

氏 名 Wang, Luwei

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2378 号

学位授与の日付 2022 年 12 月 31 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Exploring dendritic refinement of barrel cortex layer 4  
neurons via high spatiotemporal-resolution *in vivo* imaging

論文審査委員 主 査 平田 たつみ  
遺伝学専攻 教授  
木村 暁  
遺伝学専攻 教授  
小出 剛  
遺伝学専攻 准教授  
久保 郁  
遺伝学専攻 准教授  
河崎 洋志  
金沢大学 医薬保健研究域 教授

(Form 3)

## Summary of Doctoral Thesis

Name in full Wang, Luwei

**Title Exploring dendritic refinement of barrel cortex layer 4 neurons via high spatiotemporal-resolution *in vivo* imaging**

The specific arborization of dendrites determines the inputs the neuron receives, and the accurate dendritic pattern is formed through refinement during development in an activity-dependent manner. It is critical to understand how neurons refine their dendrite morphologies during development. To understand the dendritic refinement mechanism of cortical neurons at early postnatal stages, *in vivo* time-lapse imaging is useful. Recent studies in our laboratory that used two-photon *in vivo* time-lapse imaging have brought new perspectives to our understanding of dendritic refinement dynamics at the early postnatal stage. However, many details regarding the precise refinement features of cortical neuron dendrites are still largely unexplored because the imaging resolutions of these studies were not sufficiently high.

To understand the details regarding the precise refinement features of cortical neuron dendrites, I improved the *in vivo* time-lapse imaging of the neonatal mouse brain to achieve higher spatiotemporal resolution. The spatial resolution for dendrite morphology imaging was improved by using a membrane-bound RFP instead of a regular RFP. The temporal resolution was improved from 8-hour interval to 1-hour interval in time-lapse imaging. I used the mouse primary somatosensory cortex (barrel cortex), in which, thalamocortical axons form clusters, called “barrels”, in layer 4 and a single barrel corresponds to a single facial whisker. Spiny stellate (SS) neurons, the major type of excitatory neuron in the barrel cortex layer 4, locate on the barrel edge and extend their basal dendrites into the barrel center to form synapses with

thalamocortical axons. This biased dendritic orientation feature of SS neurons formed essentially during the first postnatal week under the regulation of appropriate neural activity. Another type of excitatory neuron in barrel cortex layer 4 is the star pyramid (SP) neuron, which shows no bias in the basal dendritic orientation. The mature SS neuron does not have the apical dendrite, while the SP neuron has one.

I used in-utero electroporation-based Supernova to sparsely label barrel cortex layer 4 neurons with the membrane-bound RFP, and TCA-GFP mice to enable *in vivo* visualization of the barrel map. I imaged dendrites of the same layer 4 neurons for 8 hours at postnatal day (P) 4, which is in the middle of the dendritic refinement process. Neurons labeled with the membrane-bound RFP revealed more precise dendritic morphologies compared to the regular RFP. Using the improved imaging system with accurate reconstruction of the *in vivo* imaged neurons' basal dendritic patterns, I showed the general dendritic refinement dynamics of barrel cortex layer 4 neurons at P4. I detected many short dendrite trees and tip segments that emerged and disappeared within the 8-hour imaging session. I sometimes found that a tip segment emerged at a location similar to where another tip segment previously disappeared. I concentrated on analyzing the refinement dynamics of dendritic tip segments as well as short dendritic trees. I classified imaged layer 4 neurons into two groups, high and low orientation bias neurons, according to the differences in their basal dendrite orientation. By conducting quantitative analyses, I detected differences in refinement dynamics of basal dendrites between these two neuron groups. The high orientation bias neurons presented less newly formed and transiently existed dendritic trees and tip segments than the low orientation bias neurons. While comparing the preference for choosing refinement events, the high orientation bias neurons prefer to elongate or retract their existing dendrites, while the low orientation bias neurons favor branch emergence and elimination. My improved imaging system also found that specific morphological features (thick or thin) of dendritic tips show correlations with their behaviors

(elongation or retraction). In addition, I carefully observed sites at which dendrites were retracted during the last hour of *in vivo* imaging sessions by *post hoc* high-magnification confocal images and found no evidence for pruning/degradation events in the dendritic retraction process.

My study has shown the general refinement dynamics together with some specific morphological features of layer 4 neurons in the neonatal barrel cortex via a high spatiotemporal-resolution *in vivo* imaging system.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 Wang, Luwei

Title  
論文題目 Exploring dendritic refinement of barrel cortex layer 4 neurons via high spatiotemporal-resolution *in vivo* imaging

神経細胞の樹状突起の発達は、脳の正常な情報処理のために不可欠である。Luwei Wangさんは、2光子励起顕微鏡を用いたタイムラプス解析により、新生マウスバレル野4層の神経細胞の樹状突起の発達動態を解析した。生後3日目から6日目(P3-P6)にかけてこの細胞の樹状突起の動態が活発であることがわかっていたが、これまでの研究では8時間間隔のタイムラプス解析しか行われていなかったため、記録の無い8時間の間に何が起こったかを知ることはできなかった。Wangさんは、樹状突起の変化が顕著なP4の時期に、時間および空間解像度をあげて解析することで、1本1本の樹状突起の挙動をより正確に追跡することを目指した。

まず、細胞標識のために膜移行性シグナルをつけた蛍光レポータータンパク質を使うことで、これまでよりもはっきりと細部まで樹状突起の形態が可視化できるように手法を改良した。さらに、1時間おきにマウスを麻酔し顕微鏡撮影を繰り返すことで、1時間間隔で8時間にわたるタイムラプス観察ができる条件を確立した。この改良した手法を用いて、合計19の神経細胞の樹状突起の形態変化を経時的に観察して解析した結果、以下の知見を得た。

1. 樹状突起は極めて動的に変化する。観察の間にほぼ同数の樹状突起の枝が形成され、消滅することがわかった。つまり多くの樹状突起の枝は一時的にしか存在しない構造である。
2. 樹状突起のバレルに対する伸長方向偏重(orientation bias index, OBI)を指標に用いて、将来的に spiny stellate(SS)細胞に分化する可能性が高い high-OBI 群と、star pyramid(SP)細胞に分化する可能性が高い low-OBI 群に神経細胞を分類して、各々の樹状突起の動態を比較した。その結果、low-OBI 群は、樹状突起の枝をより大きく変化させることがわかった。一方の high-OBI 群においては樹状突起の枝の変化は少なく、既に存在する枝の伸縮をおこす傾向が高いことがわかった。
3. 視床からの入力を受けるバレル内部に伸びる樹状突起と、バレル外に伸びる樹状突起の間での比較では、突起の動態に違いは認められなかった。

4. 樹状突起の先端の厚み（蛍光標識強度の強さ）とその後の突起の挙動との関係を解析したところ、先端の厚みとその後の伸長との間に正の相関が認められた。
5. 樹状突起の伸長と退縮のイベントについて一時間おきに解析したところ、この時期の樹状突起は短期間に頻繁に伸長と退縮を切り替えることがわかった。
6. ショウジョウバエの樹状突起の刈り込み時には突起の断片化や分解が起きることが知られているが、マウスのこの系においては樹状突起の断片化は観察されなかった。

以上のように、Wang さんはマウスバレル野を用いて、神経細胞の樹状突起の発達についてこれまでにない詳細なレベルで定量的解析を行い、新規知見を得ている。今後の神経科学研究において有用な基盤情報になることから、博士号授与の要件を満たす内容であると判断した。