

平成 31 年 2 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05568

研究課題名(和文) 神経回路再編成の神経活動依存性と関わる分子群の同定

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of activity dependent neural circuit refinement

研究代表者

上阪 直史 (Uesaka, Naofumi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：70597624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,000,000円

研究成果の概要(和文)：動物の生後発達において、脳内では必要なシナプスは強められて残存し、不必要なシナプスは弱められて除去されることによって、成熟した機能的神経回路が完成する(シナプスの刈り込み)。本研究では、シナプス刈り込みの神経活動依存性とその分子基盤の解明を目指し、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機構を解明することを目指した。その結果、登上線維の活動が、不必要なシナプスの除去を促進すること、登上線維によるプルキンエ細胞の支配を完成するのに必要であることを見出した。またシナプス刈り込みの促進分子・調節分子として、BDNF・Progranulinを見出した。

研究成果の概要(英文)：In the postnatal development of animals, necessary synapses in the brain are strengthened and unnecessary synapses are weakened and eliminated. This process is known as synapse elimination and important for the conversion of immature neural circuit to mature version. In this study, I tried to elucidate roles of neural activity and its molecular basis in synapse elimination of the cerebellar climbing fiber to Purkinje cell synapse in the developing mouse. I found that the neural activity of climbing fiber is necessary to eliminate unnecessary synapses and to complete the innervation of Purkinje cells by necessary climbing fibers. I also found that BDNF promotes synapse elimination and Progranulin counteracts synapse elimination.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス シナプス刈り込み 神経活動 シナプス入力 登上線維 プルキンエ細胞 バーグマングリア

1. 研究開始当初の背景

生まれたばかりの動物の神経系には、シナプスが過剰に存在しており、シナプスの密度は成熟脳の2倍程度にのぼる (Huttenlocher et al., Neurosci. Lett. 1982)。しかしこの時期のシナプスは機能的に未熟であり、動物個体としても脳機能は未熟な状態にある。成長につれて、必要なシナプスは強められて残存し、不必要なシナプスは弱められて除去されることによって、成熟した機能的神経回路が完成する(シナプスの刈り込み) (Kano & Hashimoto, Curr. Opin. Neurobiol., 2009)。この過程は、大脳皮質を含めた生後発達期の神経系で普遍的におこる重要な現象であると考えられている。小脳の登上線維とプルキンエ細胞シナプスは、神経筋シナプスや自律神経節のシナプスとともに、発達期のシナプス刈り込みを定量的に調べることができるシナプスである。小脳のシナプス刈り込みは、1本の登上線維の選択的強化、強められた登上線維のプルキンエ細胞樹状突起への移行、細胞体に残された未熟なシナプスの除去(前期除去過程、後期除去過程)という4つの過程を経て完成することが判明している (Hashimoto & Kano, Neuron 38: 785-796, 2003; Hashimoto et al., Neuron 63: 106-118, 2009) (図1)。シナプス刈り込みの分子メカニズムに関しては、小脳登上線維シナプスの実験系が最も研究が進んでいるが (Watanabe & Kano, Eur. J. Neurosci. 2011) 神経活動依存的メカニズムに関してはほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、シナプスの選択的強化・除去(シナプス刈り込み)の神経活動依存性とその分子基盤の解明を目指し、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。従来、神経活動がシナプス刈り込みに必要なことは知られているが、どのように神経活動が一部のシナプスを選択的に強化・維持し、残りのシナプスを除去するのかはほとんど不明のままである。本研究では、小脳のシナプス刈り込みにおいて神経活動依存性とそれに関わる分子をさらに網羅的に解析することによって、その分子機構を明らかにし、小脳機能における神経活動の役割の解明を目標とする。具体的には、以下の各項目について研究を進める。

(1) 神経活動の役割:

シナプス前部である登上線維間の神経活動依存的な競合の役割の解明

(2) プルキンエ細胞に存在する候補分子の機能解析

(3) 登上線維またはバグマングリアに

存在する候補分子の機能解析

(4) 同定された分子の神経活動依存性

3. 研究の方法

(1) シナプス前部である登上線維間の神経活動依存的な競合の役割の解明

登上線維間の活動依存的競合を見るために、一部の登上線維の活動を阻害した時のシナプス刈り込みを解析した。一部の登上線維のシナプス伝達を阻害するために、tetanus-toxinを用いた。生後0日目あるいは1日目のマウスの脳幹に tetanus-toxin を挿入したレンチウイルスベクターと導入された細胞を標識する GFP を持つレンチウイルスベクターを注入した。その後、生後3日齢から60日齢で、免疫組織染色法と電気生理学的方法により、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みを解析した。

(2) プルキンエ細胞に存在する候補分子の機能解析

プルキンエ細胞で遺伝子操作するために、プルキンエ細胞特異的なプロモーター(L7) (群馬大学 平井研から供与)を持ったレンチウイルスベクターを作製した。このベクターに遺伝子発現をノックダウンさせる microRNA を挿入した。それらの microRNA をを持ったレンチウイルスベクターを生後0-2日齢のマウスの小脳に注入し、生後7日齢から60日齢で登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みを解析した。

(3) 登上線維またはバグマングリアに存在する候補分子の機能解析

登上線維で発現する分子をノックダウンするために、MSCV プロモーターの下流に microRNA を挿入したレンチウイルスベクターを用いた。バグマングリアで発現する分子をノックダウンするために、アストロサイト特異的なプロモーター(GFAP 遺伝子プロモーターの改変型(群馬大学 平井研から供与))の下流に microRNA を挿入したレンチウイルスベクターを用いた。

(4) 同定された分子の神経活動依存性

プルキンエ細胞の神経活動に関わる代謝型グルタミン酸受容体や P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルと当該分子を同時にノックダウンした時のシナプス刈り込みを調べた。そのシナプス刈り込みの程度と、当該分子だけをノックダウンしたときのシナプス刈り込みの程度を比較し、代謝型グルタミン酸受容体やカルシウムチャネルとの関係を調べた。

4. 研究成果

(1) シナプス前部である登上線維間の神経活動依存的な競合の役割の解明

まず登上線維の神経活動の役割と登上線維

間の神経活動依存的競合の有無を調べるための方法の開発を行った。登上線維の神経活動を阻害するために、シナプスからの伝達物質放出を欠失させる tetanus-toxin light chain の発現ベクターを作成した。この tetanus-toxin light chain の発現ベクターをマウスの下オリブ核（登上線維の起始核）に導入し、登上線維からの入力消失することを見出した。またこの方法により一部の登上線維でのみシナプス伝達を消失できることを見出した。次に、生後すぐのマウスの登上線維に tetanus-toxin light chain の発現ベクターを導入し、発現させた時の登上線維のシナプス入力遮断される時期を電気生理学と免疫組織化学染色により解析した。その結果、tetanus-toxin light chain を導入後3日目においてシナプス入力に必要なタンパク質が消失していること、少なくとも4日目にはシナプス入力消失することを見出した。つぎに、この方法により、登上線維の神経活動を遮断し、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達を解析した。その結果、シナプス入力のない登上線維でも最終的にプルキンエ細胞を支配できることを見出した。また、シナプス入力のない登上線維はプルキンエ細胞の樹状突起への移動が遅れることを見出した。さらに、通常の成熟脳では、1つのプルキンエ細胞には1本の登上線維が入力しているが、シナプス入力のない登上線維が支配するプルキンエ細胞では他の登上線維シナプスも残存できることを見出した。

(2) プルキンエ細胞に存在する候補分子の機能解析

既に関したスクリーニング法を用い、いくつかの遺伝子の機能解析を行った。その結果、プルキンエ細胞で発現する神経栄養因子 BDNF が直接登上線維の受容体 TrkB に作用しシナプスを刈り込むことを見出した。さらに BDNF-TrkB シグナルはシナプス刈り込みの後期過程を制御することを見出した。

また別のスクリーニングにより前頭側頭型認知症の原因候補遺伝子 Granulin がシナプス刈り込みに関わることを見出した。さらに Granulin のタンパク質が直接登上線維の受容体 Sortilin に作用しシナプス刈り込みを調節することを見出した。さらに、この Granulin-Sortilin シグナルはシナプス刈り込みの後期過程からシナプス刈り込みを調節することを見出した。

(3) 登上線維またはバグマングリアに存在する候補分子の機能解析

生後1から3日齢のマウスにおいてバグマングリア細胞へ遺伝子導入を行うためにバグマングリアで機能する改良型GFAP遺伝子のプロモーターを持ったレンチウイルスベクターの作成を行った。作成条件を検討した結果、幼弱期より小脳のグリア細胞特異的に遺伝子を導入できるレンチウイルスベクターの作成に成功した。

このレンチウイルスベクターを用い、すでにノックアウトマウスで異常が見られているGLAST遺伝子をバグマングリア細胞でノックダウンした。その結果、登上線維入力に異常が見られ、この異常はノックアウトマウスで見られた異常と似ていた。このことからノックアウトマウスより簡便なレンチウイルスベクターを用いた遺伝子機能解析法がほぼ確立された。

登上線維における遺伝子スクリーニングにおいては、シナプス刈り込みに異常が認められる遺伝子は見出されなかった。

(4) 同定された分子の神経活動依存性シナプス刈り込みに関わることが示されたBDNF と代謝型グルタミン酸受容体あるいはP/Q型電位依存性カルシウムチャンネルとの関係を調べた。その結果、BDNFは代謝型グルタミン酸受容体の下流にある可能性が示唆された。

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 7件)

1. Uesaka N*, Abe M, Konno K, Yamazaki M, Sakoori K, Watanabe T, Kao TH, Mikuni T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M*.2018. * co-corresponding author

Retrograde Signaling from Progranulin to Sort1 Counteracts Synapse Elimination in the Developing Cerebellum. Neuron 97: 796-805, 査読有り

2. Choo M, Miyazaki T, Yamazaki M, Kawamura M, Nakazawa T, Zhang J, Tanimura A, Uesaka N, Watanabe M, Sakimura K, Kano M. 2017

Retrograde BDNF to TrkB signaling promotes synapse elimination in the developing cerebellum. Nat Commun. 8(1):195. 査読有り

3. Narushima M, Uchigashima M, Yagasaki Y, Harada T, Nagumo Y,

Uesaka N, Hashimoto K, Aiba A, Watanabe M, Miyata M, *Kano M. 2016 The Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 1 Mediates Experience-Dependent Maintenance of Mature Synaptic Connectivity in the Visual Thalamus. Neuron. 2016 Sep 7;91(5):1097-109. 査読有り

4. Uesaka N and Kano M. 2017. Presynaptic Mechanisms Mediating Retrograde Semaphorin Signals for Climbing Fiber Synapse Elimination During Postnatal Cerebellar Development. The Cerebellum. 17(1):17-22. 査読有り

5. Consensus Paper: Cerebellar Development. Leto K, Arancillo M, Becker EB, Buffo A, Chiang C, Ding B, Dobyns WB, Dusart I, Haldipur P, Hatten ME, Hoshino M, Joyner AL, Kano M, Kilpatrick DL, Koibuchi N, Marino S, Martinez S, Millen KJ, Millner TO, Miyata T, Parmigiani E, Schilling K, Sekerková G, Sillitoe RV, Sotelo C, Uesaka N, Wefers A, Wingate RJ, Hawkes R. 2016. Cerebellum. 15(6):789-828. 査読有り

6. T Watanabe, 渡邊貴樹, N Uesaka, 上阪直史, M Kano, 狩野方伸. 2016 生後発達期の小脳におけるシナプス刈り込みのメカニズム Journal of Japanese Biochemical Society 88 (5), 621-629. 公益社団法人日本生化学会。査読無し

7. Uesaka N, Uchigashima M, Mikuni T, Nakazawa T, Nakao H, Hirai H, Aiba A, Watanabe M, Kano M. 2015. Retrograde signaling for climbing fiber synapse elimination. The Cerebellum. Feb;14(1):4-7. 査読有り

〔学会発表〕(計 13 件)
代表的な発表のみ記載する。

Naofumi Uesaka and Masanobu Kano
Roles of retrograde signaling in climbing fiber to Purkinje cell synapse elimination during postnatal cerebellar development

the 8th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum and Ataxia, 2017

Naofumi Uesaka and Masanobu Kano
Regulation of climbing fiber synapse elimination in the developing cerebellum by retrograde signaling
第 40 回日本神経科学学会, 2017

上阪直史
逆行性シグナルによる発達期シナプス刈り込みの制御
生理研研究会「シナプスの構造構築と機能発現の分子基盤」, 2015
など

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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〕

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：7 0 5 9 7 6 2 4

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし