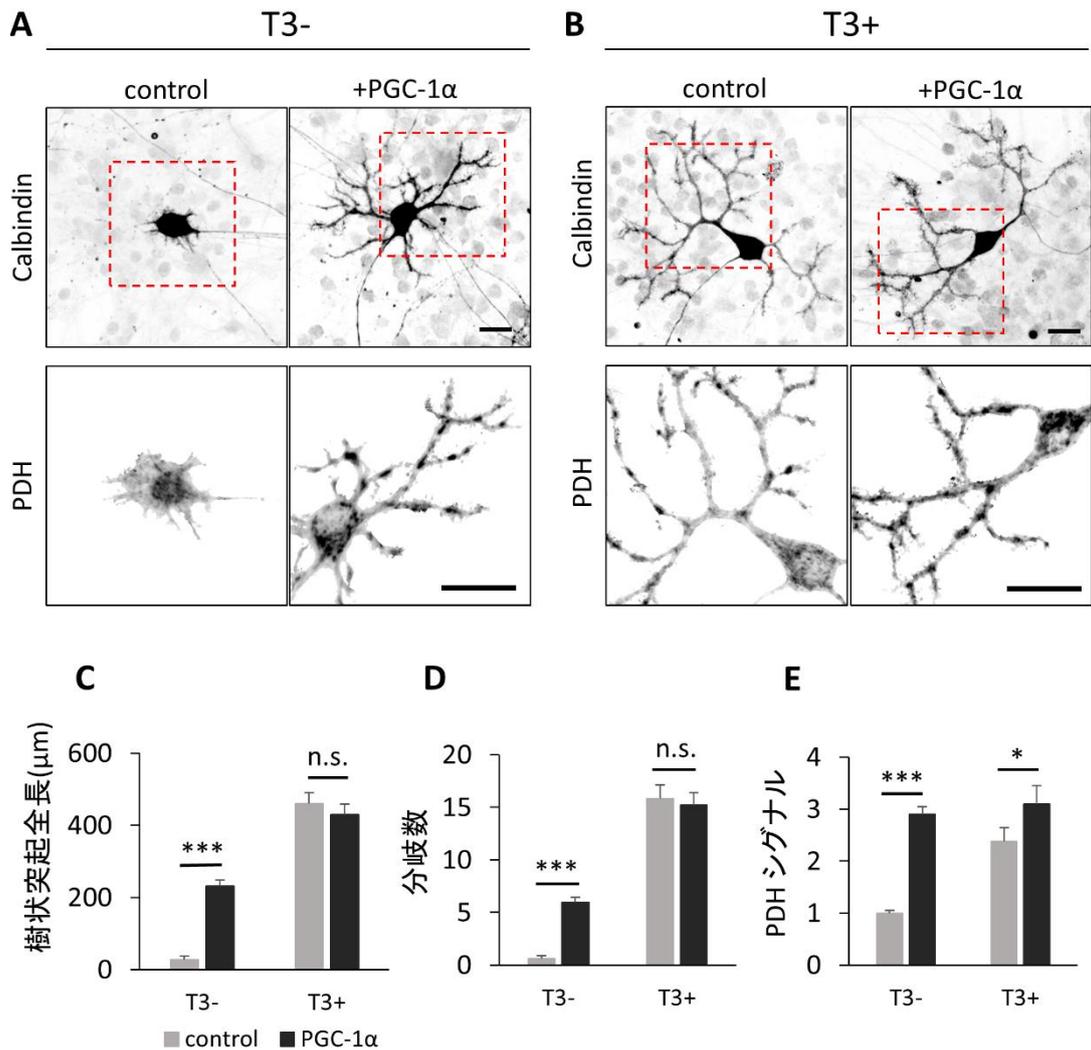


Figure 2-15. PGC-1α の過剰発現は、T3 非存在下のプルキンエ細胞における樹状突起形成を促進する。 (A,B) td-Tomato(control)または PGC-1α-mCherry(+PGC-1α)を導入したプルキンエ細胞を T3- (A) または T3+ (B) で 10 日間培養した。下図は上図破線部の拡大。Scale bars, 20μm. (C-E) 樹状突起の全長 (C)、分岐数 (D) そして PDH シグナル強度 (E) の定量解析を行った。N=30 for all data points. Mean±SEM; *** p <0.001 and * p <0.05, Student's t test.

最後に T3-の条件下で PGC-1α 同様、NRF1 の過剰発現が、プルキンエ細胞の樹状突起形成を促進するかどうか検証した。T3-または T3+の条件下で、EGFP (control)または NRF1 (+NRF1)を過剰発現させたプルキンエ細胞を培養し、Calbindin 抗体および PDH 抗体で免疫染色した。T3-において NRF1 の過剰発現

は樹状突起の形成は促進しなかった。また、PDH の発現量に有意な増加は見られなかった。これは T3 により発現誘導されるのは PGC-1 α であり、PGC-1 α の発現がない T3- で NRF1 が下流遺伝子の発現誘導ができなかったためと考えられる。一方で、T3+ の条件下で +NRF1 のプルキンエ細胞では PDH のシグナルが有意に増加したにもかかわらず、樹状突起全長や分岐数に影響はみられなかった (Figure 2-16)。この結果は、T3 存在下では PGC-1 α の発現およびミトコンドリアの活性は十分であり、ミトコンドリアの機能を活性化しても樹状突起形成が促進されるわけではないということを示している。以上の結果より、T3 により誘導されるプルキンエ細胞樹状突起伸長には PGC-1 α の発現が不可欠であると考えられる。

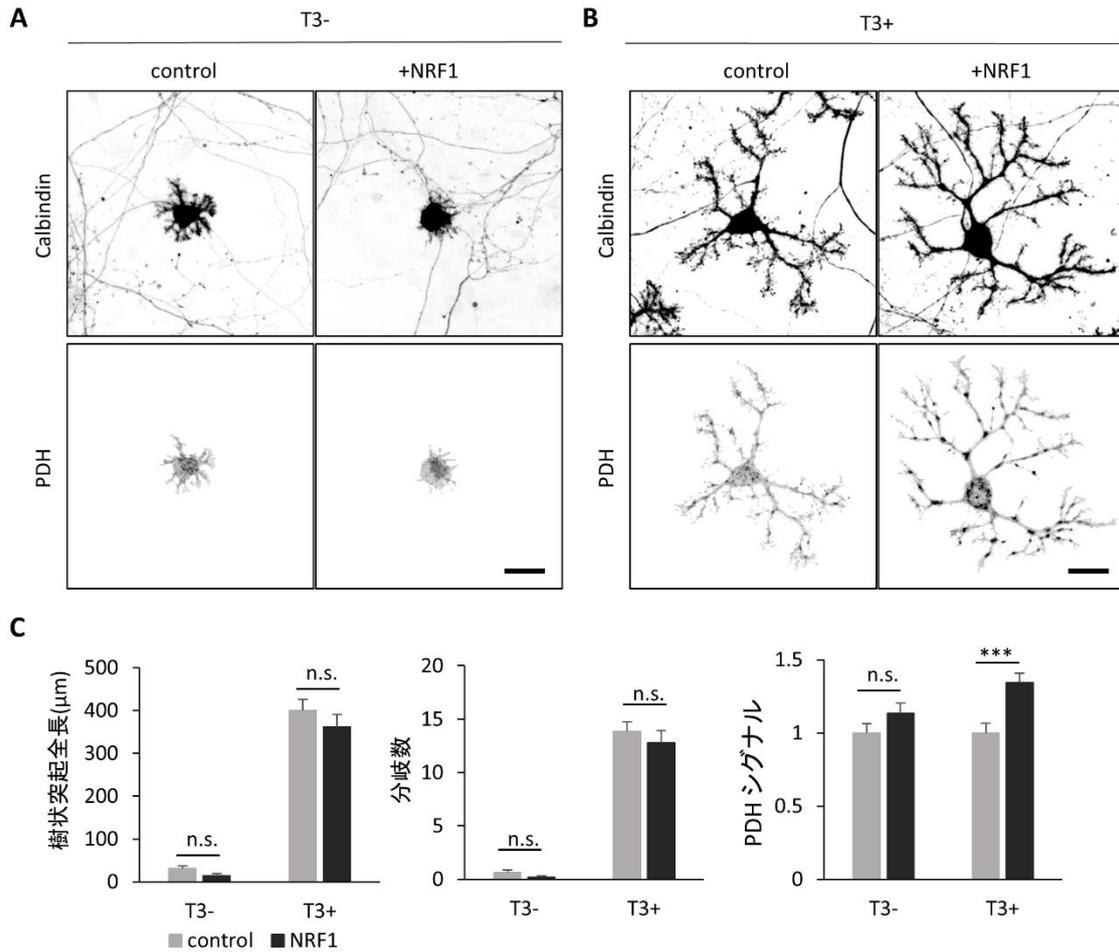


Figure 2-16. NRF1 の過剰発現は樹状突起形成に影響を与えない。

(A) EGFP (control) または EGFP-NRF1 (+NRF1) を導入したプルキンエ細胞を T3- (A) または T3+ (B) で 10 日間培養した。Scale bars, 20μm. (C-E) 樹状突起の全長 (C)、分岐数 (D) そして PDH シグナル強度 (E) の定量解析を行った。N=30 for all data points. Mean±SEM; *** p <0.001, Student's t test.

第三章

考察

ミトコンドリアは好気呼吸によって細胞内 ATP の大半を産生している。樹状突起が発達していく過程で大量の ATP を必要とするため、ミトコンドリアは増殖しその活性を増大させるはずである。本研究において T3 により促進されるプルキンエ細胞の樹状突起形成は、ミトコンドリアの生合成に関与する PGC-1 α の発現を部分的に介して起こることを示した。PGC-1 α が T3/TR シグナルの下流に存在し、プルキンエ細胞のミトコンドリア生合成を制御していることもわかった。

T3 による PGC-1 α の発現制御

PGC-1 α のプロモーターには TRE 領域が存在し、肝臓や下垂体において T3/TR シグナルによって直接的に転写が促進されることが知られている (Wulf et al., 2007; Wulf et al., 2008)。実際に T3 の欠乏は、プルキンエ細胞において *in vivo* でも *in vitro* でも生後一週間前後で始まる PGC-1 α の発現を阻害した。一方 TH は、BDNF (Neveu and Arenas, 1996; Koibuchi et al., 1999a) などの神経栄養因子 (Clos and Legrand, 1990; Lindholm et al., 1993; Neveu and Arenas, 1996) の産生に関わることが知られている。従って、PGC-1 α の発現は、T3 によって誘導された別の因子を介して間接的に活性化される可能性があった。本研究において、T3 の添加後 24 時間で PGC-1 α の発現誘導が起こることがわかり、プルキンエ細胞における PGC-1 α の発現は T3 によって直接転写制御を受ける可能性が示唆された。

T3 の欠乏は、*In vivo* および *In vitro* でプルキンエ細胞における PGC-1 α の発現の開始を遅延させるものの、その発現量は発生に伴い徐々に上昇することが示された。その一因として、発生期の小脳に存在する T3 以外の因子が PGC-1 α の発現を促進させた可能性が考えられる。実際に PGC-1 α プロモーターには TRE 領域だけでなく cAMP 応答配列 (CRE) と Ca²⁺ 誘導分子によって活性化される MEF2 結合領域が存在する。海馬ニューロンにおいて神経栄養因子の一つである BDNF が、CRE 領域に働きかけ PGC-1 α の転写誘導を起こすと共にスパイン形成を誘導することが知られている (Cheng et al., 2012)。また、MEF2 が様々な中枢神経系ニューロンにおいて樹状突起形成やシナプス形成に関わっていることが

報告されている(Brusco and Haas, 2015)。T3 欠乏下でやや遅れて現れる PGC-1 α の発現は、小脳回路の神経活動などにより活性化されるこれらのシグナルを介して誘導されるのかもしれない。プルキンエ細胞において T3 が PGC-1 α の転写を直接、活性化するかどうかの証拠を得るためには Luciferase assay または LacZ を用いた実験結果を示す必要があったと思う。

プルキンエ細胞の成熟における T3 と PGC-1 α の機能

PGC-1 α をノックダウンした際に、T3 により誘導される樹状突起伸長が顕著に阻害されることを示した。さらに、T3 非存在下で PGC-1 α の過剰発現は、完全ではないものの、有意に樹状突起形成を促進させた。この結果より T3 によって誘導される樹状突起形成は、部分的に PGC-1 α を介することがわかった。本研究で、T3 と PGC-1 α はプルキンエ細胞の分化において一部異なる機能をもつことも示唆された。PGC-1 α をノックダウンした細胞では、正常なプルキンエ細胞が一本の一次樹状突起をもつ成熟型の形態を呈する時期に、分岐が少ない複数の一次樹状突起と未熟な神経突起が残る形態を示す。このことから PGC-1 α は、樹状突起形成期のミトコンドリア生合成を促進させるだけでなく、”stellate cells stage”から”young Purkinje cells stage” (Figure 1-2)への移行にも関与していると考えられる。一方、T3 欠乏のプルキンエ細胞の表現型は、一本の一次樹状突起をもつ”young Purkinje cells stage”に移行した上で、樹状突起の伸長と分岐が阻害された形態であり、PGC-1 α ノックダウンのそれと異なる。さらに、PGC-1 α ノックダウンした細胞の樹状突起スパインはその数が減少し、その成熟異常が確認された。過去の研究で hypothyroid マウスにおけるプルキンエ細胞のシナプス数に減少は見られる(Nicholson and Altman, 1972b)が、本研究で用いた hypothyroid マウスにおいて、スパイン形成期には PGC-1 α の発現は低いながら回復しており、スパインの形態には PGC-1 α ノックダウンで見られる異常は認められなかった。このように PGC-1 α の発現は、プルキンエ細胞の樹状突起形成だけでなくスパイン成熟にも関係しており、それは T3 とは独立の機能であると考えられる。

T3 は、複数の下流経路を介してプルキンエ細胞の形態分化を促す。

T3 は、retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha (ROR α) を介してプルキンエ細胞の成熟に関与しているという報告がある(Boukhtouche et al., 2010)。プルキンエ細胞において ROR α の発現は E12.5 までに開始し、成体マウスでも確認できる(Gold et al., 2003; Ino, 2004)。ROR α の発現は、樹状突起形成が始まる前のステージから T3 によって促進され、プルキンエ細胞の”fusiform stage”(Figure1-2)から”stellate cells stage”(Figure1-2)への分化に関与していることが報告されている(Boukhtouche et al., 2006; Boukhtouche et al., 2010)。ROR α の機能は、プルキンエ細胞の形態分化だけでなく樹状突起形成後のスパイン形成まで影響を及ぼす(Takeo et al., 2015)。ROR α 変異マウスとして知られる stagger マウスは、TH/TR シグナル経路に異常はないにもかかわらず hypothyroid マウスに似た表現型であることが知られている(Qiu et al., 2007)。このことは TH の誘導するプルキンエ細胞の発達に ROR α が下流因子として関わる可能性を示唆している。表現型の比較から、T3 はプルキンエ細胞分化初期には ROR α を、樹状突起形成期には PGC-1 α を、シナプス形成期には ROR α または別の因子を介して形態分化を制御する可能性が浮かび上がる。

樹状突起形成において PGC-1 α と関連して制御される因子

PGC-1 α は、様々な転写因子または核受容体と相互作用してミトコンドリアの生合成や代謝を制御している。転写因子 NRF1/2 は複数のミトコンドリア遺伝子を活性化させ、酸化リン酸化に関わる酵素やミトコンドリアの膜タンパク質などの発現に関わる。PGC-1 α をノックダウンしたプルキンエ細胞において、NRF1 の下流にある COX-IV の発現が、著しく減少した。このことは、プルキンエ細胞の発達段階で PGC-1 α は、NRF1 の活性化を行っていることを示唆している。また、NRF1DN を用いてミトコンドリアの増殖および活性に関わる遺伝子の発現を阻害した結果、樹状突起の形成が阻害されたが、この表現型はミトコンドリアの輸送や分裂を阻害した時のそれに類似しており(Fukumitsu et al., 2015;

Fukumitsu et al., 2016) (Figure 1-6)、”young Purkinje cells stage”(Figure 1-2) に分化した後の樹状突起形成には、PGC-1 α および NRF1 が少なくとも関わっていると推測される。

一方、”stellate cells stage”(Figure 1-2)への形態分化が概ね終了する生後4日に ROR α をノックダウンされたプルキンエ細胞(Takeo et al., 2015)は、PGC-1 α をノックダウンした形態に似た特徴を有している。また、肝臓や骨格筋の細胞において PGC-1 α は、ROR α の活性化補因子として働くことが知られている(Liu et al., 2007)。このことから、プルキンエ細胞の形態分化において PGC-1 α は、ROR α を活性化し、その下流遺伝子の発現を促進する可能性が考えられる。ROR α の発現は、プルキンエ細胞の発達において重要な様々な遺伝子の転写を誘導し(Gold et al., 2003)、PGC-1 α は細胞分化と代謝調節の双方向からプルキンエ細胞の発達に関わっていると考えられる。従って、ROR α も PGC-1 α と同様に樹状突起形成に関与していると考えられる。さらに ROR α は TRE と相互作用し T3/TR の下流遺伝子の転写を促進することが知られている(Koibuchi et al., 1999b)だけでなく T3 によって ROR α そのものの発現が促進されるという報告もある(Boukhtouche et al., 2010)。このように T3、ROR α そして PGC-1 α の制御経路は、単純な上下関係ではなく複雑な相互調節ネットワークを形成していると考えられる。プルキンエ細胞の樹状突起形成における代謝調節メカニズムの理解は今後の課題である。

実験手法

試薬

本研究では以下の試薬を使用した。

3,3',5-Triiodo-L-thyronine (T3; Sigma-Aldrich)、2-Mercapto-1-methylimidazole(MMI; Sigma-Aldrich)、Sodium perchlorate monohydrate(PM; Sigma-Aldrich)

動物実験に関して

ICR 系妊娠マウスおよび仔（日本 SLC）を用いた。動物実験の取り扱いは、京都大学の動物実験等の実施に関する基本方針に従った。

甲状腺ホルモン低下症モデルマウスの作製

過去の論文を参考に行った(Sawant et al., 2015)。0.08%MMI、1.0%PM および 5.0%スクロースを加えた飲料用の水を妊娠 18.5 日目から新生仔が生後 14 日になるまで水が枯渇することのないように母マウスに与えた。新生仔は雌雄関係なく 10 匹選定した。コントロールマウスは、5.0%スクロース溶液を同様の日程で母マウスに与えた。実験は 2 度行った。

プラスミド

pAAV-CAG-EGFP/tdTomato/Mito-EGFP は、EGFP/tdTomato/Mito-EGFP の配列を pAAV-CAG-MCS ベクターに組み込んで作製した(Kaneko et al., 2011; Fukumitsu et al., 2015)。PGC-1 α cDNA (GenBank: AF049330.1) は、マウス小脳から次のプライマーを用いて得た。5'-ggatccGCCACCATGGCTTGGGACATGTGCAG および 5'-ctcgagCCTGCGCAAGCTTCTCT。PGC-1 α の shRNA に対する resistant mutant の作製には QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)を使用した。5'-TTTGAGAAAATCGACGAAGAGAATGAGGCAAACCTTGCTAGCGGTCCT をプ

ライマーとして PGC-1 α resistant mutant 配列を作製した。PGC-1 α wild type と resistant mutant 配列が、N 末端となるように pAAV-CAG-mCheey に組み込んだ。PGC-1 α shRNA の標的配列(5'-GAAGATAGATGAAGAGAATGA) は、web ソフトの siDirect を用いて設計した。shRNA 標的配列とそのアンチセンス配列の間に、7 塩基のヌクレオチドループ配列(tgtgctt)を挿入しオリゴヌクレオチドを作製した。PGC-1 α shRNA は、pAAV-CAG-EGFP-hH1-MCS ベクターにこのオリゴヌクレオチドを挿入することで作製した。また scramble shRNA (5'-GTAAAGGAAATAGAGAAGAGT) は、ネガティブコントロールとして用いた。pAAV-EGFP-NRF1DN は、NRF1 wild type の C 末端を除いた配列 (1-304 aa; GenBank: AF098077.1; Wu et al., 1999) を pAAV-CAG-EGFP ベクターに挿入し作製した。pAAV-FLAG-RIP140 は、RIP140 wild type (GenBank: NM_173440.2) の配列を pAAV-FLAG ベクターに挿入作製した。PGC-1 α 、NRF1DN および RIP140 の配列は、マウス小脳ライセートから作製した cDNA ライブラリーから PCR で増幅し精製したものである。

アデノ随伴ウイルス (AAV) の作製

HEK293T を 10% FBS in DMEM 中で培養し、70%コンフルエントになるように継代し 24 時間後、HEK293T 細胞に pAAV コンストラクト、pAAV-RC および pAAV-Helper ベクター(AAV Helper-Free System, Agilent Technologies) をリン酸カルシウム法により遺伝子導入した。導入の明日に培地交換し、その 2 日後に細胞を回収した。AAV の精製には AVB Sepharose High Performance キット(AVB Sepharose High Performance)を使用した。10⁹-10¹⁰ plaque-forming unit まで濃縮した。

プルキンエ細胞の初代培養とトランスフェクション

予め、35mm カバーガラス (MATSUNAMI) に poly-D-lysine (Sigma) を加え、インキュベーター内で一晩静置した。生後 0 日目のマウス小脳を取り出し、神経培養分散液 (住友ベークライト) を用いて分散した。その後、細胞を 10% FBS in DMEM/F12 に再懸濁し、poly-D-lysine コート処理したカバーガラス上で培養し

た。2-3 時間後、DMEM/F12 で洗い、培地中の FBS を取り除いた。培地を FBS フリーの maintenance medium (1% penicillin–streptomycin, 3.9 mM glutamine, 2.1 mg/ml glucose, 0.1mg/ml bovine serum albumin, 30 nM selenium dioxide, 20 µg/ml insulin, 40 nM progesterone, 100 µM putrescin そして 200 µg/ml transferrin in DMEM/F12) に置き換え培養した。10 nM T3 処理は、培養 0 日目と 5 日目に行った。精製したプラスミドは、分散溶液中の小脳細胞に Amaxa Mouse Neuron Nucleofector Kit (Lonza)または NEPA21 Super Electroporator (Nepa gene)を用いて導入した。AAV Mito-EGFP は培養 0 日目に培地中に加えた。

子宮内電気穿孔法

妊娠 11.5 日目のマウスにソムノペンチル (共立) を 37°C の生理食塩水で 5 倍希釈し全量 25 µl を腹腔内注射し麻酔した。四肢を固定後、腹部をアルコール消毒し出血に注意して開腹した。キムワイプを開腹部の上に乗せ、37°C の生理食塩水で湿らせた。0.1mg/ml ritodrine (Yutopar)を 30 µl を腹腔内に注入し子宮をマイスコリングピンセットで慎重にキムワイプ上に片側ずつ取り出した。0.1% Fast Green/PBS で着色した DNA 溶液 (5µg/µl) をプーラーPC-10 (Narishige)を用いて成形したガラス管 (2mm, NARISHIGE)に充填し、アスピレーターチューブ (Drummond) を用いて胎児の第四脳室に注入した。電極用ペーストのエレフィックス(Nihon Kohden)を付着させた電極 (CUY650P3; Nepa Gene) で胎児頭部を挟み、square-wave electroporation generator (CUY21; Nepa Gene)によって電気パルス (amplitude, 33 V; duration, 30 ms; intervals, 970 ms, four current pulses) x2 を与えた。子宮を腹腔内に戻し、生理食塩水で腹腔内を満たし空気を取り除いた。腹部を縫合後、37°C のヒーターの上で覚醒するまで回復させた。

蛍光抗体法 (in vitro)

4% パラホルムアルデヒド(PFA)/PBS を用いて細胞を室温で 10 分間固定した。0.2% Tween20/PBS (PBS-T) で洗浄後、30 分間室温で 2% skim milk/PBS-T 中でブロッキングした。一次抗体の反応は、抗体を 2% skim milk/PBS-T で希釈し 4°C で一晩反応させた。使用した一次抗体は以下の通りである。mouse anti-Calbindin

D28K (x1000) (Swant): rabbit anti-Calbindin D28K (x1000) (Millipore): goat anti-Calbindin (x100) (Santa Cruz): mouse anti-Pyruvate dehydrogenase, PDH (x1000) (Abcam): rabbit anti- PGC-1 α (x200) (Abcam): rabbit anti-DsRed (x1000) (Clontech): mouse anti-Pax-6 (x100) (R&D): rabbit anti-COX-IV (x500) (Abcam)。PBS-T で洗浄後、2% skim milk/PBS-T で希釈した二次抗体を 4°C で一晩反応させた。使用した二次抗体は Alexa 488-, Alexa 568-, or Alexa 647-conjugated anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat IgG (Invitrogen)のいずれかである。その後、PBS-T で洗浄し millQ で置換後、褪色防止用封入剤(Thermo Fisher)でスライドグラスにマウントした。

蛍光抗体法 (in vivo)

4% PFA/PB を用いて還流固定した後、4% PFA/PB 中で 4°C 1 晩浸漬固定した。その後 PBS 中で 4°C 1 晩置換し、マイクロライサー (D.S.K.) を用いて 100 μ m 矢状断切片を作製した。切片を 2% skim milk/0.25% Triton-PBS で 1 時間室温ブロッキングし、ブロッキング液で希釈した上記の一次抗体を 4°C で 1 晩反応させた。Triton-PBS で洗浄後、ブロッキング液で希釈した上記の二次抗体を 4°C で 1 晩反応させた。その後、PBS で洗浄し millQ で置換後、水系封入剤 (Diagnostic BioSystems)でスライドグラスにマウントした。

ウェスタンブロッティング

pAAV-CAG-PGC-1 α -mCherry および pAAV-CAG-EGFP-hH1-scramble shRNA または PGC-1 α shRNA を Lipofectamin 2000 (Thermo Fisher)を用いて 70 %コンフルエントの HEK293T 細胞に導入した。48 時間後、細胞を破碎し、サンプルを調整した。SDS-PAGE 後、ニトロセルロースメンブレンに転写した。5% skim milk in 0.2% PBS-T で 1 時間ブロッキングした。一次抗体は、rabbit anti-PGC-1 α (x1000) (abcam)および mouse anti- β -actin (x1000) (Sigma)をブロッキング液中に希釈し 4°C で 1 晩反応させた。PBS-T で洗浄後、二次抗体は、mouse anti-HRP IgG (x1000) (Millipore)および rabbit anti-HRP IgG (x1000) (Invitrogen)をブロッキング液中に希釈し 4°C で 1 晩反応させた。PBS-T で洗浄後、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)で反応させ、その発光を ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad)を用

いて検出した。

顕微鏡画像と画像解析

顕微鏡画像は、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000; Olympus) を用いて取得した。対物レンズは 40×、60×または 100×(それぞれ NA 0.95、1.20、1.40) を使用した。樹状突起の全長や分岐点の解析には Neurolucida ソフトウェア (MBF Bioscience) を用いた。ミトコンドリア量 (Mito-EGFP の面積÷細胞面積)、PDH シグナル強度 (細胞内の PDH gray value の総和) および PGC-1 α シグナル強度 (細胞体内の PGC-1 α gray value の平均値) の解析は、ImageJ を用いた。樹状突起スパインの長さおよび数に関しては遠位樹状突起の 10 μ m 分をそれぞれの細胞で ImageJ により解析した。

統計処理

多重検定には one way または two way ANOVA を用いて交互作用を調べた後、Tukey's HSD post hoc or Tukey-Kramer HSD analysis を用いた。2つのデータの比較には Student's t 検定を用いた。

参考文献

- Alvarez-Dolado, M., Figueroa, A., Kozlov, S., Sonderegger, P., Furley, A. J., and Munoz, A. (2001). Thyroid hormone regulates TAG-1 expression in the developing rat brain. *Eur J Neurosci* 14, 1209–1218. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01745.x
- Alvarez-Dolado, M., Ruiz, M., Del Río, J. A., Alcántara, S., Burgaya, F., Sheldon, M., et al. (1999). Thyroid hormone regulates reelin and dab1 expression during brain development. *J. Neurosci.* 19, 6979–93.
- Armengol, J. A., and Sotelo, C. (1991). Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in “in vitro” slices. *Dev. Brain Res.* 64, 95–114. doi:10.1016/0165-3806(91)90213-3.
- Bleazard, W., McCaffery, J. M., King, E. J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., et al. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* 1, 298–304. doi:10.1038/13014.
- Boukhtouche, F., Brugg, B., Wehrlé, R., Bois-Joyeux, B., Danan, J. L., Dusart, I., et al. (2010). Induction of early Purkinje cell dendritic differentiation by thyroid hormone requires ROR α . *Neural Dev.* 5, 18. doi:10.1186/1749-8104-5-18.
- Boukhtouche, F., Janmaat, S., Vodjdani, G., Gautheron, V., Mallet, J., Dusart, I., et al. (2006). Retinoid-Related Orphan Receptor α Controls the Early Steps of Purkinje Cell Dendritic Differentiation. *J. Neurosci.* 26, 1531–1538. doi:10.1523/JNEUROSCI.4636-05.2006.
- Brusco, J., and Haas, K. (2015). Interactions between mitochondria and the transcription factor myocyte enhancer factor 2 (MEF2) regulate neuronal structural and functional plasticity and metaplasticity. *J. Physiol.* 16, 3471-81. doi:10.1113/jphysiol.2014.282459.
- Chatonnet, F., Flamant, F., and Morte, B. (2015). A temporary compendium of thyroid hormone target genes in brain. *Biochim. Biophys. Acta.* 1849, 122–129. doi:10.1016/j.bbagr.2014.05.023.
- Cheng, A., Wan, R., Yang, J. L., Kamimura, N., Son, T. G., Ouyang, X., et al. (2012). Involvement of PGC-1 α in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. *Nat. Commun.* 3, 1250. doi:10.1038/ncomms2238.
- Clos, J. and Legrand, C. (1990). An interaction between thyroid hormone and nerve growth factor

- promotes the development of hippocampus, olfactory bulbs and cerebellum: a comparative biochemical study of normal and hypothyroid rats. *Growth Factors* 3, 205-220.
doi:10.3109/08977199009043905.
- Cowell, R. M., Blake, K. R., and Russell, J. W. (2007). Localization of the transcriptional coactivator PGC-1alpha to GABAergic neurons during maturation of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 502:1–18. doi:10.1002/cne.21211.
- Desouza, L. A., Sathanoori, M., Kapoor, R., Rajadhyaksha, N., Gonzalez, L. E., Kottmann, A. H., et al. (2011). Thyroid hormone regulates the expression of the sonic hedgehog signaling pathway in the embryonic and adult mammalian brain. *Endocrinology* 152, 1989–2000.
doi:10.1210/en.2010-1396.
- DiMauro, S., and Schon, E. A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* 348, 2656–2668. doi:10.1056/NEJMra022567.
- Dowling, A. L., Martz, G. U., Leonard, J. L., and Zoeller, R. T. (2000). Acute changes in maternal thyroid hormone induce rapid and transient changes in gene expression in fetal rat brain. *J. Neurosci.* 20, 2255–65.
- Farwell, A. P., and Dubord-Tomasetti, S. A. (1999). Thyroid hormone regulates the expression of laminin in the developing rat cerebellum. *Endocrinology* 140, 4221–4227.
doi:10.1210/endo.140.9.7007.
- Fauquier, T., Chatonnet, F., Picou, F., Richard, S., Fossat, N., Aguilera, N., et al. (2014). Purkinje cells and Bergmann glia are primary targets of the TRα1 thyroid hormone receptor during mouse cerebellum postnatal development. *Development* 141, 166–75. doi:10.1242/dev.103226.
- Fukumitsu, K., Fujishima, K., Yoshimura, A., Wu, Y. K., Heuser, J., and Kengaku, M. (2015). Synergistic Action of Dendritic Mitochondria and Creatine Kinase Maintains ATP Homeostasis and Actin Dynamics in Growing Neuronal Dendrites. *J. Neurosci.* 35, 5707–5723. doi:10.1523/JNEUROSCI.4115-14.2015.
- Fukumitsu, K., Hatsukano, T., Yoshimura, A., Heuser, J., Fujishima, K., and Kengaku, M. (2016). Mitochondrial fission protein Drp1 regulates mitochondrial transport and dendritic arborization in cerebellar Purkinje cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 71, 56–65. doi:10.1016/j.mcn.2015.12.006.
- Galeeva, A., Treuter, E., Tuohimaa, P., and Pelto-Huikko, M. (2002). Comparative distribution of the mammalian mediator subunit thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP220) mRNA in developing and adult rodent brain. *Eur. J. Neurosci.* 16, 671–683.

doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02115.x.

- Gleyzer, N., Vercauteren, K., and Scarpulla, R. C. (2005). Control of Mitochondrial Transcription Specificity Factors (TFB1M and TFB2M) by Nuclear Respiratory Factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 Family Coactivators. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1354–1366. doi:10.1128/MCB.25.4.1354-1366.2005.
- Gold, D. A., Baek, S. H., Schork, N. J., Rose, D. W., Larsen, D. D., Sachs, B. D., et al. (2003). ROR α Coordinates Reciprocal Signaling in Cerebellar Development through Sonic hedgehog and Calcium-Dependent Pathways. *Neuron* 40, 1119–1131. doi:10.1016/S0896-6273(03)00769-4.
- Hadj-Sahraoui, N., Seugnet, I., Ghorbel, M. T., and Demeneix, B. (2000). Hypothyroidism prolongs mitotic activity in the post-natal mouse brain. *Neurosci. Lett.* 280, 79–82. doi:10.1016/S0304-3940(00)00768-0.
- Harper, M. E., and Seifert, E. L. (2008). Thyroid Hormone Effects on Mitochondrial Energetics. *Thyroid* 18, 145–156. doi:10.1089/thy.2007.0250.
- Heuer, H., and Mason, C. A. (2003). Thyroid Hormone Induces Cerebellar Purkinje Cell Dendritic Development via the Thyroid Hormone Receptor $\alpha 1$. *J. Neurosci.* 23, 10604–10612.
- Hock, M. B., and Kralli, A. (2009). Transcriptional Control of Mitochondrial Biogenesis and Function. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 177–203. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163119.
- Huss, J. M., Kopp, R. P., and Kelly, D. P. (2002). Peroxisome Proliferator-activated Receptor Coactivator-1 α (PGC-1 α) Coactivates the Cardiac-enriched Nuclear Receptors Estrogen-related Receptor- α and - γ : Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1 α . *J. Biol. Chem.* 277, 40265–40274. doi:10.1074/jbc.M206324200.
- Iannaccone, E. A., Yan, A. W., Gauger, K. J., Dowling, A. L., and Zoeller, R. T. (2002). Thyroid hormone exerts site-specific effects on SRC-1 and NCoR expression selectively in the neonatal rat brain. *Mol. Cell. Endocrinol.* 186, 49–59. doi:10.1016/S0303-7207(01)00672-4.
- Ino, H. (2004). Immunohistochemical characterization of the orphan nuclear receptor ROR alpha in the mouse nervous system. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 311–323. doi:10.1177/002215540405200302.
- Kaneko, M., Yamaguchi, K., Eiraku, M., Sato, M., Takata, N., Kiyohara, Y., et al. (2011). Remodeling of monopolar purkinje cell dendrites during cerebellar circuit formation. *PLoS One* 6:e20108. doi:10.1371/journal.pone.0020108.

- Kimura-Kuroda, J., Nagata, I., Negishi-Kato, M., and Kuroda, Y. (2002). Thyroid hormone-dependent development of mouse cerebellar Purkinje cells in vitro. *Dev. Brain Res.* 137, 55–65.
- Koibuchi, N., Jingu, H., Iwasaki, T., and Chin, W. W. (2003). Current perspectives on the role of thyroid hormone in growth and development of cerebellum. *Cerebellum* 2, 279–289. doi:10.1080/14734220310011920.
- Koibuchi, N., Fukuda, H., and Chin, W. W. (1999a). Promoter-Specific Regulation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene by Thyroid Hormone in the Developing Rat Cerebellum. *Endocrinology* 140, 3955–3961. doi:10.1210/endo.140.9.6997.
- Koibuchi, N., Liu, Y., Fukuda, H., Takeshita, A., Yen, P. M., and Chin, W. W. (1999b). ROR α Augments Thyroid Hormone Receptor-Mediated Transcriptional Activation. *Endocrinology* 140, 1356–1364. doi:10.1210/endo.140.3.6562.
- Lindholm, D., Castrén, E., Tsoulfas, P., Kolbeck, R., Berzaghi Mda, P., Leingärtner, A., et al. (1993). Neurotrophin-3 induced by tri-iodothyronine in cerebellar granule cells promotes Purkinje cell differentiation. *J. Cell. Biol.* 122, 443–450. doi: 10.1083/jcb.122.2.443
- Liu, C., Li, S., Liu, T., Borjigin, J., and Lin, J. D. (2007). Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature* 447, 477–481. doi: 10.1038/nature05767
- Morte, B., Manzano, J., Scanlan, T., Vennström, B., and Bernal, J. (2002). Deletion of the thyroid hormone receptor $\alpha 1$ prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3985–3989. doi:10.1073/pnas.062413299.
- Neveu, I., and Arenas, E. (1996). Neurotrophins promote the survival and development of neurons in the cerebellum of hypothyroid rats in vivo. *J. Cell Biol.* 133, 631–646. doi:10.1083/jcb.133.3.631.
- Nicholson, J. L., and Altman, J. (1972a). The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation. *J. Cell Biol.* 44, 13–23. doi:10.1016/0006-8993(72)90362-9.
- Nicholson, J. L., and Altman, J. (1972b). The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of the rat cerebellar cortex. II. Synaptogenesis in the molecular layer. *Brain Res.* 44, 25–36. doi:10.1016/0006-8993(72)90363-0.
- Oppenheimer, J. H., and Schwartz, H. L. (1997). Molecular Basis of Thyroid Hormone-Dependent

- Brain Development. *Endocr. Rev.* 18, 462–475. doi:10.1210/edrv.18.4.0309.
- O’Shea, P. J., and Williams, G. R. (2002). Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *J. Endocrinol.* 175, 553–570.
- Portella, A. C., Carvalho, F., Faustino, L., Wondisford, F. E., Ortiga-Carvalho, T. M., and Gomes, F. C. (2010). Thyroid hormone receptor β mutation causes severe impairment of cerebellar development. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 68–77. doi:10.1016/j.mcn.2010.02.004.
- Qiu, C. H., Shimokawa, N., Iwasaki, T., Parhar, I. S., and Koibuchi, N. (2007). Alteration of Cerebellar Neurotrophin Messenger Ribonucleic Acids and the Lack of Thyroid Hormone Receptor Augmentation by staggerer -Type Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor- α Mutation. *Endocrinology* 148, 1745–1753. doi:10.1210/en.2006-1131.
- Rizzuto, R., Brini, M., Pizzo, P., Murgia, M., and Pozzan, T. (1995). Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr. Biol.* 5, 635–642. doi:10.1016/S0960-9822(95)00128-X.
- Ryan, M. T., and Hoogenraad, N. J. (2007). Mitochondrial-nuclear communications. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 701–722. doi:10.1146/annurev.biochem.76.052305.091720.
- Sawant, O., Horton, A. M., Shukla, M., Rayborn, M. E., Peachey, N. S., Hollyfield, J. G., et al. (2015). Light-Regulated Thyroid Hormone Signaling Is Required for Rod Photoreceptor Development in the Mouse Retina. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 8248-8257. doi:10.1167/iovs.15-17743.
- Schmidt, O., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 655–667. doi:10.1038/nrm2959.
- Schreiber, S. N., Knutti, D., Brogli, K., Uhlmann, T and Kralli, A. (2003). The Transcriptional Coactivator PGC-1 Regulates the Expression and Activity of the Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor α (ERR α). *J.Biol.Chem.* 278,9013-9018. doi:10.1074/jbc.M212923200.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L., and Blik, A. M. van der. (2001). Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* 12, 2245–2256. doi:10.1091/mbc.12.8.2245.
- Sotelo, C., and Dusart, I. (2009). Intrinsic versus extrinsic determinants during the development of Purkinje cell dendrites. *Neuroscience* 162, 589–600. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.12.035.
- Takeo, Y. H., Kakegawa, W., Miura, E., and Yuzaki, M. (2015). ROR α Regulates Multiple Aspects

- of Dendrite Development in Cerebellar Purkinje Cells In Vivo. *J. Neurosci.* 35, 12518–12534. doi:10.1523/JNEUROSCI.0075-15.2015.
- Vaarmann, A., Mandel, M., Zeb, A., Wareski, P., Liiv, J., Kuum, M., et al. (2016). Mitochondrial biogenesis is required for axonal growth. *Development* 143,1981-1992. doi:10.1242/dev.128926.
- Wareski, P., Vaarmann, A., Choubey, V., Safiulina, D., Liiv, J., Kuum, M., et al. (2009). PGC-1 α and PGC-1 β Regulate Mitochondrial Density in Neurons. *J. Biol. Chem.* 284, 21379–21385. doi:10.1074/jbc.M109.018911.
- Wei, L. N., and Hu, X. (2004). Receptor interacting protein 140 as a thyroid hormone-dependent, negative co-regulator for the induction of cellular retinoic acid binding protein I gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 218, 39–48. doi:10.1016/j.mce.2003.12.010.
- Weitzel, J. M., and Alexander Iwen, K. (2011). Coordination of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 342, 1–7. doi:10.1016/j.mce.2011.05.009.
- Weitzel, J. M., Hamann, S., Jauk, M., Lacey, M., Filbry, A., Radtke, C., et al. (2003). Hepatic gene expression patterns in thyroid hormone-treated hypothyroid rats. *J. Mol. Endocrinol.* 31, 291–303. doi:10.1677/jme.0.0310291.
- Wirth, E. K., and Meyer, F. (2017). Neuronal effects of thyroid hormone metabolites. *Mol. Cell. Endocrinol.* doi:10.1016/j.mce.2017.01.007.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., et al. (1999). Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115–124. doi:10.1016/S0092-8674(00)80611-x.
- Wulf, A., Harneit, A., Kröger, M., Kebenko, M., Wetzel, M. G., and Weitzel, J. M. (2008). T3-mediated expression of PGC-1 α via a far upstream located thyroid hormone response element. *Mol. Cell. Endocrinol.* 287, 90–95. doi:10.1016/j.mce.2008.01.017.
- Wulf, A., Harneit, A., and Weitzel, J. M. (2007). T3-mediated gene expression is independent of PGC-1 α . *Mol. Cell. Endocrinol.* 270, 57–63. doi:10.1016/j.mce.2007.02.008.
- Yen, P. M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* 81, 1097–1142. doi:11427693.
- Yu, L., Iwasaki, T., Xu, M., Lesmana, R., Xiong, Y., Shimokawa, N., et al. (2015). Aberrant Cerebellar Development of Transgenic Mice Expressing Dominant-Negative Thyroid Hormone Receptor in Cerebellar Purkinje Cells. *Endocrinology* 156, 1565–1576.

doi:10.1210/en.2014-1079.

謝辞

本研究を行うにあたり、懇切なるご指導を賜りました京都大学大学院生命科学部研究科神経発生学分野教授、見学美根子先生に深く感謝申し上げます。終始温かい指導を賜りました京都大学高等研究院助教、藤島和人先生に心より感謝申し上げます。さらに副指導教官として助言頂きました高次生体統御学分野教授、垣塚彰先生ならびにシステム機能学教授、井垣達吏先生に深く感謝致します。子宮内電気穿孔法の実験にご協力頂きました京都大学高等研究院研究員、栗栖純子さんに感謝申し上げます。また、様々なアイデアの提供や実験手法をご教授頂きました福光甘斎博士に感謝申し上げます。そして本研究を行うにあたりご支援頂きました神経発生学分野の皆様感謝申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Hatsukano T, Kurisu J, Fukumitsu K, Fujishima K and Kengaku M.

Thyroid hormone induces PGC-1 α during dendritic outgrowth in mouse cerebellar Purkinje cells. 2017. *Front. Cell. Neurosci.* 11:133.