

経過・成果報告書

グリア細胞によるシナプス可塑性の制御機構の解析

中條暖奈（カリフォルニア大学サンフランシスコ校）

【背景と目的】

神経回路は発生の過程において、シナプスの形成および除去を繰り返しダイナミックに再構築される。正常な神経回路の再構築は正常な神経の発達や脳機能に不可欠である。脳の免疫細胞であるミクログリアは、シナプス再構築に重要な役割をもつ。ミクログリアはサイトカインや補体シグナルに応答し、貪食によるシナプスの除去を行う。さらに申請者の留学先である Molofsky 博士の研究室の論文では、成体マウスの海馬ではミクログリアが細胞外マトリックス(extracellular matrix: ECM)を貪食し、シナプス形成を促進することを示唆した(Nguyen et al., 2020)。

ミクログリアによる神経回路の再構築機構についてのこれまでの研究では、主に脳切片を用いてミクログリアとシナプスを染色しシナプスとミクログリアの相互作用を解析する方法が主であった。しかしながらそれでは一連のミクログリアとシナプスの相互作用のスナップショットを捉えることしかできないという問題点があった。ダイナミックに変化するシナプスと、その制御におけるミクログリアの役割を明らかにするためには、ミクログリアとシナプスの相互作用をリアルタイムで捉えることができる実験系が必要であった。

ゼブラフィッシュは体外で発生し、その脳機能の多くが進化的に保存されていることに加え、体が透明であるため発生脳の *in vivo* イメージングに適したモデル動物である。本研究課題では、ゼブラフィッシュ稚魚を用いたライブイメージング法を確立することにより、ミクログリアによって制御されるシナプスのダイナミクスを明らかにし、さらにその脳機能における役割を明らかにすることを目的とした。

【成果・経過】

留学開始から一年間の期間においては、主に新たな手技の習得や、実験系の検討、目的の実験に用いるツールの作成などに時間を費やした。

1. シナプスを標識するトランスジェニック系統の作成

シナプスを蛍光タンパク質で標識する新たなトランスジェニック系統の作成を行った。神経細胞の標識に用いられる neural beta-tubulin (NBT)プロモーター下で、蛍光タンパク質と結合させたシナプス後部マーカー分子 PSD95 とシナプス小胞タンパク質 Synaptophysin を発現するトランスジェニック系統をそれぞれ作成した。

2. ミクログリアの挙動を観察するライブイメージング系の検討

色素を欠損しているためライブイメージングによる観察が容易なゼブラフィッシュ変異体である casper 変異体を用い、10-14 日齢の魚において実験した。魚をアガロースゲル内にて固定し、顕微鏡下でタイムラプス観察を行なった。ミクログリアの標識には、マクロファージ系統の細胞に特異的に発現するプロモーター *mpeg* の下流で細胞膜移行型の EGFP を発現する *Tg(mpeg:EGFP-CAAX)*を用いた。この系統を用いて、ライブイメージングのセットアップ下においてミクログリアの突起構造の細部まで観察できることが確認できた。さらに Synaptophysin に蛍光タンパク質 TdTomato を結合させた Syn-TdT を NBT プロモーター下で発現するトランスジェニック系統 *Tg(NBT:Syn-TdT)*と *Tg(mpeg:EGFP-CAAX)*系統を掛け合わせ、ミクログリアとシナプスの相互作用をライブイメージングで観察した。

3. ミクログリア除去法の検討

ミクログリアのシナプス再構築における役割を明らかにするため、ミクログリアを除去する方法を検討した。ミクログリアの生存に必要な CSF1 受容体特異的な阻害剤である PLX5622 を用いてミクログリアの除去法を検討した。最大で 50% のミクログリアの除去が観察された。

またもう一つの方法として、mpeg プロモーター下でニトロレダクターゼを発現するトランスジェニック系統 *Tg(mpeg:gal4);Tg(UAS:NTR-mCherry)* を用いる方法についても検討を行なった。この方法では魚にメロニダゾール(Mtz)を処理すると、ニトロレダクターゼが Mtz を毒素に変換し特定の細胞を除去することができる。この方法でも最大で 60% のミクログリアの除去が観察された。

4. ミクログリア除去によるシナプスへの影響

上記の方法を用いて、ミクログリアの除去がシナプスに与える影響を調べた。

Tg(mpeg:gal4);Tg(UAS:NTR-mCherry) に Mtz を処理し抗シナプス小胞タンパク質(SV2)抗体によって免疫染色を行なったところ、ミクログリアを除去した魚ではシナプスの蛍光が変化することを観察した。今後はミクログリアがシナプスを変化させるメカニズムの詳細をライブイメージング法などを用いて明らかにする予定である。

【今後の展望】

申請者はこれまでに、シナプスを標識するトランスジェニック系統を作成し、ミクログリアの挙動を捉えるライブイメージング法を確立した。今後は確立したツール、実験系を行ってミクログリアとシナプスの相互作用を観察し、ミクログリアによるシナプス再構築機構の全貌を明らかにする。またミクログリアを除去した魚でシナプスのターンオーバーがどのように変化するかについても観察する。さらにミクログリアによるシナプス再構築の脳機能における役割を調べるため、行動実験系を確立する予定である。