

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料  
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分

平成28年 5月25日現在

研究課題名（和文）シナプスにおける逆行性シグナルが生後  
発達期の機能的神経回路形成に果たす役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the roles of synaptic retrograde  
signaling in functional neural circuit formation during  
postnatal development

課題番号：25000015

研究代表者 狩野 方伸 (KANO MASANOBU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要：発達期に機能的神経回路が形成される際に、シナプス後部から前部へ「逆向きに」情報を伝えて必要なシナプスだけを強めて残し、不要なシナプスを除去する仕組みが不可欠である。本研究では小脳のシナプスを対象にして、候補分子のスクリーニングと機能解析を進め、そのような逆行性シグナルの分子実体の解明を目指している。

研究分野：神経生理学・神経科学一般

キーワード：神経科学、生理学、脳・神経、シグナル伝達、生体分子

1. 研究開始当初の背景

(1) 発達期の神経系において機能的な神経回路が形成されるためには、シナプス前部から後部への情報伝達だけではなく、シナプス後部から前部へ逆向きに情報を伝えて（逆行性シグナル伝達）、シナプス前部の神経細胞が適切な相手と適切な数のシナプスを作り、これが維持されることが必要である。生まれたばかりの動物の神経系には、シナプスが過剰に存在するが、成長につれて、必要なシナプスは強められて残存し、不必要なシナプスは除去されて、成熟した機能的神経回路が完成する（シナプス刈り込み）。

(2) 私たちは、生後発達期の小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプスをモデルとして、シナプス刈り込みのメカニズムを研究し、世界をリードしてきた。出生直後のプルキンエ細胞は5本以上の登上線維からシナプス入力を受けているが、生後発達の過程で、このうち1本の登上線維だけが強化されて残り、その他の登上線維からのシナプスは除去される。この登上線維シナプス刈り込みにおいて、シナプス後部のプルキンエ細胞の活動が必須であり、プルキンエ細胞で働く分子群も同定されているが、逆行性シグナルについては、殆ど不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、生後発達期の小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプスにおける「シナプス刈り込み」を主な研究対象とし、これに大脳皮質のシナプス機能発達の解析と内因性カンナビノイドの作用の解析を加えて、生後発達期の機能的神経回路形成に逆行性シグナ

ル伝達果たす役割とそのメカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 私たちが独自に開発した延髄—小脳の共培養系において、レンチウイルスノックダウンベクターを用いて、プルキンエ細胞特異的に標的分子をノックダウン（KD）し、プルキンエ細胞の電気生理学的解析によって、登上線維シナプス刈り込みに影響を与えるものを絞り込む。プルキンエ細胞にシナプス入力を送る登上線維の本数は、プルキンエ細胞からホールセル記録を行い、登上線維を電気刺激して生ずるシナプス応答のステップの

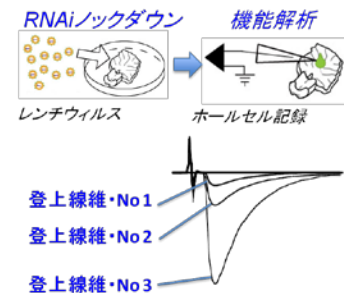


図1

数によって評価する（図1）。候補分子のシナプス刈り込みへの関与を、さらに *in vivo* におけるウイルスによる KD や遺伝子改変マウスを用いた解析によって検証し、プルキンエ細胞側の逆行性シグナル分子を同定する。(2) 次に、同定した分子が作用する受容体のうちで登上線維またはグリア細胞に発現するものを、ウイルスによる *in vivo* での KD により検索する。また、同定した逆行性シグナル分子の遺伝子改変マウスにおいて、小脳神経回路の動作を *in vivo* で解析する。さらに、内因性カンナビノイドの 2-AG に関連

する遺伝子改変マウスの大脳皮質の神経回路動作を解析し、2-AG シグナルの機能的神経回路形成における役割を明らかにする。

#### 4. これまでの成果

- (1) 生後発達期のプルキンエ細胞において発現する逆行性シグナル関連候補遺伝子 264 個をスクリーニングし、シナプス刈り込みに影響を与える遺伝子として、複数のセマフォリン (Sema3A、Sema7A など) を含む 18 遺伝子を同定した。
- (2) これらの遺伝子のシナプス刈り込みにおける詳しい役割を解析中である。Sema3A のプルキンエ細胞特異的な KD では生後 2 週目にシナプス刈り込みの促進が、Sema7A の KD では生後 15 日以降にその阻害がみられた ([Science 344: 1020, 2014](#)) (図 2)。

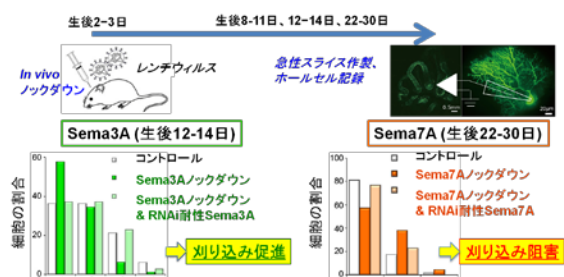


図 2

- (3) Sema3A と Sema7A は、登上線維に存在する Plexin A4 及び Plexin C1/Integrin B1 にそれぞれ直接作用してシナプス刈り込みを調節した ([Science 344: 1020, 2014](#))。
- (4) 登上線維シナプス刈り込みの経過を *in vivo* で観察し、生後 4 日から 9 日に、P/Q type  $Ca^{2+}$  channel を介する  $Ca^{2+}$  上昇に依存して 1 本の登上線維だけが強くなること ([Nat Commun 4: 2732, 2013](#))、また、 $Ca^{2+}$  上昇の下流で最初期遺伝子 *Arc/Arg3.1* が関与することを証明した ([Cell Rep 8: 1119, 2014](#))。
- (5) 大脳体性感覚野の錐体細胞から 2 光子顕微鏡を用いて *in vivo* で単一シナプス活動を記録し、錐体細胞へのシナプス入力が生後発達に伴って clustering することを示した。
- (6) 大脳視覚野の機能的神経回路発達に内因性カンナビノイドの 2-AG が関与すること、また大脳体性感覚野の機能的神経回路発達に 2-AG によるシナプス可塑性が関与することを明らかにした。
- (7) 2 光子顕微鏡を用いて *in vivo* のマウス小脳から、多数のプルキンエ細胞の登上線維反応を同時記録し、小脳の解剖学的構造 (帯状構造) とプルキンエ細胞の登上線維反応との関連を解析した。同じ帯状構造の中では登上線維応答の同期性が高く、また個々の帯域はいくつかの微小帯域から成ることを明らかにした ([J Neurosci 35:843 2015](#))。
- (8) 統合失調症関連分子である ARHGAP33 が TrkB をシナプス部位に運ぶ働きをしてお

り、ARHGAP33 の欠損によって、海馬錐体細胞樹状突起のシナプス刈り込みが過剰に起こり、シナプス密度が減少することを明らかにした ([Nat Commun 7:10594, 2016](#))。

#### 5. 今後の計画

- (1) プルキンエ細胞からの逆行性シグナルの候補分子の役割も解析を継続する。
- (2) 逆行性シグナルを受け取ると想定される登上線維側の分子、およびバグマングリアに存在する分子に関する解析を継続する。
- (3) 登上線維の挙動のリアルタイム解析および小脳神経回路の動作の解析を進め、刈り込み異常が *in vivo* の神経回路機能にどのように影響するかを調べる。
- (4) 大脳体性感覚野、視覚野の機能的神経回路発達の解析および 2-AG の役割の解析を継続する。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

##### ◆ 発表論文

- (1) Nakazawa T, 他 23 名, [Kano M](#): Emerging Roles of ARHGAP33 in Intracellular Trafficking of TrkB and Pathophysiology of Neuropsychiatric Disorders. [Nat Commun 7:10594, 2016](#)
  - (2) Tsutsumi S, 他 2 名, [Watanabe M](#), [Sakimura K](#), [Kano M](#), [Kitamura K](#): Structure-function relationships between aldolase C/zebrin II expression and complex spike synchrony in the cerebellum. [J Neurosci 35:843-852 2015](#)
  - (3) Kawata S, 他 4 名, [Hashimoto K](#), [Watanabe M](#), [Sakimura K](#), [Kano M](#): Global scaling-down of excitatory postsynaptic responses in cerebellar Purkinje cells impairs developmental synapse elimination. [Cell Rep 8: 1119-1129, 2014](#)
  - (4) Uesaka N, 他 6 名, [Watanabe M](#), [Kano M](#): Retrograde semaphorin signaling regulates synapse elimination in the developing mouse brain. [Science 344: 1020-1023, 2014](#)
  - (5) Kawamura Y, Nakayama H, [Hashimoto K](#), [Sakimura K](#), [Kitamura K](#), [Kano M](#): Spike timing-dependent selective strengthening of single climbing fiber inputs to Purkinje cells during cerebellar development. [Nat Commun 4: 2732, 2013](#)
- 英文論文総数: 35 編 (上記 5 編を含む)

##### ◆ 受賞

- ・紫綬褒章 (平成 27 年 11 月 3 日)
- ・上原賞 (平成 27 年 3 月 11 日)

ホームページ等

[http://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/Kano\\_lab/Top.html](http://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/Kano_lab/Top.html)