

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830001

研究課題名(和文) 発達期シナプス除去におけるシナプス前接着分子の役割

研究課題名(英文) Role of presynaptic adhesion molecular in synapse elimination during development

研究代表者

江川 遼 (Egawa, Ryo)

東北大学・生命科学研究科・助教(研究特任)

研究者番号：20722226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：発達期の神経回路は過剰に形成されたシナプス接続が間引かれていくことで成熟する。本研究では、シナプスの発達モデルとして長年研究されてきたニワトリ胚毛様体神経節シナプスを用いて、発達期シナプス除去のメカニズムにアプローチする実験システムを開発した。得られた結果から、毛様体神経節に入力する軸索は発達期に分枝を減らして最終的に1つの標的細胞に対してシナプスを形成すること、シナプス前終末側のシナプス接着分子が神経回路発達に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：During later developmental stages of both central and peripheral nervous systems, axonal branches and synapses are massively reorganized to form mature connections. Here, we established the experimental system to approach the mechanisms of synapse elimination during development using chick ciliary ganglion, a conventional model system of synaptic development. We found that the maturation of presynaptic terminal from bouton-type to calyx-type started during E8-10. The excess axonal branches were pruned especially during E10-12. Consequently, axonal morphology converged to a homogeneous pattern of one-to-one connection at E14. This reorganization was influenced by the manipulation of presynaptic adhesion molecular, indicating the contribution to neuronal circuit development.

研究分野：神経生理学・神経科学一般

キーワード：シナプス除去  
発達回路再編  
コネクトミクス  
軸索間競合  
シナプス接着分子  
ニワトリ胚  
杯状シナプス  
シナプス前終末  
発

## 1. 研究開始当初の背景

発達期の神経系ではまずシナプス接続が過剰な混線回路が形成された後、続くシナプス除去によって不要な接続が間引かれると共に必要な接続が選択的に強化される。この一時的な退行とも取れる選択機構は機能的な神経回路の形成、ひいては脳の正しい成熟に不可欠であると考えられている (Lichtman & Colman, *Neuron*, 2000; Vanderhaeghen & Cheng, *CSH Persp in Biol*, 2010)。これら一連の回路発達プロセスは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、除去の異常が社会性障害を来す統合失調症や自閉症の原因になるという指摘もされている (Fiala et al, *Brain Res Rev*, 2002)。

一方で発達期シナプス除去の分子メカニズムについては依然として断片的にしか理解されていないのが現状である。シナプス除去の基盤原理の一つとしてシナプス前終末間の神経活動の競合が知られている (Buffelli et al, *Nature*, 2003; Hashimoto et al, *Curr Opin Neurobiol*, 2009)。これにはシナプス前後の細胞間での分子の相互作用が関与していると考えられるが、シナプス後細胞側でのメカニズムについては徐々に調べられてきている一方 (Miyazaki et al, *J Neurosci*, 2004; Mikuni et al, *Neuron*, 2013)、シナプス前細胞側のメカニズムについてはまだ研究が進んでいない。それは主に以下の理由によると考えられる。(1) シナプス除去のような回路発達プロセスは培養系では正確な再現が困難であるため、生体内の神経組織をモデルとする必要がある。(2) 回路発達に関連する分子のグローバルノックアウトはしばしば個体の生存に悪影響を及ぼす。(3) シナプス除去の観察できる神経組織でシナプス前細胞特異的に目的遺伝子を発現するコンディショナルトランスジェニック動物の作成は技術的・コスト的なハードルが高い。これらの問題は、シナプス除去研究の進展を妨げるボトルネックであると言える。

申請者はこれまでの研究の中で、シナプス研究の実験モデルとして長年使われてきたニワトリ胚毛様体神経節シナプスに対して *in ovo* エレクトロポレーションを応用し、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できるシステムを確立した (Egawa et al, *PLoS One*, 2013)。本システムを用いれば、導入するプラスミドを選択するだけで脊椎動物局所神経回路におけるシナプス前細胞の分子組成をフレキシブルに操作可能である。ゆえに上述のボトルネックを解除してシナプス除去の分子メカニズムの研究を強力に推進できると考え、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、毛様体神経節をモデルとし、

シナプス除去のメカニズムを回路レベルで解明することを目的とする。具体的には以下の計画により、毛様体神経節の軸索投射の発達過程の全容を明らかにし、この過程に機能的に介入することでシナプス前接着分子の寄与の解明を試みる。

- (1) 毛様体神経節における軸索投射発達の定量解析法の確立
- (2) 軸索間競合への機能的介入法の確立
- (3) シナプス前接着分子の寄与の検証

## 3. 研究の方法

目的に応じたプラスミド混合液を 2 日胚 (E2) ニワトリ胚の中脳脳室に注入し、*in ovo* エレクトロポレーション法を用いて中脳へと導入する。これにより毛様体神経節へと投射する中脳 EW 核のシナプス前ニューロンを遺伝子工学的に操作する。シナプス除去が生じる E8 から E14 の間に神経節を摘出し、軸索投射の発達過程を定量的に比較解析する。

## 4. 研究成果

標的組織のごく一部を蛍光標識するまばら発現法 (Ako et al., *Mol Cell Neurosci*, 2011) と CUBIC 試薬による組織透明化 (Susaki et al., *Cell*, 2014) を組み合わせ、神経節内の個々の軸索走行を可視化・追跡して形態的特徴を定量解析する手法を確立した (図 1)。これにより、毛様体神経節中では発達に伴って軸索の枝分かれが刈り込まれていくと共にシナプスが成熟してゆき、最終的に 1 本の軸索が 1 つの標的に対して巨大シナプス：カリックスを形成することが明らかとなった (図 2)。すなわち、プレとポストのニューロンが 1 対 1 の接続関係へと収束していくことが示された (図 3)。

まばら蛍光標識と透明化による神経節内軸索投射の完全追跡技術を更に発展させ、まばらな蛍光標識と目的遺伝子の導入を同時に実現する実験システムを構築した。これにより軸索間の競合プロセスに介入して、軸索の標的支配数を決定するメカニズムにアプローチすることが可能となった。

上述のシステムを用いて N-カドヘリンと Neurexin 1 をそれぞれ過剰発現させた軸索の投射発達を解析した。これらのシナプス接着分子は、近年自閉症との関連が指摘されている (Kim et al, *American Journal of Human Genetics*, 2008; Südhof, *Nature*, 2008; Moya et al, *Euro J Human Genetics*, 2013)。E14 における軸索形態を比較した結果、相対的にシナプス前接着分子が相対的に多く発現していても最終的な標的支配数は増加しないことが示唆された。一方で、ドミナントネガティブ型の N-カドヘリン (cN390)、splicing site 4 を除いた Neurexin 1 を強制発現させた軸索では Calyx シナプスの形態発達に異常が生じた。これらの結果は、神経回路発達におけるシナプス前接着分子の関与を示唆する一方で、競合の優位性という観

点においては相対的な発現量の寄与は少ないことを示唆する。

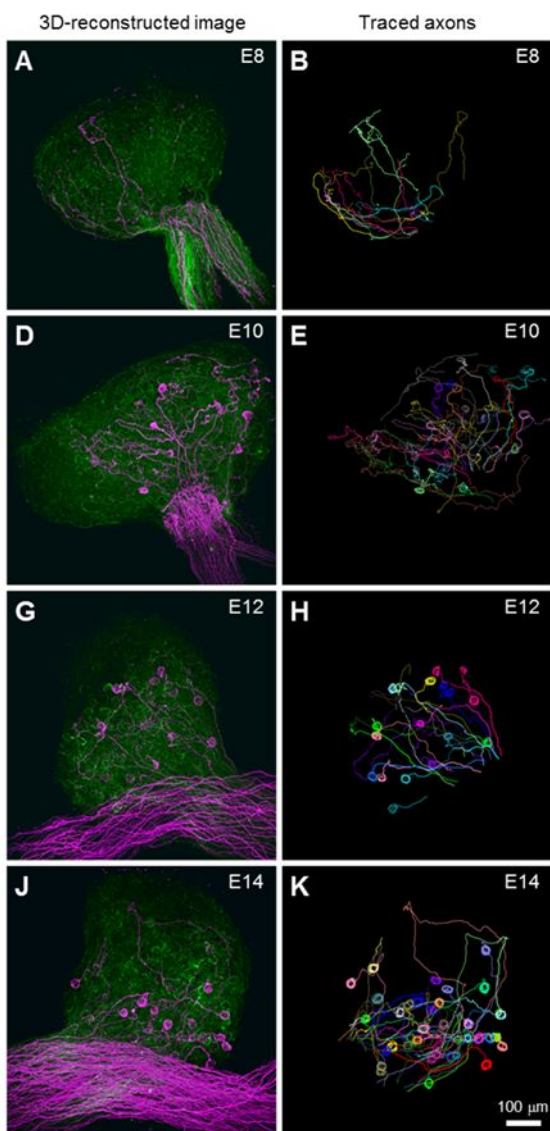


図1 毛様体神経節における軸索投射

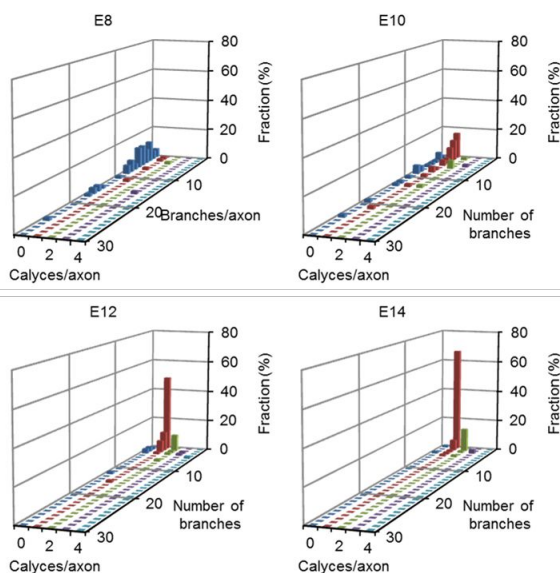


図2 軸索形態パターンの発達

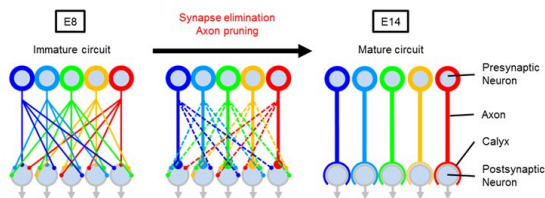


図3 毛様体神経節における軸索形態の発達過程の模式図

### 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 4 件)

Hiroyuki Igarashi, Kyo Koizumi, Ryosuke Kaneko, Keiko Ikeda, Ryo Egawa, Yuchio Yanagawa, Shin-ichi Muramatsu, Hiroshi Onimaru, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo. A novel reporter rat strain that conditionally expresses the bright red fluorescent protein tdTomato. *PlosOne*, 2016, 11(5), e0155687. (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0155687

石塚徹、江川遼、梅田桂子、東海林互、八尾寛 生命機能の光エンジニアリング 生物物理、Vol.55、No.6、2015、pp.311-316 (査読有)

DOI: 10.2142/biophys.55.311

江川遼、八尾寛 オプトジェネティクスによる細胞機能の光操作 月刊細胞、Vol.46、No.5、2014、pp.285-288 (査読無)

[http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2014/05/20146\\_3.html](http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2014/05/20146_3.html)

八尾寛、江川遼 光遺伝学に有用なツール開発：分子、遺伝子導入、光照射の実際 細胞工学、Vol.33、No.3、2014、pp.243-248 (査読無)

<http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901528.html>

[学会発表](計 10 件)

江川遼、石塚徹、八尾寛 軸索はいかにして標的を奪い合うのか？：発達期軸索再編の定量コネクトミクス解析 (招待講演) 宮川博義教授退職記念シンポジウム「脳神経機能学のフロンティア」、2016年3月12日、東京薬科大学(東京都八王子市)

江川遼、石塚徹、八尾寛 軸索はいかにして標的を奪い合うのか？：発達期軸索再編の定量コネクトミクス解析 2015年度包括脳ネットワーク冬のシンポジウム、2015年12月18日、学術総合センター(東京都千代田区)

江川遼、石塚徹、八尾寛 How do axons

scramble for targets? - Quantitative connectomics of axonal reorganization during development. 遺伝学研究所研究会、2015年12月6日、国立遺伝学研究所(静岡県三島市)

江川遼、石塚徹、八尾寛 軸索はいかにして標的を奪い合うのか? : 発達期軸索再編の定量コネクトミクス解析 第38回日本神経科学大会、2015年7月28日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

江川遼、石塚徹、八尾寛 軸索はいかにして標的を奪い合うのか? : 発達期軸索投射再編の定量コネクトミクス解析 第一回「適応回路シフト」夏の班会議、2015年6月25日、ホテルグランデコ(福島県麻郡北塩原村)

江川遼、細島頌子、石塚徹、八尾寛 ニワトリ胚毛様体神経節における発達期軸索競合の定量コネクトミクス解析 2014年度包括脳ネットワーク冬のシンポジウム、2014年12月12日、東京医科歯科大学(東京都文京区)

Ryo Egawa, Shoko Hososhima, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo. Developmental connectomics of axonal reorganization in avian ciliary ganglion. SfN2014, 2014年11月18日、ワシントンコンベンションセンター(アメリカ)

江川遼、細島頌子、石塚徹、八尾寛 ニワトリ胚毛様体神経節における軸索投射再編成の発達期コネクトミクス研究「メソ回路」平成26年度第一回領域会議、2014年9月29日、熱海国際ホテル(静岡県熱海市)

江川遼、細島頌子、石塚徹、八尾寛 ニワトリ胚毛様体神経節における軸索投射再編成の発達期コネクトミクス研究 第37回日本神経科学大会、2014年9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

江川遼、細島頌子、石塚徹、八尾寛 ニワトリ胚毛様体神経節における発達期軸索刈込の定量解析 2014光操作研究会、2014年8月22日、仙台民陵会館(宮城県仙台市)

〔図書〕(計 1 件)

Hiromu Yawo, Ryo Egawa, Shoko Hososhima, Lei Wen. "Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications" Chapter 8. General description: Future prospects of optogenetics, Springer, 2015, 111-131

〔その他〕

ホームページ等

包括型脳科学研究推進支援ネットワーク  
トップページ画像の紹介「神経節への軸

索投射」

[https://www.hokatsu-nou.nips.ac.jp/?page\\_id=1461](https://www.hokatsu-nou.nips.ac.jp/?page_id=1461)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江川遼 (EGAWA, Ryo)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教(研究特任)

研究者番号: 20722226