

えがわ りょう

氏名（本籍地） 江川 遼

学位の種類 博士（生命科学）

学位記番号 生博第247号

学位授与年月日 平成25年3月27日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科，専攻 東北大学大学院生命科学研究科  
（博士課程）生命機能科学専攻

論文題目 次世代シナプスモデルを用いた発達期プレシナプスの機能形態解析

博士論文審査委員 （主査） 教授 八尾 寛  
教授 福田 光則  
教授 田村 宏治

## 次世代シナプスモデルを用いた発達期プレシナプスの機能形態解析

### 【背景と目的】

シナプス前終末はその微小さと機構の複雑さから培養系を用いた研究が難しく、そのためげっ歯類やニワトリ、キンギョ、イカなどの生体内から摘出してきた巨大シナプスが有力な実験モデルとして用いられてきた。一方で既存の巨大シナプスモデルにおいて目的遺伝子の導入や操作といった分子生物学的アプローチを行うには技術的な制約が大きい。この問題は研究の進展を遅らせているボトルネックとなっており、シナプス前終末の機能・形態・発達の基盤原理や分子メカニズムの理解は依然として断片的なレベルに留まっている。そこで我々はこのボトルネックを解除すべく、長年研究されてきたシナプスモデルの一つであるニワトリ胚毛様体神経節杯状シナプスに着目した。そして *in ovo* エレクトロポレーションによるシナプス前細胞特異的な遺伝子導入法が可能か検証するとともに、Genetically-encoded tools を実際に導入して機能評価を行うことで、シナプス前終末研究のモデルシステムとしての有用性について議論した。

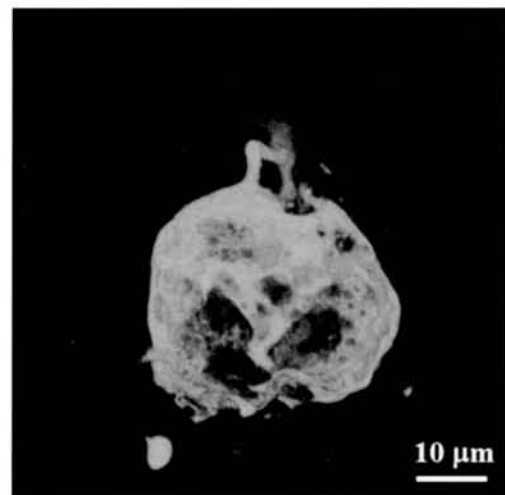
### 【結果】

#### ・ニワトリ胚毛様体神経節シナプス前細胞への遺伝子導入法の確立

毛様体神経節シナプスは動眼神経を介して中脳 Edinger-Westphal(EW)核より投射を受けている。そこで2日胚(E2)中脳に対してプラスミドベクターpCAGGS-EGFPを *in ovo* エレクトロポレーションした。EGFPの蛍光はエレクトロポレーションから約6h後には中脳領域で観察され始め、E14の時点でEW核、動眼神経、毛様体神経節においてシナプス前細胞特異的な蛍光の発現が見られた。

Figure 1.

EGFPを発現させたE14ニワトリ胚毛様体神経節杯状シナプス前終末。シナプス後細胞の細胞体を覆う巨大なシナプス前終末が形成されている。



### ・ Brainbow による形態解析

発達期の絡み合った細胞形態を見分けるため、我々は細胞の色分けを可能とさせる Brainbow 法を適用すべく、pCAGGS-Brainbow1.1M と pCAGGS-mCherry-NCre の 2 種類のプラスミドベクターを作製した。Brainbow は、loxP に挟まれた数種の蛍光タンパク質 (XFP) を含んだ配列であり、Cre によって組み替えられることで XFP をランダムに発現する。実際に 2 種のベクターを同時にエレクトロポレーションすると、XFP が多様な組み合わせで発現し、絡み合った軸索走行や軸索終末が色分けされた。発達期に従い形態を観察すると、E8 において、軸索は多数の分枝をもち、また神経終末は杯状ではなくブートン状であった。E10 より杯状終末をもった軸索が観察され始め、E14 では全ての終末が杯状であった。またこのステージにおいて、2 つ以上の分枝を持った軸索は観察されなかった。

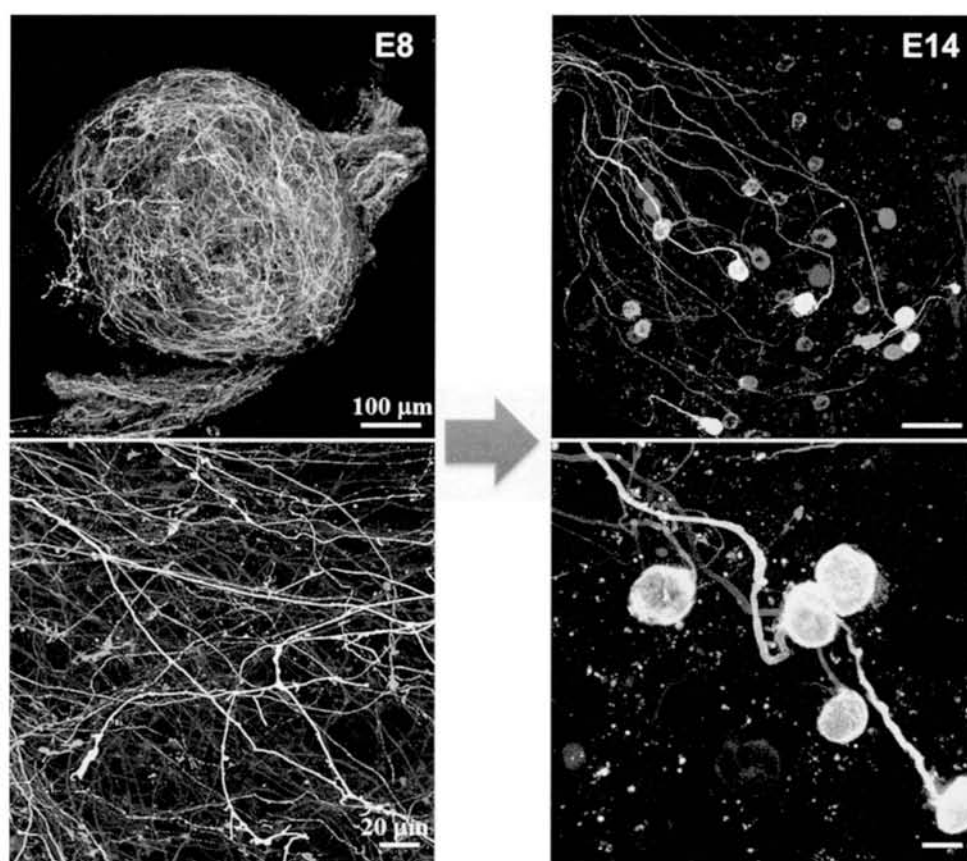


Figure 2.

Brainbow 法により多様な組み合わせで XFP を発現したニワトリ胚毛様体神経節。左が E8、右が E14。E8 では軸索の分枝が多数みられるが、E14 ではほとんどないことから軸索刈込がニューロンそれぞれに均一に生じていると考えられる。

### ・オプトジェネティクスツールによる機能解析

近年神経科学分野で台頭してきたオプトジェネティクスは、光を用いて神経活動を計測したり、操作したりすることを可能とさせる。シナプス小胞のダイナミクスを可視化する VAMP-mOrange を導入し 10Hz100 回の電気刺激を与えた結果、約 30s で放出されたシナプス小胞がターンオーバーすることが示された。赤色蛍光カルシウムセンサーである R-GECO1 を導入すると 1 回の動眼神経電気刺激によりシナプス前終末に流入したカルシウムを計測できた。チャンネルロドプシンの高効率型キメラである ChRFR を導入しシナプス前終末を直接光刺激した結果、脱分極は通常閾値以下であったが、K チャンネル阻害剤 4-aminopyridine 投与下で 20ms レーザーパルスを照射すると活動電位を起こすことができた。R-GECO1 と ChRFR の同時導入によって、シナプス前終末の光刺激によって引き起こされたカルシウム応答が計測された。この光刺激応答は、電気刺激による応答とは性質が異なり、電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤 TTX 投与で減衰したが消失しなかった。TTX の投与からさらに N タイプ電位依存性カルシウムチャンネル(VDCC)阻害剤  $\omega$ -conotoxin GVIA を投与すると、またカルシウムフリーすると、TTX 投与で残った応答はさらに減衰したが消失しなかった。

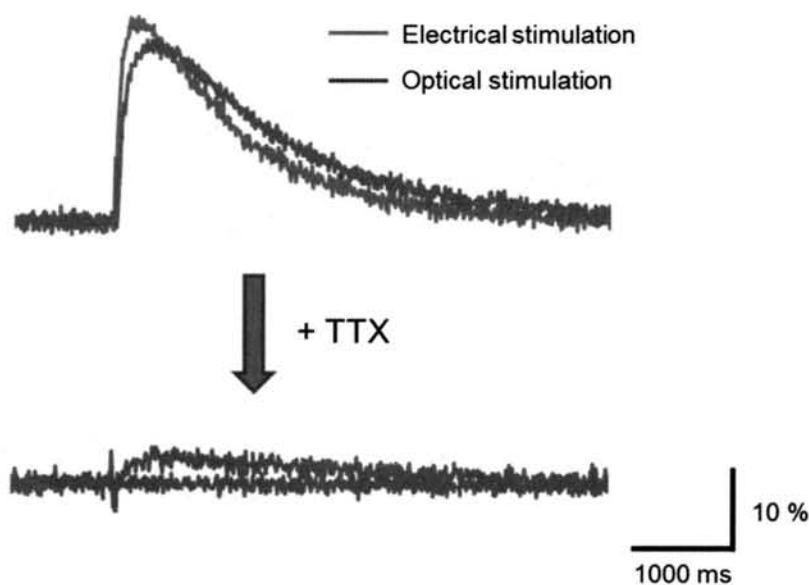


Figure 3.

ChRFR と R-GECO1 を同時に導入したシナプス前終末で、電気刺激と光刺激によって生じたカルシウム応答を比較した。光刺激によるカルシウム応答は TTX の投与により活動電位の発生を阻害してもわずかに見られた。

## 【考察】

本研究で我々は、長年研究されてきた巨大シナプスモデルの一つであるニワトリ胚毛様体神経節杯状シナプスに対して *in ovo* エレクトロポレーション法を適用することで、シナプス前細胞特異的に遺伝子導入する手法を確立した。それにより、Brainbow やオプトジェネティクスツールといった **genetically-encoded tools** を用いたシナプス前細胞の機能形態解析が容易に可能となった。

Brainbow 法により軸索投射の発達過程を観察した結果、毛様体神経節では E8-14 の間にシナプス前終末がブートン状から杯状に発達していくとともに、シナプス前細胞に対して均一に軸索刈込が生じることが示された。従来の刈込の基盤として考えられてきた競合原理ではこの均一な軸索刈込を説明することはできない。これまでになかった「共存」原理の存在を示唆するこの発見はさらに詳細な研究が期待される。オプトジェネティクスセンサーとアクチュエーターである R-GECO1 と ChRFR を同時に導入した結果、シナプス前終末を光刺激してカルシウム応答を光学計測できた。このようなツールの同時使用は巨大シナプスにおいては世界初である。さらに詳細に解析を行った結果、シナプス前終末の光刺激と電気刺激は異なる性質を持つことが示された。シナプス前終末の直接光刺激は ChR を介して生じた膜電位変化により直接 VDCC を活性化するとともに、小胞体のカルシウムストアからのカルシウム放出を促す。このようにバックグラウンドのカルシウム上昇が伝達物質放出を調節する生化学的な環境を調整し得ることは考慮する必要がある。

以上のように巨大シナプスモデルにおける分子生物学的な研究の障害を除去する我々のシステムは、利便性の高い次世代のシナプスモデルとしてシナプス前終末の機能形態発達に基盤原理や分子メカニズムの研究を加速させることができると期待できる。

## 論文審査結果の要旨

発達期の軸索投射再編成やシナプス前終末の機能発達といったシナプス前機構の研究は、生体内の特定のシナプスをモデルとして進められてきた。一方でこれらのシナプスモデルにおいてシナプス前細胞特異的に目的遺伝子の導入や操作といった分子生物学的アプローチを行うことは技術的なハードルが高い。この問題はシナプス前機構研究のボトルネックとなっており、分子メカニズムや基盤原理の理解は依然として断片的なレベルに留まっている。論文提出者は、モデルシナプスとして長年研究されてきたニワトリ胚毛様体神経節杯状シナプスに着目し、発生学分野の有力な手法として用いられてきた *in ovo* エレクトロポレーション法を適用することでシナプス前細胞特異的な遺伝子導入が可能か検証した。さらに、最新の Genetically-encoded tools を導入して機能形態解析を行い、発達期のシナプス除去に伴う軸索刈込を観察できるか、シナプス前終末における神経伝達物質放出プロセスを定量化できるか検証・評価した。発達期の絡み合った細胞形態を見分けるため、Brainbow 法を毛様体神経節のシナプス前ニューロンに適用した。Brainbow は、loxP に挟まれた数種の蛍光タンパク質 (XFP) を含んだ配列であり、Cre によって組み替えられることで XFP をランダムに発現することが期待される。その結果、毛様体神経節において、絡み合った軸索走行や軸索終末が色分けされ、E8-14 の発達期において、シナプス前終末がブートン状から杯状に発達していくとともに、シナプス前細胞に対して均一に軸索刈込が生じ、複数のシナプス後ニューロンにシナプスを形成するのは希であることが示唆された。従来の競合原理のみでは、1対1シナプスの形成を説明できない。このことから、従来の競合仮説を補足するものとして、「共存」の原理を着想するに至った。また、オプトジェネティクスセンサーとアクチュエーターである R-GECO1 とチャンネルロドプシン・ファストレシーバー (ChRFR) を同時に導入した結果、シナプス前終末を光刺激してカルシウム応答を光学計測できた。このようなツールを同時にシナプス前終末に適用した研究は、世界的に前例を見ない。その結果、シナプス前終末の光刺激と電気刺激は異なる性質を持つという新しい知見を得た。シナプス前終末の直接光刺激は ChRFR を介して生じた膜電位変化により直接 VDCC を活性化するとともに、小胞体のカルシウムストアからのカルシウム放出を促すことが示唆された。このようなバックグラウンドのカルシウム上昇が伝達物質放出を調節するメカニズムの研究の展開が期待される。いずれも、従来の神経科学の概念に変更を迫るスケールの大きな研究である。したがって、江川遼提出の論文は、博士 (生命科学) の博士論文として合格と認める。