

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830004

研究課題名(和文) シナプスの選択的強化・除去を制御する神経活動とその分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of activity-dependency and molecular mechanisms of synapse elimination

## 研究代表者

上阪 直史 (Uesaka, Naofumi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70597624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生後発達期におこるシナプスの選択的強化・除去(シナプス刈り込み)を制御するシグナル分子を同定することを目指した。このようなシグナル分子を同定するために、本研究では、シナプス刈り込みのメカニズム解明に先導的役割を果たしている小脳の登上線維-プルキンエ細胞シナプスに着目し、申請者が開発したレンチウイルスノックダウンベクターと延髄-小脳の共培養標本を用い、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みに関わるシグナル分子を探索した。その結果、活動依存性分子Arcとセマフォリンファミリーの2つの分子、Sema3AとSema7Aがシナプス刈り込みを制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have screened signaling molecules for synapse elimination in developing cerebellum during the period of elimination of redundant climbing fiber (CF) to Purkinje cell (PC) synapses, a representative case of synapse elimination in developing brain. We found that Arc mediates CF synapse elimination downstream of neural activity. In addition, two semaphorins, Sema3A and Sema7A, derived from postsynaptic PCs act as a synaptotoxin and a synaptotrophin, respectively, through their receptors on CFs. These findings have unraveled the long-unknown mechanism by which the information for eliminating or strengthening synapses is transmitted from postsynaptic cells to presynaptic cells. Our findings provide a new insight into the roles of semaphorins, a major family of intercellular signaling molecules known to play crucial roles in development of the nervous system, cell recognition in the immune system, and formation and regeneration of the bone.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス刈り込み 小脳 セマフォリン Arc 機能的神経回路形成 スクリーニング

### 1. 研究開始当初の背景

生後発達期に、人を含む動物の神経回路は、各個体の経験や置かれた環境に適応するように再編成されることが知られている。その細胞レベルでの変化として、神経活動に依存したシナプス結合の強化あるいは除去(シナプスの刈り込み)がある。申請者の目標は、神経活動がシナプスの刈り込みを制御する原理を分子のレベルで完全解明することである。

この目的を達成するため、シナプス刈り込みのメカニズム解明に有用なモデル系である小脳の登上線維-プルキンエ細胞シナプスを用いる(Kanoら, Cell, 1995など)。従来、プルキンエ細胞の神経活動やプルキンエ細胞に存在する代謝型グルタミン酸受容体1型(mGluR1)、P/Q型カルシウムチャンネル(P/Q-VGCC)、小脳内に存在するグルタミン酸NMDA受容体(NMDAR)などの受容体やチャンネルがこの除去過程に必要であることが知られている(Kanoら, 1997, Neuron; Ichiseら, 2000, Science; Kakizawaら, 2000, JNS; Miyazakiら, JNS, 2004など)。しかしながら、神経活動ならびにmGluR1, P/Q type VGCC, NMDARが登上線維-プルキンエ細胞シナプスを機能的、形態的に強化・除去する分子基盤に関してまったく不明であった。このような中で、申請者らは、**登上線維の起始核である下オリブ核を含む脳幹と小脳を共培養することにより、シナプス刈り込みを *in vitro* で再現すること成功した(Uesaka et al., JNS, 2012)**。この標本を使えば、遺伝子操作および薬物投与を簡便かつ迅速に行うことが可能で、これまで不可能であった候補遺伝子の網羅的スクリーニングが可能である。これにより、申請者はシナプス刈り込みにおいて多くの遺伝子の機能を効率良く解析できる立場にあった。

### 2. 研究の目的

本研究では、シナプスの選択的強化・除去(刈り込み)の分子機構解明を目指し、モデル系として、小脳の登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達の機構を解明することを目指した。従来、ポストシナプス細胞であるプルキンエ細胞の神経活動や分子がシナプス刈り込みに関与することが明らかとなっている。しかし、それら神経活動や分子がどのようにして、プレシナプス細胞である登上線維シナプスを強化・除去しているのかはわかっていない。ポスト細胞からプレ細胞へとシグナルを送る逆行性シグナル分子が想定されているが、その実体はまったくわかっていなかった。本研究では、特に**活動依存的な逆行性シグナル分子の実体を明らかにすることを目指した**。

### 3. 研究の方法

シナプスを強化あるいは除去する逆行性シ

グナル分子はシナプス後部の神経細胞に存在するはずである。したがって、シナプス刈り込みがおこる時期にシナプス後部の神経細胞で発現する分子をプロファイリングすることが重要である。逆行性シグナルとして働きうるのは、分泌分子と膜分子であると考えられる。われわれは、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みがおこる時期に、プルキンエ細胞で発現する分泌分子と膜分子をプロファイリングした。プルキンエ細胞選択的にGFPを発現するマウスから、セルソーターによりGFP陽性プルキンエ細胞を選別した。選別したプルキンエ細胞からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイにより遺伝子発現を解析した。その結果、登上線維シナプスの刈り込みがおこる時期に、プルキンエ細胞において分泌分子が約130種類と膜分子が約160種類発現していることが明らかとなった。

これらの候補分子の機能解析を効率よく行うためには、ロックアウトマウスなどの遺伝子改変動物に頼るのは難しい。われわれは、独自に開発したプルキンエ細胞が含まれる小脳のスライスと登上線維の起始核である下オリブ核を含む脳幹を接着させた共培養標本を用いた。この共培養標本内のプルキンエ細胞では、生体内の登上線維-プルキンエ細胞シナプスとほぼ同等の性質のシナプスが形成されること、形成された登上線維様シナプスは培養期間中に刈り込まれることがわかっている。

遺伝子発現の操作をするために、シナプス後部細胞であるプルキンエ細胞特異的に遺伝子発現をロックダウンする方法を用いた。プルキンエ細胞特異的プロモーターであるL7プロモーターを用い、遺伝子発現をロックダウンするためにmicroRNAをベースとしたRNA干渉システムを用いた。L7プロモーター配列、RNA干渉配列、ロックダウン細胞を標識するEGFP配列の順にレンチウイルスベクター用のプラスミドに組み込んだ。この方法が機能するか調べるために、シナプス刈り込みへの関与が確立しているGluD2の発現をプルキンエ細胞でロックダウンした結果、GluD2ロックダウンプルキンエ細胞ではシナプス刈り込みが障害されることを見出した。また、この結果は共培養標本内でおこるシナプス刈り込みが生体内と同じ分子メカニズムにより制御されていることを意味している。

### 4. 研究成果

上記の共培養標本とレンチウイルスロックダウン法を組み合わせ、候補分子のスクリーニングを行った。DNAマイクロアレイのデータの中で発現量の高い順にプルキンエ細胞特異的にロックダウンし、シナプス刈り込みが異常になる遺伝子を調べた。その結果、活動依存性分子Arcとセマフォリンファミリーの2つの分子、Sema3AとSema7Aが候補に上がった。そこで生後発達期のマウス小脳で

Arc, Sema3A, Sema7A の発現をノックダウンすることで、さらに解析を進めた。その結果、Arc のノックダウンにより、生後 13 日目からシナプス刈り込みが障害された。すなわち、Arc は生後 13 日目以降のシナプス除去を促進することが明らかとなった。また、Sema7A のノックダウンにより、生後 15 日目からシナプス刈り込みが障害された。一方、Sema3A のノックダウンにより、生後 8 日目からシナプス刈り込みが促進され、登上線維シナプスの興奮性シナプス後電流の振幅が減弱した。これらの結果から、Sema3A は生後 8 日目から登上線維シナプスを強化・維持し、Sema7A は生後 15 日目から登上線維のシナプス除去を促進していることが明らかとなった。

これまでノックアウトマウスの解析より、シナプス刈り込みにおいて弱い登上線維シナプスを除去する分子として、1 型代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1), P/Q 型電位依存性カルシウムチャネル (PQ-VDCC), 2 グルタミン酸受容体 (GluD2) が知られている。これらの分子と弱い登上線維シナプスの除去に關与する Sema7A や Arc との関係を調べるために、mGluR1, P/Q-VDCC, GluD2 の中のいずれか 1 つと Arc あるいは Sema7A のダブルノックダウンを行った。P/Q-VDCC あるいは GluD2 の一方と Sema7A をダブルノックダウンした時は、シングルノックダウンと比べて加算的な効果が観察された。一方、mGluR1 と Sema7A をダブルノックダウンした時は、シングルノックダウンと同じ効果が観察された。これらの結果から、Sema7A は mGluR1 と同じシグナル経路にある可能性が示唆される。さらに、Sema7A と mGluR1 の関係を調べた結果、mGluR1 ノックアウトマウスにおいて、Sema7A タンパク質の発現が有意に減少していた。また、プルキンエ細胞において mGluR1 ノックダウンと同時に Sema7A の過剰発現をすると、mGluR1 ノックダウンによる刈り込み障害が改善された。これらの結果より、Sema7A 分子の発現が mGluR1 により調節され、Sema7A が登上線維シナプスを除去することが明らかになった。また、P/Q-VDCC と Arc をダブルノックダウンした時は、シングルノックダウンと同じ効果が観察された。さらに、Arc は P/Q-VDCC からのカルシウムシグナルにより発現が上昇し、シナプス刈り込みを制御することが見出された。

次に、Sema3A と Sema7A が直接プルキンエ細胞から登上線維に働きかける逆行性シグナルであるかを調べるために、登上線維においてそれらの受容体である plexin A4 (PlxnA4)、integrin B1 (ItgB1)、plexin C1 (PlxnC1) の発現をノックダウンし、シナプス刈り込みへの影響を調べた。その結果、登上線維で PlxnA4 をノックダウンした時は Sema3A と同じくシナプス刈り込みが促進された。さらに、プルキンエ細胞で Sema3A をノックダウンしたマウスにおいて、登上線維で PlxnA4 をノックダウンした結果、Sema3A

と PlxnA4 両方をノックダウンした時と Sema3A のみをノックダウンした時では、シナプス刈り込みが促進される程度は同等であった。この結果は、プルキンエ細胞から分泌された Sema3A が登上線維の PlxnA4 に直接シグナルを伝えていることを示唆している。

一方、登上線維で ItgB1 や PlxnC1 をノックダウンした時は Sema7A と同じくシナプス刈り込みが障害された。さらに、プルキンエ細胞で Sema7A をノックダウンしたマウスにおいて、登上線維で ItgB1 あるいは PlxnC1 をノックダウンした結果、ItgB1 あるいは PlxnC1 のどちらかと Sema7A の両方をノックダウンした時と Sema7A のみをノックダウンした時では、シナプス刈り込みの障害の程度は同等であった。この結果は、プルキンエ細胞にある Sema7A が登上線維の PlxnC1 と ItgB1 に直接シグナルを伝えていることを示唆している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1: Uesaka N, Uchigashima M, Mikuni T, Hirai H, Watanabe M, Kano M. Retrograde signaling for climbing fiber synapse elimination. *Cerebellum*. 2015 Feb;14(1):4-7.

2: Uesaka N, Kawata S, Kano M. Cellular and molecular mechanisms of synapse elimination in the Mammalian brain. *Brain Nerve*. 2014 Sep;66(9):1069-77. Review.

3: Uesaka N, Uchigashima M, Mikuni T, Nakazawa T, Nakao H, Hirai H, Aiba A, Watanabe M, Kano M. Retrograde semaphorin signaling regulates synapse elimination in the developing mouse brain. *Science*. 2014 May 30;344(6187):1020-3.

4: Mikuni T, Uesaka N, Okuno H, Hirai H, Deisseroth K, Bito H, Kano M. **Arc/Arg3.1 is a postsynaptic mediator of activity-dependent synapse elimination in the developing cerebellum.** 2013 Jun 19;78(6):1024-35

[学会発表](計 12 件)

2014 年 9 月 日本神経科学学会 横浜  
1. Sema3A と Sema7A による逆行性シグナルがシナプス刈り込みを制御している  
上阪 直史, 内ヶ島 基政, 三國 貴康, 中澤 敬信, 中尾 晴美, 平井 宏和, 饗場 篤, 渡辺 雅彦, 狩野 方伸

2. 発達期小脳シナプス刈り込みにプルキン

工細胞由来 BDNF が寄与している  
Retrograde BDNF signaling from Purkinje cell regulates synapse elimination in the developing cerebellum  
秋 明貞, 宮崎 太輔, 山崎 真弥, 谷村 あさみ, 上阪 直史, 渡辺 雅彦, 崎村 健司, 狩野 方伸

2014 年 7 月 ヨーロッパ神経科学学会 (FENS) イタリア ミラノ

1. N. Uesaka, M. Uchigashima, T. Mikuni, T. Nakazawa, H. Hirai, M. Watanabe, M. Kano

SCREENING OF RETROGRADE SIGNALING MOLECULES FOR SYNAPSE ELIMINATION IN THE DEVELOPING CEREBELLUM

2. M. Choo, T. Miyazaki, M. Yamasaki, A. Tanimura, N. Uesaka, M. Watanabe, K. Sakimura, M. Kano

IMPAIRMENT OF DEVELOPMENTAL SYNAPSE ELIMINATION IN THE CEREBELLUM OF PURKINJE CELL-SPECIFIC BDNF KNOCKOUT MICE

2014 年 12 月 シナプス研究会「**シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス**」

岡崎  
発達期におこるシナプス刈り込みを制御する逆行性シグナル  
上阪直史

2015 年 1 月 グリアクラブ 函館  
Granulin-Sort1 シグナルが発達期シナプス刈り込みにおけるシナプス強化・維持シグナルとして働く  
上阪直史

2015 年 1 月  
東海大学 / INCF Japan Node 小脳プラットフォーム合同神経科学ミニシンポジウム  
脳の機能発達を担うシナプス刈り込みの機構  
上阪 直史

2015 年 3 月 日本生理学会 神戸  
1. 発達期シナプス刈り込みを制御する逆行性シグナル分子の同定  
上阪直史, 狩野方伸

2. 自閉症感受性遺伝子を前頭前野でノックダウンしたマウスのシナプス機能異常と社会的行動の異常  
酒井 浩旭, 佐郡 和人, 上阪 直史, 狩野方伸

2013 年 8 月  
Gordon Research Conference on the

Cerebellum  
Functional screening of molecules required for developmental synapse elimination in the cerebellum by RNAi-based approach  
Naofumi Uesaka, Takayasu Mikuni, Hirokazu Hirai, Masanobu Kano

2013 年 11 月 Neuroscience 2013  
Identification of retrograde signaling molecules required for developmental synapse elimination in the cerebellum by an RNAi-based approach  
Naofumi Uesaka, Takayasu Mikuni, Hirokazu Hirai, Masanobu Kano

2014 年 3 月 日本生理学会大会  
Retrograde signaling regulates synapse elimination in developing brain  
Uesaka Naofumi, Uchigashima Motokazu, Mikuni Takayasu, Hirai Hirokazu, Watanabe Masahiko, Kano Masanobu

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/Kano\\_Lab\\_j/Top\\_j.html](http://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/Kano_Lab_j/Top_j.html)

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
上阪 直史 (Uesaka Naofumi)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 70597624