

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：35303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23786

研究課題名（和文）大脳皮質から視床への投射軸索がもつ巨大シナプス終末の発達メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms underlying the giant bouton development of corticothalamic projections

研究代表者

林 周一（Hayashi, Shuichi）

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50568938

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではマウスを用いて、大脳皮質5層から視床への投射がつくる特徴的な巨大シナプス終末の形成を制御する因子の同定を試みた。異なる生後齢のマウスの視床核からRNAを抽出し、RNAシーケンシングによるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、生後2-3週で発現が増加または減少する遺伝子を同定した。その中で、巨大シナプス終末の形成を制御する可能性のある分子の候補を選出した。また、子宮内穿孔法を用いて視床の遺伝子操作を行う条件を設定した。現在、候補遺伝子の発現操作による機能解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質5層からの入力を受ける視床領域は高次視床核と呼ばれ、感覚情報の統合を仲介する重要な働きをすることが示唆されてきた。しかし、その神経回路の形成過程については不明な点が多い。本研究で得られた成果は、今後、生後期の大脳皮質の活動に依存した皮質下領域のシナプス成熟の機構を解明する上で重要である。類似のシナプス終末の構造は海馬にもあり、記憶の形成に重要である。本研究で得られた視床のシナプス終末形成制御の知見を活かすことにより、海馬の記憶形成の回路基盤についても理解が深まることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cerebral cortical layer 5 provides major outputs to subcortical areas. In this study, I sought factors that regulate the formation of giant boutons formed by layer 5 corticothalamic projections. RNA was purified from thalamus at different postnatal days, and transcriptome analysis was performed using RNA-sequencing. This identified genes that are up- or down-regulated during the second and third postnatal weeks. I also set the experimental conditions for in utero electroporation of plasmids into thalamic nuclei to perform functional analysis of candidate genes.

研究分野：神経発生学

キーワード：大脳皮質 視床 発生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質 5 層から皮質下の領域に投射する軸索経路は、哺乳類の随意運動や感覚情報に応じた運動の調節に重要な役割を果たす。大脳皮質 5 層から皮質下への投射経路の中で、視床核への投射軸索は特徴的な巨大シナプス前終末形態をもち、この形態は皮質からの強力な出力を確実に視床核に伝えるために重要であることが示唆されている。皮質 5 層から視床への軸索投射がもつ巨大シナプス終末は、マウスやネコ、サルなどの哺乳類で保存された形態である (Rouiller and Welker, 2000)。マウスでは特に体性感覚野から視床後核へ、サルでは視覚野から視床枕核への投射軸索が巨大シナプス前終末をもつことから、各動物で優位な感覚を処理するために巨大シナプスが重要であることが示唆されている。しかし、そのシナプス終末形態の発達を制御するメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

申請者は、これまでに電子顕微鏡を用いて、マウスの皮質 5 層軸索の視床における巨大シナプス前終末が生後 2, 3 週に発達することや、その巨大シナプス前終末には視床後核神経細胞の樹状突起から 10 から 20 個の excrescence という通常のスパインよりも細長い突起が突出して、複数のシナプスを形成することを見出した。さらに、そのシナプス終末の発達に SNAP25 (Synaptosomal Associated Protein 25) を介した小胞放出が必要であることを発見した。これらの結果を踏まえて、本研究では、SNAP25 依存的に巨大シナプス前終末と後終末の形態形成を制御する因子を同定することにより、皮質から視床への出力回路の発達制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

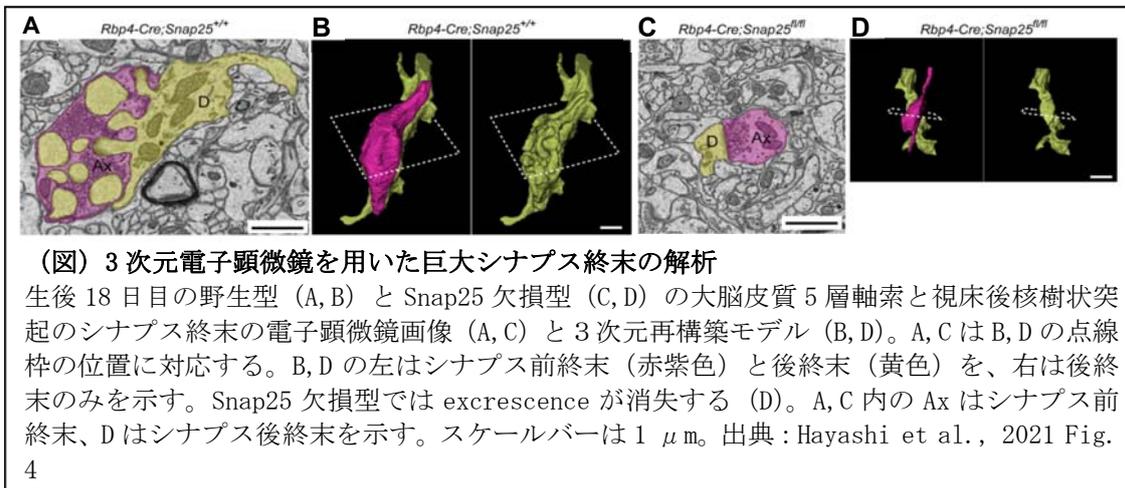
3. 研究の方法

大脳皮質 5 層特異的に発現する Rbp4-Cre マウスと Snap25^{flox};Rosa26-^{lsl}-tdTomato (Ai14) マウスを掛け合わせて、大脳 5 層特異的な Snap25 遺伝子の欠損とそのニューロンの蛍光標識を行った。生後 18 日でマウスを灌流固定し、脳をスライスして視床後核のシナプス終末の解析を行った。

シナプス前終末側の制御因子の一つとして神経活動の役割を検討するために、子宮内穿孔法を用いて内向き整流性 K⁺ チャンネル Kir2.1 を大脳皮質 5 層特異的に導入した。また、シナプス後終末側の制御因子を同定するために、異なる生後齢の野生型マウスの視床核からトータル RNA を抽出し、RNA シークエンシングによるトランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

まず、大脳皮質 5 層特異的に Snap25 遺伝子を欠損させたマウスについて、視床後核の巨大シナプス終末の 3 次元微細構造を解析した。蛍光標識された大脳皮質 5 層軸索とその巨大シナプス終末を蛍光顕微鏡下で同定し、その微細構造を Serial-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM) を用いて観察した。SBF-SEM の画像取得はスイス EPFL の Graham Knott 博士との共同研究で行った (Maclachlan et al., 2018)。その結果、Snap25 を欠損した大脳皮質 5 層軸索の視床後核におけるシナプス終末は、野生と比較して大きく減少していることが分かった (図)。また、Snap25 欠損シナプス前終末に対して視床後核ニューロンの樹状突起から伸びる excrescence が消失することを見出した。シナプス前終末の体積と後終末との接触面積を定量的に解析したところ、両者とも Snap25 欠損マウスでは有意に減少した。(Hayashi et al., 2021)。



(図) 3次元電子顕微鏡を用いた巨大シナプス終末の解析

生後 18 日目の野生型 (A, B) と Snap25 欠損型 (C, D) の大脳皮質 5 層軸索と視床後核樹状突起のシナプス終末の電子顕微鏡画像 (A, C) と 3 次元再構築モデル (B, D)。A, C は B, D の点線枠の位置に対応する。B, D の左はシナプス前終末 (赤紫色) と後終末 (黄色) を、右は後終末のみを示す。Snap25 欠損型では excrescence が消失する (D)。A, C 内の Ax はシナプス前終末、D はシナプス後終末を示す。スケールバーは 1 μ m。出典: Hayashi et al., 2021 Fig. 4

この結果は、巨大シナプス終末の複雑な形態形成には、シナプス前終末からの小胞放出が必要であることを示唆する。

本研究では、さらに視床核のトランスクリプトーム解析により、生後 2-3 週に発現が増加または減少する遺伝子を同定した。その中で、巨大シナプス終末の形成を制御する可能性のある分子の候補を選出した。また、子宮内穿孔法を用いて視床の遺伝子操作を行う条件を設定した。これを利用して、候補遺伝子の発現操作による機能解析を行っている。

本研究で得られた成果は、今後、生後期の大脳皮質の活動に依存的した皮質下領域のシナプス成熟の機構を解明する上で重要である。また、類似の複雑な形態をとるシナプス終末の構造は、海馬の苔状線維という歯状回から CA3 領域への投射軸索にも存在する。その苔状線維のシナプス終末形成を制御する機構もまだ明らかになっていない。大脳皮質 - 視床路と海馬の苔状線維の巨大シナプス終末形成の分子制御の共通性を検討することにより、今後、海馬の記憶形成の回路基盤についての知見も得られることが期待される。

研究成果に関連する参考文献

Maclachlan, C., Sahlender, D., Hayashi, S., Molnár, Z., Blanc, J. and Knott, G. Block face scanning electron microscopy of fluorescently labelled axons without using near infra-red branding. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2018; 12:88

Hayashi, S., Hoerder-Suabedissen, A., Kiyokage, E., Maclachlan, C., Toida, K., Knott, G., Molnár, Z. Maturation of complex synaptic connections of layer 5 cortical axons in the posterior thalamic nucleus requires SNAP25. *Cerebral Cortex*, 2021;31(5): 2625-2638

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi Shuichi, Hoerder-Suabedissen Anna, Kiyokage Emi, Maclachlan Catherine, Toida Kazunori, Knott Graham, Molnar Zoltan	4. 巻 31
2. 論文標題 Maturation of Complex Synaptic Connections of Layer 5 Cortical Axons in the Posterior Thalamic Nucleus Requires SNAP25	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 2625 ~ 2638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhaa379	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Horie Sawa, Kiyokage Emi, Hayashi Shuichi, Inoue Kanako, Sohn Jaerin, Hioki Hiroyuki, Furuta Takahiro, Toida Kazunori	4. 巻 529
2. 論文標題 Structural basis for noradrenergic regulation of neural circuits in the mouse olfactory bulb	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 2189 ~ 2208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.25085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shuichi Hayashi, Anna Hoerder-Suabedissen, Emi Kiyokage, Kazunori Toida, Graham Knott and Zoltan Molnar
2. 発表標題 The specialised synaptic development of layer 5 corticothalamic projections in posterior thalamic nucleus depends on regulated vesicular release.
3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林周一
2. 発表標題 大脳皮質5層 視床後核投射における巨大シナプス終末の発達
3. 学会等名 日本解剖学会第74回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi, S., Hoerder-Suabedissen, A., Kiyokage, E., Toida, K., Knott, G. and Molnar, Z.
2. 発表標題 The specialised synaptic development of layer 5 corticothalamic projections in posterior thalamic nucleus depends on regulated vesicular release.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関