

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23650160  
 研究課題名（和文）リアルタイム・マルチカラーイメージングによるシナプス刈り込み機構の解明  
 研究課題名（英文）Real-time and multi-color imaging of synapse elimination in the CNS.

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

研究成果の概要（和文）：脳の発達期には、一度作られたシナプス回路が再編成される。この過程がどのように進行するのかを細胞レベルで明らかにするためには、新たな方法の開発が必要となる。本研究では、シナプス回路の再編成の過程をリアルタイムで観察するために、3種類の色の蛍光タンパク質(緑色蛍光タンパク質GFPなど)による細胞の標識方法とリアルタイムイメージング方法の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：During brain development, immature redundant neural circuitry is refined into functionally mature versions through the process known as “synapse elimination”. However, how synapse elimination proceeds is largely unknown. In this study, we have developed the method for multi-color labeling of cells and synapses by various fluorescent proteins like green fluorescent protein(GFP), and real-time imaging of these cells and synapses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：シナプス刈り込み、小脳、プルキンエ細胞、登上線維、蛍光タンパク質、レンチウイルス、イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

幼若期の神経細胞は機能的に未熟なシナプスを過剰に形成しているが、生後発達に伴い機能的に必要なシナプスは強化され、不要なシナプスは弱化・除去され(シナプス刈り込み)、成熟した神経回路が形成される。これは発達期の動物の神経系において一般的にみられる現象であると考えられているが、この過程に関与する多数の神経細胞、軸索、グリア細胞及びシナプスが経時的にどのような構造変化をし、シナプスが刈り込まれるのか、特

に中枢神経系に関してはほとんどわかっていない。

中枢神経系シナプスの刈り込みのメカニズムを解明するために、最も適したモデル系として、小脳の登上線維-プルキンエ細胞シナプスの系がある (Cell 83:1223-1231, 1995; *ibid* 83:1233-1242, 1995; *Neuron* 18: 71-79, 1997; *PNAS* 94: 14089-14094, 1997; *ibid* 95: 15724-15729, 1998; *Neuron* 38: 785-796, 2003; *PNAS* 102: 19180-19185, 2005; *Neuron* 63:106-118,

2009 など)。成熟動物のプルキンエ細胞は1本の登上線維による興奮性シナプス入力を受けている(単一支配)が、発達初期には複数の登上線維により支配されている(多重支配)。発達が進むにつれ過剰な登上線維シナプスが除去され、マウスでは生後3週までに単一支配になる。従来、この機構解明へのアプローチとして、急性スライスを用いた電気生理学や固定標本を用いた免疫組織化学により解析されてきた。しかし、急性スライスや固定された標本では発達のある時点の状態を解析できるが、連続した経時的変化を捉えることはできず、その時点で細胞やシナプスがどういった挙動をしているのかも不明である。

## 2. 研究の目的

最近申請者は、*in vivo* と比べて遺伝子操作および形態観察がはるかに容易な登上線維-プルキンエ細胞シナプスの選択的強化・除去を再現した *in vitro* 小脳延髄共培養系を確立している (Uesakaら、JNS、2012)。この標本を用いれば、登上線維-プルキンエ細胞シナプスを構成する複数の細胞や線維、シナプスを多数の色により区別して標識することが可能である。本研究では、小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達を対象とし、申請者が新たに開発した小脳・延髄の *in vitro* 共培養系や生きた動物の脳内を直接観察する系において、発達期の小脳の中で登上線維がどのように刈り込まれるのかをリアルタイムで観察し、その細胞機構の解明を目指した。

このために、まず、生きた標本でプルキンエ細胞・登上線維とそのシナプスを特異的に染色標識する方法の確立を目指した。その上で、細胞やシナプスを別々の色で区別して標識する方法を確立し、これらの動態をリアルタイムで長期観察することを目的に研究を行った。

- ① 目的のシナプスを構成する細胞および線維を特異的に標識する方法の確立。
- ② 複数の細胞や線維を別々の色で区別して標識する方法の確立。
- ③ 複数の細胞やシナプスの長期的なリアルタイムイメージング。

## 3. 研究の方法

**① 目的のシナプスを構成する細胞および線維を特異的に標識する方法の確立。**：

後シナプス細胞のプルキンエ細胞や、シナプスに隣接するグリア細胞に特異的に蛍光タンパク遺伝子を発現させるために、小脳においてプルキンエ細胞あるいはグリア細胞特異的に働くプロモーター(L7遺伝子、GFAP遺伝子のプロモーター: Eur J Neurosci 14, 57-63, 2001; Takayamaら、Neurosci Lett 443, 7-11, 2008)の下流に蛍光タンパク遺伝子を挿入したウイルスベクターを小脳に注入する。すでに申請者の研究室で、蛍光タンパク遺伝子をプルキンエ細胞に特異的に発現させ、その細胞体や樹状突起を観察することに成功している。前シナプスである登上線維についても、本幹、分枝、シナプス前終末を蛍光タンパク発現により可視化する。現在までに、下オリーブ核細胞を含む培養延髄細胞に蛍光タンパク発現プラスミドベクターを局所的エレクトロポレーション法、あるいは蛍光タンパク発現ウイルスベクターを局所的に注入することにより、3色の蛍光タンパクを多数の細胞および線維に発現させ、細胞体から軸索終末まで別々の色で区別して可視化することができている。しかしながら、上記の方法では、下オリーブ核細胞以外の延髄細胞にも遺伝子が導入されてしまい、登上線維のみを観察するのは困難であった。この問題を解決するために、申請者らは2つの方法を進める。第一は、延髄において下オリーブ核細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスの延髄を使用し、Cre

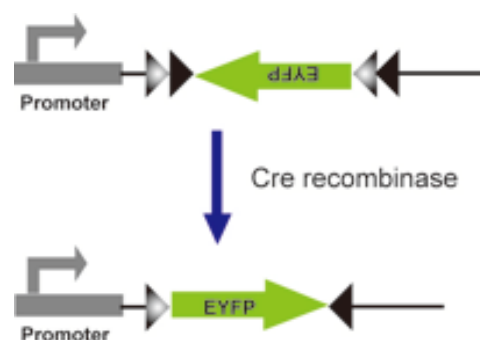


図1 Cre依存性発現システム

依存的蛍光タンパク発現ベクターをその延髄に注入して下オリーブ核細胞特異的に蛍光タンパクを発現させる方法である。図1に示すように、Cre依存的蛍光タンパク発現ベクターでは、逆方向に挿入した蛍光タンパク遺伝子を2種類のlox配

列で挟み、Cre が存在する細胞のみで蛍光タンパク遺伝子が順方向に転換され発現することができる。すでに申請者らは、Cre 依存的蛍光タンパク発現ベクターが Cre 発現細胞で特異的に働くことを確認している。また、下オリブ核細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスも使用可能な状態である。第二の方法は、第一の Cre 依存的蛍光タンパク発現ベクターをさらに応用したものである。小麦胚芽アグルチニン(WGA)は、経シナプ的に神経細胞間を移動することができ、神経回路のトレーサーとして使われてきた(Yoshihara ら、Neuron 22:33-41, 1999)。この性質に着目し、WGA と Cre の融合タンパク (WGA-Cre) と赤色蛍光タンパクである tdTomato とをウイルスベクターを用いて小脳プルキンエ細胞に特異的に発現させ、WGA-Cre を経シナプ的に登上線維に取り込ませ、下オリブ核細胞の細胞体まで運搬させる(図2)。

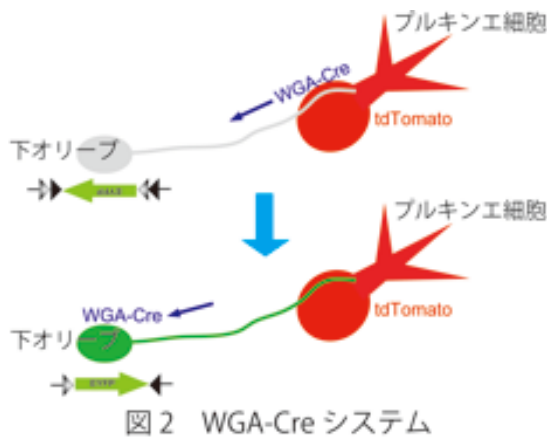


図2 WGA-Cre システム

## ② 複数の細胞や線維を別々の色で区別して標識する方法の確立:

①で確立した方法を用い、細胞や線維を別々の色で区別して標識する方法として2つの方法を試みる。第一は、3種類のCre依存的蛍光タンパク発現ベクター(例えば青: Cerulean, 緑: EYFP, 赤: tdTomato)を混合し延髄細胞に導入することで、下オリブ核細胞特異的に様々な色の蛍光タンパクが発現し、その結果登上線維のみが様々な色で標識される。ただしこの方法では、レンチウイルスベクターは概ね1コピーの遺伝子導入であるため、大部分の登上線維は青、緑、赤のいずれか単色で標識され、混合色で標識される登上線維は少ないと考えられ

る。三原色の加法混色で様々な色を作るテレビモニターのように、3色の蛍光タ

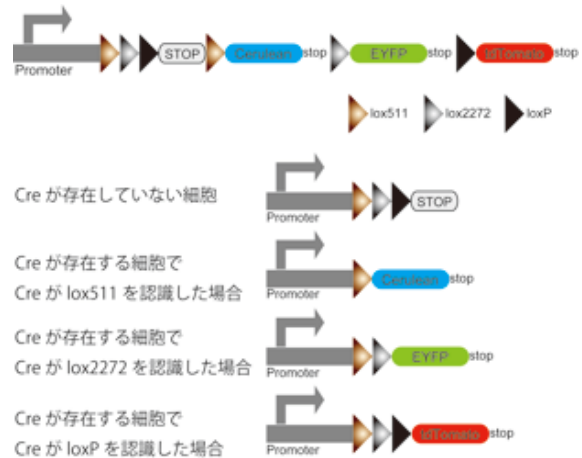


図3 改良型 Brainbow ベクター

ンパクの発現の組み合わせで様々な色に個々の細胞や線維を標識できれば、細胞や線維、シナプスの識別がより容易になると考えられる(Livetら、Nature 450: 56-62, 2007)。そこで、第二の方法として、図3に示すような改良型Brainbowベクターを用いる。Livetらが作成した構造との最大の違いは、蛍光タンパク遺伝子上流に終止コドンを含む配列(STOP配列)を挿入していることである。このベクターを延髄細胞に導入すると、Cre活性を有しない細胞ではSTOP配列により何れの蛍光タンパクも発現しない。一方、Cre活性を有する下オリブ核細胞では、lox511、lox2272、loxPの何れかが認識され、STOP配列を含むその間の配列が飛ばされる。これにより、3種類の蛍光タンパクの中で1つの蛍光タンパクがランダムにそれぞれの細胞で発現するようになる。この蛍光タンパクとloxによる配列を2コピー用意すれば、6種類の色を作製でき、さらにコピー数を増やせばそれだけ組み合わせによる色の種類は多数になる。このようにして様々な組み合わせで蛍光タンパクが発現できるようにし、生きた標本において多数の色で複数の細胞やシナプスを標識し、可視化する。

## ③ 複数の細胞やシナプスの長期的なリアルタイムイメージング:

顕微鏡下で1週間以上培養しながら、リアルタイムで細胞やシナプスを観察する。

このために、培養に適した37℃、CO<sub>2</sub> 5%で湿度が飽和した閉鎖環境を保てる培養装置付きの顕微鏡を使用する。または、数時間から1日置きに顕微鏡下で観察し、培養器へ戻す作業を繰り返す。

#### 4. 研究成果

①、②  
プルキンエ細胞や、シナプスに隣接するグリア細胞に特異的に蛍光タンパク遺伝子を発現させる方法を確立した。プルキンエ細胞特異的に機能するプロモーター(L7)の下流に蛍光タンパク遺伝子を挿入したウイルスベクターを作製し、注入した結果、プルキンエ細胞特異的に蛍光タンパクを発現させることに成功した。またグリア細胞特異的にウイルスが導入される条件を検討した結果、グリア細胞にも特異的に蛍光タンパクを発現させることに成功した。また、登上線維のみ、蛍光タンパク質を発現させるために、小麦胚芽アグルチニン(WGA)を用いた方法を試みた。WGAは、経シナプ斯的に神経細胞間を移動することができ、神経回路のトレーサーとして使われてきた。この性質に着目し、WGAとCreの融合タンパク(WGA-Cre)と赤色蛍光タンパクであるtdTomatoとをウイルスベクターを用いて小脳プルキンエ細胞に特異的に発現させ、WGA-Creを経シナプ的に登上線維に取り込ませ、下オリーブ核細胞の細胞体まで運搬させる。同時に延髄細胞にCre依存EGFP発現ベクターを注入しておくことにより、下オリーブ核細胞特異的に蛍光タンパクを発現させる。これらのベクターを作製し、試みた結果、プルキンエ細胞がtdTomatoで標識され、延髄細胞の一部がEGFPで標識された様子が観察された。

3種類の蛍光タンパク質とそれらを発現させるためのレンチウイルスベクターを用い、小脳・延髄の共培養標本へ蛍光タンパク質発現レンチウイルスベクターを注入した結果、複数の細胞が別々の色で標識され、複数の線維も別々の色で標識されていた。しかしながら、それらの線維が登上線維であるかどうかは良い登上線維マーカーがないため決定できなかった。そこで、生きたマウスで登上線

維を観察する方法を試すために、生後直ぐのマウスの延髄にそれらの蛍光タンパク質発現ウイルスベクターを注入し、1週間以降経過した後に、観察した。その結果、小脳内において、蛍光タンパク質で標識された登上線維がその標的細胞であるプルキンエ細胞の細胞体や樹状突起上に観察された。今後、これらの方法を組み合わせ、生きたマウスの脳内において、リアルタイムイメージングを行うことで、シナプスの選択的強化や除去がどのように進行するのかが明らかになることが期待できる。

③  
顕微鏡の改良や観察する環境に関して、試行錯誤を行った。37度、5%CO<sub>2</sub>の環境下で培養液を温め、それを還流することで、生きた標本内で24時間、蛍光標識した線維を観察することが可能となった。また、1日に1度、顕微鏡下で観察した場合、最大1週間、生きた標本内で同じ細胞や線維を観察することが可能となった。今後は、この方法と上記①、②の方法を組み合わせれば、長期間シナプスの刈り込み過程を観察できることが期待される。

#### 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2件)

①査読あり

Uesaka N, Mikuni T, Hashimoto K, Hirai H, Sakimura K, Kano M.

Organotypic coculture preparation for the study of developmental synapse elimination in mammalian brain. *J. Neurosci*, 2012, 22 August. 32(34): 11657-11670;

②査読あり

Tanimura A, Uchigashima M, Yamazaki M, Uesaka N, Mikuni T, Manabu Abe, Kouichi Hashimoto, Masahiko Watanabe, Kenji Sakimura and Masanobu Kano. Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde

synaptic suppression Proc Natl Acad Sci U S A. 2012, 2012 Jul 10.

[学会発表] (計6件)

①三國貴康、Possible involvement of the Ca<sup>2+</sup>-dependent gene Arc in activity-dependent synapse elimination in the cerebellum、北米神経科学学会 Neuroscience2012、

2012年10月、アメリカ ニューオーリンズ

②谷村あさみ、Synapse type-independent degradation of 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression in the cerebellum、北米神経科学学会Neuroscience2012、2012年10月、アメリカ ニューオーリンズ

③上阪 直史、組織培養法と細胞種特異的遺伝子導入法を用いたシナプス刈り込みのメカニズムの解明、第90回(平成24年度)日本生理学会、2013年3月、東京

④三國貴康、Postsynaptic Purkinje cell activity accelerates climbing fiber synapse elimination in an organotypic coculture preparation of the cerebellum and medulla oblongata、北米神経科学学会 Neuroscience2011、2011年11月、アメリカ ワシントン

⑤三國貴康、小脳-延髄共培養標本の登上線維シナプス除去におけるプルキンエ細胞活動の役割、第34回日本神経科学大会、2011年9月、パシフィコ横浜、神奈川

⑥谷村あさみ、2-アラキドノイルグリセロールリパーゼは小脳皮質においてシナプス非特異的に分解される、第34回日本神経科学大会、2011年9月、パシフィコ横浜、神奈川

[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