

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07039

研究課題名(和文) 軸索の標的支配は競合相手の数に依存するのか? : 発達期再編の定量コネクトミクス解析

研究課題名(英文) Does the number of targets dominated by each axon depend on the number of competitors?

研究代表者

江川 遼 (Egawa, Ryo)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：20722226

交付決定額(研究期間全体) : (直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文) : 発達期の神経回路再編の過程において、シナプス前軸索同士が競合しながら標的細胞との接続を成熟させていく際の基盤原理はまだほとんど理解が進んでいない。本研究では、軸索の標的支配数は競合相手の数に依存するという仮説を実験的に検証するため、シナプス前後の接続関係が発達に伴い1対多から1対1へと収束する毛様体神経節シナプスをモデルとして、シナプス前ニューロン数を遺伝子工学的に間引いた際の軸索の投射パターンを定量的に評価することで、標的支配数が変化するか否かを調べた。その結果、シナプス前ニューロン数を半数程度まで減少させても標的支配数の変化は見られず、シナプス後ニューロンの細胞数が連動して減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発達期における神経回路の再編は、脳の発達の根幹を成す現象の1つである。学習の臨界期の神経基盤として広く認識されているほか、発達期再編の異常は統合失調症や自閉症、共感覚の原因であるという指摘もされている。本研究で得られた成果は、軸索の標的支配数は競合相手の数ではなく、内因的な分子・細胞メカニズムによって運命づけられている可能性を示唆し、今後のさらなる研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文) : The underlying principles that allow axons to compete with each other to mature their connections to target cells during developmental neural reorganization are still poorly understood. To experimentally test the hypothesis that the number of targets dominated by each axon depend on the number of competitors, we used ciliary ganglion synapses as a model system in which presynaptic connections converge from one-to-many to one-to-one during development. We quantitatively assessed axon projection patterns when the number of presynaptic neurons is genetically thinned out. As a result, halving the number of presynaptic neurons did not change the number of synapses formed by axons, and the number of postsynaptic neurons also decreased. This result suggests that the number of targets dominated by each axon may be destined by endogenous molecular/cellular mechanisms, rather than by the number of competitors.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索間競合 コネクトミクス 発達期再編 ニワトリ胚 杯状シナプス

1. 研究開始当初の背景

発達期の神経回路は、ニューロンが標的細胞に向けて軸索を伸長する過程、シナプス接続を形成する過程、余剰なシナプス接続を間引く過程、の3つの一過的な段階を経ることで成熟していく。このうち第3の過程はシナプス除去と呼ばれ、活動依存的に必要なシナプスが強化され不要なシナプスが除去されることで機能的な回路が作られていくと考えられている (Buffelli et al., *Nature*, 2003; Hashimoto et al., *Curr Opin Neurobiol*, 2009)。シナプス除去は、よりマクロな局所回路の視点から見た場合、シナプス前軸索同士が競合しながら標的細胞とのシナプス接続を奪い合うプロセスだと言える。一方で、単一軸索レベルの投射解析は技術的に容易ではないことから、多くの研究は記述的なレベルに留まっており、発達期の軸索投射がどのような原理によって再編されるのか、まだほとんど理解が進んでいない。研究代表者は、発達期の回路再編を研究する新たな実験モデルとしてニワトリ胚毛様体神経節シナプスに着目して研究を行ってきた。このシナプスは脊椎動物における最もシンプルなネットワークの典型である。毛様体神経節は瞳孔の収縮や焦点調節に関わる副交感神経節で、その中では毛様体ニューロンが中脳 Edinger-Westphal (EW) 核に存在するシナプス前細胞からの軸索投射を受けている。発達期シナプスの古典的モデルとして長年研究に用いられており、多くの生理学的・形態学的知見が蓄積しているメリットがある (Yawo & Chuhma, *Nature*, 1993; Dryer, *Prog Neurobiol*, 1994)。8日胚(E8)では1つの毛様体ニューロンに対して多数のブートン状シナプスが形成されているが、14日胚(E14)ではシナプス後細胞の細胞体を覆う1つの巨大な杯状シナプス(カリックス)が形成されるようになり、この過程においてシナプス除去が生じている (Landmesser & Pilar, *J Physiol*, 1972) 【図1】。

研究代表者は近年、*in ovo* エレクトロポレーション法を応用することで毛様体神経節シナプス前細胞特異的に容易かつ高効率に目的遺伝子を局所導入する手法を独自に開発した (Egawa et al., *PLoS One*, 2013)。さらに、Cre/loxP システムを用いたマバら発現法や、CUBIC 法 (Susaki et al., *Cell*, 2014) による組織透明化などの新たな技術と融合することで、発達期の神経節内における軸索投射の再編過程の全体像を定量解析した結果、E8 の時点では多数の分枝を持っていた軸索が、E14 までに分枝がなくカリックスを1つだけ持った均一な投射パターンに収束していくことを見出した。すなわち、シナプス前細胞と後細胞が1対1接続の関係に収束することが示唆された 【図2】 (Egawa et al., *Soc Neurosci Abstr*, 2014)。このような回路再編の傾向は、シナプス除去が生じる他の組織でもみられる。例えば小脳の下オリブ核からブルキンエ細胞に投射する軸索では分枝数は7本に収束し、シナプス前後のニューロン数比も1対7となる (Fujita & Sugihara, *Front. Neural Circuits*, 2013)。また筋細胞に投射する運動ニューロン軸索では、分枝数は標的となる筋肉の種類ごとにおおむね一定の数に収束する (Brown et al., *J Physiol (London)*, 1976; Tapia et al., *Neuron*, 2012)。

個々の軸索が支配する標的細胞の数がそれぞれの組織で固有の値に収束するのはなぜなのだろうか。これまで、発達期におけるシナプス除去は活動依存的な軸索間の競合に基づくと考えられてきた。しかし競合原理のみに従うのであれば、相対的に活動の強い軸索が多くの標的細胞を寡占することになるはずであり、軸索同士が協調したような1対1という接続関係に収束するとは考えにくい。そこで研究代表者らは、生態系の数理モデル化のエキスパートである東北大学生命科学研究科酒井聡樹博士との共同研究により発達期回路再編の数理モデルを構築してシミュレーション実験を行った。その結果、同じ標的に投射する軸索間の競合、シナプス数が多い軸索ほど競合に弱くなる負のフィードバック、シナプス前細胞と後細胞の初期数のバランス、の3つの要素が相互に作用しあうことで、1対多接続の未熟な初期神経回路が徐々に自己組織化し、1対1接続のような寡占の生じない神経回路が創発することを見出した。研究代表者の実験システムは、機能的な介入とその効果の定量的な比較解析が容易に行える点に研究上のアドバンテージを有する。ゆえに軸索投射再編の基盤原理を実験的に明らかにできると考え本研究を着想した。

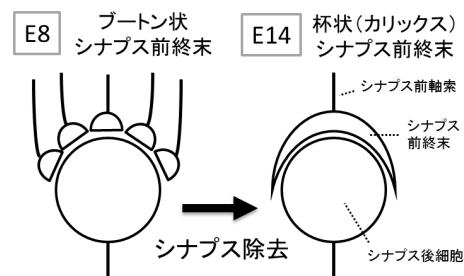


図1 毛様体神経節における発達期シナプス除去

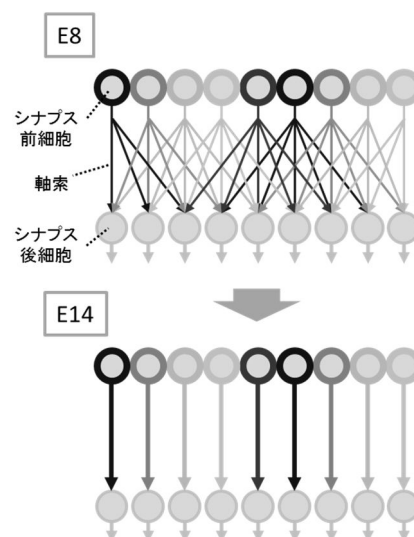


図2 毛様体神経節における均一な軸索投射再編

2. 研究の目的

我々の構築した回路再編の数値モデルからは、シナプス前後のニューロン数のバランスが軸索の標的支配数を決定する一要素であることが示された。すなわち、シナプス前細胞が相対的に少なくなって競合相手が減るほどに最終的に収束する軸索の標的支配数が増えていくことが予想された。そこで本研究では、毛様体神経節シナプスにおいてシナプス前細胞を間引いた際の軸索投射パターンを定量的に解析することで、軸索の標的支配は競合相手の数に依存するのか？【図3】という問いに対して、実験的に回答を得ることを目的とした。

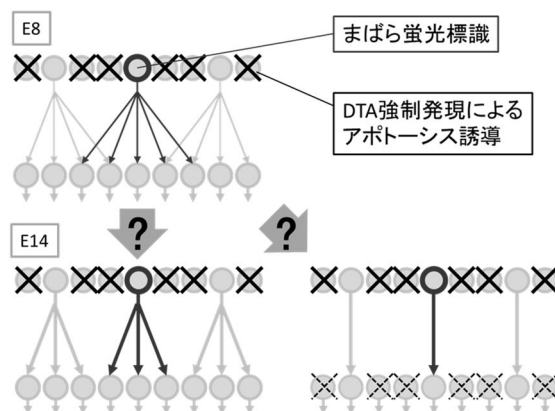


図3 軸索の標的支配は競合相手の数に依存するのか？

3. 研究の方法

プラスミド混合液を E2 ニワトリ胚の神経管に注入して **in ovo** エレクトロポレーション法を用いて中脳に導入することで、毛様体神経節へと投射する中脳 **EW** 核のシナプス前細胞に任意の遺伝子を発現させた。1:1 接続に収束する E14 までインキュベーションして中脳と神経節を摘出し、**CUBIC** 法もしくは **ScaleS** 法で透明化して二光子顕微鏡で撮像することで、シナプス前後の細胞数と軸索投射のパターンを定量解析した。

4. 研究成果

人為的なアポトーシス誘導によるニューロン数比への介入法の確立

競合するシナプス前ニューロンを適切な割合で間引くため、ジフテリアトキシン A 鎖(DTA)を **Tet-on** システム制御下で発現させて細胞死を誘導する手法を確立した。プラスミドの導入濃度を最適化することで、間引く割合を任意に制御することが可能となった。

毛様体神経節シナプスにおけるシナプス前後のニューロン数の定量解析法の確立

細胞死誘導の効果を正確にモニタリングするため、シナプス前後のニューロンの数を三次元的に正確にカウントする手法を確立した。毛様体神経節シナプスのシナプス前ニューロンの定量は、中脳 **EW** 核特異的に発現する **Vasotocin** の **3D-in situ hybridization** によって実現できた。シナプス後ニューロンの定量は、毛様体ニューロン特異的に発現する **Islet1/2** および **Somatostatin** の 3 次元免疫染色により実現できた。

軸索の標的支配は競合相手の数に依存するのか？

上述の手法を軸索のまばら蛍光標識と組み合わせ、競合相手を減らした際の個々の軸索の投射パターンを定量的に解析した。その結果、シナプス前ニューロン数を半数程度まで減少させても標的支配数の変化は見られず、正常条件と同様に 1 対 1 接続へと収束した。またシナプス前ニューロンの減少と連動して、シナプス後ニューロンにおいても細胞数が半減した。この結果は、軸索の標的支配数は競合相手の数ではなく、内因的な分子・細胞メカニズムによって運命づけられている可能性を示唆する。

CRISPR/Cas9 によるまばら KO システムの構築

軸索投射パターンの形態決定に関わる遺伝子を効率的にスクリーニングするために、条件的発現系と **CRISPR/Cas9** システムを組み合わせることで、**KO** とまばらかつ高強度な蛍光標識を同時に実現する実験系を構築した。この系を用いることで、**90%**に達する高い **KO** 効率と軸索の高強度の可視化を同時に実現することができた。軸索投射パターンに関わる分子メカニズムを明らかにするうえで強力な方法となると期待できる。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Egawa Ryo, Yawo Hiromu	4. 巻 87
2. 論文標題 Analysis of Neuro Neuronal Synapses Using Embryonic Chick Ciliary Ganglion via Single Axon Tracing, Electrophysiology, and Optogenetic Techniques	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Protocols in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 e64 ~ e64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/cpns.64	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 -

1. 著者名 Katow Hidetaka, Kanaya Teppei, Ogawa Tomohisa, Egawa Ryo, Yawo Hiromu	4. 巻 59
2. 論文標題 Regulation of axon arborization pattern in the developing chick ciliary ganglion: Possible involvement of caspase 3	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ	6. 最初と最後の頁 115 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12346	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江川 遼, 久場 博司
2. 発表標題 ニワトリ脳幹聴覚神経回路における領域依存的なミエリン形成の3次元形態解析
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関川 博, 江川 遼, 久場 博司
2. 発表標題 Brainbow法と組織透明化によるニワトリ脳幹聴覚神経回路の3次元形態解析
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関川 博, 江川 遼, 久場 博司
2. 発表標題 3-D visualization of avian auditory brainstem circuits using Brainbow labeling and tissue clearing method
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関川 博, 江川 遼, 久場 博司
2. 発表標題 Brainbow法と組織透明化によるニワトリ脳幹聴覚神経回路の3次元的可視化
3. 学会等名 第65回中部日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江川 遼, 服部 展幸, 久場 博司
2. 発表標題 ニワトリ脳幹聴覚神経回路におけるオリゴデンドロサイトの3次元形態解析
3. 学会等名 第65回中部日本生理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

受賞(計 5件)
2019年12月 株式会社ニコンインステック NIKON JOICO AWARD 2019 特別賞 両耳間時差を検出する脳幹聴覚神経回路 http://www.nikon-instruments.jp/jpn/bioscience-products/joico/award/award_3
2019年8月 新学術領域「スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御」 優秀ポスター賞 ニワトリ脳幹聴覚神経回路における領域依存的なミエリン形成の3次元形態解析 http://www.scrapandbuild.bs.s.u-tokyo.ac.jp/category/event/
2018年12月 ABiS先端バイオイメージング支援プラットフォーム ABiS イメージコンテスト 2018 光学顕微鏡画像部門 入選 http://www.nibb.ac.jp/abis/event/ev20181128-2
2017年10月 Nikon Instruments Inc. 7th Place, 43rd annual Nikon Small World Photomicrography Competition https://www.nikonsmallworld.com/galleries/2017-photomicrography-competition/individually-labeled-axons-in-an-embryonic-chick-ciliary-ganglion
2017年9月 Nikon Instruments Inc. HONORABLE MENTION, 7th annual Nikon Small World in Motion Photomicrography Competition https://www.nikonsmallworld.com/galleries/2017-small-world-in-motion-competition/individually-labelled-axons-in-an-embryonic-chick-ciliary-ganglion

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
研究協力者	八尾 寛 (Yawo Hiromu) (00144353)	東京大学・物性研究所・特任研究員 (12601)	
研究協力者	酒井 聡樹 (Sakai Satoki) (90272004)	東北大学・生命科学研究科・准教授 (11301)	