

氏 名 中村 佳代

学位(専攻分野) 博士(医学)

学位記番号 総研大甲第 2093 号

学位授与の日付 平成 31年 3 月 22日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Overexpression of neuronal K^+ - Cl^- co-transporter enhances
dendritic spine plasticity and motor learning

論文審査委員 主 査 教授 吉村 由美子
教授 鍋倉 淳一
教授 南部 篤
教授 福田 敦夫 浜松医科大学 医学部

(様式3)

博士論文の要旨

氏名

中村佳代

論文題目

Overexpression of neuronal K^+ - Cl^- co-transporter enhances dendritic spine plasticity and motor learning

The neuron-selective isoform of the K^+ - Cl^- cotransporter KCC2 plays an important role in regulating intracellular chloride concentration. In most adult neurons KCC2 simultaneously exports K^+ and Cl^- and thereby maintains a low intracellular Cl^- that facilitates subsequent gamma-amino butyric acid receptor ($GABA_A$ Rs) mediated Cl^- influx, hyperpolarization and neuronal inhibition. Indeed, GABAergic inhibition can be diminished when KCC2 is absent or has reduced function, such as occurs during neuronal development and/or after injury. Given this role in influencing GABA function, there has been extensive investigation into the contributions that KCC2 may play in neuronal circuit development and in the pathogenesis of different diseases, and into the mechanisms which regulate KCC2 expression and transport function.

However, KCC2 has also been reported to have additional morphogenic effects on neuronal circuits independent of its Cl^- transport function. In neuronal cultures from KCC2 knockout mice, dendritic spines exhibited a more immature filopodia-like phenotype, and the number of immunohistochemically and functionally identified excitatory synapses was markedly decreased. Remarkably, this immature spine phenotype was rescued by overexpression of transport-deficient KCC2 mutant constructs. Furthermore, *in utero* overexpression of KCC2, or a transport-defective mutant KCC2, resulted in an increase in the density of mature dendritic spines in the somatosensory cortex (Layer II/III) that was sustained for at least until 90 days after birth. Pertinently, KCC2 appears to form a complex with the actin-associated proteins

4.1N and β PIX, and can interact with the kinase and cofilin signaling pathways associated with spine development and stabilization. Thus it would appear that KCC2 supports the development of excitatory synapses by enhancing spinogenesis and/or maturation. Such a role is consistent with the upregulation of KCC2 expression in development coinciding with the start of spinogenesis, and may (at least partly) explain the presence of KCC2 on dendritic spines at glutamatergic synapses.

Maintenance of dendritic spines in the adult nervous system is also highly dynamic, underpinned by numerous molecular mechanisms, and facilitates the functional and structural plasticity required for memory and behavioral adaptations in response to training. More specifically, *in vivo* experiments have demonstrated a strong correlation between the rate of newly-formed dendritic spines in the motor cortex and the extent and rate at which mice can improve specific motor behaviors during learning. In addition, long-term potentiation (LTP) of synaptic transmission is associated with the appearance of new dendritic spines and an increase in the volume of dendritic spine heads, while long-term depression (LTD) is correlated with dendritic spine shrinkage and removal. Together this suggests an activity-dependent modulation of dendritic spine appearance, growth and stability during learning. Recent evidence suggests that KCC2 can directly contribute to aspects of dendritic spine plasticity. Suppression of KCC2 expression in juvenile rats and in cultured neurons prevented the induction of LTP and the associated increases in dendritic spine volume and AMPA receptor insertion, pointing to a possible link between KCC2 and learning induced synaptic plasticity in adult neuronal circuits.

Here, I examined the effects of KCC2 expression on synaptic plasticity in the motor cortex and motor learning *in vivo*. I used a genetically modified mouse that overexpression of KCC2 under the control of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) promoter by combining KCC2-tetO knock-in mouse and CaMKII-tTA mouse (KCC2 overexpressing mice). Firstly, in order to confirm the

overexpression of KCC2 in these mice, I examined the expression of KCC2 protein using western blotting and immunohistochemistry. At 7 days after stopping the oral administration of the tetracycline derivative, doxycycline (Dox), relative value of total KCC2 was significantly increased in the cerebral cortex. Next, I evaluated the anxiety and the behavioral activity with open field test and elevated plus maze test. There was no significant difference both in the anxiety and the activity behavior between KCC2 overexpressing and WT mice. On the other hand, the rotarod training test, which is employed to assess motor coordination and learning, KCC2 overexpressing mice showed a significantly greater motor learning compared to WT mice. *In vivo* imaging with two-photon laser microscopy revealed that the formation rate of dendritic spines of layer V pyramidal neurons gradually increased in KCC2 overexpressing and WT mice with training. Spine formation rate of KCC2 overexpressing mice, but not the WT mice, after the first training significantly increased compared with that before training. Corresponding with the increased spine formation in KCC2 overexpressing mice, the spine turnover rate (an average of elimination and formation) after 1 day of training was also significantly increased in KCC2 overexpressing mice, but not in WT mice. Hence my data supports the growing appreciation of the transport-independent role of KCC2 in dendritic spine development/maturation/ maintenance, suggesting a putative role in enhancing synaptic plasticity and performance during learning *in vivo*.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 中村 佳代

論文題目 Overexpression of neuronal K^+ - Cl^- co-transporter enhances dendritic spine plasticity and motor learning

神経細胞特異的に発現するカリウム-塩素イオン共役担体 (K^+ - Cl^- co-transporter 2; KCC2) は細胞内塩素イオン濃度を低く保ち、抑制性神経伝達物質である GABA 機能を調節する主要な分子である。近年、KCC2 は興奮性シナプス後部 (スパイン) にも発現しており、シナプス形成にも関与していることが報告された。一方、運動学習によりマウス大脳皮質運動野の錐体細胞のスパイン数が増加することが報告されており、新たなスパイン形成が学習・記憶の神経基盤であると考えられている。

本申請者は、運動学習に対する KCC2 の役割を検討するために、カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II α (CaMKII) プロモーター下で KCC2 を時期特異的に過剰発現可能な遺伝子改変マウス (KCC2-tet0 マウスと tTA-CaMKII α マウスを交配、Tet-Off システム) において、ロータロッド試験 (連続 5 日間) による運動学習評価と、2 光子励起顕微鏡を用いた大脳皮質運動野・第 V 層錐体細胞の樹状突起上のスパインの可塑的变化の観察を行った。まず、大脳皮質第 V 層錐体細胞に KCC2 の過剰発現が誘導されるのかを NeuN (神経細胞) と VP16 (KCC2 遺伝子導入細胞) に対する 2 重染色を行い、90% 以上の錐体細胞に KCC2 の強制発現を誘導できることを確認した。ドキシサイクリン (Dox) の経口投与を中止して KCC2 を過剰発現させたマウスでは、ロータロッド試験において、2 日目に有意な運動能力の亢進が認められたのに対し、対照群では 4 日目になってその亢進が認められた。さらに、最終的な運動達成レベルも KCC2 過剰発現マウスでは有意に高かった。次に、大脳皮質運動野第 V 層に CaMKII プロモーター下で GFP を発現させるアデノ随伴ウイルス (AAV-CaMKII-eGFP) を注入し、大脳皮質第 I 層に存在する同細胞の樹状突起を可視化し、運動学習によるシナプスの可塑的变化を経時的に観察した。KCC2 過剰発現マウスでは対照群よりもトレーニング前においてもスパインの密度は有意に高かった。さらに、KCC2 過剰発現マウスのみで初日のトレーニング後にはスパイン新生の有意な亢進が観察された。トレーニングによる運動学習とスパイン新生の相関を検討した結果、対照群においては、これまで報告があるように、トレーニング前後でのスパイン新生の割合と運動能力の亢進の程度に有意な正相関が認められた。一方、KCC2 過剰発現マウスでは、新生スパインの割合と翌日の運動能力の亢進の程度に正相関が認められた。これらの結果から、KCC2 過剰発現マウスでは、トレーニングにより大脳皮質運動野第 V 層錐体細胞でのスパイン新生が亢進し、その一部は次の日の運動学習効率に関連している可能性が示めされた。

本研究では、行動学的解析と *in vivo* マウス大脳皮質の同一細胞からの経時的イメージングなど、適切な解析がなされている。また、運動学習とシナプス再編に KCC2 が関与していることを示しており、KCC2 の機能を理解する上で、重要な成果と考えられる。

(備考)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格 (JIS) A4 縦型とする。
2. 1 行あたり 40 文字 (英文の場合は 80 文字)、1 ページあたり 40 行で作成する。
3. 上マージン、下マージン、右マージンは 2 cm、左マージンは 2.5 cm とする。
4. タイトルと本文の間は、1 行空ける。
5. ページ番号は入れない。
6. 出願者 (申請者) が論文審査に合格し、博士号が授与された場合は、本紙を総合研究大学院大学リポジトリにおいて、インターネット公開する。

Note:

1. The sheets must be Japanese Industrial Standard (JIS) A4 vertical.
2. Each line shall have approximately 40 characters in Japanese or 80 characters in English, and each page shall have 40 lines.
3. The top, bottom, and right margins must be 2 cm and the left one must be 2.5 cm.
4. Single spacing is required between the title and the text.
5. There must be no page numbers.
6. If the applicant is conferred a doctoral degree, this paper will be published on the SOKENDAI Repository.