

機関番号：63904

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700364

研究課題名 (和文) 神経回路形成の後期過程における分子機構の解明

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of retinal axon branching and synaptogenesis

研究代表者

鈴木 亮子 (SUZUKI RYOKO)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・特別協力研究員

研究者番号：60414017

研究成果の概要 (和文)：

申請者らが単離同定した新規分泌因子 SPIG1 は、神経栄養因子の受容体の一つと結合することが明らかとなり、神経軸索側枝形成及びリファインメントの過程に関わる分子であることが示唆された。さらに、SPIG1 がシナプス形成の過程に関与している可能性を調べた。その結果、視蓋の表層が薄くなっていることが観察されたが、シナプスの形態に異常は見られず、正しい層においてシナプスを形成していることが判明した。SPIG1 は、神経軸索周辺の細胞外マトリックスの分解調節にも関与していると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

SPIG1 is a secretory molecule of unknown function, which is composed of a follistatin-like domain, an extracellular calcium-binding domain, and two immunoglobulin-like domains. I have here investigated the role of SPIG1 during the branch formation, elaboration of axon terminals and synaptic formation in retinal axons. I found that SPIG1 interacts with one of a neurotrophic receptor. I also investigated the possibility that SPIG1 is involved in synaptic formation during development. In SPIG1 knock-down dorsal retina, the superficial layers of the optic tectum were thin. However, the synapse structure and synaptic positions were normal. These results indicate that SPIG1 is involved in branch formation and refinement of developing retinal axons, and also SPIG1 might function as an axonally secreted regulator of the local extracellular proteolysis involved in the innervation by retinal axons within the tectum.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経回路形成、軸索側枝、神経栄養因子、ニワトリ

1. 研究開始当初の背景

脳神経系の発生過程において正確な神経回

路網を形成することは、成長後の成体において高次の神経機能を発現するために必須の構造的基盤となっている。視神経の視覚中枢への投射（網膜視蓋投射）は、神経系で見られる領域特異的神経結合の代表例であり、投射マップ形成の機構解明は、神経発生生物学の重要な課題である。申請者らは、網膜内領域特異化の分子機構とその後起こる視神経の視覚中枢への領域特異的神経結合形成の分子機構を明らかにするために、発生期ニワトリ網膜の鼻耳軸（前後軸）、あるいは、背腹軸方向において発現量に差のある分子のスクリーニングを行い、領域特異的に発現する多数の分子を同定した。我々は、同定した分子群の機能解析により、網膜内領域特異化および軸索ガイダンスの分子機構をほぼ明らかにした。一方、網膜視蓋投射マップが完成するには、網膜内領域特異化、軸索ガイダンスに引き続いて、軸索分枝形成、神経回路リファイメントの過程を必要とするが、後半の2つの過程に関わる分子基盤は十分明らかにされていない。先に同定した分子群の中で申請者らは、網膜の背側側の神経節細胞に多く発現し、フォリスタチン様ドメイン、プロテアーゼ阻害ドメイン、EF hand モチーフおよび免疫グロブリン様ドメインを有する新規分泌因子を見出した（SPIG1 と命名）。本分子は、特異的抗体を用いた組織染色から、神経軸索を輸送され、成長円錐に運ばれることが示唆された。さらに、遺伝子の発現ピークが軸索から多数の分枝が生じる時期にあることから、本分子が軸索の分枝形成、神経回路リファイメントの過程で働くと推測した。検証するにあたり、*in vivo* エレクトロポレーション法により shRNA をニワトリ胚網膜に発現させ、SPIG1 の発現を抑制する系を確立した。その結果、軸索分枝形成過程において、背側網膜から伸び出す神経軸索は、視蓋上で背側に拡がると共に、視蓋の前側で異所的な分枝を多数形成した。さらに、リファイメントの過程では、terminal zone の形成不全が認められた（未発表データ）。通常の投射形成においては、視蓋に到達した視神経軸索は、当初視蓋上に多少ながら分散する。しかし、その後、

軸索からの分枝形成、シナプス形成、およびそれに続く不適切な分枝やシナプスの除去をたどることにより、コンパクトな terminal zone が形成されるという経過をたどる。本分子の発現を抑制した場合には、分枝形成期以降に異常が見られるため、SPIG1 が、これまで詳しい分枝メカニズムが不明であった軸索の分枝形成及びリファイメントの過程に重要な分子であることを強く示唆した。

2. 研究の目的

網膜視蓋投射マップが完成するには、網膜内の領域特異化、軸索ガイダンスに引き続いて軸索分枝形成、神経回路リファイメントの過程を必要とするが、後半の2つの過程に関わる分子基盤は十分明らかにされていない。これまでの我々の研究から、新規分泌因子 SPIG1 は、軸索の分枝形成および、リファイメントの過程に関わる分子であることが示唆された。しかし、その分子作用メカニズムは全く不明である。そこで、本研究では神経軸索の分枝形成、および神経回路リファイメントの分子機構を、SPIG1 を通して *in vivo* で明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実施課題は、(1) SPIG1 の結合分子の同定、(2) 神経軸索の分枝形成の分子機構の解明、(3) 神経回路リファイメントの分子機構の解明である。

(1) SPIG1 の結合分子の同定

① 分泌性因子である SPIG1 は、細胞外の環境を何らの形で修飾し、機能していると考えられた。結合分子の候補として、これまでに細胞外マトリックス成分を検討してきたが、決定的な証拠は得られていない。一方、神経栄養因子の受容体の一つと SPIG1 の結合を示唆する結果を得た。そこで、SPIG1 と受容体との結合を免疫沈降法にて検討した。

② 免疫組織化学により、SPIG1 と受容体との網膜および視蓋での局在を調べた。SPIG1 は分泌性因子である為、組織での共局在が

明確に示されない可能性があった。よって、SPIG1遺伝子と結合分子の遺伝子にそれぞれ異なる蛍光タンパク質遺伝子を連結したベクターを培養細胞に発現させ、それらの局在を調べることも同時に行った。

③ SPIG1の発現抑制時における結合分子の発現および活性の変化を *in situ* ハイブリダイゼーション及びウェスタンブロット解析により検討した。

(2) 神経軸索の分枝形成の分子機構の解明

(1)–③の実験結果から SPIG1 が結合分子の発現制御あるいは活性制御に関わる知見は得られなかった。その結果を踏まえ、網膜の分散培養系を用いて活性制御についてさらに詳細に調べた。

(3) 神経回路リファインメントの分子機構の解明

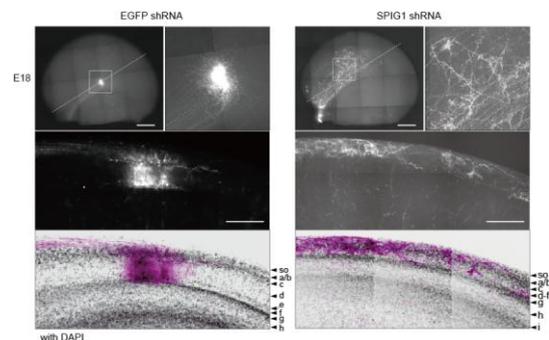
誤った投射は最終的には除去され、シナプスは形成されない。一方、SPIG1は、その発現を抑制した時には、軸索分枝の形成位置の異常およびリファインメントが起こらないことが判っている。このことは、SPIG1がシナプス形成の過程にも関与している可能性を示している。これを検討するために、電子顕微鏡を用いてSPIG1の発現抑制時の視蓋の層構造および、シナプスの形態、シナプスを形成する層に異常がないか調べた。具体的には、軸索を脂溶性蛍光色素DiIにて標識し、DABを基質に用いたphoto-conversionによりDiIシグナルを黒色沈殿に代えて電子顕微鏡用サンプルを調製した。

4. 研究成果

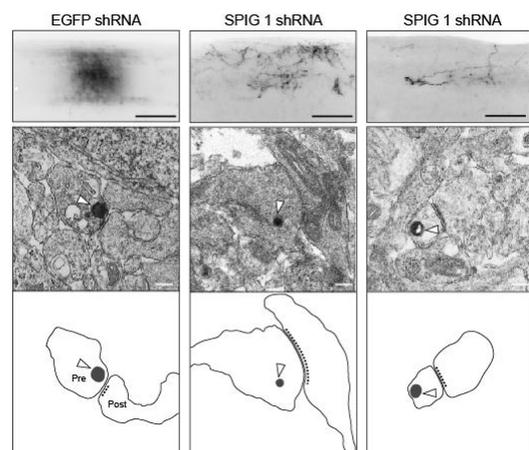
分泌因子である SPIG1 は、細胞外の環境を何らかの形で修飾し、機能していると考えられ、その結合分子の候補として、神経栄養分子の受容体の一つを検討した。結果、免疫沈降法によりその結合が示唆された。また、免疫組織化学法により網膜内における受容体の発現分布を調べたところ、SPIG1 が発現する層と一致することが明らかとなった。これらのことから SPIG1 が結合分子の発現制御あるいは、活性制御に関わることが示された。ウェスタンブロット解析により、網膜における SPIG1 の発現抑制時結合分子の発現量の変化

を調べた。その結果、発現量に大きな変化は見られなかった。また、網膜の分散培養系を用いて受容体の下流で働く細胞シグナル伝達分子への影響を検討した。さらに、SPIG1 がシナプス形成の過程にも関与している可能性を検討するために、電子顕微鏡を用いて SPIG1 の発現抑制時の視蓋の層構造およびシナプスの形態、シナプスを形成する層に異常がないかを調べた。その結果、視蓋の表層が薄くなっていることが観察されたが、シナプスの形態に異常は見られず、正しい層においてシナプスを形成していることが判明した（未発表データ：図 1 a, b）。分泌因子である SPIG1 が神経軸索周辺の細胞外マトリックスの分解調節に関与していると考えられる。

[図 1 a]



[図 1 b]



[図 1 a 説明]

パネル左 (コントロール) : 腹側視蓋上で背側網膜由来の神経軸索はリファインメントにより明確な terminal zone が形成される (E18)。パネル右 (SPIG1 knock down) : 背

側網膜由来の神経軸索は、腹側視蓋上で背側に広がり、異所的分枝を形成する。明確な terminal zone が形成されない。

パネル中段・下段：破線に沿ってスライスした部位の層構造を示す。SPIG1 knock down において視蓋表層が薄くなっているが、おおよそ正しい層に投射している。

[図1b説明]

パネル左（コントロール）：パネル中央・右（SPIG1 knock down）：パネル左、中央は、視蓋中央に投射した軸索の神経終末、パネル右は視蓋後方に投射した異常な軸索の神経終末におけるシナプス構造を示す。

5. 主な発表論文等

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 亮子 (SUZUKI RYOKO)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・特別協力研究員

研究者番号：60414017