

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09602

研究課題名(和文) 成熟シナプスの維持機構の分子基盤 レット症候群退行現象の解明を目指して

研究課題名(英文) Molecular mechanism for maintenance of mature synapse - to elucidate the regression phenomenon of Rett syndrome -

研究代表者

矢ヶ崎 有希 (Yagasaki, Yuki)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90392422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は成熟シナプスの維持機構の分子基盤の解明を目指している。まずは、シナプスの成熟過程が良く研究されているマウス外側膝状体(視覚情報の中継核)に着目し、レット症候群の原因遺伝子であるMeCP2のタンパク質発現パタンを解析を行った。そして、中継細胞であるグルタミン酸作動性ニューロンにおいて、臨界期の視覚経験によりMeCP2のタンパク質の発現が誘導されることを明らかにした。この成果は2018年5月にPLOS ONEに受理されている。また、シナプス維持に必須の因子のスクリーニングを行う実験系の立ち上げもほぼ終了し、その現在はスクリーニングを進行中である。

研究成果の概要(英文)：Retinogeniculate (RG) synapses in the mouse dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) are known to develop into the mature circuit through three phases: synapse formation (P0-P10), synapse elimination (P10-P20), and the experience-dependent maintenance (P20-30) phases. Methyl CpG binding protein 2 (MeCP2), a transcriptional regulator associated with Rett syndrome, has been reported to be involved in experience-dependent maintenance of RG synapses. The MeCP2 expression pattern in the mouse dLGN, however, is not fully understood during the three phases. We found that the MeCP2 protein level in the dLGN gradually increased in glutamatergic but not GABAergic neurons during development. Interestingly, dark rearing from P21 for 10 days decreased MeCP2 expression only in glutamatergic neurons in the dLGN. These results suggest that the MeCP2 expression level in glutamatergic neurons is regulated in a visual experience-dependent manner during the RG synapse maintenance phase.

研究分野：神経科学

キーワード：脳・神経 神経疾患 レット症候群 MeCP2 成熟シナプスの維持機構

1. 研究開始当初の背景

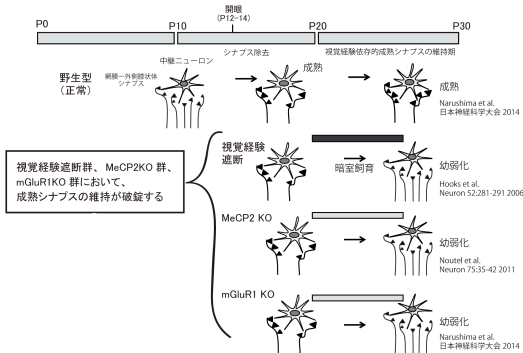
レット症候群は出生から発症時の生後6-18か月までは正常な精神・運動発達を示すが、発症後は、急速な精神・運動機能の退行が生じる。しかし、レット症候群の退行現象をもたらす詳細なメカニズムは十分明らかになっていない。レット症候群の原因遺伝子として、様々な遺伝子の転写を抑制および活性化する機能をもつ、メチル化 CpG 結合タンパク質 2 (MeCP2) が同定されている (Science 320:1224-1229, 2008)。MeCP2 遺伝子は X 染色体上にあり、男性は胎生致死となるため、患者は全て女性となる。X 染色体の不活性化の度合いにより、重症度が変化することが知られている。また、レット症候群の患者の死後脳および MeCP2 ノックアウト(KO)マウスの解析では、神経細胞の細胞体サイズの減少や樹状突起数の減少が報告されている (Neuropsychopharmacology 38: 212-219, 2013)。近年、MeCP2 遺伝子の重複により、レット症候群と同様に自閉傾向を示す、MeCP2 duplication syndrome が生じることが示されている (American Journal of Human Genetics 77: 442-53, 2005)。このことから、MeCP2 タンパク質の適切な発現量の調節が発達期の神経回路形成時に重要であることが予想される。

一方、マウスの網膜-外側膝状体 (LGN) シナプスの発達過程の電気生理学的解析は進んでいる。まず、網膜から LGN へ多数のシナプスが形成され、その後、刈り込みにより 2-3 本の軸索入力へと精練が行われ、生後 20 日ほどでシナプスが成熟する。またシナプス成熟後に視覚経験を遮断 (生後 20 - 30 日に暗室飼育) することにより、一度成熟したシナプスの減弱・再多重化 (幼弱化) が起こることが明らかとなっている (Neuron 52:281-291, 2006)。近年、MeCP2KO マウスの発達期の網膜 LGN シナプスの解析において、シナプス成熟までは正常に進行するのに対し、その後、視覚経験の入力があるにも関わらず、成熟シナプスの維持機構が破綻する (一度シナプスは成熟するが幼弱型に戻る) ことが示された (Neuron 70:35-42, 2011)。また、当研究室において代謝型グルタミン酸受容体 1 (mGluR1)KO マウスでも、MeCP2KO マウスと同様の結果が得られることが明らかとなった (Neuron 91:1097-109, 2016)。

つまり、成熟シナプスの維持に MeCP2 および mGluR1 が何らかの形で必須の役割を担っており、感覚入力とリンクして機能していることが示唆される (図 1)。申請者は、成熟後の感覚経験依存的なシナプス維持機構に必須の因子が存在し、臨界期の視覚経験遮断と同様に、MeCP2 または mGluR1 がノックアウトされることによりこの因子の制御機構が破綻すると仮説を立て、この因子の同定を目指す。この研究はレット症候群の退行現象をもたらす分子メカニズムの解明へ

と繋がると考えられる。

図1. マウスにおける網膜-外側膝状体シナプスの発達過程と成熟シナプスの維持が破綻する事が明らかとなったこれまでの知見および本研究の仮説



2. 研究の目的

以下の実験を行い、レット症候群の退行機構をもたらす分子メカニズム解明を目指す。

- 1) 基礎実験として、発達期の LGN における MeCP2 タンパク質の発現パターンおよび視覚経験遮断による影響を検討する。
- 2) 成熟後のシナプス維持過程に必須の因子を RNAseq により同定する。

3. 研究の方法

1) 発達期の外側膝状体における MeCP2 および mGluR1 タンパク質の発現パターンをウエスタンブロット法および免疫染色法により解析した。また、臨界期およびその前後に視覚経験遮断 (生後 11-20 日齢、生後 21-30 日齢、生後 41-50 日齢のそれぞれで暗室飼育) を行い、MeCP2 や mGluR1 の発現が視覚経験依存的に変化するかどうかを検討した。また、mGluR1KO マウスの外側膝状体における MeCP2 のタンパク質発現をウエスタンブロット法により検討した。

2) 成熟後のシナプス維持に必須の因子をスクリーニングするため、目的のニューロンの翻訳中 RNA のみを回収する方法 (Ribosomal Affinity Purification : TRAP 法) を用いて、感覚入力遮断時に中継ニューロン特異的に発現変化する mRNA を網羅的に解析する予定である。この解析のための環境を整えた。

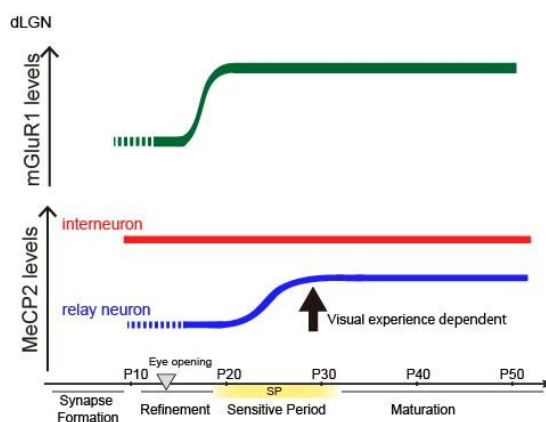
4. 研究成果

1) 生後 10 日齢~50 日齢のマウスの外側膝状体における MeCP2 および mGluR1 のタンパク質発現をウエスタンブロット法により検討した。MeCP2 タンパク質は生後 20~30 日の間で、mGluR1 は生後 10~20 日の間でその発現が有意に上昇することが明らかとなった。免疫染色法により、MeCP2 タンパク質の発現上昇はグルタミン酸作動性ニューロンにおいて選択的に生じていることが明らかとなった。

生後 11-20 日齢、生後 21-30 日齢、生後 41-50 日齢のそれぞれで暗室飼育を行ったところ、mGluR1 タンパク質は全ての期間において

暗室飼育をしても発現変化は認められなかった。一方、MeCP2 タンパク質は、生後 21-30 日齢、生後 41-50 日齢の期間に暗室飼育を行うと発現が低下することが明らかとなった。さらに、免疫染色法により解析を進めると、視覚経験遮断による MeCP2 タンパク質の発現低下はグルタミン酸作動性ニューロンにおいてのみ生じることが明らかとなった。今回の研究で、外側膝状体の興奮性ニューロンにおいて臨界期以降に MeCP2 のタンパク質発現が上昇すること、臨界期以降の暗室飼育により MeCP2 タンパク質の発現が低下することが明らかとなった(図 2)。シナプスの維持が暗室飼育および MeCP2 ノックアウトマウスで破綻することから、シナプスの維持機構には、外側膝状体の興奮性ニューロンにおける MeCP2 の適切な発現が必要な可能性が示唆される。また mGluR1KO マウスにおいて MeCP2 タンパク質の発現が上昇することも明らかとした。このことから、mGluR1 が何らかの形で MeCP2 の発現を調節している可能性も示唆された。以上の研究成果は 2018 年 4 月に PLOS ONE に受理され、in press となっている。

図 2 外側膝状体における発達期の mGluR1 および MeCP2 タンパク質発現変化と視覚経験遮断における影響



2) 成熟後のシナプス維持に必須の因子のスクリーニング

申請者は視床の中継ニューロンより成熟後のシナプス維持に必須の因子が発現誘導されると仮説と立て、そのスクリーニングを進行中である。具体的には視床特異的に Cre を発現するマウス (5HTT-Cre) に Cre 依存的に tdTomato を発現するマウス (Ai14) を掛け合わせ、200 μ m の脳スライスを作製し、VPM のヒゲ領域を切り出し、セルソーターで tdTomato 陽性の中継ニューロンのみを分取しようと試みた。しかし、5HTT-Cre マウスが生後 15 日ぐらいでは Cre の発現特異性が低いこと、セルソーターを行うために細胞 1 つずつをバラバラにする際に細胞の生存率が著しく低下することが明らかとなったため、スクリーニング系としてこの方法で進めるのは難しいとの結論に至った。現在は、目的のニューロンの翻訳中 RNA のみを回収

する方法 (Ribosomal Affinity Purification : TRAP 法) を用いて、感覚入力遮断時に中継ニューロン特異的に発現変化する mRNA を網羅的に解析する系を立ち上げている。具体的には視床特異的に Cre を発現する他のマウスライン (Pkcd-Cre) と Cre 依存的に HA タグ付きリボソーム構成タンパク質を発現する RiboTag マウスを用いて解析を行う。現在は条件検討を行っているところである。今後 TRAP 法により、外側膝状体の中継ニューロン特異的な遺伝子発現変化を網羅的に行い、感覚経験依存的なシナプス維持機構に必須の因子の同定へとつなげたい。

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 3 件)

(1) Yagasaki Y., Miyoshi G., and Miyata M (CA)
Experience-dependent expression of MeCP2 in the mouse dorsal lateral geniculate nucleus excitatory cells
PLOS ONE in press (査読有)

(2) Takeuchi Y., Osaki H., Yagasaki Y., Katayama Y., and Miyata M (CA)
Afferent fiber remodeling in the somatosensory thalamus of mice as a neural basis of somatotopic reorganization in the brain and ectopic mechanical hypersensitivity after peripheral sensory nerve injury
eNeuro **23** March 2017,
ENEURO.0345-16.2017 (査読有)
DOI: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0345-16.2017>

(3) Narushima M., Uchigashima M., Yagasaki Y., Harada T., Nagumo Y., Uesaka N., Hashimoto K, Aiba A, Watanabe M, Miyata M.(CA), and Kano M.(CA)
Type1 Metabotropic Glutamate Receptor Mediates Experience -Dependent Maintenance of Mature Synaptic Connectivity in the Visual Thalamus
Neuron **91**: 1097-1109 (2016) (査読有)
DOI:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.07.035>

【学会発表】(計 5 件)

(1) 矢ヶ崎 有希, 宮田 麻理子,
発達期マウス外側膝状体における MeCP2 タンパク質の発現制御機構、

第 94 回 日本生理学会大会 (浜松) 2017 年

(2)Madoka Narushima, Motokazu Uchigashima, Yuki Yagasaki, Takeshi Harada, Yasuyuki Nagumo, Naofumi Uesaka, Kouichi Hashimoto, Atsu Aiba, Masahiko Watanabe, Mariko Miyata, Masanobu Kano. Type I metabotropic glutamate receptor is crucial for visual experience-dependent maintenance of mature connectivity of retinogeniculate synapses
10th FENS Forum of Neuroscience 2016.
(Copenhagen, Denmark)

(3) 矢ヶ崎 有希、宮田 麻理子
網膜 視床外側膝状体シナプス維持期における MeCP2 タンパク質の発現制御
第 38 回日本神経科学大会 (神戸) 2015 年

(4)鳴島 円、内ヶ島 基政、矢ヶ崎 有希、原田 武志、南雲 康之、上阪 直史、渡邊 貴樹、橋本 浩一、饗場 篤、渡辺 雅彦、宮田 麻理子、狩野 方伸
1 型代謝型グルタミン酸受容体による網膜 - 外側膝状体シナプスの成熟型結合パタンの維持 女性研究者によるシンポジウム - 神経回路の発達原理の解明 -
第 38 回日本神経科学大会 (神戸) 2015 年

(5) 三好 悟一、植田 禎史、尾崎 弘展、矢ヶ崎 有希、花嶋 かりな、Gord Fishell、宮田 麻理子
神経発達症因子 FoxG1 による GABA 抑制性回路の発達機構
第 38 回日本神経科学大会 (神戸) 2015 年

〔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〕
ホームページ等

6 . 研究組織
(1)研究代表者
矢ヶ崎 有希 (YAGASAKI YUKI)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 90392422