

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 3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659105

研究課題名（和文） 機能的ブレインボウ法による発達期シナプス形成—選択メカニズムの解明

研究課題名（英文） Research on the mechanisms underlying developmental synaptogenesis using functional brainbow strategy

研究代表者

八尾 寛 (Hiromu Yawo)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：00144353

研究成果の概要（和文）：

ニワトリ胚毛様体神経節のカリックスシナプスは、中枢神経系および末梢神経系におけるシナプス形成の発達期モデルとして、形態および機能について研究の蓄積がある。近年の遺伝子操作技術の発達にともない、膜電位や Ca^{2+} 上昇など、シナプス伝達の要素ステップを光遺伝学的に操作あるいは計測することが重要になってきた。そこで、本研究においては、カリックスシナプス前終末を分子および機能レベルで操作する手法を開発した。

研究成果の概要（英文）：

The calyx-type synapse of chick ciliary ganglion (CG) has been intensively studied for decades as a model system for the synaptic development, morphology and physiology. Here, we evaluated a method for manipulating the molecular and functional organization of the presynaptic terminals of this model synapse.

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：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：発生、分化、シナプス形成、トロフィック物質、自律神経節

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系および末梢神経系におけるシナプス形成の発達期では、シナプス前ニューロン、シナプス後ニューロンとも、過剰に形成されるが、発達期におけるニューロン死の結果、適正な数に調整される。シナプス前ニューロンがその標的細胞に作るシナプスについても、いったん過剰に作られたものが選択され、シナプス前ニューロンあたりのシナプス形成数や標的ニューロンあたりのシナプス数が、適正な数に調整される（シナプス除去）。これらのプロセスは、シナプス前ニューロンとその標的細胞の情報伝達を精密に制御する上で重要であるが、そのメカニズムの詳細は不明である(Kasthuri and Lichtman, 2004; Luo and O'Leary, 2005)。ニワトリ胚毛様体神経節において、中脳 Edinger-Westphal 核

のニューロンがその標的ニューロンに形成する大型のカリックスシナプスは、発達期シナプスの古典的モデルシステムとして、研究の積み重ねがある(Yawo and Momiyama, 1993; Yawo and Chuhma, 1993; Dryer, 1994)。このシステムにおいては、シナプス前ニューロン、標的ニューロンの細胞死に引き続き、シナプス除去の結果、最終的に1つの標的ニューロンに1個のカリックスシナプスが選択されることがわかっている。また、エレクトロポレーションにより、中脳ニューロンに安定的に遺伝子導入する技術や RNAi ノックダウンの技術が確立している(Katahira and Nakamura, 2003; Nakamura et al., 2004; Odani et al. 2008)。そこで、これらを組み合わせ、カリックスシナプスの発達を制御しているメカニズムを分子レベルで解明することを着想した。

2. 研究の目的

(1) シナプス形成、成熟のプロセスの再評価。ニワトリ胚毛様体神経節のカリックスシナプスの発達については、Landmesser and Pilar (1972)の古典的な報告以来の研究報告がなされていない。エレクトロポレーション法により、カリックスシナプスの形態、機能の発達を再評価する。

(2) シナプス除去メカニズムの解明。シナプス除去の分子メカニズムとして、さまざまな仮説が提唱されている。受容体の過剰発現、ドミナントネガティブ受容体の過剰発現、RNAi 法などを組み合わせエレクトロポレーション法により、これを検証する

3. 研究の方法

各種プラスミド混合液をニワトリ胚E2(Stage 11, Hamburger and Hamilton, 1951)の中脳脳室内に注入し、定法によりエレクトロポレーションを行う(Harada et al., 2008)。中脳EW核のシナプス前ニューロンが毛様体神経節にシナプスを形成し始めるE5(stage 26)からカリックスシナプスが完成するE14(stage 40)にわたり、励起および蛍光波長の組み合わせにより、個々のニューロンの軸索やシナプス前終末を識別し、形態やネットワーク結合を時系列的に解析する。

4. 研究成果

m-CFP, m-YFP, m-RFPなどをloxP, lox2272, loxNなどの配列で挟んで組み込んだpCAGGS-Brainbow1.1Mプラスミド、Creリコンビナーゼ遺伝子を組込んだpCAGGS-mCherry-NCreプラスミドを作製した。これらの混合してin ovoエレクトロポレーション法により中脳ニューロンに導入した。中脳Edinger-Westphal(EW)核のシナプス前ニューロン、動眼神経および毛様体神経節カリックスシナプスにおいて、個々のニューロン、それらの軸索やシナプス前終末を識別し、絡み合った軸索走行や軸索終末が色分けされることを確認した。また、毛様体神経節においては、E8-14の発達期において、シナプス前終末がブートン状から杯状に発達していくとともに、シナプス前細胞に対して均一に軸索刈込が生じ、複数のシナプス後ニューロンにシナプスを形成するのは希であることが示唆された。このことから、従来の競合仮説を補足するものとして、「共存」の原理を着想するに至った。また、オプトジェネティクスセンサー(ChRFR)とアクチュエーター(R-GECO1)を同時に発現させ、シナプス前終末を光刺激してCa²⁺応答を光学計測することに、世界に先駆けて成功し、シナプス前終末の直接光刺激はChRFRを介して小胞体のCa²⁺ストアからのCa²⁺放出を促すことが示唆された(Egawa et al., 2013)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Yawo H, Asano T, Sakai S, Ishizuka T (2013) Optogenetic manipulation of neural and non-neural functions. *Dev Growth Differ* 55(4):474-490. (doi: 10.1111/dgd.12053) (査読有)
2. Egawa R, Hososhima S, Hou X, Katow H, Ishizuka T, Nakamura H, Yawo H (2013) Optogenetic probing and manipulation of the calyx-type presynaptic terminal in the embryonic chick ciliary ganglion. *PLoS ONE* 8(3), e59179. (DOI: 10.1371/journal.pone.0059179) (査読有)
3. Yawo H, Koizumi A, Hegemann P (2013) Adventure beyond borders of scientific fields with optogenetics. *Neurosci Res* 75:1-2. (doi: 10.1016/j.neures.2013.02.001) (査読有)
4. Ji Z-G, Ishizuka T, Yawo H (2013) Channelrhodopsins - their potential in gene therapy for neurological disorders. *Neurosci Res* 75:6-12. (doi: 10.1016/j.neures.2012.09.004) (査読有)
5. Umeda K, Shoji W, Sakai S, Muto A, Kawakami K, Ishizuka T, Yawo H (2013) Targeted expression of a chimeric channelrhodopsin in zebrafish under regulation of Gal4-UAS system. *Neurosci Res* 75(1):69-75. (doi: 10.1016/j.neures.2012.08.010) (査読有)
6. Tanimoto S, Sugiyama Y, Takahashi T, Ishizuka T, Yawo H (2013) Involvement of glutamate 97 in ion influx through photo-activated channelrhodopsin-2. *Neurosci Res* 75(1):13-22. (doi: 10.1016/j.neures.2012.05.008) (査読有)
7. Sakai S, Ueno K, Ishizuka T, Yawo H (2013) Parallel and patterned optogenetic manipulation of neurons in the brain slice using a DMD-based projector. *Neurosci Res* 75(1):59-64. (doi: 10.1016/j.neures.2012.03.009) (査読有)
8. Ito S, Ishizuka T, Yawo H (2012) Remodeling of hippocampal network in pilocarpine-treated mice expressing synaptotagmin in the mossy fiber terminals. *Neurosci Res* 74(1):25-31. (doi: 10.1016/j.neures.2012.07.003) (査読有)
9. Ji Z-G, Ito S, Honjoh T, Ohta H, Ishizuka T, Fukazawa Y, Yawo H (2012) Light-evoked somatosensory perception of transgenic rats which express channelrhodopsin-2 in dorsal root ganglion cells. *PLoS ONE* 7:e32699. (doi: 10.1371/journal.pone.0032699) (査読有)
10. Ji ZG, Ito S, Honjoh T, Ohta H, Ishizuka T,

Fukazawa Y, Yawo H (2012) Light-evoked somatosensory perception of transgenic rats that express channelrhodopsin-2 in dorsal root ganglion cells. PLoS One 7(3):e32699. (doi: 10.1371/journal.pone.0032699) (査読有)

11. Asano T, Ishizuka T, Yawo H (2012) Optically controlled contraction of photosensitive skeletal muscle cells. Biotechnol Bioeng 109(1):199-204. (doi: 10.1002/bit.23285) (査読有)
12. Konno A, Honjo T, Uchida A, Ishizuka T, Yawo H (2011) Evaluation of a Sindbis virus vector displaying an immunoglobulin-binding domain: antibody-dependent infection of neurons in living mice. Neurosci Res 71(4):328-334. (doi: 10.1016/j.neures.2011.08.013) (査読有)

[学会発表] (計 24 件)

1. Shoko Hososhima, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo. Optogenetic manipulation of presynaptic activity in chick ciliary ganglion during synapse elimination. 第 90 回日本生理学会大会, 東京, 2013 年 3 月 27~29 日.
2. Ryo Egawa, Shoko Hososhima, Saki Tanimoto, Toru Ishizuka, Harukazu Nakamura, Hiromu Yawo. An experimental platform to study physiology, morphology and development of the vertebrate presynaptic terminal with genetic manipulations. 第 90 回日本生理学会大会, 東京, 2013 年 3 月 27~29 日.
3. Shoko Hososhima, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo. Optogenetic manipulation of presynaptic activity in the ciliary ganglion of chick embryo. 7th International chick meeting, Nagoya, Japan, 2012/11/14-18.
4. 八尾 寛, 光操作システムの開発とオプトジェネティクス(光遺伝学)への応用. 第 32 回 東邦大学生命科学シンポジウム, 船橋市, 2012/10/31. (招待講演)
5. 細島 頌子, 石塚 徹, 八尾 寛, 杯状シナプスにおけるシナプス除去機構への光遺伝学的アプローチ. 第 44 回東北生理談話会, 山形, 2012/10/27.
6. 谷本 早希, 石塚 徹, 八尾 寛, 光受容体チャネル, チャネルロドプシンのイオン流は Gd3+によりブロックされる. 第 44 回東北生理談話会, 山形, 2012/10/27.
7. 浅野豪文, 石塚徹, 八尾寛. チャネルロドプシンを発現した骨格筋管細胞における筋収縮と成熟の光操作. 第 50 回日本生物物理学会年会, 名古屋, 2012 年 9 月 22-24 日.
8. Egawa R, Hososhima S, Tanimoto S, Ishizuka T, Nakamura H, Yawo H. An experimental platform for the study of presynaptic development, morphology and physiology - gene manipulation of the vertebrate model synapse, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "Axon Guidance, Synapse Formation and Regeneration", Cold Spring Harbor, USA, 2012/9/18-22.
9. 江川遼, 八尾寛: 次世代シナプスモデルを用いた発達期シナプス刈込機構の研究. 東北大学脳科学 GCOE 異分野融合研究報告会, 仙台, 2012 年 3 月 2 日
10. Egawa, R., Hososhima, S., Ishizuka, T., Nakamura, H., and Yawo, H: ニワトリ胚毛様体神経節における杯状シナプスの発達プロセス—Brainbow 法による解析. 東北脳科学ウィンタースクール, 仙台・蔵王, 2012 年 2 月 18-19 日
11. 浅野豪文, 石塚徹, 八尾寛: オプトジェネティクスを用いた培養骨格筋の光操作. 生体情報インターフェース創生のためのフォトニクス研究 - 共同プロジェクト研究会, 仙台, 2011 年 12 月 13 日
12. Egawa, R., Hososhima, S., Ishizuka, T., Nakamura, H., and Yawo, H: ニワトリ胚毛様体神経節における杯状シナプスの発達プロセス—Brainbow 法による解析. 生化学若い研究者の会 若手シンポジウム, 仙台, 2011 年 12 月 10 日
13. 細島頌子, 侯旭濱, 仲村春和, 石塚徹, 八尾寛: Distribution of the actin-binding protein, coactosin in the chick ciliary ganglion during embryonic synaptogenesis. 3rd UCL-Tohoku symposium, London, UK, 2011 年 10 月 19 日
14. 浅野豪文, 石塚徹, 八尾寛: チャネルロドプシンを用いた光刺激による筋収縮制御. 第 1 回オプトジェネティクス講習会, 仙台, 2011 年 9 月 23 日
15. Yawo H, Wen L, Sakai S, Wang H, Tanimoto S, Egawa R, Ishizuka T: Resonant rhythms generated by neurons and network - opto-current-clamp with optimized channelrhodopsins. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011 年 9 月 21 日
16. Egawa R, Hososhima S, Ishizuka T, Nakamura H, Yawo H: ニワトリ胚毛様体神経節における杯状シナプスの形成—Brainbow 法による解析. The 34th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (NEURO2011), 横浜, 2011 年 9 月 14-17 日
17. 細島頌子, 侯旭濱, 仲村春和, 石塚徹, 八尾寛: Expression of the actin-binding

- proteins, coactosin and drebrin, in the developing chick ciliary ganglion. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 2011年9月17日
18. Tanimoto S, Wang H, Sugiyama Y, Ishizuka T, Yawo H: The molecular determinants involved in ion flux regulation of channelrhodopsin-2. 第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月17日
 19. Egawa R, Hososhima S, Ishizuka T, Nakamura H, Yawo H: Synaptogenesis in the embryonic chick ciliary ganglion – a brainbow study. OIST International Workshop “Molecular & structural organization of presynaptic function and plasticity”, Okinawa, 2011年9月7-9日
 20. Egawa R, Hososhima S, Ishizuka T, Nakamura H, Yawo H: Development of the calyx-type synapses in the embryonic chick ciliary ganglion – a brainbow study. 8th IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE, Florence, Italy, 2011年7月14-18日
 21. Tanimoto S, Wang H, Sugiyama Y, Ishizuka T, Yawo H: The molecular determinants involved in ion flux regulation of channelrhodopsins. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, 2011年7月17日
 22. 八尾寛, 石塚徹: 新世代チャネルロドプシンによるオプトジェネティクス. 神経組織の成長・再生・移植研究会 第26回学術集会, 東京, 2011年6月25日
 23. 八尾寛: 光受容イオンチャネル、チャネルロドプシンの光受容ーチャネル構造・機能関連. CBI学会 第317回研究講演会, 東京, 2011年5月27日
 24. 細島頌子、侯旭濱、仲村春和、石塚徹、八尾寛: Localization of the actin binding protein, coactosin that expressed in the developing chick ciliary ganglion. 第44回日本発生生物学会年会、沖縄、2011年5月19日

[図書] (計2件)

1. Asano T, Ishizuka T, Yawo H (2013) Muscle Optogenetics: Controlling muscle functions with light. In: Muscle Cells (Ed, Benigno Pezzo), Nova Science Publisher Inc., Hauppauge NY, pp. 127-135, 2013.
2. Hiromu Yawo, “Whole-Cell Patch Method” Patch-Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols (Springer Protocols Handbooks) (Ed. Yasunobu Okada), Springer Verlag, Japan (2012/2/29), ISBN-10: 4431539921, pp 43-69.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: ラット脳内光誘発けいれんモデル
 発明者: 大沢 伸一郎, 岩崎 真樹, 虫明 元, 八尾 寛, 富永 悌二, 古澤 義人
 権利者: 東北大学
 種類: PCT 出願
 番号: PCT/JP2012/580
 出願年月日: 2012年9月12日
 国内外の別: 国外

名称: ラット脳内光誘発けいれんモデル
 発明者: 大沢 伸一郎, 岩崎 真樹, 虫明 元, 八尾 寛, 富永 悌二, 古澤 義人
 権利者: 東北大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2011-198126
 出願年月日: 2011年9月12日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

[その他]

新聞報道

1. 日本経済新聞 (朝刊, 科学欄), 光が照らす脳の迷宮. 2012年7月1日.
2. 日経産業新聞、皮膚で光感じるネズミ - 触角の仕組み解明に活用、2012年3月21日
3. 朝日新聞 (朝刊, 科学欄)、手足の皮膚で光を感知、2012年3月15日
4. 河北新報 (朝刊)、皮膚で光を感知、東北大グループがマウス使い発見 応用期待、2012年03月09日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八尾 寛 (Hiromu Yawo)

東北大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号: 00144353