

「脳神経回路の形成・動作と制御」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成26年度終了研究課題－

研究総括 村上 富士夫

1. 研究領域の概要

本研究領域は、脳の統合的理解を目指し、新たな視点に立って脳を構成する神経回路の形成やその動作原理ならびにその制御機構の解明に挑戦する研究を対象とします。具体的には、神経回路や脳の機能単位である神経核・層構造の形成、領域や神経細胞の特異性の獲得、単一神経細胞における情報処理、神経細胞間の情報伝達やその可変性、神経細胞のネットワークとしての機能発現や可変性、さらには複雑なネットワークの集合体である領域・領野等の形成機構および動作原理、ネットワークの制御機構の研究を対象とします。また、グリア細胞など神経細胞以外の神経系の細胞の役割や、神経細胞数の維持の機構に関わる研究も含まれます。さらに、神経回路形成や動作原理の解明の飛躍的発展につながるような、革新的な基盤技術の創出も対象とします。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 18件(内、大挑戦型1件)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1) 選考は、「脳神経回路の形成・動作と制御」領域に設けた選考委員13名の協力を得て、研究総括が行う。

2) 選考方法は、書類選考、面接選考の結果をもとに総合的に判断する。

3) 選考に当たっては、さががけ共通の選考基準(URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html>)の他、以下の点を重視した。

提案が提案者自身の着想であることを特に重視し、

また分野・研究環境に関して採択課題が特定の分野に偏らないよう配慮する。

さらに提案者の性別あるいは実施場所の国内外を問わない。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者15名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ2課題を推薦した。(不採択となった。)

選考	書類選考	面接選考	採択数		
			14件	内訳	3年型
対象数	226件	29件			

()内は大挑戦型としての採択数。

備考:

1)平成23年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・松田信爾研究者

研究期間が5年で、今年度には終了しないため。今年度は中間評価を実施する(中間評価結果:
http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/mid-term/midterm_h26hyouka.html)

・行川-濱田文香研究者

ライフイベントにより研究を一時中断し、終了年度がずれるため。

2)加えて、以下を今年度の事後評価対象とする。

・今井猛研究者、川内健史研究者、田渕克彦研究者、筒井秀和研究者、山口瞬研究者(平成21年度採択)

研究期間が5年で、今年度終了するため。

・小早川研究者(平成21年度採択)

大挑戦型として平成21年度に採択され、期間延長審査の結果、2年間延長したため。

5. 研究実施期間

平成23年10月～平成27年3月(3年型)

平成21年10月～平成27年3月(5年型)

6. 領域の活動状況

領域会議はこれまでに11回実施している。会議では各研究者の発表時間を越える時間を質疑討論に充てて十分な議論を行い、多様な研究者間の相互刺激とアドバイザーからの助言を期した。また研究成果報告会と合わせ特別講演として外部より6名の著明な神経研究者、および11名の領域アドバイザー・総括に、研究の進め方を含めて講演していただいた。

研究費の執行にあたっては、進捗と研究環境を把握のうえ柔軟に対応した。

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:

全員について総括と技術参事がサイトビジットを実施したほか、必要に応じて総括または技術参事が訪問・面談して研究環境と進捗の把握に努めた。

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成 26 年 12 月 評価会開催

平成 27 年 3 月 研究総括による事後評価

平成 27 年 5 月 被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

(1) 研究課題等の研究目的の達成状況

(2) 研究実施体制及び研究費執行状況

(3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

9. 評価結果

当領域は上記の概要にもあるように広大な神経科学分野の多様な研究を採択してきたことを反映して、本報告が対象とする18件の研究課題も方法論的には生理学的、遺伝学的、生化学的、から神経システム論的アプローチまで、問題設定も神経回路形成から回路解析、神経疾患など多彩な組み合わせとなっている。これらの研究者が領域会議や懇親会で他の領域研究者と議論しながら相互に知識と視野を広め、単独では望めなかった地平をそれぞれが切り開き、また相互の協力も発生してきた。ほぼすべての研究者で研究成果がすでに論文発表となっており、そうでない場合でも近く大きい成果が見込まれる。なお期間中に10名の研究者が昇格を果たし、うち2名は教授に昇格している。

1. 今井 猛 研究者「末梢入力に依存した神経回路形成のロジック」(5年型)

神経回路が形成されるためには特異的で正確な神経結合が前提となるがそのメカニズムは依然として良く分かっていない。本研究は解析対象として優れたモデル系であるマウス嗅覚系に着目して、感覚入力神経投射に果たす役割に迫ったものであり、嗅覚受容体からGsタンパク質を介して生じるbasal activityが投射位置を規定することを明らかにし、また嗅球の出力細胞である僧帽・房飾細胞が生後発達の過程で単一の糸球体にのみ接続を確立する過程を解析して、生後の神経活動が重要な役割を果たしていることを明らかにしたこと、さらに鼻腔の呼吸気流刺激によって生じる神経活動の周期振動が匂い情報のコーディングに重要な役割を果たしているという予期せぬ発見に至ったことはいずれも大きな成果である。またこれらの研究課程で必要となり開発した脳組織の画期的な透視化技術 SeeDB 法については速やかに発表し、大きな反響を呼んだ。こ

これらの成果に基づき、今後は発見した嗅球の自発活動の生理的意義、および僧帽細胞の樹状突起刈り込みの特異性のメカニズム、さらに嗅球の活動振動の生成メカニズムとその意義の解明などが大きく展開することが十分に期待できる。

2. 川内 健史 研究者「細胞内機能ドメインが大脳皮質形成に果たす役割の解明」(5年型)

脳組織の形成においては細胞体の適切な配置のための細胞移動が必須であり、これには神経細胞軸索と樹状突起の形成の制御が密接に関係する。本研究は組織レベルの現象と、関係する遺伝子の発現の間に位置するオルガネラ、小胞、細胞接着装置などの構造体(細胞内機能ドメイン)に着目して、それらの神経細胞移動への関与を解明しようとしたものである。その結果、発生途上のマウス大脳皮質において放射状突起への接着に関わる細胞接着分子 N-カドヘリンがエンドソームによりダイナミックに制御されていることを明らかにした。さらに、神経細胞のロコモーション様式の移動を直接解析できる実験系を確立して、細胞周期関連分子である Cdk5 と p27^{Kip1} が増殖を停止した神経細胞でも機能し、滑脳症の原因遺伝子産物と協調して、神経細胞に特異的な移動様式を制御することなどを明らかにすることができた。これらの成果はすでに論文として発表している。今後小胞トラフィックに鍵を握るゴルジ体を含めたこれらの細胞内機能ドメインがどのように協調制御されるのか、一段上のレベルの観点からの展開が期待できる。また学会シンポジウムや、国際レビュー誌の編集などを通して、“In vivo 細胞生物学”を標榜する分野を立ち上げつつあることが注目される

3. 小早川 高 研究者「匂いに対する特異的な行動や情動を制御する神経ネットワーク」(3年型、大挑戦型、期間延長2年)

哺乳類の多くは発達した嗅覚系を有し、これは天敵回避、摂食行動、生殖行動、社会行動などに関わる神経回路の重要な入口となっている。本研究は匂い分子で誘発される行動・情動に着目し、嗅覚一次中枢である嗅球の限局された機能を阻害したマウスを作出することにより、匂い分子の情報が処理される経路の解明に挑んだものである。主嗅球の背側の機能を阻害された遺伝子改変マウスでは、匂い嗅ぎ行動、フェロモン分子による鋤鼻嗅覚系活性化は正常であるのに、雌尿への誘引行動と発声、攻撃性、母性行動、警戒フェロモンに対する警戒行動などの社会行動に異常を見出した。また天敵臭による先天的恐怖と学習による後天的恐怖による脳内の活性化を比較する組織学的全脳マッピングの結果から、両恐怖行動は異なる神経回路基盤を有し、互いに拮抗的關係があること、また扁桃体中心核のセロトニン 2A 受容体発現細胞は先天的恐怖だけにより活動を低下させることなど、興味深い一連の発見に至っている。さらに天敵臭分子 TMT を起点として人工化合物ライブラリーのスクリーニングにより、10 倍以上の比活性を有する化合物も発見した。これらの成果はその独自性において優れた成果と認められ、その一部は論文として発表され、出願も行われた。増額により取得した自動免疫染色装置などを駆使してこの間に意欲的に推進した全脳マッピングデータなども含め、膨大なデータと未発表の成果を早い機会に論文報告することが期待される。

4. 田淵 克彦 研究者「精神発達障害原因解明のための Neuroligin/Neurexin モデルの確立」(5年型)

自閉症は多数の遺伝子がかかわる疾患と考えられているが、自閉症家系に見出される Neuroligin-3 遺伝子とそのシナプスにおける結合パートナーである Neurexin の遺伝子の異常から、これらのシナプス分子が自閉症原因理解の橋頭堡となる可能性がある。本研究はこの点に着目し、すでに作成していた neuroligin-3 R451C 変異導入ノックインマウスに加えて、neuroligin-3 R704C KI マウス、Neurexin-3 の KO マウス、Neurexin と Neuroligin との結合特異性を規定するスプライス部位(ss4)の挿入を操作した neurexin-3 ss4KI/KO マウスを作出して、それらの自閉症関連症状を解析することにより、その病態との関係に迫ったものである。neuroligin-3 R451C KI マウスの海馬でのシナプス機能についてはLTP増強、AMPA 受容体機能に対するNMDA 受容体機能の上昇、NMDA 受容体の NR2B サブユニットの機能亢進などの幼若シナプスの特徴を見出し、一方 neurexin-3 KO マウスの解析などから、シナプス前終末タンパク質である Neurexin が Neuroligin と結合することにより経シナプ的にシナプス後終末の AMPA 受容体機能を制御していることなどを見出したものである。これらの成果は今後の展開によっては一部の自閉症の治療法の開発にもつながる成果である。成果の一部は論文報告を行っている。主要な成果は責任著者として早い時期に論文報告が期待される。

5. 筒井 秀和 研究者「膜電位の時空間計測における、次世代技術開発」(5年型)

神経回路を駆け巡る神経信号は伝達物質と細胞膜電位によって担われている。後者はこれまでに電気生理学的手法により解析されてきたが、複雑な回路を構成する多数の細胞とその空間分布を一挙に観測すること

には限界があり、光学計測法に期待が集まっている。本研究はこの点に着目したもので、蛋白質性の膜電位プローブの作動原理の根本に立ち返って応答速度と感度および安定性に優れたプローブの創出を目論んだものである。すでに手にしていた mermaid プローブを用いて生きたゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態を無麻酔・非拘束で非侵襲的に撮像できることを実証したのち、膜電位プローブの特性を効率よく迅速に評価できる誘起膜電位の空間分布を利用した独自の評価システムを確立した。これを用いることにより、電位依存性フォスファターゼに由来する電位センサードメインと蛍光共鳴エネルギー移動レポータードメインとを組み合わせることで電位変化をエネルギー移動効率の変化として光学的に検出できるプローブ候補をスクリーニング評価し、センサードメインの機能様式に関する発見を介して新しい高速高感度プローブに近づけたことは高く評価される。今後プローブ特性のさらなる改良と完成、および in vivo 神経活動記録への適用が十分に期待できる。これまでに着実に成果を論文として報告しているが、特許出願も期待できると思われる。

6. 山口 瞬 研究者「脳内分子変化と電気生理学的・行動学的変化の統合解析」(5年型)

神経回路特性の長期的変化は一般的には遺伝子発現制御が関わりと考えられるが、それを生きた標本において経時的に観測する技術は未発達である。本研究は記憶・学習や感覚情報処理に際して神経細胞に誘導される Arc 遺伝子発現に着目し、これを蛍光蛋白質 dVenus により可視化できるトランスジェニックマウスの脳内の蛍光シグナルを記録できるカメラの作出をねらったものである。自由行動下の動物頭部に装着するカメラを試作し改良を進めてきたが、励起光密度や重量などについて課題が発生し完成には至っていない。一方平行して進めてきた二光子励起顕微鏡にマウス頭部を固定して課題に伴う変化を経時観察する方法、および課題後に脳スライスとして解析する方法については、視覚刺激や恐怖刺激による、あるいは病態モデル動物における、脳内の Arc 遺伝子発現様式の解析は共同研究者も得て発展しており、論文にもなっている。山口研究者はもともと遺伝子発現・電気生理学的変化・行動学的変化の同時モニタリングへの強い興味から、脳波および行動計測のシステムも立ち上げており、今後この独自の観点からの研究展開が期待できる。非常に有用なマウスの作成により広範な共同研究者に恵まれたことは、当該分野にとっても貴重な貢献である。今後責任著者として主要成果の論文発表も期待される。

7. 阿部 洋 研究者「シナプス可塑性に関わる RNA 群の革新的イメージング法の開発」

遺伝子情報はまず RNA として発現し、その多くは各種の制御のもとに蛋白質に翻訳されて細胞機能に組み込まれてゆく。神経細胞はその突起の広がりゆえに特定の RNA の局在とその変化に特に関心がもたれるが、生細胞でそれを解析する手段はない。本研究はそこに着目して、神経細胞内に導入してスプライシング、RNA 輸送や翻訳制御など RNA 動態のイメージング解析を可能にするプローブの開発をねらったものである。このために一対のオリゴヌクレオチドにマスクした蛍光性原子団あるいは還元剤を結合させたものを細胞に導入し、これらが標的 RNA に結合すると化学反応により蛍光団が生じるプローブの開発と実証に成功したものである。さらに、高感度化するためにこの反応を回転増幅して 1500 倍の増感を達成し、また標本に固有の自家蛍光を克服するため希土類元素を用い時間分解蛍光解析を行うことでさらに感度と特異性を向上できることを見出した。論文発表も行い、特許活動も行っている。今後、現在進めている神経細胞への応用を進展させ、実用化に供される日が待たれる。

8. 宇賀 貴紀 研究者「柔軟な判断を可能にする神経回路の動作原理の解明と制御」

状況に応じて適切な行動選択を判断することは反射行動や本能行動と異なり神経回路機能の最も高度なものの一つである。本研究はその神経回路基盤の解明に挑んだものである。サルにランダムドットステレオグラムを提示し、ドットの運動方向と奥行き判断を眼球運動により判定できる課題訓練を施し、大脳皮質 MT 野および LIP 野とから神経活動を記録して、柔軟で素早い判断の切り替えに伴う神経信号を解析したところ、MT 野には運動方向判断と奥行き判断それぞれに特異的に使用されるニューロン群が存在し、その 2 群を使い分けることで判断の切り替えが実現すること、さらに LIP 野では運動方向・奥行き情報がともに時間積分されるが、報酬によりランダムに要求される判断モードに柔軟に対応して必要な情報が蓄積され、不要な情報が除去されることを見出したことは非常に興味深い成果である。またこのような高難易度のタスクスイッチ課題をサルに課して成功したことは世界的にも追従を許さない成果と言える。今後 LIP 野での積分器の回路実体とその上流機構の解明が進展することが期待される。

9. 生沼 泉 研究者「ガイダンス因子シグナルで普遍的に駆動されるシグナル伝達経路の解明」

神経細胞の軸索や樹状突起がどうして正しい方向に伸長してゆくことができるのかは神経科学の長年の課題であり、多数の誘引性あるいは反発性ガイダンス因子が同定され細胞接着分子の関与が研究されてきたが、

それらのシグナルが細胞内でどう処理、伝達、統合されるかについてはほとんど不明であった。生沼研究者らは先に低分子量 G 蛋白質 R-Ras の関与明らかにしてきたが、本課題は軸索に対する誘引性ガイダンス因子 netrin-1 刺激の下流において R-Ras が Afadin に結合して細胞膜への移行を引き起こし、アクチン細胞骨格再編成により軸索分枝を呈すること、一方樹状突起においては M-Ras がアクチン細胞骨格系制御に関わる Lamellipodin に結合すること、さらに反発性ガイダンス因子 Sema4D 受容体 Plexin-B1 の下流の R-Ras の関与は軸索と樹状突起に共通であることなどを、神経細胞プライマリーカルチャー系を用いた精力的な実験によって明らかにしたことは大きな成果であり、課題をほぼ達成したものと言える。これらの成果は論文発表も行っている。今後は同定したエフェクター系が他のガイダンス因子にも普遍的なものであるかの説明が注目されるとともに、軸索成長円錐および樹状突起先端部の詳細な解析と in vivo での検証が大いに期待される。

10. 佐藤明子 研究者「神経細胞における膜タンパク質選別輸送システムの順遺伝学による説明」
神経細胞においても細胞膜はその機能に応じたドメインに分かれており、それらを維持調整するための膜タンパク質を積載した小胞のゴルジ体を経由する輸送は細胞内物流の大きな部分を占めている。ショウジョウバエ網膜の視細胞は頂端面の光受容膜をはじめ 4 個の明瞭に区別できる細胞膜区画を有するため、選別輸送システムの解析に有利な材料である。本研究はこれに着目し、ロドプシンの選別輸送の異常を指標として得ていた 300 以上の変異体の中から数個を選び、遺伝子の解析と細胞生物学的イメージングにより、Rab6 が頂端面への輸送に関与するが側底面への輸送には関わらないことを見出して段階的な選別機構が存在することを発見し、一方 ER 膜内で複合体を形成する膜タンパク質 EMC の 2 サブユニットの解析からは ER 膜におけるロドプシン分子の通過儀礼様式を説明したものである。これまでの成果の一部はすでに論文発表しており、国内学会の招待講演も行っている。今後は立ち上げた独自の系を足掛かりにしてこの細胞内選別膜系輸送システムのより広い展望が開け、またそれらの普遍的意義を明らかにする成果を期待したい。

11. 佐藤 隆 研究者「霊長類の高次脳機能を担う大脳皮質神経回路の可視化と制御」
本研究はもともと霊長類の前頭眼野に着目して、眼球運動の意志に関わる神経回路が様々な情報を統合して運動指令を出す様式を説明しようとする提案であったが、準備中に所属研究機関のサル施設が感染事故により停止したため、マウスの眼球運動に関わる大脳皮質回路の解析に向かったものである。ところが、両眼視の比重が小さいと見られ眼球運動研究から顧みられなかったマウスを解析してみると霊長類と類似した特性が続々と発見され、新たな分野を単独で開拓する成果となった。本研究により、マウス大脳皮質にも霊長類の前頭眼野に相当する部位が存在すること、その刺激で霊長類と同様なサッケード眼球運動が惹起されることなどを明らかにし、またいくつかの特性を解析できた。これらの成果は光遺伝学、二光子顕微鏡イメージング、Cre-LoxP システムなどが適応できるマウスにおいても、ヒトの眼球運動の基本原理に迫る研究ができる可能性を示すものであり、事実数ヶ所からセミナーに呼ばれるなどその研究が注目されている。今後はこの領野の感覚認知システムなどの入力や眼球運動制御様式などを含め興味深い進展が期待できる。

12. 谷口 弘樹 研究者「局所コネクティクス:抑制性局所神経回路発達の細胞種特異的解析」
大脳皮質の抑制性神経細胞には解剖学的、神経化学的および電気生理学的特性により区別される多様なサブタイプが存在すること、また興奮性の錐体細胞は各細胞区画(樹状突起、細胞体、軸索起始部)において特定の抑制性神経細胞サブタイプから局所入力を受けることが長く知られているが、それらの解剖学的細胞学的詳細や神経結合の発達などに関しては解析の困難から不明な部分が多く残されている。本研究は、これらのサブタイプを特異的に標識する遺伝学的技術を開発し、抑制性局所神経回路の結合様式と発達様式を体系的に明らかにしようとするものである。このために組み替え酵素 Cre をサブタイプ特異的に発現するマウスと狂犬病ウイルスを用いた逆行性経 1 シナプス標識法を組み合わせることにより抑制性神経細胞サブタイプ特異的な標識に成功し、たとえば第 II/III 層錐体細胞への各層の Parvalbumin 陽性抑制性神経細胞から入力の様相などを明らかにすることに成功し、また形態的サブタイプの一つシャンデリア細胞の全貌を詳細に可視化することにも成功した。これらの成果は大脳皮質の局所回路の解明の強力な基盤を開くものであり、その意義は大きい。今後他のサブタイプについても解析が進み、大脳皮質の神経回路の理解が大きく進展することが期待できる。

13. 早坂 直人 研究者「神経グリア相互作用としての概日リズム制御系の新たな理解」
本研究は、マウスで概日リズム中枢である視床下部 SCN においてアストロサイトが昼夜で分布が変わるとする予備的データなどに基づいて、SCN 活動の概日リズムの発振・同調などにアストロサイトが関わるという興味深い可能性を検証する研究として提案されたものである。その後アストロサイト細胞株やプライマリーカル

チャーを用いる解析、各種の遺伝子改変マウスの解析などを精力的に進めてきたが、十分に説得性あるデータはまだ纏まっていないようである。今後はテーマを絞り着実な実験を積み上げることにより、成果を論文として世に問うことが期待される。

14. 平田 普三 研究者「グリシン作動性シナプスの活動依存的形成と臨界期の分子基盤」

平田研究者は先にグリシン受容体のアンタゴニストであるストリキニンの作用下ではゼブラフィッシュのグリシン作動性シナプスが形成されないことを発見したことに基づき、本研究においてさらにこの可塑性の分子基盤の解明に挑んだものである。グリシン受容体に作用する候補分子を絞り込み Gephyrin(さらにはの神経特異的アイソフォーム)と Dhx37 を同定してそれらの作用を精力的に解析することにより、「グリシン放出→グリシン受容体活性化→ポストシナプスにおける CaMKII 活性化→Gephyrin リン酸化→グリシン受容体凝集増加」という図式を見出したことは大きい成果であり、課題を達成したものと言える。これらの成果は多数の論文として発表しており、国際的評価も受けつつある。今後は本研究から得られた他のグリシン作動性シナプス関連分子なども活用して、臨界期も含めたグリシン作動性シナプスの生理的意義などの解明が期待できる。

15. 堀江 健生 研究者「遊泳運動を規定する神経回路の発生と動作原理の解明」

ホヤは脊椎動物と同じ基本設計を有する中枢神経系を持ちながら、その神経細胞数は約 100 個、特に遊泳運動に直接関わる回路は 14 個の神経細胞からなる。本研究はこの点に着目して、回路の活動イメージング、光遺伝学による特定細胞の活動操作、転写因子機能阻害による特定神経細胞の欠損または置換などの方法により、遊泳運動神経回路の動作原理の解明を意欲的に目論んだものである。実際に高速共焦点顕微鏡を用いたカルシウムイメージングにより、遊泳運動中の 14 個の神経細胞の活動様式を明らかにし、特定の細胞に光制御型チャネル/ポンプを発現させてこれを強制的に活性化または抑制して遊泳運動を自在に操作することに成功し、また特定の神経細胞を欠損した個体を作成してその遊泳運動における役割を証明したことは大きい成果であり、課題の骨格を達成したものと言える。またさきがけ領域会議を機に OIST の研究者との共同研究を展開している。上記の成果も早期に論文にまとめ、今後この神経回路の全神経細胞の役割を明らかにして、脊椎動物の遊泳・爬行様式の理解に新たな視点を開くことが期待できる。

16. 松尾 直毅 研究者「個々の記憶情報をコードする神経回路の解析と制御」

先に開発した、任意の時期に活動した神経細胞集団に任意の遺伝子操作を行うことができる遺伝子改変マウスを活用して、「記憶情報は協調的な活動により形成される複数の散在神経細胞の機能的な集団により符号化されている」という cell assembly 仮説の実験的検証に意欲的に挑戦したものである。TetOプロモーターを利用してシナプス伝達を可逆的に遮断できる毒素を薬物投与により発現するよう仕組んだ遺伝子改変マウスを作成して、状況空間を記憶させる恐怖刺激を与えたのちシナプス遮断を行うと記憶の想起が障害されること、遮断から回復する 1 ヶ月後に記憶想起も回復することを明らかにし、またその特異性も実証して、特定の記憶情報を担う一部の神経細胞集団が存在することを示し得たことは大きい成果であり、課題の根幹を達成したものである。世界的にも競争の激しいこの分野において小グループでこれを成し遂げたことも注目される。今後は解剖学的解析も加えてこの記憶“痕跡”細胞集団の実体と特性を明らかにし、さらには複数の脳領域にまたがる記憶細胞集団の解析などから、記憶における各領域の機能とその制御の理解にも発展できればさらに大きな成果が期待できる。

17. 村越 秀治 研究者「シグナル分子の活性化観察と操作によるシナプス可塑性機構の解明」

脳の大型神経細胞の樹状突起にはシナプスを受ける小突起があり、このスパインは機能的にも形態的にも可塑性を示し、これがシナプス機能の調整に重要であると考えられている。本研究は、特にこのスパイン内で Rho GTPase やアクチンを制御してシグナル伝達の鍵を握るプロテインキナーゼ CaMKII に着目し、CaMKII の活性化を光照射によって制御することができる蛋白性分子を作成して、シナプス可塑性を局所的に操作する分子活性化イメージングを開拓しようとするものである。実際に植物由来の LOV2 ドメインを利用した光活性化型 CaMKII 阻害分子 paAIP2 の作出に成功し、スパイン可塑性の特性を解析した。さらに蛍光共鳴エネルギー移動を利用した CaMKII FRET センサーを作成し改良を重ねて高感度高精度低毒性の活性化イメージングにも成功している。これらは本課題の根幹的技術開発を達成したものである。これらのツールを用いて培養細胞におけるスパインの形態的可塑性の特性を解析したが、今後は他にも開発している分子なども合わせて生体内でのイメージングに発展させ、国際的にも注目される成果が十分に期待できる。

18. 吉田 知之 研究者「中枢シナプスオーガナイザーによる標的認識と特異的シナプス形成の調節機構



の解明」

神経結合の特異性の分子的基盤は Sperry の chemoaffinity 説以来半世紀以上にわたる神経科学の重要問題であるが、この間にガイダンス分子や接着分子が多数同定されたにも拘わらずシナプスにおける分子メカニズムは解明からほど遠い。本研究は、先にゼブラフィッシュ胚でシナプス形成促進因子のスクリーニングにより IL1RAPL1 や PTP δ などを見出していたことに基づき、これらのシナプスオーガナイザー分子の構造、特にスプライスバリエーションの結合特異性における意義に着目して、巧みな実験系を工夫して IL1RAPL1—PTP δ 系の機能に深く詳細な解析を加え、さらにこの結合系と NRXN—NLGN 結合系間の抑制関係の発見とその解析を行ったものである。これらの成果により、シナプス結合特異性の分子メカニズムの様相の主たる特徴が明らかになり、この問題への方法論のモデルとなるばかりでなく、今後の組織学的あるいは行動学的生理学的展開や、神経回路の維持調整メカニズムや神経疾患の研究に新たな見通しを提示した意義も大きい。

10. 評価者

研究総括 村上 富士夫 大阪大学大学院生命科学研究科・特任教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成27年3月末現在)

上村 匡 京都大学大学院生命科学研究科・教授
岡本 仁 化学研究所脳科学総合研究センター・副センター長
貝淵 弘三 名古屋大学大学院医学系研究科・教授
影山 龍一郎 京都大学ウイルス研究所・教授
狩野 方伸 東京大学大学院医学系研究科・教授
川口 泰雄 自然科学研究機構生理学研究所・教授
小坂 俊夫 九州大学大学院医学研究院・教授
立花 政夫 東京大学大学院人文社会系研究科・教授
能瀬 聡直 東京大学大学院新領域創成科学研究科・複雑理工学専攻・教授
平田 たつみ 情報・システム研究機構国立遺伝学研究所・教授
藤田 一郎 大阪大学大学院生命機能研究科・教授
虫明 元 東北大学大学院医学系研究科・教授
柚崎 通介 慶應義塾大学医学部・生理学・教授

(参考)

件数はいずれも、平成27年3月末現在。

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	89	89
口頭	129	58	187
その他	34	0	34
合計	163	147	310

(2) 特許出願件数

国内	国際	計
4	2	6

(3) 受賞等

- ・川内 健史
日本細胞生物学会 日本細胞生物学会若手優秀発表賞(H25.6)
- ・小早川 高
バイオビジネスコンペ JAPAN 実行委員会 第10回バイオビジネスコンペ JAPAN 最優秀賞(H22.3)
- ・阿部 洋

- 長瀬科学技術振興財団 長瀬研究振興賞(H26.4)
- ・生沼 泉
 - 井上科学振興財団 第5回井上リサーチアワード(H25.2)
 - 花王芸術科学財団 第15回 花王研究奨励賞(H26.6)
 - 日本生化学会 平成 26 年度日本生化学会奨励賞(H26.10)
- ・佐藤 明子
 - 広島大学 広島大学 Distinguished researcher(H23.6)
- ・谷口 弘樹
 - Brain & Behavior Research Foundation Honorable mention, 2013 Daniel X Freedman Award(H25.7)
- ・早坂 直人
 - 近畿大学医学会 近畿大学医学会賞(H23.10)
- ・平田 普三
 - 日本生化学会 日本生化学会奨励賞(H23.10)
 - 文部科学省 文部科学大臣表彰若手科学者賞(H24.4)
- ・村越 秀治
 - 日本生物物理学会 2011 年日本生物物理学会若手奨励賞(H23,9)
 - 日本生理学会 第 89 回日本生理学会ポスター賞(H24.3)

(4)招待講演

国際 43 件

国内 62 件

別紙

「脳神経回路の形成・動作と制御」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成27年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
阿部 洋 (兼任)	シナプス可塑性に関わるRNA群の革 新的イメージング法の開発 (理化学研究所、北海道大学)	北海道大学 准教授 (理化学研究所 専任研究員)	40
宇賀 貴紀 (兼任)	柔軟な判断を可能にする神経回路の 動作原理の解明と制御 (順天堂大学)	順天堂大学 前任准教授 (同上)	40
生沼 泉 (兼任)	ガイダンス因子シグナルで普遍的に駆 動されるシグナル伝達経路の解明 (京都大学)	京都大学 助教 (同上)	43
佐藤 明子 (兼任)	神経細胞における膜タンパク質選別輸 送システムの順遺伝学による解明 (名古屋大学、広島大学)	広島大学 准教授 (名古屋大学 特任准教授)	40
佐藤 隆 (兼任)	霊長類の高次脳機能を担う大脳皮質 神経回路の可視化と制御 (チュービンゲン大学)	チュービンゲン大学 Junior Group Leader (同上)	40
谷口 弘樹 (兼任)	局所コネクティクス:抑制性局所神経回 路発達の細胞種特異的解析 (コールドスプリングハーバー研究所、 マックスプランクフロリダ研究所)	マックスプランクフロリダ研究所 Research Group Leader (コールドスプリングハーバー研究 所 研究員)	40
早坂 直人 (兼任)	神経グリア相互作用としての概日リズム 制御系の新たな理解 (近畿大学、山口大学)	山口大学 准教授 (近畿大学 講師)	40
平田 普三 (兼任)	グリシン作動性シナプスの活動依存的 形成と臨界期の分子基盤 (遺伝学研究所)	遺伝学研究所 准教授 (同上)	35
堀江 健生 (兼任)	遊泳運動を規定する神経回路の発生 と動作原理の解明 (筑波大学)	筑波大学 助教 (同上)	40
松尾 直毅 (兼任)	個々の記憶情報をコードする神経回路 の解析と制御 (京都大学)	大阪大学 准教授 (京都大学 特定准教授)	40
村越 秀治 (兼任)	シグナル分子の活性化観察と操作に よるシナプス可塑性機構の解明 (生理学研究所)	生理学研究所 准教授 (同上)	40
吉田 知之 (兼任)	中枢シナプスオーガナイザーによる標 的認識と特異的シナプス形成の調節 機構の解明 (東京大学、富山大学)	富山大学 准教授 (東京大学 講師)	40

(5年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成27年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
今井 猛 (専任、兼任)	末梢入力に依存した神経回路形成の ロジック (東京大学、理化学研究所)	理化学研究所 チームリーダー (東京大学 特任助教)	100
川内 健史 (兼任、専任)	細胞内機能ドメインが脳皮質形成に 果たす役割の解明 (慶應大学)	JST さきがけ研究者 (慶應大学 講師)	100
小早川 高 (兼任)	匂いに対する特異的な行動や情動を 制御する神経ネットワーク (大阪バイオサイエンス研究所)	大阪バイオサイエンス研究所 研究員 (同上)	125
田淵 克彦 (兼任)	精神発達障害原因解明のための Neurologin/Neurexin モデルの確立 (生理学研究所、信州大学)	信州大学 教授 (生理学研究所 准教授)	100
筒井 秀和 (兼任)	膜電位の時空間計測における、次世 代技術開発 (大阪大学、理化学研究所、北陸先端 科学技術大学)	北陸先端科学技術大学 准教授 (大阪大学 助教)	76
山口 瞬 (兼任)	脳内分子変化と電気生理学的・行動 学的変化の統合解析 (神戸大学、岐阜大学)	岐阜大学 教授 (神戸大学 准教授)	95

研究報告書

「末梢入力に依存した神経回路形成のロジック」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 今井 猛

1. 研究のねらい

我々哺乳類の神経系においてどのようにして特異的な神経接続が保証されているのか、という問題は、神経科学における大きな問題の一つである。近年の研究により、遺伝学的なプログラムによって規定される決定論的な神経接続の分子機構はかなり解明されてきたが、より高次の神経回路、たとえば、大脳皮質で入力情報に応じて異なる情報処理がなされるための神経回路がつけられる仕組みは、依然としてよく分かっていない。哺乳類の中枢神経系の回路形成においては、しばしば末梢からの入力や神経活動が重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、マウス嗅覚系をモデルとして、嗅覚受容体からの入力がどのようにして嗅神経細胞軸索投射を制御しているのか、さらにはどのようにして高次嗅覚回路の形成を制御しているのかを明らかにする。また、こうした研究を進める上では神経回路をカラム単位、感覚情報の入力・演算ユニット単位で遺伝学的に操作・可視化することが重要である。そこで本研究ではそのための新奇遺伝学ツールや可視化技術の開発も平行して進める。

2. 研究成果

(1) 概要

哺乳類中枢神経系においてどのようにして特異的な神経回路が作られるのかを研究する上で、マウス嗅覚系は極めて優れたモデル系である。嗅上皮において、個々の嗅神経細胞は約 1,000 種類ある嗅覚受容体遺伝子の中から 1 種類のみを選択的に発現し、同種の嗅覚受容体を発現する嗅神経細胞の軸索は嗅球において同一の糸球体へと収斂する。従って、匂い情報は嗅球において糸球体を素子とするマップへと展開される。一方、嗅球の糸球体において匂い情報は僧帽・房飾細胞へと受け渡されるが、僧帽・房飾細胞は単一の主樹状突起を単一の糸球体にもみ接続することで、匂い情報の混線が生じないようにしている。本研究課題においては、嗅神経細胞軸索が発現する嗅覚受容体の種類に応じて決まった糸球体に投射する際にどのようなパラメータを用いているのかについて研究を行い、嗅覚受容体からGsタンパク質を介して生じる basal activity が投射位置を規定することを明らかにした。また、僧帽・房飾細胞が生後発達の過程で単一の糸球体にもみ接続を確立する過程について研究を行い、生後の神経活動が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

また、回路形成の過程では神経活動が重要な役割を果たすことから、嗅球における自発神経活動の研究を行ったが、その過程で思いがけず、自発活動の匂い情報処理における役割を見出すことになった。嗅覚系では鼻腔の airflow 刺激によって神経活動が生じ、嗅球に活動のオシレーションを生じる。このオシレーションにもとづいて作られる神経活動の時間的パターンが匂い情報をコードしていることを明らかにした。

さらに、嗅球をはじめとする中枢神経系における 3 次元的な回路の研究を効率的に行う為、新しい回路可視化技術の開発にも取り組んだ。広範な回路可視化のための組織透明化試薬 SeeDB を開発し、嗅球における僧帽・房飾細胞の回路多様性を明らかにした。さらに、シナプスレベルでの高分解能 3D イメージングのための新しい透明化試薬の開発にも成功した。

(2) 詳細

嗅神経細胞軸索投射を制御する cAMP シグナルの解析

嗅神経細胞軸索投射の過程で、嗅覚受容体は Type-I と Type-II という 2 種類の軸索ガイダンス・細胞接着分子の遺伝子発現を制御している。Type-I は幼若な嗅神経細胞に発現しており、嗅球前後軸に沿ったおおまかな軸索投射位置の規定に関わっている。一方、Type-II はより成熟した嗅神経細胞に発現し、軸索間で局所的に作用して嗅神経細胞軸索の選り分けを行っている。Type-II については鼻腔閉塞で発現が変化することから主に環境中からの刺激が関与していると考えられていた一方、Type-I についてはどのようなシグナルが発現制御しているのか不明であった。

我々は幼若な嗅神経細胞では Gs が、成熟した嗅神経細胞では Golf が発現していることからこれらの G タンパク質に着目して解析を行い、嗅神経細胞特異的な Gs のノックアウトマウスでは Type-I 遺伝子の発現が影響を受け、Golf のノックアウトマウスでは Type-II 遺伝子の発現が影響を受けることを明らかにした。更に我々は、Gs と Golf が下流の cAMP シグナルを伝えるモードが異なる可能性を検討するため、嗅覚受容体を含むいくつかの GPCR と Gs/Golf の融合タンパク質を作製して、リガンドに対する応答特性を解析した。その結果、Gs はリガンド非依存性の basal activity を生じやすいのに対し、Golf では basal activity が低く、リガンド依存性の cAMP シグナルを伝達するのに適していることが判明した。本研究により、嗅神経細胞の投射位置特異性の源は嗅覚受容体の basal activity の違いにあることを明らかにすることができた (*Cell*, 2013; 論文 3)。

嗅球僧帽細胞の樹状突起刈り込みのメカニズム

嗅球の糸球体において、嗅神経細胞軸索から入力された匂い情報は 2 次神経細胞である僧帽・房飾細胞へと受け渡される。僧帽・房飾細胞は単一の主樹状突起を単一の糸球体へと伸ばして興奮性入力を受け取ると共に、複数の側方樹状突起を伸ばして顆粒細胞から抑制性入力を受ける。このような樹状突起の形態形成は生後数日の間に確立される。我々は僧帽細胞をまばらに蛍光タンパク質で標識することにより、樹状突起の発達過程を観察した。その結果、生後 2 日目までは僧帽細胞の複数の樹状突起が複数の糸球体に伸びているが、生後 3-4 日目に樹状突起の刈り込みが起こり、生後 6 日目までにほとんどの僧帽細胞が単一の主樹状突起を有するようになることが判明した。従って、僧帽細胞樹状突起の接続特異性は、ガイダンスプロセスではなく、刈り込み過程で制御されているということになる。このような刈り込みプロセスは、嗅球において匂い情報の”混線”を防ぐ上で極めて重要である。

これまでに、匂いを検出できない CNGA2 ノックアウトマウスの解析から、この刈り込みプロセスには感覚入力は必要ないことが示されていた。そのため、どのようなメカニズムで樹状突起の刈り込みが起こるのかは不明であった。我々は匂い刺激によらない、自発的な神経活動

が樹状突起の刈り込みに関与している可能性を考え、内向き整流性 K⁺チャネル Kir2.1 を過剰発現させ、神経活動を抑えたときの発達プロセスについて調べた。この結果、神経活動阻害をすることで僧帽細胞主樹状突起の刈り込みが阻害されること、側方樹状突起の伸長が阻害されることが明らかになった。

実際に嗅球で生後発達期に自発活動が生じているかどうかを確かめるため、新生仔マウス嗅球における2光子カルシウムイメージングを行った。僧帽・房飾細胞特異的に GCaMP3 を発現するトランスジェニックマウスを用いて嗅球の *in vivo* イメージングを行ったところ、ケタミン麻酔下ではほとんど自発活動が見られないが、覚醒下では観察することができた。自発活動は P2-3 では同期性の高いウェーブとして観察されるが、P10 では糸球体毎に異なるタイミングで活動する様子が観察された。同様の実験を、嗅神経細胞特異的に GCaMP3 を発現するトランスジェニックマウスでも行ったが、自発活動は認められなかった。以上のことから、嗅球の僧帽・房飾細胞では、生後発達期に感覚刺激に依存しない自発活動があることが明らかとなった。

同様の結果は嗅球スライスでも観察された。そこで嗅球スライスを用いて薬理学実験を行ったところ、NMDA 受容体と AMPA 受容体の両方が必要であること、ギャップ結合が必要であることなどが判明した。スライスでのカルシウムイメージングではより高速のイメージングも行い、自発活動の時間的なパターンについても詳細に解析した。相互相関解析を行ったところ、P2-3 においては自発活動が決まったパターンで糸球体間を伝播するのに対し、P10 においては伝播のパターンに明確な法則性がない(ランダム)ことが判明した。今後は自発活動生成のメカニズムについてさらに追求するとともに、活動の伝播パターンと樹状突起刈り込み特異性の間に何らかの法則性があるのかどうかについて研究を進める。

嗅球における匂い情報の時間コーディングの仕組み

嗅球の僧帽・房飾細胞において、匂い情報は発火頻度だけでなく、発火のタイミングも変化させる。従来から、発火タイミングにも匂いの情報がコードされているのではないかと考えられてきたが(時間コーディング)、いったいどのような情報が発火パターンにコードされているのか、時間コーディングの意義は何か、時間コードがどのように作られるのかについては全く不明であった。本研究においては、自発神経活動の解析を行う中で思いがけずにこれらの問題に対する手がかりが得られたため、時間コーディングに関する以上の問題に取り組んだ。

我々は、嗅上皮および嗅球の *in vivo* GCaMP3 カルシウムイメージングを行い、嗅神経細胞が匂い分子だけでなく、airflow 刺激にも応答することを見出した。通常、匂い分子は極めて小数の種類のみを活性化させるが、airflow 刺激は約半数程度の嗅神経細胞を活性化させる。嗅球においては、応答の程度は糸球体によって異なり、再現性もあることから、発現する嗅覚受容体の種類によって airflow 応答の程度が決まっていると考えられる。嗅球の僧帽・房飾細胞においては、より多くの糸球体において、抑制性応答も含めた広範な airflow 応答が観察される。通常マウスは 2-10Hz の範囲で呼吸をしながら匂いを嗅いでいるため、この airflow 応答は、嗅球僧帽・房飾細胞において、広範な神経活動オシレーション(シータオシレーション)を生み出す。僧帽・房飾細胞におけるオシレーションは鼻腔閉塞によって消失し、また人工吸気システムにおいて airflow の頻度を変えると、それに従ってオシレーションの周

期が変わることが確認された。さらに、各系球体におけるオシレーションの位相について詳しく解析したところ、その位相が系球体毎に異なっており固有であることが判明した。この固有の位相は、airflow の速度や頻度を変えても大きく変化しない一方で、匂い刺激を行うとしばしば位相シフトすることが判明した。このことから、位相コードは匂い刺激と airflow 変化とを区別する上で重要であると考えられる。

次に、匂い刺激によって生じる発火頻度の情報と位相シフトのどちらがより安定的に情報をコードできるのかについて検討を行った。GCaMP 蛍光シグナルは繰り返し匂いをかぎ続けるとダイナミックに変化し、相関が徐々に低下していくのに対し、位相シフトは繰り返し匂いを嗅いでも変化しにくいことが判明した。従って、匂い探索行動のような繰り返し匂いを嗅ぐ行動においては、位相コードの方がより安定した情報をコードしており、有利であると考えられる。

そもそも匂い分子は呼吸に伴って鼻腔に持ち込まれるため、airflow 応答がなくてもリズム的な匂い応答は達成できそうなものである。時間コーディングにおいて、airflow 応答は積極的な役割をもっているのであろうか？この問題に答えるため、我々は airflow 刺激と匂い分子の両方をリズム的に嗅神経細胞に提示した場合と、airflow 一定下で匂い分子のみをリズム的に提示した場合とで、嗅球における匂い情報コーディングに差があるのかについて検討した。その結果、airflow 応答があった方が、1) 匂い刺激に対する応答速度が速くなること、2) 匂い刺激に対する応答が大きくなること、3) 呼吸サイクル毎にリズム的な応答が可能になること、4) 時間コードがより安定になること、を明らかにした。これらのことから、嗅神経細胞の airflow に対する応答は、単に避けがたいノイズということではなく、嗅球においてよりロバスタな時間コーディングを可能とするための必須の性質であると考えられる。

オシレーションを基盤とした情報コーディングは嗅内皮質-海馬で既に知られていたものの、本研究を通して、嗅球においてもオシレーションが感覚情報処理の基盤となっていることが明らかとなった。(未発表)

神経回路の 3 次元解析を可能とする組織透明化試薬の開発

従来、神経回路の 3 次元的なつながりを明らかにするには、大量の連続切片を作製して再構成するという大変骨の折れる作業が必要であった。こうした問題を克服するため、しばしば有機溶媒を用いた組織透明化が行われてきたが、有機溶媒は蛍光タンパク質の蛍光を褪色させてしまうため、遺伝学的な回路標識と組み合わせて使用することは困難であった。

こうした問題を克服するため、我々は蛍光タンパク質や神経トレーサーの蛍光を保持したまま組織を透明化する方法の開発に取り組んだ。最近他のグループによって開発された方法では組織が膨張・収縮して形態変化を生じるという問題があったため、我々はこうした問題の克服も試みた。その結果、フルクトースを主成分とする透明化試薬 SeeDB によって、マウス脳を短時間で、蛍光を保持し、形態を保持したまま透明化できることを見出した。SeeDB は屈折率が高いため、十分に透明になっても従来の対物レンズでは球面収差のために深部まで観察することが難しい。そこで、最適な特注対物レンズを 2 光子励起顕微鏡に用いることで、マウス脳を背側から腹側までイメージングすることに成功した。この方法を用いて、例えばマウスの脳梁繊維を 1 本 1 本右脳から左脳までトレースすることが可能となった。また、この SeeDB 法を用いて、単一の系球体に接続する 20-50 個の”姉妹”僧帽・房飾細胞の接続様式の解析

を行った。単一の糸球体からデキストラン色素を注入することで姉妹僧帽・房飾細胞を標識し、その分布を解析したところ、それらの細胞体の位置は必ずしも糸球体の直下に集まっている訳ではなく、糸球体 20-30 個分の領域に広がって分布していることが判明した。さらに、姉妹僧帽細胞の側方樹状突起のパターンは互いに似ておらず、多様性に富んでいることも判明した。この結果は、姉妹僧帽細胞であっても異なる抑制性入力を受け、異なる応答特性を持っている可能性を示唆している。(Nat Neurosci, 2013; 文献 4)

3. 今後の展開

嗅神経細胞軸索投射の研究については、主要な問題についてはほぼ解明に至ったと考えている。現在は、これまでの知見を活かして、成体におけるマップ再生の問題に取り組んでいる。嗅神経細胞は生後でも再生および再投射を繰り返しているが、頭部損傷などの際に嗅神経細胞が一度に切断されてしまうとマップの再生が難しいことが知られている。これは異臭症をひきおこし、著しいQOLの低下につながるが、根本的治療法はない。成体における軸索再投射の過程が胎生期のマップ形成のプロセスとどのように異なるのかを明らかにすることで、正しいマップ再生の道の筋を得たいと考えている。

嗅球僧帽細胞の樹状突起刈り込みの問題に関しては、今後自発活動のタイミングと刈り込み特異性の関係について研究を進展させたいと考えている。将来的には光遺伝学的手法によって自発活動のタイミングをコントロールし、刈り込み特異性を決めていくルールを証明したいと考えている。神経突起の刈り込みという現象は生後発達期の脳における普遍的な現象であるため、この研究を進展させることは生後脳発達の普遍的なルールの解明につながると期待している。

本研究を通して、嗅球の動作原理にかかわる研究にも踏み込むことができたのは予想以上の成果であった。オシレーションにもとづく外界情報の認識、記憶形成は中枢神経系における中心的な問題の一つであることから、今後はそうした問題意識で本研究を進展させたい。具体的には、比較的単純な回路からなる嗅球においてオシレーションが生成され、糸球体に固有の位相が作られる仕組みを、細胞レベル、回路レベルで解明することが今後 5 年程度での大きな目標である。

こうした問題に取り組む上で、引き続き技術開発も重要であると考えている。組織透明化法は、更に改良してシナプスレベルのコネクトーム研究に発展させる必要がある。また、in vivo イメージングや光遺伝学とコネクトームの橋渡しを可能とする透明化および 3 次元イメージングのパイプライン構築も今後必要である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では、1) 嗅覚受容体からの入力に依存した嗅神経細胞軸索投射の分子機構の解析、2) 嗅覚受容体の種類に対応した僧帽・房飾細胞神経回路の形成過程の解析、3) 新奇遺伝学・可視化ツールの開発を目標とした。

1)については、特に嗅覚受容体から入力されるシグナルの実体の解明を目指し、おおまかな軸索投射位置を決める Type-I 遺伝子と、局所的な軸索の選別を制御する Type-II 遺伝子の制御機構を解析した。Type-I 遺伝子については、嗅覚受容体 Gs を介し、リガンド非依存性の

シグナルを伝えるという結論にたどり着くことが出来た。

一方、Type-II 遺伝子の制御機構について示唆を得ようと始めた in vivo 2 光子カルシウムイメージングによる airflow 応答イメージングの研究が、思いがけず嗅覚情報処理の研究に発展した。本さきがけ研究の開始に当たっては、「予想外の研究に発展することが最大の目標である」と書いたが、その通りになったという意味で成功であった。神経回路機能において活動のオシレーションが重要であるという今回の成果は、中枢神経系における普遍的な問題を含んでおり、今後さらに「機能的」回路の動作・形成原理を研究する上で、重要な足がかりになったと評価している。

2)については、特に僧帽細胞樹状突起の接続特異性が生後発達の過程でどのように決まるのかに着目して研究を進め、一定の成果を得ることができた。生後の自発活動が重要であるという結果は、過去の研究からは予想外の結論であり、嗅覚神経回路形成の理解に大きく貢献する成果であると考えられる。一方で、神経活動がどのようにして回路特異性を規定しているのかという中心的な問題は依然として残されたままである。自発活動の時空間的パターンの解析によって手がかりは得られつつあるものの、光遺伝学などを用いた最終的な証明はこれからである。神経回路の刈り込みは普遍的な現象であり、様々な系で記述されているが、刈り込みの特異性(即ちどの枝を選ぶか)に関するメカニズムは全く未知である。本研究によってその足がかりが得られつつあることは大きな成果であると考えている。

3)に関しては、新技術の開発することで新しいアプローチの研究を優位に展開できるという考えのもと、当初、回路標識と回路解析の両方を想定して研究に取り組んできた。回路解析に関しては、新しい透明化法の開発など、十分な成果を収めることが出来た。一方、自在に回路標識する手法の研究については、いくつか進展はあったものの、実用化して論文発表する段階には至らなかった。今後回路標識の手法についても可視化技術の進展を踏まえて取り組みたい。

本研究課題では、脳神経回路の動作原理、形成原理に迫る研究を展開することができた。また神経回路の全容解明をめざす世界的な機運の中で、新しい技術の開発でも貢献することができた。本課題の成果は、今後も続く神経回路解明の研究に資するとともに、特に生後発達期および成体における神経回路制御の技術に発展するものと期待している。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

神経回路が形成されるためには特異的で正確な神経結合が前提となるがそのメカニズムは依然として良く分かっていない。本研究は解析対象として優れたモデル系であるマウス嗅覚系に着目して、感覚入力(神経投射)に果たす役割に迫ったものであり、嗅覚受容体から Gs タンパク質を介して生じる basal activity が投射位置を規定することを明らかにし、また嗅球の出力細胞である僧帽・房飾細胞が生後発達の過程で単一の糸球体にのみ接続を確立する過程を解析して、生後の神経活動が重要な役割を果たしていることを明らかにしたこと、さらに鼻腔の呼吸気流刺激によって生じる神経活動の周期振動が匂い情報のコーディングに重要な役割を果たしているという予期せぬ発見に至ったことはいずれも大きな成果である。またこれらの研究課程で必要となり開発した脳組織の画期的な透視化技術 SeeDB 法については速やかに発表

し、大きな反響を呼んだ。これらの成果に基づき、今後は発見した嗅球の自発活動の生理的意義、および僧帽細胞の樹状突起刈り込みの特異性のメカニズム、さらに嗅球の活動振動の生成メカニズムとその意義の解明などが大きく展開することが十分に期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Imai T. Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol.* (2014) 35:180–188.
2. Ke M-T, Imai T. Optical clearing of fixed brain samples using SeeDB. *Curr Protoc Neurosci.* (2014) 66:2.22.1–19
3. Nakashima A*, Takeuchi H*, Imai T*, Saito H, Kiyonari H, Abe T, Chen M, Weinstein LS, Ron Yu C, Storm DR, Nishizumi H, Sakano H. (*equally contributed) Agonist-Independent GPCR Activity Regulates Anterior-Posterior Targeting of Olfactory Sensory Neurons. *Cell* (2013) 154:1314–1325.
4. Ke M-T, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci.* (2013) 16:1154–1161.
5. Tsuboi A*, Imai T*, Kato HK, Matsumoto H, Igarashi KM, Suzuki M, Mori K, Sakano H. (*equally contributed) Two highly homologous mouse odorant receptors encoded by tandemly-linked MOR29A and MOR29B genes respond differently to phenyl ethers. *Eur J Neurosci.* (2010) 33:205–13.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2 件

1.

発明者: 今井 猛、柯 孟岑

発明の名称: 生物材料を透明化する方法および生物材料用透明化処理キット

出願人: 理化学研究所

出願日: 2012/6/22

出願番号: 2012-141488

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

海外学会発表

1) Ryo Iwata, Takeshi Imai.

Nasal airflow entrains glomerulus-specific oscillations for phase odor coding

Society for Neuroscience 2014

2014. 11. 15–19, Washington DC, USA

- 2) Meng-Tsen Ke, Takeshi Imai.
Correlative histochemistry: a quick and simple method for whole-mount immunohistochemistry and optical clearing of in vivo-imaged neurons
Society for Neuroscience 2014
2014. 11. 15–19, Washington DC, USA
- 3) Ryo Iwata, Takeshi Imai.
Nasal airflow entrains glomerulus-specific theta oscillations for robust phase odor coding.
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Neuronal Circuits
2013. 7. 18–22, NY, USA
- 4) Ryo Iwata, Takeshi Imai.
Widespread glomerular responses to nasal airflow in the mouse olfactory system.
Society for Neuroscience 2013
2013. 11. 9–13, San Diego, CA, USA.
- 5) Meng-Tsen Ke, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai.
SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction
Society for Neuroscience 2013
2013. 11. 9–13, San Diego, CA, USA.
- 6) Meng-Tsen Ke, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai.
SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction
ECRO2013
2013. 8. 26–29, Leuven, Belgium.
- 7) Meng-Tsen Ke, Satoshi Fujimoto, Takeshi Imai.
SeeDB-A simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Wiring the Brain
2013. 7. 18–22, NY, USA
- 8) Meng-Tsen Ke, Takeshi Imai.
Differential wiring of sister mitral cells revealed by a novel optical clearing agent
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Axon Guidance, Synapse Formation and Regeneration
2012. 9. 18–22, NY, USA
- 9) Takeshi Imai
Wiring specificity of mitral/tufted cells in the mouse olfactory bulb
ISOT 2012
2012. 6. 23–27 Stockholm, Sweden
- 10) Takeshi Imai
Odorant receptor-instructed neuronal wiring in the mouse olfactory system
EMBO Workshop, Frontiers in Sensory Development
2011. 5. 3–6. Barcelona, Spain

プレスリリース

1) 刺激によらない GPCR 基礎活性の機能を初めて解明

－嗅覚受容体の基礎活性による嗅神経回路の形成－

平成 25 年 9 月 13 日

<http://news.ad.u-fukui.ac.jp/wp-content/uploads/20130912.pdf>

2) 簡便で生体試料にやさしい組織透明化試薬「SeeDB」を開発

－神経細胞の微細な形状や接続の様子を脳丸ごと3D解析－

平成 25 年 6 月 24 日

http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130624_1/

研究報告書

「細胞内機能ドメインが大脳皮質形成に果たす役割の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成27年3月

研究者: 川内 健史

1. 研究のねらい

脳の高次機能の基盤となる神経回路網は、発生過程をさかのぼると、1層の単純な神経上皮から誕生した神経細胞が特定の脳領域(層や神経核)に配置され、軸索や樹状突起を伸ばして互いに連結することによって形成される。神経上皮細胞から誕生した神経細胞は、最終分裂を終えた後、脳室側から脳の表層へ向かって長い距離を移動し、特定の位置に配置される。神経細胞は、この移動過程において軸索を伸長し、樹状突起の成熟を開始することから、神経細胞移動は、「細胞体の適切な配置」のみならず、「軸索や樹状突起の形成」とも関連が深い。このことから、神経細胞移動は、神経回路網形成における主要な発生段階であると考えられる。

これまでの神経細胞移動の研究は、解剖学・組織学的な形態観察と、ヒトの脳疾患を対象とした遺伝学的解析が中心であった。近年、簡便に個体への遺伝子導入を行うことができる「子宮内エレクトロポレーション法」の普及により、神経細胞の産生や移動に関与する分子が少しずつ明らかとなりつつあるが、このような「遺伝子(分子)と表現型の対応表」を作るだけでは、複雑な形態変化を伴う多段階の神経細胞移動のメカニズムを理解するには至らないのではないかと考えた。そこで本研究では、組織・個体レベルの表現型と、個々の遺伝子とのギャップを埋めるために、オルガネラや小胞、細胞接着装置などの細胞内構造体(これらを「細胞内機能ドメイン」と呼ぶ)の役割に着目し、哺乳類に特異的な6層構造を示すマウス大脳皮質を用いて、神経回路網形成の基盤となる神経細胞移動のメカニズムを理解することを目指して研究を行った。

2. 研究成果

(1)概要

発生期の脳皮質において、脳室近辺で誕生した神経細胞は多段階の移動を行うが、その中で最も長い移動距離を占めるのは、放射状突起に沿って移動する様式(これをロコモーション様式と呼ぶ)である。よって、ロコモーション移動は、哺乳類に特異的な6層構造の形成において、中心的な役割を果たすと考えられる。1970年代に行われた形態学的な解析により、ロコモーション移動細胞が脳室から脳表層まで伸びる放射状に沿って移動することは知られていたが、発生期の脳皮質において、ロコモーション移動細胞がどのようにして放射状突起に接着し、その上を動いているのかについては分かっていなかった。我々は、ロコモーション移動細胞は、細胞接着分子 N-カドヘリン依存的に放射状突起に接着していることを見いだした。さらに、一部の N-カドヘリンが、複数のエンドソームの協調作用により、まず細胞内に取り込まれ、再び細胞膜上へと輸送されることが、放射状突起に沿った移動に重要であることを明らかにした。このように、エンドソームによる細胞接着装置のダイナミックな動態制御が、

神経細胞を脳表層に向けて移動させ、その結果として、哺乳類に特異的な6層構造の大脳皮質が形成されることが示唆された。

ロコモーション移動細胞は、突起近位部に特徴的な膨らみを形成し、その中に核が伸長して入り込むといった、他の細胞ではみられない特殊な移動様式を示す。我々は、移動の初期段階の影響を排して、ロコモーション様式の移動を直接解析できる実験系を確立し、これを用いて、細胞周期関連分子である Cdk5 と p27^{kip1} が増殖を停止した神経細胞でも機能し、滑脳症の原因遺伝子産物と協調して、神経細胞に特異的な移動様式を制御することを示した。

以上の研究より、高次機能を担う脳の構造的基盤の形成における細胞内機能ドメイン(エンドソーム、細胞接着装置、突起近位部の特徴的な膨らみ、核)の動的制御機構と生理機能が明らかとなった。

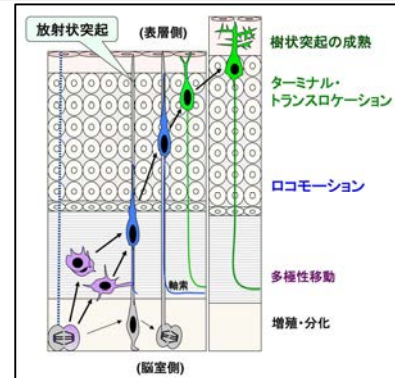


図1 多段階の神経細胞移動

(2) 詳細

研究テーマ A 「多段階の神経細胞移動における細胞接着装置の役割の解明」

発生期の脳皮質において、脳室近辺で誕生した神経細胞は多段階の移動を行うが、そのうち最も長い移動距離を占める様式は「ロコモーション様式」の移動である。ロコモーション様式で移動する神経細胞が、脳室から脳表層まで伸びる放射状突起に沿って移動することは、40年近く前から観察されていたが(Rakic P. *J Comp Neurol*, 1972)、発生期の脳皮質において、ロコモーション移動細胞がどのようにして放射状突起と接着し、その上を移動しているのかについては未解明であった。

我々は、細胞-細胞間接着分子である N-カドヘリンが、ロコモーション移動する神経細胞と、放射状突起の両方に発現していることを見いだした。そこで、簡便に個体への遺伝子導入を行える子宮内電ポレーション法を用いた *in vivo* ノックダウン実験法(Kawauchi T. et al. *Nature Cell Biol*, 2006; Kawauchi T. et al. *EMBO J*, 2003)により、移動神経細胞における N-カドヘリンの発現量を低下させたところ、先導突起をもった神経細胞と放射状突起との間の接着が弱まること分かった。この実験では、神経前駆細胞の段階からノックダウンベクターが導入されるため、神経前駆細胞における何らかの異常が、その後起きる神経細胞移動の異常を引き起こした可能性が否定できない。そこで、神経細胞特異的な Tα1 プロモーターの制御下で、ドミナントネガティブ体の N-カドヘリンを発現できる発現ベクターを構築し、これを子宮内電ポレーション法により発生期のマウス大脳皮質に導入したところ、やはり神経細胞移動が抑制されることが分かった。以上より、ロコモーション移動を行う神経細胞は、N-カドヘリン依存的に放射状突起に接着し、N-カドヘリンの適切な発現は神経細胞の移動に必要なことが明らかとなった(Kawauchi T. et al. *Neuron*, 2010)。

放射状突起に沿ってロコモーション様式の移動を行った神経細胞は、移動の最終段階における短い距離のみ、放射状突起に依存しない「ターミナル・トランスロケーション様式」で移動する。我々は、ターミナル・トランスロケーション様式の移動を行う神経細胞の細胞体では、N-

カドヘリンの発現が低下していることを見いだした。そこで、初代培養神経細胞において、リソソームへの輸送経路を阻害したところ、N-カドヘリンの総タンパク質量が増加し、さらに子宮内エレクトロポレーション法によりリソソームへの輸送経路を *in vivo* で抑制すると、移動の最終段階が阻害された。これらより、移動の最終段階においては、リソソーム系の分解経路の必要性が亢進し、N-カドヘリンが分解されることが示唆された。これに対して、ターミナル・トランスロケーション様式の移動を行う神経細胞の先端突起が存在する辺縁帯において、細胞外基質フィブロネクチンが発現し、フィブロネクチンと接着する細胞-基質間接着分子 $\alpha 5 \beta 1$ -インテグリンの活性が高かったことから、インテグリンの $\alpha 5$ サブユニットもしくは $\beta 1$ サブユニットの機能抑制を行ったところ、ターミナル・トランスロケーション様式の移動が特異的に阻害されることが明らかとなった。以上より、移動の各段階において、細胞接着分子の活性が切り替わることが、多段階の神経細胞移動に必要であることが示唆された。なお、この細胞接着分子の切り替えの制御には低分子量 G タンパク質 Rap1 の活性調節が関与することも見いだしている (Kawauchi T. et al. *Neuron*, 2010; Sekine K. et al. *Neuron*, 2012)。

研究テーマ B 「エンドソームによる放射状突起に沿った長距離移動の制御機構の解明」

前項目により、放射状突起に沿ったロコモーション様式の神経細胞移動には、細胞接着分子 N-カドヘリンが必要であることが示されたが、細胞が動くためには、細胞接着装置の崩壊と再構築を繰り返す必要があることが予想される。そこで我々は、細胞接着装置を細胞内に取り込むために必要なエンドサイトーシスおよびそれに続く輸送経路であるエンドサイトーシス経路に着目した。

エンドサイトーシスは複数のタイプに分類されるが、多くのタイプのエンドサイトーシスは、Dynamin や低分子量 G タンパク質 Rab5 を必要とする。そこで、子宮内エレクトロポレーション法を用いて、発生期大脳皮質の神経細胞において Dynamin1 もしくは Rab5 の機能を抑制すると、神経細胞移動が大きく障害された。神経細胞特異的な T α 1 プロモーターの制御下でドミナントネガティブ体の Rab5 を発現させた場合も、やはり神経細胞移動が抑制された。さらに、Rab5 の機能抑制を行うと細胞表面の N-カドヘリンの量が増加していたことから、子宮内エレクトロポレーションを用いて N-カドヘリンの過剰発現を行ったところ、神経細胞は、ロコモーション型の形態は示したものの、その後の移動が遅延することが分かった。これらより、Rab5 依存的に N-カドヘリンが細胞内に取り込まれることが、神経細胞移動に重要であることが示唆された (Kawauchi T. et al. *Neuron*, 2010; Shikanai M. et al. *Commun Integr Biol*, 2011)。

それでは、細胞内に取り込まれた N-カドヘリンはどのような運命をたどるのであろうか。エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた膜タンパク質は、まず初期エンドソームへと運ばれる。初期エンドソームからは、細胞膜、リサイクリングエンドソーム、リソソーム、ゴルジ体などに向かう様々な輸送経路が続く。これらの輸送経路は、それぞれ異なる Rab ファミリー G タンパク質によって制御されていることから、我々は、子宮内エレクトロポレーション法を用いた Rab タンパク質

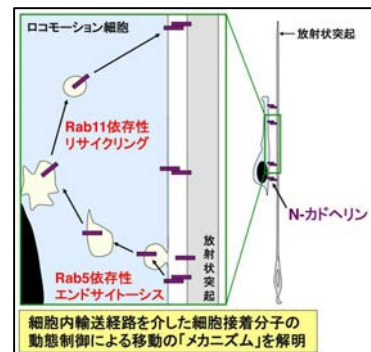


図2 エンドソームによる細胞接着装置の動的制御

の系統的な機能阻害により、それぞれの輸送経路を特異的に遮断する実験を行った。その結果、Rab4 依存性の速いリサイクリング経路を遮断しても神経細胞移動には大きな影響を与えなかったが、Rab11 依存性の遅いリサイクリング経路を遮断すると、神経細胞移動が抑制され、細胞内においてリサイクリングエンドソームに N-カドヘリンが異常に蓄積することが分かった。よって、Rab5 および Rab11 によって、N-カドヘリンが細胞内を動的にリサイクリングされることが、放射状突起に沿った神経細胞移動に重要であることが示唆された(Kawauchi T. et al. *Neuron*, 2010)。

研究テーマ C 「神経細胞特異的な移動様式を制御するメカニズムの解明—突起近位部の膨らみの形成と核の伸長の制御機構—」

ロコモーション様式の移動を行う神経細胞は、(a)先導突起の根元に特徴的な膨らみを形成し、(b)核が細長く形態変化して、その膨らみの中に入り込む、といった、他の細胞ではみられない特殊な移動様式を示す。従来の研究手法では、神経前駆細胞もしくは分化直後の神経細胞の段階から特定の分子の機能を抑制することは可能であったが、ロコモーション様式に変換した後に活性化するプロモーターが知られていないため、移動の初期段階における形態変化や神経成熟過程の影響を排して、ロコモーション様式の移動を直接解析することは困難であった。そこで我々は、発生期大脳皮質のスライス培養のタイムラプス観察と阻害剤実験を組み合わせることにより、EGFP で標識された神経細胞がロコモーション様式に変換した後に、培地中に特定の分子に対する機能阻害剤を添加し、その影響をタイムラプス顕微鏡下で観察するという新たな実験法(*ex vivo* 阻害剤実験法)を確立した。この *ex vivo* 阻害剤実験法を用いることにより、非典型的なサイクリン依存性キナーゼ Cdk5 と、Src ファミリーキナーゼ Fyn が、ロコモーション様式の移動に関与することを明らかにした。子宮内エレクトロポレーション法を用いた *in vivo* ノックダウン実験では、Cdk5 もしくは Fyn の機能抑制を行った細胞の大半は移動の初期段階で停止してしまっただけから、ロコモーション様式の移動の解析における *ex vivo* 阻害剤実験法の有用性が示された(Nishimura YV. et al. *J Biol Chem*, 2010)。

さらに、*ex vivo* 阻害剤実験法などを用いて、ロコモーション様式の移動のメカニズムに関する詳細な解析を行った。その結果、Cdk5 の機能抑制により、先導突起の根元にみられる特徴的な膨らみの形成(上記(a)の段階)と、その後起きる核の伸長(上記(b)の段階)の両方が阻害されることが分かった。初代培養神経細胞を用いて Cdk5 の機能を抑制すると、微小管の形態や、エンドサイトーシス経路に異常がみられたことから、*ex vivo* 阻害剤実験法を用いて、Nocodazole(微小管の重合阻害剤)もしくは Dynasore(Dynamin 依存性エンドサイトーシス阻害剤)を大脳皮質スライスに添加したところ、どちらも先導突起の根元の特徴的な膨らみの形成と核の伸長が抑制され、ロコモーション細胞の移動速度も低下した。Cdk5 は非常に多くの基質をリン酸化することが知られているが(Kawauchi T. *Dev Growth Differ*, 2014. [review])、そのうち、微小管の形態やエンドサイトーシス経路に関与することが示唆されている、細胞周期関連分子 p27^{kip1} と滑脳症の原因遺伝子産物 Dcx が、ロコモーション移動における特

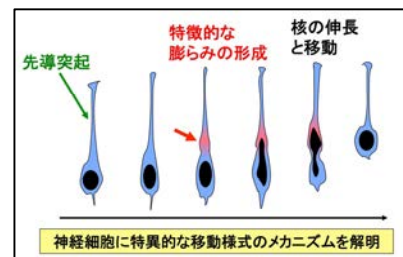


図3 突起近位部の膨らみと核の伸長の制御機構

微的な膨らみの形成と核の伸長に関与していることを明らかにした。これに対して、以前に我々が、微小管の安定性の制御を介して神経細胞移動に関与することを報告した JNK の機能を抑制すると、ロコモーション細胞の核の伸長と移動が阻害されたが、特徴的な膨らみは形成された。以上より、Cdk5 と JNK は、異なる下流経路を介して、神経細胞に特異的な移動様式を制御していることが示唆された(Nishimura YV. et al. *Development*, 2014)。

3. 今後の展開

本研究により、エンドソームによる細胞接着装置の動的な制御が、放射状突起に沿った神経細胞移動に必須であることが明らかとなった。エンドソームの細胞内動態については、培養細胞レベルでも未解明な点が多いが、今後は、スライス組織内を移動する神経細胞において、エンドソームや、これによって運ばれる細胞接着装置がどのような振る舞いをしているのかを経時的に観察したい。イメージング技術は日進月歩であることから、超解像顕微鏡を用いたタイムラプス・イメージングにより、スライス組織内の小胞の動きを捉えることも、近い将来には可能ではないかと考える。また、エンドソームや小胞の動態が、方向性をもった細胞移動に必要であることから、エンドソームの動きや融合過程は、全体として厳密に制御されていることが予想される。すなわち、細胞全体の移動方向や極性の情報が、個々の小胞やエンドソームに伝わる仕組みが存在すると考えられる。これを理解するためには、エンドソームだけを追うのではなく、細胞骨格系との相互作用や、シグナル伝達系による細胞接着の制御、その他の細胞内機能ドメインとの関係など、細胞現象を統合的に扱う必要がある。これまでに我々は、組織・個体を用いつつも、アクチン細胞骨格、微小管、細胞周期関連分子、細胞接着分子、細胞内輸送の制御因子など、広範囲の細胞現象を俯瞰的に研究してきたことから、この強みを生かし、神経細胞の移動や成熟における細胞内機能ドメインの生理機能と動態制御機構を理解したいと考える。

細胞内機能ドメインが織りなす多彩な細胞現象は、脳神経回路が作り出す様々な高次機能において、どのような役割を担っているのだろうか。近年、全ゲノムを対象とした解析が可能となり、精神疾患と関連のある遺伝子変異(コピー数多型や染色体微小欠失なども含む)が同定されつつあり、遺伝子破壊や薬理的に作出した精神疾患モデルマウスの解析も進んでいる。しかし、精神疾患の病態解明や治療法の確立を実現するためには、やはり遺伝子と表現型をつなぐ細胞生物学的なアプローチが必要になってくるのではないかと考える。本研究の目標の1つに、「*In vivo* 細胞生物学分野の基礎を確立する」ことを挙げたが、まずは神経発生学において、長期的には、脳の高次機能や精神疾患の研究にも視野を広げ、組織・個体レベルにおける細胞内機能ドメインの役割という視点から研究を展開したいと考える。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究で目指した「細胞内機能ドメインが脳皮質形成に果たす役割の解明」について、エンドソームによる細胞接着装置の動的制御については、*Neuron* 誌に掲載され、プレスリリースも行った。また、移動神経細胞に特徴的な構造体と核の形態に関する成果も、*J Biol Chem* 誌および *Development* 誌に掲載され、後者はプレスリリースを行った。これらのプレスリリースは、

日刊工業新聞や日経産業新聞などの新聞や、Science Portal やマイナビニュースなどのネットニュースに紹介された。さらに、さきがけ研究期間中に、25件以上の招待講演・シンポジウムを行ってきたことから、学术界での成果発表と一般市民への発信の両方において、一定の成果を得られたと考える。エンドソームやゴルジ体の役割については、未発表のデータも多いことから、今後もさきがけ研究の成果を継続して世界に発信する必要があるとともに、精神疾患の研究者などとも連携を深めていくことが重要と考える。

本研究では、「*In vivo* 細胞生物学分野の基礎を確立する」という目標を掲げていたことから、Frontiers in Cellular Neuroscience 誌に、ゲスト・エディターとして「*In vivo* cell biology of cerebral cortical development and its related neurological disorders」という特集号を企画し、すでにいくつかの論文が投稿されている (<http://journal.frontiersin.org/ResearchTopic/2703>)。この雑誌のインパクトファクターは 4.2 点であるにもかかわらず、Mary Hatten 博士 (*Genes Dev* や *Curr Opin Neurobiol* の editorial board)、Nancy Ip 博士 (*J Neurosci* の Senior editor)、Jonathan Cooper 博士 (*Mol Cell Biol* の editorial board)、Bettina Winckler 博士 (*J Neurosci* の editorial board) や、Nature Review 誌に執筆経験のある、Wieland Huttner 博士、David Price 博士を含む、著名な研究者から執筆の快諾を得ている。私は、Chief guest editor に加えて、*In vivo* 細胞生物学を総括する総説を執筆予定であることから、本研究の目標である *In vivo* 細胞生物学分野の基盤は確立しつつあるのではないかと考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

脳組織の形成においては細胞体の適切な配置のための細胞移動が必須であり、これには神経細胞軸索と樹状突起の形成の制御が密接に関係する。本研究は組織レベルの現象と、関係する遺伝子の発現の間に位置するオルガネラ、小胞、細胞接着装置などの構造体(細胞内機能ドメイン)に着目して、それらの神経細胞移動への関与を解明しようとしたものである。その結果、発生途上のマウス大脳皮質において放射状突起への接着に関わる細胞接着分子 N-カドヘリンがエンドソームによりダイナミックに制御されていることを明らかにした。さらに、神経細胞のロコモーション様式の移動を直接解析できる実験系を確立して、細胞周期関連分子である Cdk5 と p27^{kip1} が増殖を停止した神経細胞でも機能し、滑脳症の原因遺伝子産物と協調して、神経細胞に特異的な移動様式を制御することなどを明らかにすることができた。これらの成果はすでに論文として発表している。今後小胞トラフィックに鍵を握るゴルジ体を含めたこれらの細胞内機能ドメインがどのように協調制御されるのか、一段上のレベルの観点からの展開が期待できる。また学会シンポジウムや、国際レビュー誌の編集などを通して、“*In vivo* 細胞生物学”を標榜する分野を立ち上げつつあることが注目される

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sakuma C, <u>Kawauchi T</u> , Haraguchi S, Shikanai M, Yamaguchi Y, Gelfand VI, Luo L, Miura M, Chihara T. A STRIPAK component Strip serves as a platform for early endosome organization during axon elongation. <i>Nature Commun.</i> 2014, 5, 5180.
2. Nishimura YV, Shikanai M, Hoshino M, Ohshima T, Nabeshima YI, Mizutani K, Nagata K, Nakajima K, * <u>Kawauchi T</u> . Cdk5 and its substrates, Dcx and p27 ^{kip1} , regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. <i>Development</i> 2014, 141, 3540-3550.
3. Sekine K, <u>Kawauchi T</u> , Kubo K, Honda T, Herz J, Hattori M, Kinashi T, Nakajima K. Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation of integrin alpha5beta1. <i>Neuron</i> 2012, 76, 353-369.
4. Sekine K, Honda T, <u>Kawauchi T</u> , Kubo K, Nakajima K. The outermost region of the developing cortical plate is crucial for both the switch of the radial migration mode and the Dab1-dependent “inside-out” lamination in the neocortex. <i>J. Neurosci.</i> 2011, 31, 9426-9439.
5. Shikanai M, Nakajima K, * <u>Kawauchi T</u> . N-Cadherin regulates radial glial fiber-dependent migration of cortical locomoting neurons. <i>Commun. Integr. Biol.</i> 2011, 4, 326-330.
6. * <u>Kawauchi T</u> , Sekine K, Shikanai M, Chihama K, Tomita K, Kubo K, Nakajima K, Nabeshima YI, Hoshino M. Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-Cadherin trafficking. <i>Neuron</i> 2010, 67, 588-602.
7. Nishimura YV, Sekine K, Chihama K, Nakajima K, *Hoshino M, Nabeshima YI, * <u>Kawauchi T</u> . Dissecting the factors involved in the locomotion mode of neuronal migration in the developing cerebral cortex. <i>J. Biol. Chem.</i> 2010, 285, 5878-5887.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な招待講演・シンポジウム

1. <u>Kawauchi T</u> . “Cortical neuronal migration and its related diseases” 第 37 回日本神経科学大会、Symposium “Between neurodevelopmental disorders and normal brain formation: Focusing on neuronal differentiation and migration as key milestones”、横浜、2014年9月11-13日 (Organizers: PRESTO, JST/Keio University School of Medicine. Takeshi Kawauchi, University of Tokyo. Ryuta Koyama)
2. <u>川内健史</u> “大脳皮質形成における細胞接着分子の動態制御機構” 第66回日本細胞生物学会大会、シンポジウム“細胞外環境コミュニケーションを介した形態形成とその維持 - 神経発生・細胞移動と極性決定へのアプローチ”、奈良、2014年6月

11-13 日 (オーガナイザー:新潟大学 武内恒成 准教授、 <u>科学技術振興機構/慶應義塾大学 川内健史</u>)
3. <u>川内健史</u> “ほ乳類の脳皮質形成における神経細胞移動の分子メカニズム” 同志社大学脳科学研究科、京都、2014 年 3 月 31 日 (世話人:神経分化再生部門 水谷健一准教授)
4. <u>川内健史</u> “世界に先駆ける研究に至るまで” (基調講演) 脳科学若手の会東北部会ウインタースクール、宮城県大崎市、2014 年 2 月 15-16 日 (世話人:東北大学大学院医学研究科脳神経科学コアセンター 大隅典子センター長、脳科学若手の会東北部会 木村龍一代表)
5. <u>川内健史</u> “脳皮質形成におけるエンドサイトーシス経路の「使い分け」とその意義” 第 13 回テニユアトラック教員支援セミナー、東京女子医科大学、東京、2013 年 12 月 9 日 (世話人:総合研究所 田邊賢司テニユアトラック准教授)
6. <u>川内健史</u> “子宮内エレクトロポレーション法を用いた脳皮質形成の細胞生物学的解析” 分子細胞機能学 (生化学第二) セミナー、新潟大学医学部、新潟、2013 年 10 月 2 日 (世話人:分子細胞機能学 (生化学第二) 教室 武内恒成准教授)
7. <u>川内健史</u> “脳皮質形成のメカニズムの細胞生物学的理解” 難研セミナー/難治疾患共同研究拠点セミナー、東京医科歯科大学、東京、2013 年 4 月 25 日 (世話人:発生再生生物学分野 仁科博史 教授)
8. <u>川内健史</u> “エンドソームによる脳皮質形成の制御:脳奇形との関連” 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、シンポジウム “オルガネラの恒常性維持機構～疾患を見据えた細胞生物学的アプローチ～”、栃木、2014 年 3 月 27-29 日 (オーガナイザー:名古屋大学 大崎雄樹 助教、福島医科大学 亀高諭 講師)
9. <u>Kawauchi T.</u> “Membrane traffic and glycosylation control neuronal migration during cerebral cortical development” International Symposium on Glyco-neuroscience, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan. January 9-11, 2014.
10. <u>川内健史</u> “Rab21 によるカドヘリン輸送制御が脳皮質形成に果たす役割” 第 86 回日本生化学会大会、シンポジウム “メンブレントラフィックの新局面:多様な細胞現象との連携による生理機能の制御”、横浜、2013 年 9 月 11-13 日 (オーガナイザー: <u>科学技術振興機構/慶應義塾大学 川内健史</u> 、首都大学 久永真市 教授)
11. <u>川内健史</u> 、鹿内弥磨、柚崎通介 “脳皮質形成における多段階の神経細胞移動における Rab21 の役割” 第 65 回日本細胞生物学会大会、シンポジウム “高次生命現象を支えるメンブレントラフィック研究の最前線”、愛知、2013 年 6 月 19-21 日 (オーガナイザー:理化学研究所 大野博司教授、群馬大学 佐藤健教授)
12. <u>川内健史</u> “脳皮質形成における細胞接着分子の動態制御機構～メンブレントラフィック経路の多様な役割～” 共同利用・共同研究拠点セミナー、群馬大学生体調節研究所、群馬、2013 年 2 月 21 日 (世話人:細胞構造分野 佐藤健 教授)
13. <u>Kawauchi T.</u> “Regulatory mechanisms for multi-step neuronal migration: Roles

of cell cycle-related proteins and cell adhesion molecules” APSN2012 (The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry), Symposium “Intracellular molecular mechanisms regulating neurogenesis and migration during cerebral cortical development”, Kobe, Japan. September 30 - October 2, 2012.

(Organizers: Tokyo Medical and Dental University. Itsuki Ajioka and PRESTO, JST/Keio University School of Medicine. Takeshi Kawauchi) .

14. 川内健史 “細胞内輸送・細胞接着・細胞骨格・細胞周期関連分子の協調作用による大脳皮質形成の制御メカニズム” 国立精神・神経医療研究センター 所内セミナー、小平、東京、2012年5月17日（世話人：病態生化学研究部 星野幹雄 研究部長）

15. 川内健史 “大脳皮質形成における多段階の神経細胞移動を制御する分子経路” 第44回神経解剖懇話会（第117回日本解剖学会総会・全国学術集会サテライトセミナー）、甲府、2012年3月26日

16. 川内健史、仲嶋一範 “齧歯類終脳の外套発生過程における細胞内小胞輸送の役割” 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、シンポジウム“メンブレントラフィック研究の新展開”、甲府、2012年3月26-28日（オーガナイザー：福島医科大学 和栗聡 教授、大阪大学 原田彰宏 教授）

17. Kawauchi T. “Rab GTPases differentially regulate the endocytic trafficking and molecular metabolism of N-cadherin, contributing to multi-step cortical neuronal migration” Global COE Program Workshop 2011, Tokyo. February 17, 2012. (The Best Award for Excellent Paper : 最優秀論文賞受賞講演)

18. 川内健史 “細胞生物学的視点からみた大脳皮質形成における多段階の神経細胞移動のメカニズム” 第70回 Brain Club、慶應義塾大学医学部、東京、2012年2月3日（世話人：生理学教室 柚崎通介 教授）

19. Kawauchi T. “Endocytic regulation of N-cadherin promotes neuronal migration during cerebral cortical development” The 21st Hot Spring Harbor Symposium jointly with 9th Global COE International Symposium “Cell Migration in Biology and Medicine, Kyushu University, Fukuoka, Japan. January 22-23, 2012.

20. 川内健史 “大脳皮質形成における神経細胞移動のメカニズム 一組織培養系を用いた阻害剤実験の確立とその応用” 第33回神経組織培養研究会、東京、2011年10月29日

21. Kawauchi T. “Endosomal trafficking regulates neuronal cell migration and adhesion” 第84回日本生化学会大会、Symposium “New horizon in organelle research”、京都、2011年9月21-24日（Organizers: 大阪大学 岡本浩二 准教授、群馬大学 佐藤健 教授）

22. Kawauchi T., Kazunori Nakajima. “Cellular insights into the locomotion mode of cortical neuronal migration” 第34回日本神経科学大会、Symposium “Dynamics of neuronal polarity formation and migration”、横浜、2011年9月14-17日（Organizers: 大阪大学 村上富士夫 教授、京都大学 見学美根子 准教授）

23. 川内健史 “低分子量 G タンパク質による細胞機能制御を介した大脳皮質形成のメカニズム” 徳島大学、徳島、2011 年 2 月 23 日（世話人：分子病態学分野 佐々木卓也 教授）
24. 川内健史 “発生期大脳皮質における神経細胞の移動と成熟の分子機構” 神戸大学大学院医学研究科、神戸、2010 年 12 月 3 日（世話人：分子生物学分野 片岡徹 教授）
25. Kawauchi T. “Cdk5 regulates the locomotion mode of neuronal migration during cerebral cortical development” International Symposium: Cell Cycle and Cell Differentiation -From A to Z-, Nagoya, Japan. November 4-6, 2010.
26. 川内健史 “*In vivo* 細胞生物学による神経細胞移動のメカニズムの解明” 第 28 回 脳科学グローバル COE 若手フォーラム、東北大学医学部、仙台、2010 年 9 月 24 日（世話人：膜輸送機構解析分野 福田光則 教授）
27. Kawauchi T. “Molecular and cellular mechanisms for the radial glial fiber-dependent locomotion mode of cortical neuronal migration” Global COE Liaison Laboratory regular seminar, Kumamoto University, Kumamoto, Japan. September 15, 2010.（世話人：神経分化学教室 田中英明 教授）

プレスリリース

1. 「脳神経細胞の特殊な移動様式を制御する仕組みの一端を解明」（2014 年 9 月 2 日）
<http://www.jst.go.jp/pr/info/info1043/index.html>
2. 「大脳皮質が作られる際に神経細胞が正しい位置まで動く仕組みを解明—脳疾患の原因究明と治療法の開発に前進—」（2010 年 8 月 26 日）
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20100826/index.html>

研究報告書

「匂いに対する特異的な行動や情動を制御する神経ネットワーク」

研究タイプ: 大挑戦型(※大挑戦型課題として延長有/増額有)

研究期間: 平成21年10月～平成27年3月

研究者: 小早川 高

1. 研究のねらい

情動とはヒトや動物が生存に必須の本能を誘発する脳の機能であり、ヒトや動物の行動に大きな影響を与える。脳が感覚器官で感知した情報から情動や行動を誘発するメカニズムは明らかになっていない。悪臭は嫌悪情動と忌避行動、天敵臭は恐怖情動とフリージング行動などというように、匂い分子は動物に様々な種類の情動や行動を誘発する。本研究では、匂い分子の情報が情動や行動の誘発へと結びつく未知のメカニズムの解明を通して、脳が多様な情動を生成するメカニズムの解明と、情動を制御する新技術の開発を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

多くの哺乳類は主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の2つの嗅覚サブシステムを持つ。主嗅覚系の完全な遮断は鋤鼻嗅覚系へのフェロモンの到達を阻害するので、両サブシステムの機能的な分離は困難であった。両サブシステムを遺伝学的に分離するために2段階のノックアウトマウスを作成した。主嗅覚系を全領域で遮断したマウスでは、匂い嗅ぎ行動の減少と、新生期における生存確率の著しい低下が観察された。これに対し、背側の嗅球に局限した機能阻害を持つミュータントマウスでは、匂い嗅ぎ行動、フェロモン分子による鋤鼻嗅覚系の活性化は正常であった。しかし、雌の尿に対する誘因行動、それに伴う超音波による発声、匂い嗅ぎ行動の嗜好性、攻撃行動、母性行動、警戒フェロモンに対する危険関連行動などの、広範な社会行動異常が認められた。フェロモンの感知とそれに伴う行動の分離が可能になったことで、前嗅核が主嗅覚系の下流で社会行動を制御することが明らかになった。主嗅覚—前嗅核システムによるフェロモン経路の発見は、ヒトを含む機能的な鋤鼻嗅覚系を持たない動物のフェロモン情報処理に新たな知見を与えるという意味でも重要である。

先天的と後天的な情報処理の統合は行動制御の基本である。この現象を嗅覚による先天的恐怖と後天的恐怖の対比系により解析した。私たちは、強力な先天的恐怖を誘発するチアゾリン類恐怖臭の開発に成功し、同等レベルのフリージングを伴う先天的と後天的な恐怖の比較を可能にした。先天的な恐怖刺激を予め提示すると後天的な恐怖応答が緩和されるが、その逆は起こらなかった。この結果は、両者の恐怖の間の拮抗的で階層的な制御の可能性を示唆する。全脳活性化マッピングと薬理スクリーニングの結果、扁桃体中心核のセロトニン2A受容体発現細胞がこの制御に関与する可能性が示唆された。この仮説を、光ファイバー内視鏡による自由行動マウスの神経活動記録と、薬理遺伝学を用いた行動解析で検証した。その結果、先天的な恐怖刺激のみが扁桃体中心核のセロトニン2A受容体発現細胞の神経活動を低下させることと、人為的にこの細胞の活動を低下させると、先天的と後天的フリージングの、それぞれ上昇と低下が誘発された。これらの結果は、これまでに予測されていなか

った先天的と後天的な恐怖の拮抗的で階層的な関係性と、それを支える分子実体を解明するものであり、恐怖情動の理解と制御に新たな視点を与える。

(2) 詳細

匂い分子を感知する嗅細胞が存在する嗅上皮は、背側と腹側の2つのゾーンに区分される。それぞれのゾーンには異なる種類の嗅覚受容体が発現している。一般的に、一種類の匂い分子は双方のゾーンに存在する、数十から百種類程度の嗅覚受容体に結合する。私たちが作成した、背側ゾーンに存在する嗅細胞を特異的に除去したミュータントマウスでは、悪臭や天敵臭を識別したり、後天的に学習したりすることはできるにも関わらず、これらの匂いに対する先天的な忌避行動を示さなかった。この結果は、匂いに対する忌避行動が背側の嗅覚神経回路によって先天的に制御されることを示すものである。私たちは、本研究の開始時点においてここまでの解明を進めていた。匂い分子は忌避性の情動や行動以外にも、様々な情動や行動を誘発する。それらの中には、動物から分泌されて同種の動物に影響を与えるフェロモンが含まれる。では、フェロモンに対する行動の制御に嗅覚系がどのように関与するのかを解析することから本研究を開始した。

多くの哺乳類は主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の2つの主要な嗅覚サブシステムを持っている。マウスの社会行動は鋤鼻嗅覚系によって制御されると長らく考えられてきたが、最近の知見によって主嗅覚系もフェロモン制御に関与することが示唆されている。しかしながら、主嗅覚系の完全な遮断は鋤鼻嗅覚系へのフェロモンの到達自体を阻害するので、2つのサブシステムの社会行動制御に対する機能分担を解明することは困難であった。私たちは、主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の機能を遺伝学的に分離するために、主嗅覚系の全ての領域、または、背側ゾーンのみを遮断する2種類のノックアウトマウスを作成した。主嗅覚系の全領域を遮断したマウスでは、匂い嗅ぎ行動の減少と、新生期における生存確率の著しい低下が観察された。これに対して、背側の嗅球に局限した機能阻害を持つミュータントマウスでは、匂い嗅ぎ行動、フェロモン分子の感知、鋤鼻嗅覚系の活性化は保たれていた。しかしながら、雌の尿に対する誘因行動、それに伴う超音波の発声、匂い嗅ぎ行動の嗜好性、攻撃行動、母性行動、警戒フェロモンに対する危険関連行動を含む、広範な社会行動に異常が認められた。フェロモンの感知とそれに伴う行動の分離がなされたことにより、前嗅核が主嗅覚系の下流で社会行動を制御することが明らかになった。破壊実験と神経活動マッピングの結果、扁桃体と視床下部の社会行動制御に重要な役割を果たす複数の核が、主嗅覚系と前嗅核の制御を受けることが明らかになった。主嗅覚—前嗅核システムによるフェロモン経路の発見は、ヒトを含む機能的な鋤鼻嗅覚系を持たない動物のフェロモン情報処理に新たな知見を与えるという意味でも重要である(論文 1,フェロモン情報処理の遺伝的な分離によって解明された主嗅覚系が仲介するマウスの社会行動)。これらの結果により、主嗅覚系は、悪臭に対する嫌悪、天敵に対する恐怖、フェロモンが誘発する警戒、攻撃、母性を含む、動物の生存に必須となる多様な情動や行動を先天的に制御するという視点が確立された。

主嗅覚系は揮発性の匂い分子によって活性化される。低分子量で極性が比較的低い化合物は匂い分子として感知できる可能性があり、これに該当する化合物は膨大な数が存在する。その中から、先天的な情動や行動を誘発する生理活性を持つ匂い分子を同定する方法は知られていない。特異的な情動や行動を誘発する匂い分子を発見することは、嗅覚系によ

る情動や行動の誘発メカニズムの研究において極めて重要であるにもかかわらず、これまで十分に研究がなされていなかった。そこで、本研究では先天的な恐怖を誘発する匂い分子の開発に取り組んだ。

先天的な恐怖は種の存続のために必須である。マウスの恐怖情動はフリージング行動を指標にして定量的に計測される。天敵の分泌物や、そこから抽出された活性成分は、マウスに対して忌避行動を誘発できるものの、フリージングの誘発活性は低いことが知られている。モデル動物に先天的恐怖を効率的に誘発する技術が不足していることは、先天的恐怖情動の性質の理解を妨げる要因となっている。私たちは、人工化合物ライブラリーを用いて、弱い生理活性を持つ天敵の分泌物の化学構造を最適化するという新たな方法によって、極めて強力な先天的フリージング行動を誘発する一群の匂い分子「チアゾリン類恐怖臭」の発見に成功した。チアゾリン類恐怖臭によって誘発される先天的恐怖と、あらかじめ電気ショックと関連学習した匂い分子による後天的な恐怖は、共に行動解析では区別できないフリージング行動を伴う。しかし、先天的な恐怖のみが、背筋を中心とした体表面温度と体深部温度の3℃もの低下、心拍数の急速な半減、睡眠状態と同等の脳波の徐波化、という特徴的な生理応答を伴うことが明らかになった。これらの結果は、嗅覚入力による恐怖情動は少なくとも2つの明らかに異なる様相、先天的な冷たい恐怖と後天的な温かい恐怖に分類できることを示唆している。チアゾリン類恐怖臭の発見は、文字通り「背筋の凍る恐怖」を人為的に制御することや理解するための出発点となる(論文タイトル:チアゾリン類恐怖臭の発見により解明されたマウスの複数の恐怖情動)。全脳活性化マッピング法を用いた解析によって、嗅覚入力による先天的と後天的な恐怖は大きく異なる神経回路によって分離して処理されることが示唆された。これまで、分離して存在する先天的と後天的な情報処理経路の間にどのような相互作用が存在するのかは明らかにされていない。そこで、この問題の解明を目指した研究を実施した。

先天的と後天的な情報処理の統合は行動制御の基本である。しかし、これを支える細胞や分子メカニズムはよく分かっていなかった。私たちは、この現象を嗅覚による先天的恐怖と後天的恐怖の対比を用いた独自の実験系を活用して研究した。私たちは、強力な先天的恐怖を誘発するチアゾリン類恐怖臭の開発に成功した。この結果、これまで技術的に困難であった同等レベルのすくみ行動(フリージング)を伴う先天的と後天的な恐怖を比較することが可能になった。興味深いことに、先天的な恐怖刺激を予め提示すると後天的な恐怖応答が緩和されるが、その逆の効果は起こらないことが明らかになった。この結果は、両者の恐怖の間に拮抗的かつ階層的な制御が存在する可能性を示唆している。全脳活性化マッピングと薬理スクリーニングの結果から、扁桃体中心核のセロトニン2A 受容体発現細胞がこの制御に関与する可能性が明らかになった。この仮説を検証するために、私たちは自由行動条件のマウスの神経活動の光ファイバー内視鏡による記録と、薬理遺伝学を活用した行動解析を行った。その結果、後天的な恐怖刺激ではなく、先天的な恐怖刺激のみが扁桃体中心核のセロトニン2A 受容体発現細胞の神経活動を低下させることと、人為的にこの細胞の活動を低下させると、それぞれ中脳水道周囲灰白質の異なる亜核を介した、先天的フリージング行動の上昇と後天的フリージングの低下が同時に誘発された。これらの結果は、これまでに予測されていなかった先天的と後天的な恐怖の拮抗的で階層的な関係性と、それを支える細胞と分子実体を解明するものであり、恐怖情動の理解と制御に新たな視点を与える(論文タイトル:扁桃

体中心核のセロトニン 2A 受容体発現細胞は先天的と後天的な恐怖の階層性を制御する)。

3. 今後の展開

チアゾリン類恐怖臭の発見により、先天的恐怖を誘発する感覚入力の特異性が解明された。現在、個々の嗅覚受容体と匂い分子の結合から、情動情報が生成されるメカニズムの解明を進めている。チアゾリン類恐怖臭の発見は、先天的な恐怖情動の解明を進めるブレークスルー技術として活用できるという側面を持つ。本研究によって明らかになった、先天的と後天的な恐怖が互いに協調的ではなく拮抗的に作用するという現象は、恐怖情動を理解することに加え、向精神薬の開発においても重要な示唆を与える。例えば、統合失調症の治療薬に使われているリスペリドン[®]は、セロトニン2A受容体の阻害薬であり、後天的恐怖を緩和する作用があるが、同時に、先天的恐怖を増悪する作用がある。精神疾患の原因となる情動制御メカニズムを先天的と後天的な側面に分解して、適切な分子ターゲットへの作用を目指すという創薬戦略が必要になるだろう。この戦略において、本研究で開発された、先天的と後天的な恐怖情動を分離して計測する技術が有効に活用できる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

一連の研究成果により、独自の視点による、嗅覚入力^①が情動を誘発する末梢メカニズムの解明と、嗅覚入力によって誘発された恐怖情動が中枢で処理されるメカニズムの解明が進んだと評価できる。また、本研究によって開発された先天的恐怖の誘発と測定技術は、嗅覚入力の情報コーディングメカニズムの解明、恐怖情動を制御する分子メカニズムの解明などの今後の基礎研究の推進に加え、向精神薬の新たなスクリーニング技術や、革新的な有害動物忌避剤の開発技術としても応用可能である。既に、これらの技術を活用した産業界との共同開発や、製品の市販計画は大きく進展している。本研究は、完全な基礎生物学研究であっても、本質的に新しい視点からの成果を達成することができれば、速やかに実社会生活への還元ができることを証明する事例としても評価できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

哺乳類の多くは発達した嗅覚系を有し、これは天敵回避、摂食行動、生殖行動、社会行動などに関わる神経回路の重要な入口となっている。本研究は匂い分子で誘発される行動・情動に着目し、嗅覚一次中枢である嗅球の限局された機能を阻害したマウスを作出することにより、匂い分子の情報が処理される経路の解明に挑んだものである。主嗅球の背側の機能を阻害された遺伝子改変マウスでは、匂い嗅ぎ行動、フェロモン分子による鋤鼻嗅覚系活性化は正常であるのに、雌尿への誘引行動と発声、攻撃性、母性行動、警戒フェロモンに対する警戒行動などの社会行動に異常を見出した。また天敵臭による先天的恐怖と学習による後天的恐怖による脳内の活性化を比較する組織学的全脳マッピ

ングの結果から、両恐怖行動は異なる神経回路基盤を有し、互いに拮抗的關係があること、また扁桃体中心核のセロトニン 2A 受容体発現細胞は先天的恐怖だけにより活動を低下させることなど、興味深い一連の発見に至っている。さらに天敵臭分子 TMT を起点として人工化合物ライブラリーのスクリーニングにより、10 倍以上の比活性を有する化合物も発見した。これらの成果はその独自性において優れた成果と認められ、その一部は論文として発表され、出願も行われた。増額により取得した自動免疫染色装置などを駆使してこの間に意欲的に推進した全脳マッピングデータなども含め、膨大なデータと未発表の成果を早い機会に論文報告することが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Matsuo T, Hattori T, Asaba A, Inoue N, Kanomata N, Kikusui T, Kobayakawa R and <u>Kobayakawa K.</u>
Genetic dissection of pheromone processing reveals main olfactory system-mediated social behaviors in mice. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> (in press) |
| 2. Igarashi K M*, Iseki N, An M, Yamaguchi Y, Nagayama S, <u>Kobayakawa K</u> , <u>Kobayakawa R</u> , Tanifuji M, Sakano H, Chen W R, and Mori K*.
Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. <i>J Neuroscience</i> 32(23) p7970-7985, 2012 |
| 3. Yokoyama T K*, Mochimaru D, Murata K, Manabe H, <u>Kobayakawa K</u> , <u>Kobayakawa R</u> , Sakano H, Mori K, and Yamaguchi M.
Elimination of adult-born neurons in the olfactory bulb is promoted during the postprandial period. <i>Neuron</i> 71(5) p883-897, 2011 |
| 4. Matsumoto H, <u>Kobayakawa K</u> , <u>Kobayakawa R</u> , Tashiro T, Mori K, Sakano H and *Mori K.
Spatial arrangement of glomerular molecular-feature clusters in the odorant-receptor-class domains of the mouse olfactory bulb. <i>J Neurophysiol.</i> Vol.103, p3490-3500, 2010 |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件

1.
発明者: 小早川高、小早川令子
発明の名称: 恐怖又は不安の計測システム
出願人: 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所
出願日: 2013/11/22(非公開希望)
出願番号: PCT/JP2013/081548
2.
発明者: 小早川高、小早川令子

発明の名称: 動物用忌避剤
出願人: 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所
出願日: 2013/8/30
出願番号: 特許第 5350496 号

3.
発明者: 小早川高、小早川令子
発明の名称: 恐怖又は不安の計測システム
出願人: 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所
出願日: 2012/11/22(非公開希望)
出願番号: 特願 2012-256514

4.
発明者: 小早川高、小早川令子
発明の名称: Cartpt mRNA 発現細胞標識動物およびそれを用いたスクリーニング方法
出願人: 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所
出願日: 2012/1/24(非公開希望)
出願番号: 特願 2012-1168

5.
発明者: 小早川高、小早川令子
発明の名称: 動物用忌避剤
出願人: 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所
出願日: 2011/2/8(非公開希望)
出願番号: PCT/JP2011/052652

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 第10回バイオビジネスコンペ JAPAN 最優秀賞 (2010年3月11日)
「神経回路の機能に基づいて哺乳類の本能情動を制御する機能性匂い分子の開発」
2. 第34回日本神経科学大会シンポジウム(2011年9月17日)
「Neuronal mechanisms controlling innate and learned fear responses」
3. 第5回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRES(2011年10月7日)
「先天的と後天的な恐怖によって誘発される不動行動は異なる神経回路によって制御される」
4. 生理学研究所国際研究集会「Central Neuroplasticity in Sensory-Emotional Link」
Odor-evoked innate and learned fear responses are mediated by distinct neuronal mechanisms. (2012年9月13-15日)
5. 第35回日本分子生物学会年会ワークショップ 2W1I(2012年12月12日)
「匂いに対する恐怖のメタボロミクス」
6. 生理研研究会『感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻』(2013年9月2日)
「嗅覚入力誘発する先天的な冷たい恐怖と後天的な温かい恐怖」

研究報告書

「精神発達障害原因解明のための Neuroligin/Neurexin モデルの確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 田淵 克彦

1. 研究のねらい

自閉症は、社会的相互作用の障害、コミュニケーションの障害、興味の範囲と行動の著しい限局性を特徴とする精神発達障害である。罹患率は年々増加傾向にあるが(近年の統計では 100 人に 2 人以上というものもある)、原因が不明であるため、診断のためのバイオマーカーや根本的治療法は存在せず、社会問題として認識されるようになってきた。原因として、以前より遺伝学的素因との関係が指摘されてきたが、必ずしもメンデル型遺伝をするわけではなく、同一家系の患者同士でも症状が異なることが多いことから、自閉症の多くは、複数の遺伝子異常の総合的結果によって引き起こされる(多因性遺伝性)と考えられている。このため、特定の遺伝子に焦点を絞って原因解明のための研究を行うことが困難であった。我々は以前の研究において、自閉症の患者から発見されたシナプス接着因子 Neuroligin-3 の単一アミノ酸置換変異(R451C 変異)を導入したノックインマウスを作成し、解析を行ったところ、このマウスで自閉症様行動異常が再現されることが確認された。これは、Neuroligin-3 遺伝子の変異が単独で自閉症を起こし得ることを世界で初めて示したものである。また、このマウスでは大脳皮質の抑制性シナプス機能の亢進が認められたが、シナプス以外での異常が認められないことから、シナプス異常が自閉症発症の最小構成要素ではないかと考えるに至った。近年、自閉症患者からの遺伝学的スクリーニングにおいて、Neuroligin のシナプスにおける結合パートナーである Neurexin の遺伝子異常も頻繁に報告されるようになってきた。これらのことから、Neuroligin と Neurexin の結合がシナプス機能獲得に果たす役割およびその破綻が引き起こす病態を研究することは、自閉症の原因解明につながるのではないかと考えた。本研究では、Neuroligin および Neurexin の、自閉症およびシナプス機能に関連した変異マウスを作成し、これらのシナプス機能を解析して自閉症の原因解明を目指すと同時に、これらのマウスを自閉症のモデルマウスとして評価・確立することをねらいとする。

2. 研究成果

(1) 概要

自閉症モデルとして、以前作出した neuroligin-3 R451C KI マウスに加え、Neuroligin の細胞内領域の 1 アミノ酸変異を導入した neuroligin-3 R704C KI マウス、Neuroligin の結合相手である Neurexin-3 の KO マウス、Neurexin と Neuroligin との結合特異性を規定することが知られている Neurexin-3 の第 4 選択的スプライス部位(ss4)の挿入を操作した neurexin-3 ss4KI/KO マウスを新規に作出した。

neuroligin-3 R451C KI マウスの海馬でのシナプス機能を解析し、LTPの増強、AMPA 受容体機能に対する NMDA 受容体機能の上昇、NMDA 受容体の NR2B サブユニットの機能亢進を検出した。これらは幼若なシナプスの特徴であり、シナプスの成熟異常が自閉症の病態モ

デルの一つである可能性を見出した。また、neuroigin-3 R704C KI マウスのシナプス機能を解析し、海馬で AMPA 受容体機能が選択的に低下していることを見出した。

neurexin-3 KO マウスのシナプス機能を解析し、AMPA 受容体機能が選択的に低下していることを見出した。neurexin-3 ss4 KI ニューロン(Neuroigin との結合不全型)でも同様の結果を得たが、ss4 KO ニューロン(Neuroigin との結合可能型)では AMPA 機能は正常であった。このことから、シナプス前終末タンパク質である Neurexin が、Neuroigin と結合することにより経シナプ斯的にシナプス後終末の AMPA 受容体機能を制御していることを見出した。

Calsyntenin ファミリータンパク質が、Neurexin を介したシナプス誘導に関わっていることを新たに見出した。Calsyntenin は Neurexin と直接結合はしないが、複合体を形成して興奮性、抑制性の両方のシナプス前終末を誘導することを見出した。

Neurexin のシナプスでの機能発現のメカニズムを解明する目的で、Neurexin の細胞内領域の構造機能解析を行った。NMR および円偏光二色性スペクトルにより、この領域は天然変性タンパク質の構造を呈し、静電学的に PI(4,5)P2 と結合し、これは PKC による Neurexin のセリンリン酸化によって解除されることを見出した。また、この領域が AP2 タンパク質と結合することを見出した。PKC シグナルが、AP2・PI(4,5)P2 複合体を介した Neurexin のエンドサイトーシスや下流遺伝子の転写を制御している可能性を考え、解析を継続している。

(2) 詳細

研究テーマA「細胞外領域にアミノ酸変異のある Neuroigin 自閉症モデルの海馬のシナプス機能の解析」

Neuroigin-3 の細胞外領域のアセチルコリンエステラーゼ様ドメイン内にアミノ酸置換変異のある自閉症変異を導入したノックインマウス(neuroigin-3 R451C KI マウス)では、社会的相互作用の障害と、空間学習記憶能力の亢進がみられ、大脳皮質では GABA 受容体機能が亢進がみられる。今回、このマウスに GABA 遮断薬を投与し、GABA 受容体機能の亢進を軽減したところ、社会的相互作用の障害が正常化した。このことから、この変異による GABA 受容体機能の亢進が社会的相互作用の障害の原因になっている可能性を見出した。また、このマウスにおける空間学習能力の亢進の原因についても未解明であったため、海馬のシナプス機能の解析を行った。電気生理学的解析により、このマウスの海馬の錐体ニューロンでは LTP の増強がみられ、NMDA/AMPA 応答比が上昇していた。更に、NMDA 受容体のサブユニット構成が NR2B 優位になっていることも見出した。海馬錐体ニューロンのシナプスの成熟過程において、幼若なシナプスでは NMDA 受容体が AMPA 受容体に先立ってシナプス後膜に挿入されるが、このときの NMDA 受容体は NR2B が主体であり、成熟するに従って NR2A サブユニット主体に置き換わり、同時 AMPA 受容体も挿入されることが知られている。他のグループの NR2B の過剰発現マウスでは、シナプスの可塑性が亢進し、空間学習記憶能力の亢進がみられることから、本自閉症モデルマウスでは、Neuroigin-3 の R451C 変異

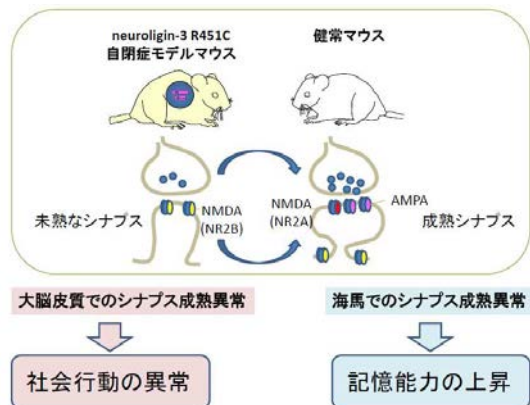


図1. シナプス成熟異常による自閉症の病態モデル

によりシナプスの成熟が妨げられ、本来発達に伴って獲得すべき社会的相互作用に障害をきたすと同時に、単純な学習記憶能力が亢進するという自閉症の病態を引き起こしているのではないかと結論付けた(図1。論文1及び未発表の内容)。これは当初計画していた研究内容であり、シナプス機能の解析および自閉症の病態モデルを導き出す目標が達成できた。

研究テーマB「細胞内領域にアミノ酸変異のある Neuroligin 自閉症モデルの開発」

自閉症患者から発見された、Neuroligin の細胞内領域のアミノ酸変異(R704C 変異)の、シナプスおよび自閉症の病態に及ぼす影響を、細胞外領域の変異(R451C)と比較検討する目的で、この変異を有するノックインマウス(neuroligin-3 R704C)を作成し、解析を行った。このマウスは正常に発生・成長し、目立った外見的異常は認められなかったが、R451C 変異マウスとは異なり、海馬において AMPA 受容体機能の低下が認められた。一方で、NMDA 受容体機能や、GABA 受容体機能には変化がなかった(論文2)。neuroligin-3 R704C マウスの作出及び解析は、さきがけ当初の目標としたもので、これに関しては達成できた。一方、自閉症関連行動についての詳細な解析は今後の課題である。

研究テーマC「neurexin-3 遺伝子改変マウスのシナプス機能の解析」

Neurexin の第4選択的スプライス部位(ss4)の挿入の有無は、Neurexin/Neuroligin の結合の特異性を規定することが知られており、ss4 の挿入の無いフォームは、どのタイプの Neuroligin とも結合できるが、ss4 の挿入の有る Neurexin は、殆どの Neuroligin アイソフォームと結合しない。まず、この ss4 の挿入の有無は、脳の部位特異的な特徴があり、嗅球や小脳では ss4 を含むフォームが優位に発現し、大脳皮質や海馬では ss4 を欠くフォームが優位に発現していることを定量的 PCR により見出した。この傾向は、Neurexin-3 で特に顕著であることも見出した。我々は neurexin-3 の欠損マウス及び、ss4 の挿入の有無を遺伝学的に操作したマウス(neurexin-3 ss4 KI/KO マウス)を作成し、Neurexin/Neuroligin の結合とシナプス成熟との関連について研究を行った。Cre 組換え酵素をレンチウイルスで導入することにより作成した neurexin-3 KO 培養神経細胞のシナプス機能を、パッチクランプ法により解析したところ、neurexin-3 KO シナプスでは、シナプス前終末機能を反映したパラメータの異常は見られなかったが、シナプス後終末の AMPA 受容体機能の選択的低下が認められた。Neurexin はシナプス前終末タンパク質であるため、これは Neurexin が Neuroligin との結合を介して経シナプ的にシナプス終末に影響を与えている可能性が考えられた。これを検証するために、neurexin-3 ss4 KI および ss4 KO の培養神経細胞を用いて、Neurexin の Neuroligin との結合能と、AMPA 受容体機能との関係について解析を行った。この結果、ss4 KI において、KO 神経細胞と同様 AMPA 受容体機能の低下が認められた。また、界面活性剤有りおよび無し条件下で AMPA 受容体の主要サブユニット GluR1 に対する抗体で AMPA 受容体を標識した実験で、neurexin-3 ss4 KI マウスでは AMPA 受容体のエンドサイトーシスが亢進して、シナプス表面に局在する数が低下していることを見出した。このことから、Neurexin はリガンドの結合を介して、シナプス後終末の AMPA 受容体の機能を制御していると結論付けた(論文4及び未発表の内容)。これらのマウスは当初の計画で作出及び解析を目標としており、これに関しては達成できた。一方、自閉症関連行動解析は、今後の課題である。

研究テーマD「Neurexin を介してシナプス形成を誘導する新たなシナプス接着因子の発見」

我々は、以前 Neurexin の細胞外領域と結合する分子を、親和性沈降後 MASS SPEC により探索していた際、シナプス接着分子 Calsyntenin ファミリータンパク質が検出されていた。今回、Calsyntenin ファミリータンパク質に着目し、Calsyntenin の Neurexin を介したシナプス誘導能について解析を行った。マウス海馬分散培養ニューロンに Calsyntenin-1, -2, -3 の全ての shRNA をレンチウイルスにより同時に導入すると(triple knock-down)、興奮性、抑制性両方のシナプスの数の減少がみられた。また、patch clamp 法によりシナプスの活動性を解析したところ、興奮性、抑制性ともに微小電流の頻度の減少がみられた。子宮内エレクトロポレーション法により、Calsyntenin-1, -2, -3 の shRNA を大脳皮質 II/III 層の錐体ニューロンに導入して、電気生理学的に解析したところ、やはり同様の結果が得られた。野生型 Calsyntenin をレンチウイルスにより導入すると、これらはレスキューされた。Calsyntenin のうち、特にシナプス誘導効果の高かった Calsyntenin-3 について、細胞外ドメインを用いて親和性沈降して MASS SPEC で解析した結果、Neurexin の沈降がみられたが、Neurexin と Calsyntenin の直接結合実験ではネガティブな結果が出たため、Calsyntenin は第3の分子を介して、Neurexin によるシナプス前終末の誘導を引き起こしていることが示唆された(論文4)。この研究は、当初のさきがけテーマとして予定していなかったものだが、さきがけ研究の重点が Neurexin の分子機能の解析に移行していく中で行うことにしたものである。

3. 今後の展開

本研究の成果として、少なくともある種類の自閉症の原因として、シナプスの成熟異常が関係しているという病態モデルを導くことができた。今後、これを更に検証していき、治療法の開発に結び付けたいと考えている。特に、neuroigin-3 R451C ノックインマウスは、作成時に R451C 変異周辺エクソンを loxP で挟んでおり、Cre 組換え酵素導入により neuroigin-3 遺伝子の発現が除去できる。neuroigin-3 R451C 変異は機能獲得型変異であり、neuroigin-3 の機能欠損では、少なくとも海馬や大脳皮質では目立ったシナプス機能や行動異常をきたさないため、neuroigin-3 R451C ノックインマウスが成熟した後、neuroigin-3 遺伝子を除去し、自閉症様行動異常が改善されるかどうか、シナプス成熟異常が改善されるかどうかについて検討を加える。また、自閉症モデルに対し、シナプス成熟促進因子として知られる Neuroigin-1などを過剰発現することにより、シナプス成熟異常が改善され、自閉症様行動異常が改善されるかについて研究を行い、自閉症の根本的治療法の開発の可能性を探りたい。これらに加え、Neurexin を軸としたシナプス成熟の分子機構に関する研究を継続し、シナプス成熟を効果的に誘導するための分子基盤の確立に努めたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究は、近年自閉症との関連が指摘されるようになったシナプス接着因子、Neuroigin 及び Neurexin に着目し、これらの遺伝子改変マウスを作出し、シナプス機能及び自閉症関連行動を解析することにより、自閉症の病態像を解明すると同時にこれらのマウスを自閉症モデルとして確立することを目指したものであった。当初の研究計画として、具体的な遺伝子改変マ

ウスを4系統列挙していた。これらは研究開始時点でおおむね作出できつつあるものであったが、研究開始後、全てを完成させ系統化できた。そして、これらすべてにおいて、シナプス機能を解析し、それぞれの系統で起こっているシナプス異常を見出した。また、これらの研究の中で、シナプス成熟の異常が自閉症の原因と深いかわりがあるという病態モデルを導くことができた。これは、自閉症の根本的治療法を開発していく上で、重要な知見であり、社会的波及効果に繋がると信じている。研究期間中に、研究室の上司が海外へ異動することになったことや、その後自分自身が信州大学へ異動して新しい研究室を立ち上げるようになったことなどがあり、研究環境のイレギュラーな変化に伴い、研究費の執行が当初の計画から大幅に変更せざるを得ない状況になったが、さきがけから柔軟に対応していただき、乗り切ることができた。当初の計画では、作出したマウスの行動解析を精力的に行い、モデルマウスとして確立することを目標の一つに掲げていたが、実際の研究では、シナプス成熟に関わる分子機構の解明に重点をシフトすることになり、行動解析が当初の計画ほど進行していない結果となってしまった。また、得られた成果は論文投稿中や準備中のものの中に含まれるものも多く、これらに関しては、世に出るのがさきがけ期間終了後になる予定である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

自閉症は多数の遺伝子がかかわる疾患と考えられているが、自閉症家系に見出される Neuroligin-3 遺伝子とそのシナプスにおける結合パートナーである Neurexin の遺伝子の異常から、これらのシナプス分子が自閉症原因理解の橋頭堡となる可能性がある。本研究はこの点に着目し、すでに作成していた neuroligin-3 R451C 変異導入ノックインマウスに加えて、neuroligin-3 R704C KI マウス、Neurexin-3 の KO マウス、Neurexin と Neuroligin との結合特異性を規定するスプライス部位(ss4)の挿入を操作した neurexin-3 ss4KI/KO マウスを作出して、それらの自閉症関連症状を解析することにより、その病態との関係に迫ったものである。neuroligin-3 R451C KI マウスの海馬でのシナプス機能についてはLTP増強、AMPA 受容体機能に対する NMDA 受容体機能の上昇、NMDA 受容体の NR2B サブユニットの機能亢進などの幼若シナプスの特徴を見出し、一方 neurexin-3 KO マウスの解析などから、シナプス前終末タンパク質である Neurexin が Neuroligin と結合することにより経シナプ斯的にシナプス後終末の AMPA 受容体機能を制御していることなどを見出したものである。これらの成果は今後の展開によっては一部の自閉症の治療法の開発にもつながる成果である。成果の一部は論文報告を行っている。主要な成果は責任著者として早い時期に論文報告が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Etherton M, Földy C, Sharma M, Tabuchi K, Liu X, Shamloo M, Malenka RC, Südhof TC. Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108(33):13764-9.
2. Etherton MR, Tabuchi K, Sharma M, Ko J, Südhof TC. An autism-associated point mutation

in the neuroligin cytoplasmic tail selectively impairs AMPA receptor-mediated synaptic transmission in hippocampus. EMBO J. 2011; 30(14):2908-19.

3. Budreck EC, Kwon OB, Jung JH, Baudouin S, Thommen A, Kim HS, Fukazawa Y, Harada H, Tabuchi K, Shigemoto R, Scheiffele P, Kim JH. Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 110(2):725-30.

4. Aoto J, Martinelli DC, Malenka RC, Tabuchi K, Südhof TC. Presynaptic neuroligin-3 alternative splicing trans-synaptically controls postsynaptic AMPA receptor trafficking. Cell. 2013; 154(1):75-88.

5. Um, J. W., Pramanik, G., Ko, J. S., Song, M. Y., Lee, D., Kim, H., Park, K. S., Südhof, T. C., Tabuchi K. and Ko, J. Calsyntenins function as synaptogenic adhesion molecules in concert with neuroligins. Cell Rep. 2014; 6(6): 1096-109.

(2)特許出願

該当なし。

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(著書)

1. Tabuchi, K.: Neuroligins and Neurexins in Autism. In "TEXTBOOK OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS" ed. E. Hollander, A. Kolevzon and J. T. Coyle, pp.347-352, American Psychiatric Publishing, Inc., Washington, DC, London, England, 2011

(総説)

2. 田淵克彦: 自閉症とニューロリギン. Clinical Neuroscience, Vol.27, No.10, PP.1092-1093, 中外医学社, 2009

3. 田淵克彦: Neuroligin.分子精神医学, Vol.11, No.3, PP.207-208, 先端医学社, 2011

4. Deeba Noreen Baig, Toru Yanagawa, Katsuhiko Tabuchi: Analysis of Neuroligin-3 R451C knock-in mice as models for autistic savant.: Japanese Journal of Biological Psychiatry, Vol.23, No.4, 2012

5. 田淵克彦: シナプスと自閉症, 生体の科学, 65(1): 3-6., 医学書院, 2014

研究報告書

「膜電位の時空間計測における、次世代技術開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 筒井 秀和

1. 研究のねらい

脳の中では膨大な数の神経細胞が互いに複雑な回路を構築し、情報の保持や処理等を行い、動物の知的で多様な行動の基礎を作り出している。神経回路を伝播する信号の主要な実態は、細胞膜電位変化という電気信号である。一つ、あるいは少数の細胞であれば、ガラス管微小電極を用いた手法などにより正確な電気活動記録を得ることが出来る。しかしながら、多くの細胞を同時に計測対象とすることは難しい。生き物の中では、生体電気信号は一体どのように扱われているのか、という根源的な問いに迫る事を目指して、細胞の電気活動の時空間動態を計測しようとする試みが行われはじめてから半世紀以上が経つが、生理学における最も本質的な課題の一つであり続けている。

細胞は実際に生体電気信号を巧みに解釈して、信号を増幅したり、化学反応を引き起こしたりしている。細胞膜には電圧変化を感知して状態遷移を引き起こす膜蛋白質があり、このような蛋白質を分子の部品として利用する事で、蛋白質性の膜電位プローブを創出し、電気信号の時空間動態を光学的に検出する事が出来る。例えば、電位依存性フォスファターゼに由来する電位センサードメインと、蛍光共鳴エネルギー移動レポータを組み合わせ、電位センサードメインの電位依存的状態遷移をエネルギー移動効率の変化として光学的に検出する事が出来る。この計測原理に基づいて、培養下の単一細胞における単一スパイクを光学的に可視化する事などが可能になってきた(Tsutsui et al., 2008)。しかしながら、実際に動作している神経回路から、十分な精度と堅牢性を兼ね備えた計測を行うには応答感度、速度、光安定性などの点で、さらなる特性の向上が必要である。本研究において、ナノスケールで起きる光物理現象や蛋白質と電場の相互作用に関する知見等を駆使し、膜電位の時空間計測技術の発展に寄与する事を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

まず、自身が開発した膜電位プローブ mermaid (Tsutsui et al., 2008) を用いて、ゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態を無麻酔・非拘束で非侵襲的に「見る」ことに取り組んだ。抗ヒスタミン系の薬物がゼブラフィッシュにおいて心機能障害を誘発する事が知られているが、そのような状態での電氣的興奮の伝播が、正常時とは異なる様式になっている事が分かり、膜電位光学計測の応用的発展の可能性の一つが示された。次に、設計する蛋白質の電位依存的な光学特性を迅速に評価する手法の開発に取り組んだ。蛋白質の設計において、些細な変異や部分設計の変更がしばしば予期せぬ効果を持つ事があるが、通常の電気生理学的手法は計測効率が必ずしも高くなく、多数の蛋白質の評価には適していない為である。細胞外電場に対する誘起膜電位 (field-induced potential) の空間分布を用いる事で、効率的な評価法を

確立する事が出来た。この評価法を用いて、様々な設計の人工蛋白質の挙動を調べていると、電位センサードメインの状態遷移に関する新しい知見が得られた。すなわち、従来まで、電位センサードメインの4つの膜貫通セグメント(S1-S4)の内、状態遷移時においてはS4が主要な構造変化を示すと考えられてきたが、S4のみならずS1の上流にも匹敵する影響を与える可能性が示された。この可能性は別の詳しい一連の光学的計測によっても支持された。この現象を膜電位の時空間計測に応用する事を試みた。電位センサードメインのS1、S4に蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)のドナー・アクセプターを配置する事で、膜電位変化により誘起される電位センサードメインの状態遷移をFRET 高速・高感度に検出できる事を見出した。また、遺伝学的にコードできる第2高調波発生レポーターの開発にも取り組んだ。静電相互作用に基づいた細胞膜配向技術を開発し、哺乳類細胞において2倍波の観察にも成功した。

2) 詳細

研究テーマ 1. ゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態

ゼブラフィッシュは、遺伝子操作技術が確立されている事、幼魚では細胞や組織の観察が生きたまま可能な事、発生が速く進む事、飼育コストが比較的安い事、等々のモデル脊椎動物としての利点を持ち、それらは心臓研究においても発揮されてきた。また、近年は、損傷後に再生がおきる事や、個体を用いた大規模スクリーニングへの適合性などのユニークな点にも注目されてきている。開発してきた膜電位プローブ、mermaid を用いて、ゼブラフィッシュ心臓の電気活動を非侵襲的に「見る」ことを試みた。まず、心筋細胞で特異的に mermaid を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ *cmlc2::Mermaid* を得た。標本には受精後 70-80 時間後の胚を用いた。ガラスボトムディッシュ上に寒天で小さな凹みをつくり、その中で泳がせ、腹側から観察した。この時期の胚の泳ぎは間欠的であるため、無麻酔、非拘束という極めて生理的な状態で心臓の膜電位動態を見る事が出来た。収縮サイクルにおいて、最初の脱分極は心房と血管の境界部付近で起こり、それが心室へと伝播していくようなレシオ画像の時系列が見えた。偽陽性信号を調べるために、Mermaid D129R というネガティブコントロールプローブを発現したトランスジェニックゼブラフィッシュも同様に作成した。心収縮を観察すると、今度はほとんどレシオ変化がみられず、*cmlc2::Mermaid* のレシオ変化の大部分は膜電位を反映したものであるとわかった。アステミゾールという、第二世代のヒスタミン H1 受容体拮抗薬がある。QT 延長などの副作用を持つことが明らかとなり市場撤退した薬物で、ゼブラフィッシュに投与した場合も心臓の機能障害を引き起こす事が知られている(但し、薬理作用も同一かについてはまだ解明されていない)。アステミゾール投与が膜電位動態に与える影響を調べた。投与前は前述同様、心房-血管の接合部から心室に膜興奮の正常な伝播が観察された。アステミゾール投与後、心室の収縮が欠如している状態においては、驚くべき事に、最初の電氣的興奮が、心房、心室の境界付近で発生し、心房方向に逆伝播しているような結果が得られた。投与前の正常な収縮サイクルでは、心房-心室境界部、及び、心室での蛍光レシオのピーク時間は、心房でのピーク時間に比べて、それぞれ、 57 ± 6.2 ミリ秒、及び、 85 ± 6.2 ミリ秒 “遅れて”いた。これに対し、アステミゾール投与後の、心室収縮が阻害されている心臓では、 52 ± 4.9 ミリ秒、及び 95 ± 4.3 ミリ秒 “進んで”いた ($n=5$, 平均値 \pm 標準誤差)。このように、mermaid を用いた膜電位イメージング技術を用いて、ゼブラフィッシュの心

臓の薬剤誘発性心機能障害における異常な興奮伝播のモードが明らかとなった。前述のように、ゼブラフィッシュの心臓は、心臓機能に関わり、哺乳類のものと相同性の高い重要な分子を多く発現しながら、低コスト、高い透明性、遺伝子操作性、マイクロウェルに収まる“小ささ”、などを兼ね備えた優れた材料である。また、損傷後の再生が起きる事は特有の現象で、興味深い。拍動している心臓の電気発動を“見える”ようにすることで、心臓の生理、発生、薬理学の発展につながる事が期待された(Tsutsui et al., 2010)。

研究テーマ 2. 光学信号の高速評価法の確立

細胞外に電場をかけることで誘起される“field-induced potential ($\Delta\Psi$)”の空間分布を利用することで、電気生理学的な計測を行うことなく、候補プローブの定量的な特性を効率的に調べる手法を確立した。解析には、ほぼ球形のN2a細胞を用い、電場印加に対する光学信号の電極との角度依存性を用いる。ここで、実際の電位センサードメインが「感じる」のは、 $\Delta\Psi$ ではなく、静止膜電位 $+\Delta\Psi$ であるが、細胞ごとの静止膜電位のばらつきが問題となった。安定的に内向き整流性・チャンネルを発現する細胞株を作ることで、この問題を解決することが出来た。single shot で、電位依存性や細大応答などが、約10mV以下の誤差範囲のもと、効率的に解析できるようになった。この方法を用いる事で、例えば、電位センサードメイン上において、膜電位プローブの応答性を向上させるアミノ酸変異などが発見された(Tsutsui et al., 2014)。

研究テーマ 3. 電位センサードメインの状態遷移機構

従来、電位センサードメインが、その構造変化を伝える主要な部位はS4の下流と考えられていたが、S1の上流にFRETレポータを付加したコンストラクトの光学信号を本研究で開発した手法を用いて解析したところ、予想に反して、電場印加に応じてFRET効率の変化が検出された。同様の結果はツメガエル卵母細胞の発現系でも得られた。さらに同様の現象は、FRETレポータではなく、テトラメチルローダミン(TMR)の環境依存性に基づく計測法によっても観察され、一般的に観察される現象であることを示していた。これらの結果は、電位センサードメインの状態遷移による構造的摂動はS1の上流にも及びうる事を初めて示すものであり、電位依存性チャンネルの動作原理を考える上でも重要な知見となり得る(Tsutsui et al., 2013)。

研究テーマ 4. 高速・高感度型の膜電位プローブ mermaid2 の開発

テーマ3で得られた電位センサードメインに関する新しい知見を元に、S1の上流、S4の下流にそれぞれFRETドナー・アクセプターを配置することで、高速・高感度型の膜電位プローブmermaid2を開発した。Mermaid2の信号は、mermaidに比べて、信号変化量が1.8倍、時定数で7.7倍向上していた。このようにして得られた新たなプローブmermaid2を用いる事で、時間平均加算することなく、150Hzまでのスパイク列において個々のスパイクを分解する事、単一スパイクのみならず閾値下の膜電位現象も捉える事、そしてマウス大脳皮質における聴覚刺激に対する応答を可視化する事に成功した(Tsutsui et al., 2013)。

研究テーマ 5. 蛍光蛋白質の細胞膜への配向制御と第2高調波発生

第 2 高調波発生とは光電場に対する物質の非線形分極に基づく現象の一つであり、入射光の 2 倍の振動数(半分の波長)の光が発生する現象である。非線形分極を起こす有機化合物色素などで染色する事により、細胞膜-細胞質界面からの第 2 高調波発生が検出でき、さらにその発生効率は膜電位依存性である事などがこれまでに報告されてきた。しかしながら、哺乳類細胞に遺伝学的に導入可能な第 2 高調波発生レポータはこれまで開発されてこなかった。第 2 高調波は中心対称性が破れた領域でのみ信号が発生するという性質があり、効率的に発生させるためには非線形感受率を持つ蛋白質を配向させる必要がある。本研究では、低分子 GTP 結合蛋白質の一種である Kirsten Ras4B (K-Ras4B)の静電相互作用による膜局在メカニズムを蛍光蛋白質(mVenus)に応用し、配向制御と第 2 高調波の検出に成功した。膜電位依存性を示す事は出来なかったが、蛍光蛋白質群は多様な非線形感受率を持つ事が知られている。これらに着目する事で、また表面の静電特性をより精密に制御する事で膜電位依存性が得られる可能性もあると考えている(Jinno et al., 2014)。

3. 今後の展開

1)開発した膜電位プローブを行動中の動物の神経活動記録へと応用していく事、2)プローブの高速・高感度化、そして 3)新規の膜電位計測原理の探索、に積極的に取り組みたい。例えば、研究機関中、原生動物から哺乳類に至るさまざまな動物種から電位センサー蛋白質のコレクションを行ってきた。この中には、本研究で用いたホヤ電位依存性フォスファターゼに由来する電位センサードメインより、プローブへの応用という観点でより理想的な特性を持つものが存在する可能性がある。今回開発した細胞外電場を用いたプローブ分子の高速評価法は、そのようなスクリーニングに適用出来る。また、電位センサーの状態遷移がどのような機構で起きるのか、分光計測を組み合わせ、より深いレベルでの理解を目指す事も目指していく。

4. 評価

(1)自己評価

(達成状況) さきがけ研究開始時に、6 個の研究テーマを設定した:

- A: プローブの大規模スクリーニング系の構築
- B: “photostable FRET pair”の開発
- C: 多種多様な電位センサードメイン蛋白質コレクションの構築
- D: FRET 型膜電位プローブ分子の創出、
- E: SHG 型膜電位プローブ分子の創出
- F: 遺伝子導入動物における実証実験

この全てに取り組む事が出来、それぞれにおいて一定の進展があった。A については計画していた酵母ではなく、哺乳類細胞に電場を印可するアプローチに変更し、結果を論文に発表した(Tsutsui et al., BBA Biomemb., 2014)。B に関しては 3 倍程度光安定なレポータ分子を得る事ができた。C に関しては、20 種類以上の遺伝子クローニングを完了した。これらは今後の研究の重要なリソースとなる。D、F に関しては、高速・高感度型の膜電位プローブ(Mermaid2)を開発しマウスの大脳皮質に導入し、聴覚応答の記録を行った(Tsutsui et al., J. Physiol., 2013)。E に関しては、SHG レポータを開発するところまで至ったが、明確な電位依存性はまだ確認できていない(Jinno et al., 2014)。しかし哺乳類細胞で機能する蛋白質の SHG

レポータの開発自体、これまでにないものであり、その点にも学術的な価値があると考えられる。この他、心臓の膜電位動態の可視化(Tsutsui et al., J.Physiol., 2010)、電位センサー蛋白質の状態遷移に関する研究(Tsutsui et al., Biophys. J 2013)についても取り組む事が出来た。状態遷移機構の理解は未解決な重要な課題であり、今後も実験手技をより洗練させ、例えばセグメントの回転運動を直接的に検出する事などにも引き続き取り組みたい。

(研究の進め方)さきがけの人員費で雇用した全3名の研究補助員が非常に活躍してくれて、研究の遂行にあたってなくてはならない存在であった。内2名は、研究開始にあたってはほぼ未経験の状況であったが、様々な手技を取得し、さきがけ後は、新たな研究環境で活躍している、またはしていく予定となっている。人材育成という点においても少しでも貢献できているとしたら、非常に嬉しく思う。

(波及効果)

膜電位の時空間計測技術は、学術的な有用性のみならず、創薬関連化合物のスクリーニングという点で、社会還元ができる可能性を持つ。細胞膜の電気的興奮性を担う膜蛋白質は多くの疾患とも深く関係して、これらは重要な創薬のターゲットであるにもかかわらず、薬の開発効率は可溶性蛋白質をターゲットとしたものに比べてとても低いという問題がある。可溶性蛋白質であれば水溶液中で化合物との結合や機能阻害・促進を比較的容易に並列計測する事が出来るが、膜蛋白質では必ずしも容易ではない。膜電位センサーの性能向上により、低コスト・高スループットで光学的に創薬関連化合物をスクリーニングする系を提案・構築できる可能性がある。さまざまな研究者と密接な情報交換を行う事で、画期的な薬物副作用の評価や新薬の創出に貢献できる可能性がある。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

神経回路を駆け巡る神経信号は伝達物質と細胞膜電位によって担われている。後者はこれまでに電気生理学的手法により解析されてきたが、複雑な回路を構成する多数の細胞とその空間分布を一挙に観測することには限界があり、光学計測法に期待が集まっている。本研究はこの点に着目したもので、蛋白質性の膜電位プローブの作動原理の根本に立ち返って応答速度と感度および安定性に優れたプローブの創出を目論んだものである。すでに手にしていたmermaid プローブを用いて生きたゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態を無麻酔・非拘束で非侵襲的に撮像できることを実証したのち、膜電位プローブの特性を効率よく迅速に評価できる誘起膜電位の空間分布を利用した独自の評価システムを確立した。これを用いることにより、電位依存性フォスファターゼに由来する電位センサードメインと蛍光共鳴エネルギー移動レポータドメインとを組み合わせる電位変化をエネルギー移動効率の変化として光学的に検出できるプローブ候補をスクリーニング評価し、センサードメインの機能様式に関する発見を介して新しい高速高感度プローブに近づけたことは高く評価される。今後プローブ特性のさらなる改良と完成、および in vivo 神経活動記録への適用が十分に期待できる。これまでに着実に成果を論文として報告しているが、特許出願も期待できると思われる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Tsutsui et al., Visualizing voltage dynamics in zebrafish heart. J. Physiol. (2010). 588, 2017–2021. |
| 2. Tsutsui et al., Optically Detected Structural Change in the N-Terminal Region of the Voltage-Sensor Domain. Biophys. J. (2013). 105:108–115. |
| 3. Tsutsui et al., Improved detection of electrical activity with a voltage probe based on a voltage-sensing phosphatase. J. Physiol., (2013), 591, 4427–4437. |
| 4. Tsutsui et al., Rapid evaluation of a protein-based voltage probe using a field-induced membrane potential change. BBA- Biomembranes, (2014), 1838, 1730–1737. |
| 5. Jinno et al., Engineering a genetically-encoded SHG chromophore by electrostatic targeting to the membrane. Front. Mol. Neurosci. (2014) doi: 10.3389/fnmol.2014.00093. |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Tsutsui, H. FRET sensing of transmembrane voltage. (招待)

New Advances in Optical Imaging of Live Cells and Organisms

Cold Spring Harbor Laboratory Asia meeting

Sozhou, China, Aug 20–23, 2013

Tsutsui, H. Rapid evaluation of a protein based voltage probe using the field-induced membrane potential

Optical Measurements of Membrane Potential Symposium

– A Merocyanine 540 Celebration

Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA, Aug 2–4, 2013

Tsutsui, H. FRET sensing of transmembrane voltage. (招待)

Gordon Research Conference on Bioelectrochemistry

Lucca, Italy, July 1–6, 2012

Tsutsui, H. FRET Probing of Membrane Voltage (招待)

Janellia Farm Voltage Imaging Workshop

Janellia Farm Research Campus, USA, Nov 1–7; 2009

研究報告書

「脳内分子変化と電気生理学的・行動学的変化の統合解析」

研究タイプ: 大挑戦型(※大挑戦型課題として延長無/増額無)

研究期間: 平成21年10月～平成27年3月

研究者: 山口 瞬

1. 研究のねらい

記憶・学習を始めとした脳機能のメカニズムを解明するには、分子レベルの変化や電気生理学的変化が脳のどの神経細胞でいつ生じるのかを明らかにする必要がある。

本研究では、研究者らが開発した *Arc-dVenus* マウス(記憶・学習や感覚情報処理に際して誘導される *Arc* 遺伝子の発現に伴い蛍光蛋白質 *dVenus* が発現するトランスジェニックマウス)を用いて、遺伝子発現の変化を *in vivo* で経時的にモニタリングし、個々の記憶・学習課題や感覚情報処理によって生じた微小な分子変化を捉えることを目指した。さらに電気生理学的変化や行動学的変化も同時に記録し解析することで、分子(遺伝子)変化・電気生理学的変化・行動学的変化の間に存在する法則性を明らかにし、脳機能の動作原理に迫ることを目指した。

また記憶・学習等に障害のある種々のミュータントマウスでも解析し、それらの機能障害の原因となる脳の責任部位の同定や病態のメカニズムについても明らかにすることを目指した。

大挑戦型としては特に、自由行動状態で遺伝子発現と電気生理学的変化と行動学的変化を同時に記録・解析できる系を確立することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

自由行動マウスで、脳の遺伝子発現変化と電気生理学的変化、行動の三者を同時に記録し、それら三者の関係性を明らかにすることに挑んだ。

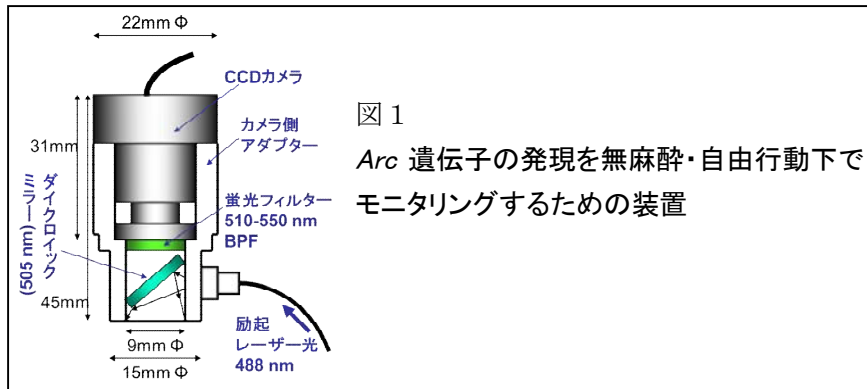
- ① *Arc-dVenus* マウスを用いて、無麻酔・自由行動下で *Arc* 遺伝子発現をモニタリングする系の開発を目指した。(i)小型 CCD カメラを用いた新規 *in vivo* イメージング装置の開発と(ii)二光子励起顕微鏡を利用した *in vivo* イメージング法の開発を行った。(ii)の方法により、正常な脳とアルツハイマー病の脳では視覚情報処理の際の神経細胞の活動パターンに差異のあることを明らかにした。
- ② 遺伝子発現の変化と電気生理学的変化と行動の関係性を調べる有効な方法として、行動課題後の *Arc-dVenus* マウスの脳スライスで電気生理学的解析を行う実験法を開発した。この系を用いて、恐怖条件付け課題によって活性化した扁桃体神経細胞や新奇環境の探索によって活性化した海馬 CA1 神経細胞の電気生理学的特性を明らかにした。
- ③ *Arc-dVenus* マウスの脳を透明化し、視覚情報処理に関わる神経細胞を網羅的に検出することに成功した。
- ④ *Arc-dVenus* マウスと種々のミュータントマウスを交配し、蛍光イメージングすることで、種々の脳機能障害に伴う機能低下部位を明らかにした。

(2) 詳細

研究テーマ A「脳内遺伝子発現(転写)の *in vivo* モニタリング法の開発」

(i) 小型 CCD カメラを用いた *in vivo* イメージング装置の開発

無麻酔かつ自由行動状態で *Arc* 遺伝子の発現をモニタリングするため、新たなイメージング装置の開発を目指した。さまざまなタイプのイメージング装置を考案し、それらを、作製の難易度や必要なコスト、使いやすさなどの面から検討した。その結果、CCD カメラを *Arc-dVenus* マウスの頭に装着する方式が良いと判断した。光学的な設計後、試作機を作製した(図 1)。



この試作機では、光ファイバーの先端から出た励起光が、ダイクロイックミラーに反射したあと円錐状に広がって対象面(脳表面)に照射され、中心部が辺縁部に比べて明るくなるという問題点があった。そこでそれを補正するためのプログラムを開発した。

またこの試作機では、装置の重量がマウスにとってかなりの負担になる問題点があった。そのため、現在、*Arc-dVenus* マウスの代わりに *Arc-dVenus-3'*ラット(*Arc-dVenus* マウスと同様のコンストラクトで作製したトランスジェニックラット)を用いてイメージングを試みている。

(ii) 二光子励起顕微鏡を利用した *in vivo* イメージング

上記の小型 CCD カメラを用いた *in vivo* イメージング装置の開発と並行して、二光子励起顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングを行った。この実験系では、イメージングの際にマウス頭部を顕微鏡下に固定する。そのため、完全な自由行動下での連続イメージングではないが、それに近い条件でのデータ採取と考えられる。

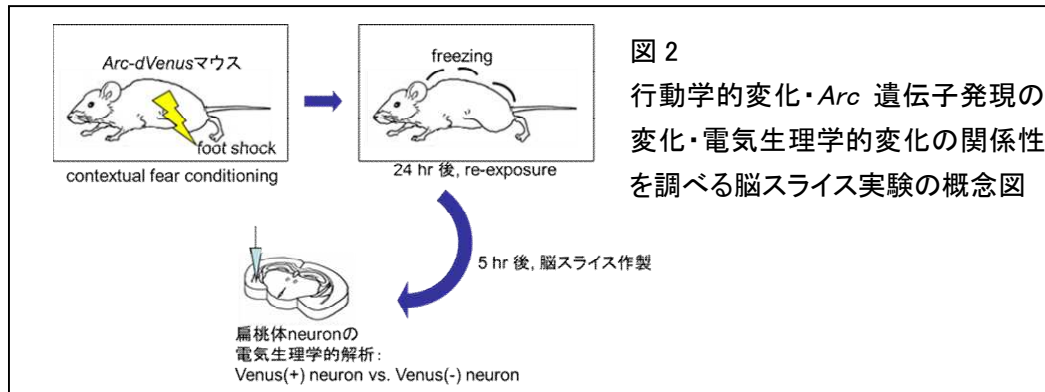
Arc-dVenus マウスに視覚刺激(縦縞模様による刺激)を与えたあと二光子励起顕微鏡を用いて大脳皮質視覚野(内側二次視覚野)を観察すると、第 II/III 層で蛍光シグナル(+)の神経細胞を多数観察することができた。*Arc-dVenus* マウスに対して二光子励起顕微鏡を用いてイメージングする方法が極めて有用であることを示した(論文 6)。

この系を用いてアルツハイマー病モデルマウスの脳を解析し、アルツハイマー病に特有の異常な反応パターンを明らかにした(論文 6, 研究テーマ F 参照)。

研究テーマ B「電気生理学的変化・行動学的変化のモニタリング法の開発」

(i) 電気生理学的変化のモニタリング法の開発

in vivo のモニタリングではないが、電気生理学的変化と *Arc* 遺伝子発現の変化、行動学的変化の関係性を調べる有効な方法として、脳スライスを用いる実験法を開発した。この実験系では、*Arc-dVenus* マウスに行動実験課題を行わせ、その5時間後(蛍光シグナルが十分誘導された後)に脳スライスを作製し、蛍光シグナル(+)⁺の神経細胞と蛍光シグナル(-)⁻の神経細胞で電気生理学的特性を比較する(図 2)。



この実験系を用いて、恐怖条件付け課題によって活性化した扁桃体神経細胞(蛍光シグナル(+)⁺の扁桃体神経細胞)では、mEPSC (miniature excitatory postsynaptic currents) の頻度の増加や paired pulse ratio の低下が見られることを明らかにした(論文 1)。

また、新奇環境の探索によって活性化した海馬 CA1 神経細胞は、その後の sharp waves/ripples (記憶の自動再生の際に生じると考えられている電位変化)で再活性化することを明らかにした(論文 3)。

(ii) 行動学的変化のモニタリング法の確立

行動学的変化を記録するため、ビデオモニタリングシステムを導入した。

研究テーマ C「脳内遺伝子発現・電気生理学的変化・行動学的変化の同時モニタリング法の開発」

上で述べたように、無麻酔・自由行動下での遺伝子発現のモニタリングは、二光子励起顕微鏡を用いてかなりの程度まで達成された。脳波の変化と行動学的変化は、導入したテレメリーシステムとビデオシステムを用いて記録することが可能である。これらを併用することで同時モニタリングが可能である。

研究テーマ D「転写以外の遺伝子発現変化のモニタリング法の開発」

Arc mRNA には活性化シナプス近傍へ運ばれる特性がある。*Arc* 遺伝子の 3'-非翻訳領域を用いてトランスジェニックマウス・ラットを作製し、レポーター mRNA が活性化シナプス近傍に運ばれる様子を観察することに成功した(未発表データ)。

研究テーマ E「正常な記憶・学習、感覚情報処理のメカニズムの解析」

(i) 視覚刺激を反復して与えた場合の大脳皮質視覚野神経細胞の反応の解析

視覚刺激(縦縞模様による刺激)を反復して与えた場合の大脳皮質視覚野神経細胞の反応を、二光子励起顕微鏡による *in vivo* イメージングで調べた。1 回目の刺激でも 2 回目

の刺激でも、同程度の数の神経細胞に蛍光が誘導された。しかしそのポピュレーションは異なり、両方の回に蛍光が誘導された神経細胞は、それぞれの回に蛍光が誘導された神経細胞の約半数であった。そして 1 回目の刺激で蛍光が強く誘導された神経細胞ほど、2 回目の刺激でも蛍光が誘導されやすいことがわかった。このことから *Arc* が誘導された神経細胞は再活性化されやすくなっていることを示した(論文 6)。

(ii) 脳の透明化による視覚情報処理神経回路の可視化

アミノアルコールを用いて *Arc-dVenus* マウスの脳を透明化した。透明化した脳を ultramicroscope を使って撮影し、個々の細胞の蛍光シグナルを脳全体にわたって検出した。視覚刺激(光刺激)が(+)と(-)それぞれの条件の脳を比較し、視覚情報処理に関わる神経細胞を網羅的に検出することに成功した(論文 2)。

研究テーマ F「脳機能障害のメカニズムの解析」

Arc-dVenus マウスと種々のミュータントマウスを交配した。得られたマウスの脳サンプルを蛍光イメージングすることで、種々の脳機能障害に伴う機能低下部位を明らかにした(*GaMKII-alpha* ヘテロマウス[論文 8], *Schnurri-2* ノックアウトマウス[論文 5], *SNAP-25* ドミナントネガティブマウス[論文 4])。また *Arc-dVenus* マウスとアルツハイマー病モデルマウスを交配して得られたマウスを二光子励起顕微鏡でイメージングし、神経細胞の異常活動を *in vivo* で定量的に捉えることに成功した(論文 6)。

大挑戦型として取り組む挑戦的な研究項目に対する進展

大挑戦型として、自由行動マウスで、脳の遺伝子発現変化と電気生理学的変化、行動の三者を同時に記録し解析することに挑んだ。

完全な自由行動状態で解析するシステムの完成には至らなかったが、遺伝子発現をモニタリングするための小型 CCD カメラ *in vivo* イメージング装置の開発を行った。

また、二光子励起顕微鏡を用いることで、完全な自由行動状態ではないがそれに近い状態での遺伝子発現のモニタリングに成功した。これは脳波を記録するためのテレメトリーシステムや行動を記録するためのビデオシステムと併用可能である。

さらに、遺伝子発現変化と電気生理学的変化と行動の関係性を調べる有効な方法として、行動課題後の *Arc-dVenus* マウスの脳スライスで電気生理学的解析を行う方法を開発した。

3. 今後の展開

Arc-dVenus マウスを用いたイメージングは、脳内の遺伝子発現変化と電気生理学的変化、行動の三者を結び付ける要の技術として神経科学の分野で普及するかもしれない。しかし *Arc-dVenus* マウスと現存する最も高性能な顕微鏡(二光子励起顕微鏡など)の組み合わせでも、海馬など脳深部領域を *in vivo* で観察することは困難である。*in vivo* で脳を透明化する手法を開発し、脳深部を観察するための技術的ブレイクスルーをもたらしたい。

3*. 非公開の今後の展開(参考情報)

Arc-dVenus マウスに対して二光子励起顕微鏡などを用いて *in vivo* イメージングを行う技術

や、行動課題後の *Arc-dVenus* マウスの脳スライスで電気生理学的解析を行う方法は汎用性があり、今後もさまざまな脳機能のメカニズムや脳機能障害の病態の解明に貢献すると思われる。

特に、*in vivo* イメージングで個々の神経細胞の反応パターンを解析する方法（論文6の方法）は、アルツハイマー病を始めとした種々の脳疾患において、病態や新たな治療法（新薬など）の効果を解析する重要なパラダイムとなる可能性がある。論文6の成果はその端緒を開くものであり、5年以内に脳疾患に対する新薬の開発に結び付く可能性があると考えられる。

4. 評価

(1) 自己評価

（研究者）

大挑戦型として、自由行動マウスで、脳の遺伝子発現変化と電気生理学的変化、行動の三者を同時に記録し解析することに挑んだ。研究期間内に、完全な自由行動状態で解析するシステムの完成には至らなかったが、遺伝子発現をモニタリングするための小型 CCD カメラ *in vivo* イメージング装置の開発を行い、また、二光子励起顕微鏡を用いることで、自由行動に近い状態での遺伝子発現のモニタリングに成功した。さらに、遺伝子発現変化と電気生理学的変化と行動の関係性を調べる方法として、行動課題後の *Arc-dVenus* マウスの脳スライスで電気生理学的解析を行う方法を開発した。

これらの方法は、今後もさまざまな脳機能のメカニズムや脳機能障害の病態の解明、脳疾患に対する新たな治療法の開発に貢献すると予想される。研究期間内にこれらの方向性を示せたことは大きな成果だと考えている。

(2) 研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

神経回路特性の長期的変化は一般的には遺伝子発現制御が関わると考えられるが、それを生きた標本において経時的に観測する技術は未発達である。本研究は記憶・学習や感覚情報処理に際して神経細胞に誘導される *Arc* 遺伝子発現に着目し、これを蛍光蛋白質 *dVenus* により可視化できるトランスジェニックマウスの脳内の蛍光シグナルを記録できるカメラの作出をねらったものである。自由行動下の動物頭部に装着するカメラを試作し改良を進めてきたが、励起光密度や重量などについて課題が発生し完成には至っていない。一方平行して進めてきた二光子励起顕微鏡にマウス頭部を固定して課題に伴う変化を経時観察する方法、および課題後に脳スライスとして解析する方法については、視覚刺激や恐怖刺激による、あるいは病態モデル動物における、脳内の *Arc* 遺伝子発現様式の解析は共同研究者も得て発展しており、論文にもなっている。山口研究者はもともと遺伝子発現・電気生理学的変化・行動学的変化の同時モニタリングへの強い興味から、脳波および行動計測のシステムも立ち上げており、今後この独自の観点からの研究展開が期待できる。非常に有用なマウスの作成により広範な共同研究者に恵まれたことは、当該分野にとっても貴重な貢献である。今後責任著者として主要成果の論文発表も期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nonaka A, Toyoda T, Miura Y, Hitora-Imamura N, Naka M, Eguchi M, <u>Yamaguchi S</u> , Ikegaya Y, Matsuki N, Nomura H. Synaptic plasticity associated with a memory engram in the basolateral amygdala. J Neurosci . 2014, 34(28), 9305-9309
2. Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, <u>Yamaguchi S</u> , Abe T, Kiyonari H, Shimizu Y, Miyawaki A, Yokota H, Ueda HR. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. Cell . 2014, 157, 726-739
3. Mizunuma M, Norimoto H, Tao K, Egawa T, Hanaoka K, Sakaguchi T, Hioki H, Kaneko T, <u>Yamaguchi S</u> , Nagano T, Matsuki N, Ikegaya Y. Unbalanced excitability underlies offline reactivation of behaviorally activated neurons. Nat Neurosci . 2014, 17(4), 503-505
4. Ohira K, Kobayashi K, Toyama K, Nakamura HK, Shoji H, Takao K, Takeuchi R, <u>Yamaguchi S</u> , Kataoka M, Otsuka S, Takahashi M, Miyakawa T. Synaptosomal-associated protein 25 mutation induces immaturity of the dentate granule cells of adult mice. Mol Brain . 2013, 6(12), 1-17
5. Takao K, Kobayashi K, Hagihara H, Ohira K, Shoji H, Hattori S, Koshimizu H, Umemori J, Toyama K, Nakamura HK, Kuroiwa M, Maeda J, Atsuzawa K, Esaki K, <u>Yamaguchi S</u> , Furuya S, Takagi T, Walton NM, Hayashi N, Suzuki H, Higuchi M, Usuda N, Suhara T, Nishi A, Matsumoto M, Ishii S, Miyakawa T. Deficiency of Schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. Neuropsychopharmacology . 2013, 38(8), 1409-1425
6. Rudinskiy N, Hawkes JM, Betensky RA, Eguchi M, <u>Yamaguchi S</u> , Spires-Jones TL, Hyman BT. Orchestrated experience-driven Arc responses are disrupted in a mouse model of Alzheimer's disease. Nat Neurosci . 2012, 15(10), 1422-1429
7. Shinohara Y, Hosoya A, Ahmed H, Yamasaki N, Hattori S, Eguchi M, <u>Yamaguchi S</u> , Miyakawa T, Hirase H, Shigemoto R. Right-hemispheric dominance of spatial memory in split-brain mice. Hippocampus . 2012, 22(2), 117-121
8. Matsuo N, Yamasaki N, Ohira K, Takao K, Toyama K, Eguchi M, <u>Yamaguchi S</u> , Miyakawa T. Neural activity changes underlying the working memory deficit in alpha-CaMKII heterozygous knockout mice. Front Behav Neurosci . 2009, 3(20), 1-10

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Yamaguchi S, Eguchi M. A transgenic mouse line that allows fluorescence imaging of brain function. Biotech 2012, 27 April 2012, Tokyo
2. 「マウス脳細胞 動き“見える化”」アルツハイマー解明に一步

中日新聞 2012年9月12日朝刊

3. 「『アルツハイマー』脳神経細胞」異常な活動 視覚化

読売新聞 2012年9月26日朝刊

4. 「アルツハイマー病の脳神経細胞異常活動状態を視覚化」

TBS テレビ みのもんたの朝ズバッ！ 2012年9月28日

研究報告書

「シナプス可塑性に関わる RNA 群の革新的イメージング法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 阿部 洋

1. 研究のねらい

生細胞中の内在性 RNA をイメージングする革新的技術「化学反応プローブ」を開発し、神経細胞におけるスプライシング、RNA 輸送や翻訳制御などの RNA 動態を明らかにする方法論を確立する。特に、記憶や学習などの脳機能を発現するシナプスの可塑性に注目し、その鍵を握る mRNA 群を標的とした多色蛍光イメージングプローブを創製する。さらに、開発したプローブを用いて、世界で初めての海馬細胞における内在性 mRNA の検出・ライブイメージングを目指す。これまで、遺伝子改変を用いた人工蛍光タンパク質及びタグ配列を有する非天然型 RNA のライブイメージング技術は盛んに報告されているが、天然型 RNA を直接とらえることを目指す本研究計画は大きな意味を持つと考える。

2. 研究成果

(1) 概要

神経生物学研究に用いることができる細胞内 RNA の解析・機能制御技術を開発する。第一に、化学反応プローブを用いた細胞内 RNA イメージング法を開発した。本プローブは細胞内 RNA に結合することで蛍光を発生し、RNA の存在を可視化することができる。プローブを用いて、mRNA スプライシング反応の解析が可能になり、反応の結果生じる成熟型 mRNA 及びイントロン由来のラリアット型 RNA の検出に成功した。微量 RNA を細胞内で検出する方法論も検討した。すなわち、細胞内で標的 RNA を触媒化することで、化学反応が回転し、微量 RNA シグナルを増幅できる新規検出原理を考案した。原理的には、RNA シグナルを最大 1500 倍に増感できることになる。一方、生体イメージングの際に、生体物質由来の自家蛍光が本来のシグナル解析の邪魔になる。この問題を解決するために、ミリ秒以上の長寿命蛍光を有する希土類元素を用いた化学反応プローブを開発した。このプローブを用いて、時間分解蛍光解析を行うことで、有機化合物である生体物質由来の自家蛍光を除いて、希土類由来のシグナルのみを観測することが可能になった。

第二に、細胞内 RNA の機能を制御する方法論を開発した。ひとつは、RNA を環状化しその配列から終止コドンを除くことで、その RNA を用いた翻訳反応で高効率なタンパク質合成が起こることを見出した。本現象を終わりのない回転式タンパク質翻訳法と名づけて現在応用研究を展開中である。また、細胞内 RNA をロタキサン構造で強力に捕らえる新規アンチセンス法を考案した。本法は、RNA をトポロジカルに捕らえることができる全く新しい方法論である。

(2) 詳細

mRNA スプライシング反応の解析

mRNA 検出化学反応プローブとして、酸化還元反応に基づき蛍光を発する RETF (Reduction Triggered Fluorescence) プローブを合成した。本プローブは化学的な修飾により蛍光を消光させた分子とその修飾を外し、蛍光を回復させる還元剤をそれぞれ標的 RNA に相補的なオリゴヌクレオチドに結合した 2 本 1 組のプローブである。フルオレセインの水酸基をアジドメチル基で保護させた分子あるいは還元剤であるトリフェニルホスフィンをそれぞれ標的 RNA に相補的な配列を有する DNA に結合させた。このプローブが標的 RNA に隣り合って結合することで生じる還元反応によりアジドメチル基が脱保護され、標的 RNA 特異的な蛍光を発する。

RETF プローブを用いて、未成熟 mRNA のスプライシング反応のリアルタイム解析法の開発を検討した(図 1)。具体的には、CDC (chicken d-crystallin) 遺伝子由来の未成熟 mRNA がスプライシング反応を受け、成熟型 RNA ができる過程を解析するプローブの開発に成功した。

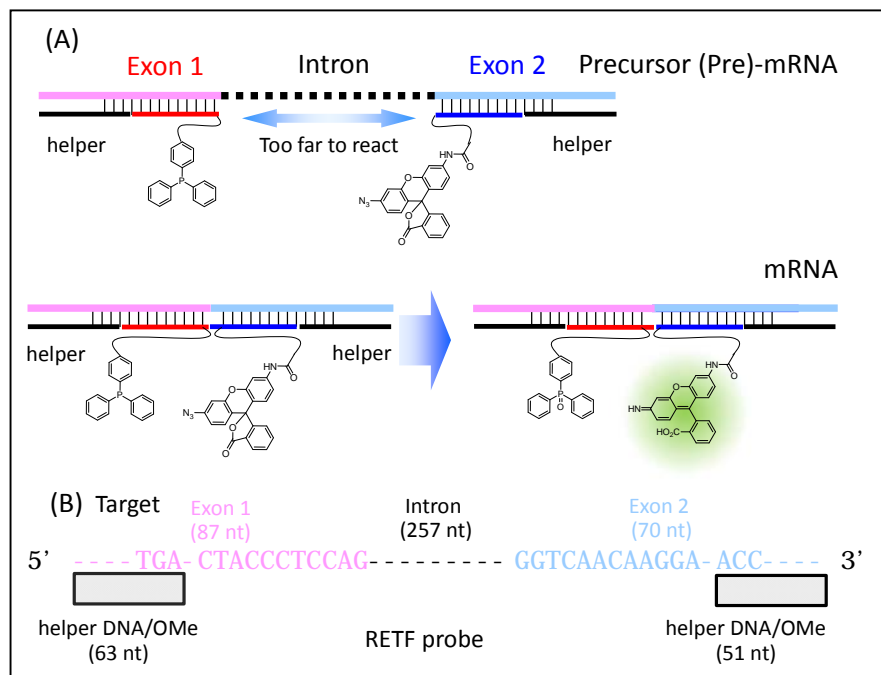


図1 スプライシング反応の検出

Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, 22(23), 7248–7251 (2012).

環状 RNA における終わりのない翻訳現象の解析

mRNA を解析するプローブの開発中に、真核生物の mRNA がタンパク質と複合体を形成し、環状構造をとることに注目した。そこで、人工的に作成した環状 RNA でタンパク質翻訳を起こすこと着想した。ストップコドンを除いた環状 RNA を用いると終わりのないタンパク質翻訳現象が起こる。さらに、タンパク質合成の効率の観点で考察する。通常の直鎖型構造(終わりのある)RNA を用いたタンパク質合成において、一反応サイクルの律速段階はリボソームが開始複合体を形成する開始段階にある。タンパク質をたくさん作るためには、リボソームは直鎖型 RNA 鋳型上を端から端までターンオーバーする(くっついて離れてを繰り返す)必要がある。一方、環状 RNA をタンパク質翻訳の鋳型に用いた場合、律速段階は最初の翻訳開始の結合

時のみとなり、それ以降のタンパク質合成は効率よく行われる。本メカニズムは高効率タンパク質合成法となりえることを確認した(図2)。

Angewandte Chemie International Edition, 52(27), 7004–7008 (2013).

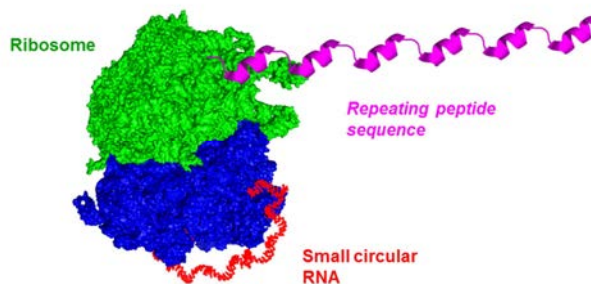


図2 終わりのない回転式タンパク質翻訳現象

細胞内で高効率なシグナル増幅を可能とする化学反応プローブの開発

2-シアノ-4-ニトロベンゼンスルホニル(CNs)基で保護したアミノクマリン(AMCA)を修飾したCNs-AMCAプローブと、チオフェノール基で修飾されたMBAプローブの2本を合成した。プローブは、RNA配列特異的に結合するように設計します。プローブ同士が隣あって結合すると、チオフェノール基がCNs基に求核置換反応を起こし、

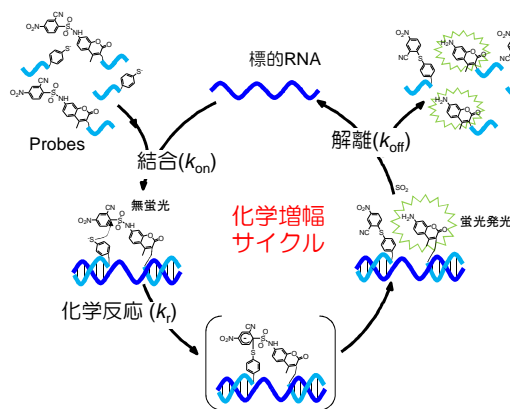


図3細胞内でのRNAシグナルの化学増幅

が試験管中で起こるか検討した。標的DNAを用意して、プローブを導入すると時間経過とともに化学反応が進行してAMCAが生成した。AMCAの生成率は60秒後には頭打ちになっており、反応が完結しました。一方で、標的DNAがない場合は、AMCAは全く生成されませんでした。以上のことから、開発したプローブは従来法と比較して非常に反応速度が速いのに加え、標的が存在しない場合に副反応が起こりにくいため、シグナル/ノイズ比が高いことが分かりました。次に、低濃度の標的DNAを検出できるかを検討するため、プローブ濃度は変えずにDNAの量を変えて混合し、15時間後の蛍光を検出しました。結果、試験管内で0.5pM(生細胞内で一分子のDNAに相当)の微量の遺伝子を検出することに成功しました。また、この条件では、15時間でDNA一分子に対して1500個のプローブが結合して蛍光シグナルを発することが明らかとなった。今回の実験より、芳香族求核置換反応を利用したプローブが、化学増幅反応を起こすことで、標的RNAを高感度に検出できることが明らかとなった(図3)。

Journal of the American Chemical Society, 135 (38), 14172–14178 (2013).

長寿命蛍光を有する希土類発光化学反応プローブの開発

細胞や組織を観察する際に、生体由来の自家蛍光は大きな問題となる。希土類錯体蛍光は数百マイクロ秒オーダーの長寿命であるため、有機化合物由来の数ナノ秒オーダーの自家蛍光を完全に除去できると考えられる。これは時間分解蛍光測定を行うことで可能になる。そこで、蛍光寿命が長い希土類錯体をプローブの発光システムに組み込むことを考えた。希土類錯体は直接励起できないため、アンテナ分子を介して励起する。そこで、アンテナ分子にスイッチ機能をつけることで、シグナル発生をコントロールすることにした。まず、新規化合物であるフェナンスリジノン環がアンテナ分子として機能することを確認した。アンテナ分子は、励起されるとまず一重項状態となり続いて速やかに三重項状態に遷移し、その後希土類にエネルギーを渡す機能を有する必要がある。特に重要なのが一重項で蛍光発光や熱失活を起こさずに、確実に三重項状態に移行することである。今回設計した分子は、340nm 付近に吸収を持ち、アンテナ分子として希土類錯体であるランタノイド金属(Eu 及び Tb)の両方を励起することができることが明らかとなった(図4)。続いて、フェナンスリジノン環を開裂させ、アジド基とエステル基を導入し、アンテナ分子の機能をオフにしたプレアンテナ分子を作成した。このプレアンテナ分子は、アジド基を還元することでフェナンスリジノン環が再生しアンテナ分子となる。プレアンテナ分子と希土類錯体を導入した DNA プローブと、還元剤であるトリフェニルフォスフィンを導入した DNA プローブを作成し、標的 DNA 中で蛍光発光が起こるかを検討したところ、標的が存在するときのみ蛍光発光が起こることを確認できた。また、これを用いた懸濁液中のバクテリアの RNA を検出できることを明らかにした。

Journal of the American Chemical Society, 135 (37), 13632–13635 (2013).

環状構造による mRNA の補足法の開発

mRNA を検出するプローブは、強力に標的に対して結合する必要がある。これまでの核酸プローブは基本的には平衡下可逆的に結合する性質を有するものがほとんどである。そこで不可逆的に標的 mRNA に結合するプローブを設計することを試みた。mRNA の化学構造には傷をつけずに標的を補足する方法論として、トポロジカルに標的に絡みつくとタキサン構造を利用することにした。ロタキサンは、環の中にひも状の分子(軸)が貫通しその両端にストッパーが付くことで、環が抜けなくなっている分子集合体である。核酸化学において、ロタキサンのようなトポロジカルな分子集合体は核酸二本鎖間の塩基対を利用して構築される。DNA を用いてロタキサンを形成する方法はこれまでにいくつか報告されているが、化学試薬や酵素を必要とし、細胞内でこのような構造を人工的に形成させることは困難であった。このような背景の下、我々は混ぜるだけで化学反応が進行し核酸分子の擬ロタ



図5 ロタキサン構造による RNA 補足法

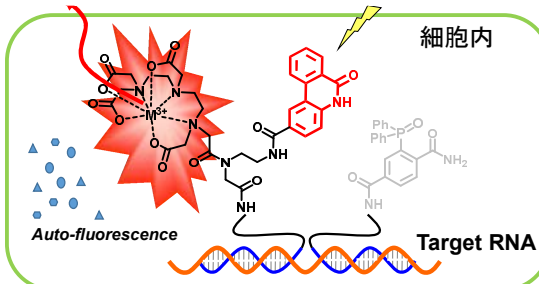


図4 希土類を利用した長寿命発光化学反応プローブ

キサンの形成される新しい方法の開発に着手した。2つの化学反応性オリゴ DNA(ODN)を設計・合成し、実際にこの2つのODNを標的核酸に加えたところ速やかに反応が進行し、擬ロタキサンの形成が観測された(図5)。この方法で形成された二本鎖は非常に安定であり、細胞内の mRNA に対してこの反応を実現できれば確かな mRNA 検出や効果的な翻訳の阻害や可能になると期待できる。

Journal of the American Chemical Society, 136 (20), 7201-7204 (2014).

3. 今後の展開

細胞内 RNA の解析と機能制御に焦点をあて研究を展開する。解析では、化学反応プローブを用いた内因性 RNA のイメージング法開発を進める。特に、一分子レベルの RNA でも解析可能なプローブを開発し、スプライシングなどの細胞内現象のリアルタイム解析を可能にすることを旨とする。機能制御では、ロタキサン分子を用いた遺伝子発現制御法や高効率なタンパク質発現を実現する方法論を開発することで、生命科学研究の重要なツールを研究者に向けて提供する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

神経生物学研究に用いることができる RNA 解析技術や機能制御技術の開発に取り組んできた。方法論の開発については、成果項目に記載した 5 報の論文の他にも、4報の関連論文を報告し、4件の関連特許を出願しており、十分な研究成果を達成したと考えている。神経細胞内の RNA イメージング研究は、共同研究を進めており、数年以内に成果がまとまる予定である。また、RNA イメージング法及びタンパク質発現法に関するプレスリリースを行った。RNA イメージング法では、細胞内で微量 RNA のシグナルを化学増幅できる方法論を報告した。非酵素的に1500倍のシグナル増幅を可能とするプローブは前例がなく、RNA イメージングによる基礎研究のみならず、遺伝子解析技術などの産業応用も期待できる。また、環状 RNA を利用したタンパク質合成もタンパク質材料の生産技術への利用が期待できる。プレスリリースの結果、多くの研究者や複数の企業から連絡を受け、現在、上記研究に関連した複数の共同研究を進めている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

遺伝子情報はまず RNA として発現し、その多くは各種の制御のもとに蛋白質に翻訳されて細胞機能に組み込まれてゆく。神経細胞はその突起の広がりゆえに特定の RNA の局在とその変化に特に関心がもたれるが、生細胞でそれを解析する手段はない。本研究はそこに着目して、神経細胞内に導入してスプライシング、RNA 輸送や翻訳制御など RNA 動態のイメージング解析を可能にするプローブの開発をねらったものである。このために一対のオリゴヌクレオチドにマスクした蛍光性原子団あるいは還元剤を結合させたものを細胞に導入し、これらが標的 RNA に結合すると化学反応により蛍光団が生じるプローブの開発と実証に成功したものである。さらに、

高感度化するためにこの反応を回転増幅して 1500 倍の増感を達成し、また標本に固有の自家蛍光を克服するため希土類元素を用い時間分解蛍光解析を行うことでさらに感度と特異性を向上できることを見出した。論文発表も行い、特許活動も行っている。今後、現在進めている神経細胞への応用を進展させ、実用化に供される日が待たれる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1.	Kazumitsu Onizuka, Fumi Nagatsugi, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe Automatic Pseudorotaxane Formation Targeting on Nucleic Acids Using a Pair of Reactive Oligodeox-ynucleotides <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 136 (20), 7201–7204 (2014).
2.	Hisao Saneyoshi, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe Long-lived luminogenic probe for detection of RNA in a crude solution of living bacterial cells <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 135 (37), 13632–13635 (2013).
3.	Aya Shibata, Takanori Uzawa, Yuko Nakashima, Mika Ito, Yukiko Nakano, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe Very rapid DNA templated reaction cycle for efficient signal amplification and its steady-state kinetic analysis of the turnover cycle <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 135 (38), 14172–14178 (2013).
4.	Naoko Abe, Michio Hiroshima, Hideto Maruyama, Yuko Nakashima, Yukiko Nakano, Akira Matsuda, Yasushi Sako, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe Rolling circle amplification in a prokaryotic translation system using small circular RNA <i>Angewandte Chemie International Edition</i> , 52(27), 7004–7008 (2013).
5.	Yasutsugu Tamura, Kazuhiro Furukawa, Rei Yoshimoto, Yuto Kawai, Minoru Yoshida, Satoshi Tsuneda, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe Detection of Pre-mRNA Splicing in vitro by an RNA-Templated Fluorogenic Reaction. <i>Bioorganic Medicinal Chemistry Letters</i> , 22(23), 7248–7251 (2012).

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件

1. 発明の名称: 環状 RNA 及びタンパク質の製造方法
発明者: 阿部洋、阿部奈保子、伊藤嘉浩、西原みづき
出願人: 理化学研究所
国際出願番号: PCT/JP2013/053095
出願国: 日本・米国に移行予定
2. 発明の名称: 機能性核酸分子の構築法、および当該方法に用いる核酸組合せ物
発明者: 阿部洋、丸山豪斗、伊藤嘉浩
出願人: 独立行政法人科学技術振興機構
国際出願番号: PCT/JP2013/055732
3. 発明の名称: 機能性核酸分子の構築法
発明者: 阿部洋、伊藤美香、伊藤嘉浩
出願人: 理化学研究所
出願番号: 特願 2013-012686
4. 発明の名称: 核酸連結法
発明者: 阿部洋、丸山豪斗



出願人:独立行政法人科学技術振興機構
出願番号:特願 2014-171540

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

プレスリリース

平成 25 年 9 月 6 日 「生きた細胞内での画期的な RNA 検出法を開発」

JST、理化学研究所、北海道大学

上記論文1に関するリリース

遺伝子検出に関する報道

- 日経バイオテクネット 2013 年 9 月 9 日 生きた細胞内での画期的な RNA 検出法を開発
- QLifePro、2013 年 9 月 13 日 生きた細胞内で RNA 検出を可能にする分子プローブを開発
- 日経産業新聞、2013 年 9 月 17 日、細胞を壊さず RNA 検出
- 科学新聞 2013 年 9 月 27 日、遺伝子発現の有無解析「その場検査に応用期待

研究報告書

「柔軟な判断を可能にする神経回路の動作原理の解明と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 宇賀 貴紀

1. 研究のねらい

状況に応じて柔軟に判断をし、多様な選択を行うことはヒトの重要な認知機能のひとつである。これは、感覚入力から行動の生成までの神経回路が、反射のように固定しておらず、柔軟に切り替わることを示している。このような柔軟性の一部は、長期にわたる学習によって獲得され、その神経基盤としてシナプスの可塑性変化が対応すると考えられている。しかし、素早い判断の切り替えはシナプスの可塑性では説明できず、短時間でダイナミックにスイッチする神経回路を必要とする。このようなスイッチ機能は、ヒトの高度な認知機能の根幹を成していると考えられるが、その神経メカニズムは明らかではない。本研究では判断とその柔軟性の神経回路の動作原理の解明を目指す。

我々は、運動方向の判断課題と、奥行き判断課題を用いて知覚判断の切り替えメカニズムの研究を進めてきた。このような知覚判断の有力なモデルでは、感覚受容器からの情報が脳で蓄積(時間積分)され、一つの選択肢に合致する証拠が十分に貯まったら判断が確定すると仮定されている。実際、運動方向と奥行きの感覚情報は、大脳皮質 MT 野に表現され、これらの情報が LIP 野で蓄積されて判断を形成すると考えられている。我々は、これら2つの判断課題をランダムに切り替えるタスクスイッチ課題をサルに訓練した結果、運動方向の判断、奥行き判断、それぞれに特異的に使用される感覚ニューロン群が MT 野に存在し、その2群を使い分けることで判断の切り替えが実現されている可能性を発見した(Sasaki & Uka, Neuron, 2009)。従来、スイッチ機能の作用機序として、不必要な情報が判断に使われないように入力を遮断するという考え方(Gate 仮説)が主流であったが、本研究では一度貯めた情報を時間と共に廃棄する方法(Leaky integrator 仮説)を新たに検証するのがねらいである。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、知覚判断の系を用いた素早い判断の切り替えの神経回路メカニズムを解明した。運動方向の判断課題と奥行き判断課題の2つの知覚判断課題をランダムに切り替えるタスクスイッチ課題をサルに訓練し、知覚・判断それぞれを担当する大脳皮質 MT 野・LIP 野から神経活動を記録、電気刺激し、どの段階でどのようにして素早い判断の切り替えが起きるかを検証した。MT 野には運動方向の判断、奥行き判断、それぞれに特異的に使用される感覚ニューロン群が存在し、2群を使い分けることで判断の切り替えが実現されていることを解明した。また、LIP 野では運動方向・奥行き情報のどちらも蓄積(時間積分)されるが、運動方向・奥行きのどちらかを答えなければならぬかに依存して必要な情報が蓄積され、不要な情報が除去されていること、すなわち、ルールに則って感覚情報の蓄積ゲインが変化し、最終的な判

断に必要な計算がなされていることを解明した。

(2) 詳細

タスクスイッチ課題

タスクスイッチ課題では、運動方向および奥行き判断課題を課した。試行ごとに注視点の色を変え、ランダムに2つの判断課題のどちらかを行なうように指示した(図1、左パネル)。視覚刺激として、CRTモニターにランダムドットステレオグラムを呈示した。運動方向判断の場合、ドットが上向きに動いていたら目を上に向け、ドットが下向きに動いていたら目を下に向けるよう訓練した。奥行き判断の場合、注視点よりもドットが奥にあれば目を上に向け、ドットが手前にあれば目を下に向けるよう訓練した(図1、中パネルと右パネル)。この課題で一番重要なのは、運動方向・奥行きいずれに注目するかにより、行なう行動を「切り替え」なければならない点である。例えば、ドットが上向きに動いていて、手前に存在すれば(図1、中パネル、上から3段目)、運動方向判断を行っている時には上、奥行き判断を行っている時には下と答えなければならない。

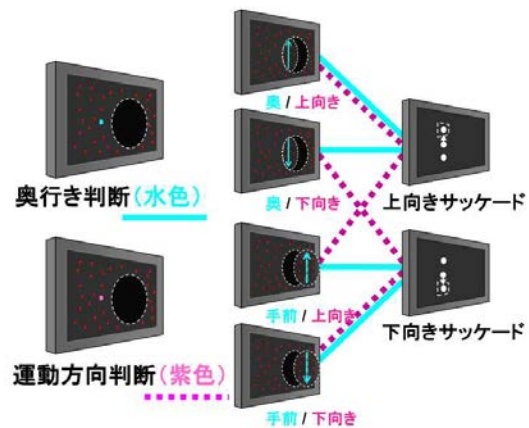


図1 タスクスイッチ課題

研究テーマA 「MT野の電気刺激による判断の切り替えの制御メカニズムの解明」

これまでの研究から、感覚情報表現を司るMT野の活動自体は、行う課題に依存して変化しないことがわかっていた。また、MT野ニューロンの活動と行動との関係については相関のみを解析していた。そこで、ランダムドットを提示中にMT野を電気刺激し、行動への影響を解析した。

従来の研究から、MT野を電気刺激すると、運動方向の判断、奥行きの判断、どちらにおい

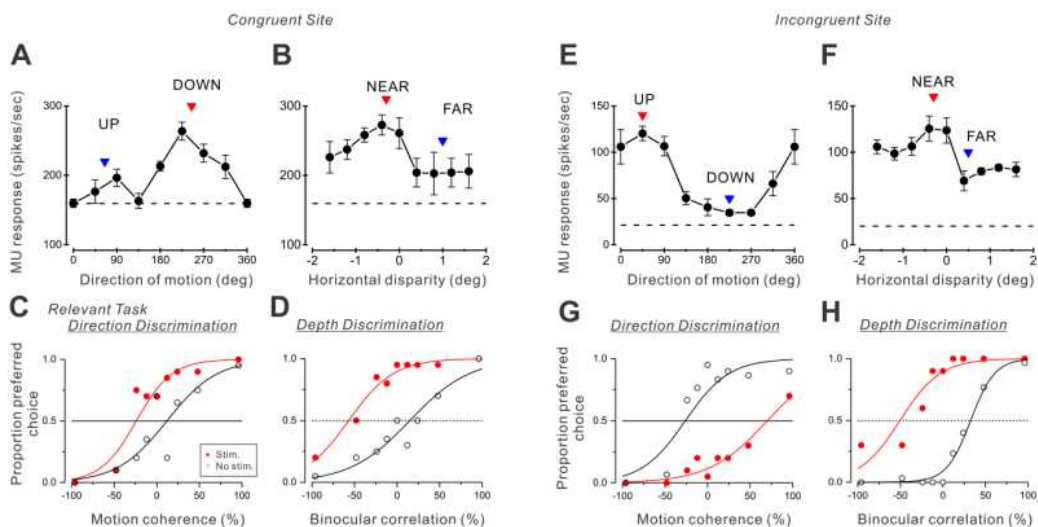


図2 タスクスイッチ課題においてMT野を電気刺激すると、特定の行動が誘発される

ても、刺激したニューロン群の最適方向に判断がバイアスされることが知られていた (Salzman et al., 1992; DeAngelis et al., 1998)。しかしタスクスイッチ課題では、刺激したニューロン群の最適運動方向、奥行きがどちらも同じ行動に関連している場合 (Congruent: 例えば、下/手前; 図 2A、B) は、どちらの判断を行っていても最適方向に判断がバイアスされた (図 2C、D) が、刺激したニューロン群の最適運動方向、奥行きが逆の行動と関連していた場合 (Incongruent、例えば、上/手前; 図 2E、F) は、片方の課題ではニューロン群の最適方向に判断がバイアスされたが、もう片方の課題では最適方向と反対方向に判断がバイアスされた (図 2G、H)。つまり、電気刺激は特定の行動 (例えば目を下に向ける) を誘発したのである。

以上の結果から、MT 野ニューロンの出力は行動特異的であると考えられる。これは、本タスクスイッチ課題を学習する過程で獲得した性質であろう。そして、本タスクスイッチ課題を解く際、脳は課題ごとに MT 野ニューロンを 2 群準備し、ルールに依存して不要な出力を遮断していると予想される。例えば、MT 野には同じ動き・奥行きに反応する領域が複数存在するが、それらの出力は特定の行動を誘発する専用回線として配線され、ルールによって不要な回路が MT 野の後段で遮断されると考えられる (図 3)。

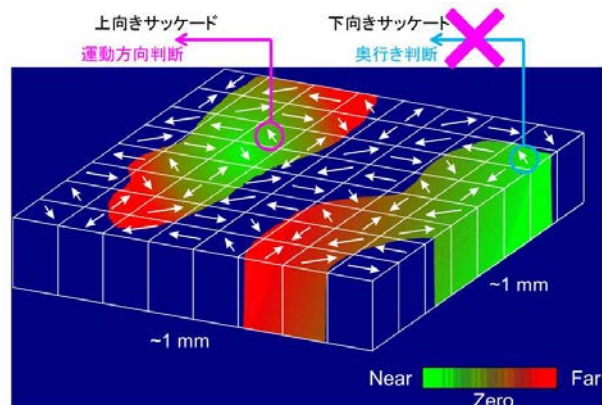


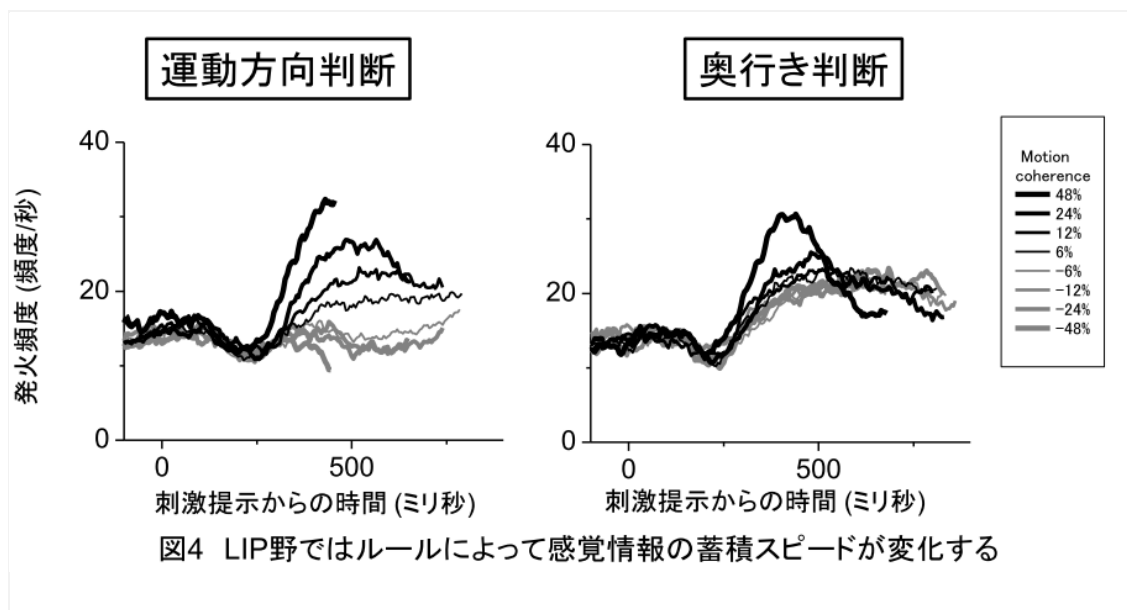
図3 MT野の出力は特定の行動を誘発する専用回線として配線され、ルールによって不要な回路が遮断される

研究テーマ B 「LIP 野の神経活動記録による判断の形成の実態の解明」

続いて、判断の形成過程が垣間見える頭頂葉の LIP 野から神経活動記録を行った。ここまでの研究では、一定時間視覚刺激を呈示した後にサルの判断を測定していたが、判断形成過程をニューロンレベルで見ると、反応時間を測定した方がよい。そこで、正解がわかった瞬間に答えられるよう、タスクスイッチ課題を改変した。

LIP 野ニューロンでは、感覚情報が時間積分される過程が見られ、その活動が一定の値に達すると判断が確定すると考えられている。その根拠として、LIP 野ニューロンは運動方向判断の反応時間課題において、刺激強度に依存した漸増 (build up) 活動を示し、判断の指標となる眼球運動の直前に活動がそろうことが挙げられる (Roitman & Shadlen, 2002)。

タスクスイッチ課題においては、運動方向判断と奥行き判断のどちらにおいても刺激強度に依存した漸増活動が見られた。また、どちらの課題を行っているときでも、眼球運動の直前に活動がそろうていた。さらに、刺激強度に依存した漸増活動、すなわち感覚情報の蓄積速度は、課題によって異なっていた (図 4)。これらのことは、課題に依存して必要な情報を蓄積し、不要な情報を除去した後、LIP 野ニューロンが運動方向・奥行き情報を統合し、サッケード方向の判断を行っている可能性を示唆している。すなわち、ルールに則って感覚情報の蓄積ゲインが変化し、最終的な判断に必要な計算がなされていると考えられる。



3. 今後の展開

判断の柔軟性の基盤となる積分器神経回路の分子メカニズムの解明を目標とする。積分器神経回路の最も一般的な神経回路モデルによると、積分器神経回路には①NMDA 受容体②再帰的回路③相互抑制が重要であると考えられている。そこで今後はそれぞれを制御することを目指す。最初に NMDA 受容体に着目し、NMDA 受容体拮抗薬の全身投与と神経活動記録の併用により、NMDA 受容体が積分器神経回路に重要であるのか、そうであれば判断のどの部分に作用するのかを drift diffusion model (DDM) と絡めて解明する。続いて、NMDA 受容体拮抗薬の局所投与と神経活動記録の併用により、どの脳領域の NMDA 受容体が重要なのかを解明する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

当初目標に掲げた MT 野の電気刺激実験および LIP 野の神経活動記録実験は完了し、前頭前野 (PFC) の研究は最終準備段階に入った。よって、目標はおおむね達成できた。また、本研究を進めていく過程で、判断の柔軟性に必要な神経回路の動作原理のみならず、神経回路の実体の解明に関するアイデアも蓄えることができ、非常に有意義な期間であった。

マカクザルを用いたシステム神経生理学研究は、脳を情報処理器官として捉え、脳の中で行われている計算を理解するには重要な手法である。特に霊長類で発達した認知機能の計算原理の解明には必須である。本研究では霊長類で特に発達したと思われるタスクスイッチングを研究した。タスクスイッチ課題をサルーニに訓練するのは難しく、世界でも成功している研究室は数少ない。そのためか、多くの研究室では数百試行のブロックごとにスイッチさせており、1 試行毎に課題をスイッチするのに成功しているのは私の研究室のみである。これまでに訓練方法に関する問い合わせを数多くいただいており、世界から注目されている。

今後、本研究の成果が認知症など認知機能障害の病態解明につながることを期待され

る。その目標達成に向け、日々精進していきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

状況に応じて適切な行動選択を判断することは反射行動や本能行動と異なり神経回路機能の最も高度なものの一つである。本研究はその神経回路基盤の解明に挑んだものである。サルにランダムドットステレオグラムを提示し、ドットの運動方向と奥行きを眼球運動により判定できる課題訓練を施し、大脳皮質 MT 野および LIP 野とから神経活動を記録して、柔軟で素早い判断の切り替えに伴う神経信号を解析したところ、MT 野には運動方向判断と奥行き判断それぞれに特異的に使用されるニューロン群が存在し、その 2 群を使い分けることで判断の切り替えが実現すること、さらに LIP 野では運動方向・奥行き情報がともに時間積分されるが、報酬によりランダムに要求される判断モードに柔軟に対応して必要な情報が蓄積され、不要な情報が除去されることを見出したことは非常に興味深い成果である。またこのような高難易度のタスクスイッチ課題をサルに課して成功したことは世界的にも追従を許さない成果と言える。今後 LIP 野での積分器の回路実体とその上流機構の解明が進展することが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Mitani A, Sasaki R, Oizumi M, Uka T. A leaky-integrator model as a control mechanism underlying flexible decision making during task switching. PLoS One. 2013, 8, e59670.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Takanori Uka, Studying flexible decision making using perceptual decisions. Symposium “Neural circuitry for visual cortical processing”, The 9th Asia-Pacific Conference on Vision (APCV 2013), Suzhou, China, July 5th-8th, 2013.

宇賀 貴紀、柔軟な判断の神経基盤、ブレインサイエンス・レビュー2014 pp39-56 (公財)ブレインサイエンス振興財団 廣川信隆編。

研究報告書

「ガイダンス因子シグナルで普遍的に駆動されるシグナル伝達経路の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 生沼 泉

1. 研究のねらい

低分子量 G 蛋白質 R-Ras は細胞外マトリックスへの接着刺激により細胞内で活性化され、さらに逆に、この活性化された R-Ras が細胞内から(inside-out)に細胞接着因子受容体、インテグリンを物理的に活性化分子構造にし、細胞外マトリックスへの親和性を上昇させることで、細胞接着におけるポジティブフィードバックを担う。一方、反発性ガイダンス因子 semaphorin(Sema)受容体、Plexin はそれ自身の持つ R-Ras GAP 活性により R-Ras を不活性化し、このポジティブフィードバックループの一点を抑制することで、インテグリン活性化を効率的に抑制し、神経軸索の伸長を抑制する。最も基本的で普遍的な細胞機能の1つにおいて R-Ras を介した増幅機構が存在し、また、様々なガイダンスシグナルシグナルにおいて、その機構の制御による細胞接着の制御が普遍的・中心的役割を担っていると予想されることから、R-Ras の情報伝達経路の理解は、ガイダンス因子シグナルの普遍的駆動原理の理解に繋がる。本研究は、個々の分子要素の同定を行い、それらの分子イメージングおよび細胞内・生体内での機能解析で得られるデータを手がかりに、種々の誘引性・反発性ガイダンスシグナルにおいて普遍的に駆動される情報伝達機構の発見へとつなげることを、目標として掲げた。

2. 研究成果

(1) 概要

発生期に生まれた神経細胞は、個々の特定の位置に移動し、軸索および樹状突起を適切な標的細胞に伸展させ、やがてはシナプスを形成することにより神経回路が形成される。神経回路網は複雑であるものの、正確で厳密にできており、これを可能としているのは神経ガイダンス因子の誘導作用である。神経ガイダンス因子には、大きく分けて、神経繊維に誘引的に働き伸長に促進的に働く誘引性因子と、忌避的に働き伸長に抑制的に働く反発性因子の2つがあり、神経細胞は軸索の先頂部にある成長円錐という構造体で、神経細胞周辺に存在するそれらの因子を感知しながら、伸長の方向性を判断している。

これまでのガイダンス因子シグナル伝達研究は、個々のガイダンス因子に特化された報告が散漫に羅列されている状態で、「ガイダンス応答」という全体的視野では有機的に捉えられていなかった。さらに、軸索と樹状突起という、2つの性質の異なる神経突起形態制御が同じシステムに依っているのかも不明であった。その状況で、われわれは、最終的に伸長や方向性の決定がどのような細胞内シグナルに統合され、神経細胞内において、形態変化や進路の「判断」を下しているかのメカニズムに興味を持ち、数々のガイダンス因子の下流で活性制御が行われている R-Ras ファミリー低分子量 G 蛋白質

を窓とし、研究を行った。その一連の研究成果をここに報告する。

(2) 詳細

1) 軸索の分枝化のエフェクターの同定

われわれのこれまでの研究で、R-Ras は神経軸索の形成に必要であることが明らかになっている。さらに最近の研究で、反発性ガイダンス因子 Sema の1つ、Sema4D は軸索の分枝を減少させ、また、誘引性ガイダンス因子 netrin-1 の刺激は逆に、軸索の分枝を増加させることがわかっている。しかしながら、どのような分子機構で軸索分枝の形態を制御するかは不明であったので、われわれは R-Ras による軸索の形態制御に必要な下流のエフェクター分子の同定を試みた。酵母のツーハイブリッドシステムを用いた結合蛋白質のスクリーニングにより、活性型 R-Ras の結合蛋白質として、アクチン細胞骨格に連結した足場蛋白質である Afadin を得た。Afadin は N 末端側に RA ドメイン(Ras 蛋白質結合ドメイン)を有する蛋白質で、*in vitro* での結合実験により、R-Ras は活性(GTP 結合)依存的に Afadin の RA ドメインに直接結合することが明らかになった。

また、初代培養神経細胞における内在性 Afadin 蛋白質の発現を調べたところ、大脳皮質および海馬由来の神経細胞のいずれにおいても、Afadin は培養初期の軸索の形成時期に多く発現していることがわかった。また、培養2日目の初代培養大脳皮質神経細胞を用いた免疫沈降実験によって、内在性の R-Ras と Afadin の結合が確認され、内在性の Afadin は軸索の先頂部の成長円錐および、分岐部分に F-actin と共局在するかたちで集積していた(図1)。

次に、初代培養大脳皮質神経細胞の軸索形態における R-Ras および Afadin の役割を検討した。活性型の R-Ras を大脳皮質神経細胞に発現させると、神経軸索の分枝化が引き起こされ、この分枝化は内在性 Afadin のノックダウンにより阻害されることがわかった。さらに、R-Ras による Afadin を介した軸索分枝の増加の分子メカニズムを検討したところ、Afadin はそれ単独では大部分が細胞質画分存在するが、活性型 R-Ras が結合することにより、細胞膜へと移行した。Afadin を強制的に細胞膜に移行させる CAAX シグナルを付加した Afadin-CAAX を大脳皮質神経細胞に発現させておいた神経細胞では、著しい軸索分枝の増加が認められ、膜移行と軸索分枝の機能相関が示された。

さらに、下流のシグナル伝達経路についても検討した結果、R-Ras および Afadin を介した軸索分枝化には Afadin の C 末端のアクチン結合ドメインが必要であり、実際に、R-Ras および

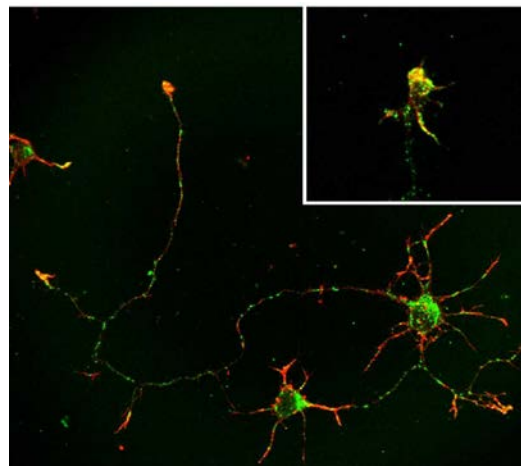


図 1. 大脳皮質神経細胞内在性の Afadin の局在

培養 2 日目の大脳皮質初代培養神経細胞における Afadin(赤色)の細胞内局在を F-actin(緑色)との共染色で示す(右上の挿入写真は、軸索先端の成長円錐の拡大写真)。

Afadinによる軸索分枝化は、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン B により、阻害された。以上の結果から、神経細胞において R-Ras は Afadin を介したアクチン細胞骨格再編成により軸索の分枝化を制御することを明らかにできた(参考文献 1)。

2)樹状突起伸長・分枝化のエフェクターの同定

R-Ras サブファミリーは R-Ras(R-Ras1)、TC21(R-Ras2)、および M-Ras(R-Ras3)からなり、われわれは過去に、R-Ras が軸索の形態制御、M-Ras が樹状突起の形態制御を行っているという研究成果を報告している。しかしながら、M-Ras がどのような分子機構で樹状突起の形態を制御するかは不明であったので、M-Ras による樹状突起形成に必要な下流のエフェクターの同定を試みた。データベースを用いた結合蛋白のスクリーニングにより、M-Ras の新奇結合蛋白質として、アクチン細胞骨格系制御因子 Ena/VASP 蛋白質の結合蛋白質である Lamellipodin (Lpd) を得た。Lpd は N 末端側に RA ドメインを有する蛋白質であり、*in vitro* で結合実験により、M-Ras は活性依存的に Lpd に直接結合することが明らかになった。また、大脳皮質初代培養神経細胞において、M-Ras と Lpd の内在性の結合が確認された。

次に、樹状突起形成における Lpd の役割を検討した。われわれは以前の報告で、恒常的活性型の M-Ras (M-RasQL) を過剰発現させると、大脳皮質神経細胞において樹状突起伸長や分枝の増加が引き起こされることを明らかにしている。この条件において、内在性の Lpd を shRNA を用いてノックダウンしたところ、M-RasQL による樹状突起伸長が抑制された。以上の結果から、Lpd は M-Ras による樹状突起伸長作用に必須であることが明らかになった。

われわれは以前の報告で、反発性ガイダンス因子 Sema 受容体、Plexin はそれ自身の持つ R-Ras GAP 活性により直接的に R-Ras を不活性化し、神経細胞の軸索に対して反発作用を示すことを明らかにしているが、今回の研究で、Sema4D 刺激によって軸索に加え、樹状突起が退縮し、それに伴ってアクチン骨格が樹状突起の先から消えて無くなっていることがわかった(図 2)。さらに、これらの樹状突起の分枝の退縮やアクチン骨格の消失は、M-RasQL を導入しておくことで、阻止されたことから、Sema による樹状突起の分枝の退縮には受容体の Plexin が M-Ras に対する GAP 活性を発揮して M-Ras の活性を抑制することで、アクチン骨格の崩壊を引き起こすことが必要であることが明らかになった。

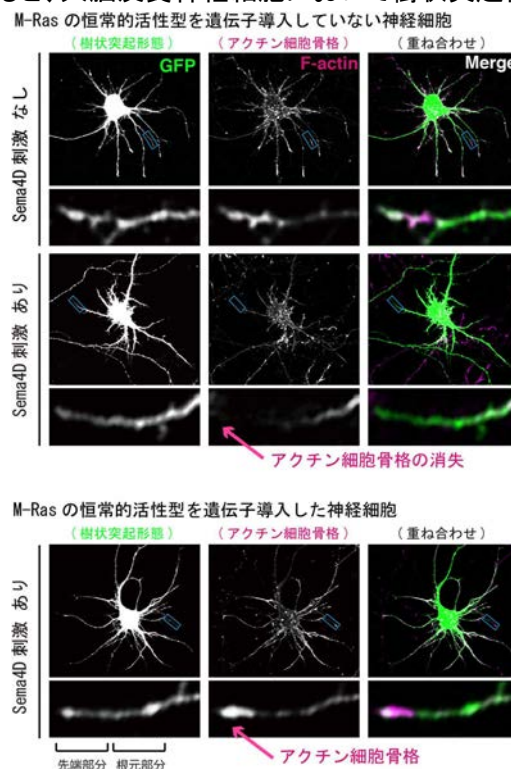


図 2. Sema4D 刺激が大脳皮質神経細胞の樹状突起先端のアクチン細胞骨格に与える影響
培養 7 日目の神経細胞に Sema4D 刺激を 90 分間行い、観察した。

さらに、分子メカニズムを詳細に検討したところ、M-RasQL は Lpd に結合してそれを細胞膜へ運ぶ作用があることが生化学的な分画実験により明らかになった。一方で、不活性型である M-RasSN にはそのような作用はなかった。このことから、Lpd は M-Ras の活性依存的に細胞膜へ運ばれると考えられる。大脳皮質神経細胞に Sema4D 刺激を加えると、膜画分に存在する Lpd の量が減少していた。Lpd に CAAX シグナルを付加した Lpd-CAAX を大脳皮質神経細胞に発現させておいた神経細胞では、Sema4D によって引き起こされる樹状突起の退縮が阻止された。

これらの結果から、Sema が無い状態では受容体の Plexin が活性化されていないため、樹状突起内の M-Ras の活性が高いため、Lpd が樹状突起の先端の細胞膜へ運ばれ、アクチン骨格系の伸長が起こるが、Sema が存在すると、受容体の Plexin の GAP 活性が活性化され、樹状突起内の M-Ras が不活性化状態に変換されることによって、Lpd が樹状突起の先端の細胞膜へ運ばれなくなり、アクチン骨格系の伸長が抑制されるということがわかった (図3)。また、今回の成果により、Plexin による R-Ras GAP 活性発揮のシステムは、軸索と樹状突起という、性質の異なる神経突起における共通のシグナル機構であることを明らかにできた(参考文献 2)。

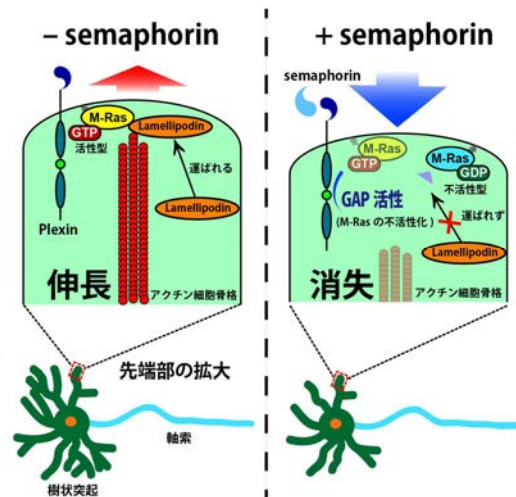


図 3. semaphorin 刺激によって引き起こされる Plexin の GAP 活性を介した樹状突起先端のアクチン細胞骨格制御のモデル

3. 今後の展開

本プロジェクトによって、神経細胞の分枝化および伸長に必要な細胞骨格制御に必要なエフェクターを明らかにできた。また、反発性ガイダンス因子受容体 Plexin による R-RasGAP システム (R-Ras 不活性化システム)は、軸索と樹状突起という、2つの性質の異なる突起の形態制御において共通のメカニズムであることが明らかになった。今後は、同定したエフェクターが種々のガイダンス因子の下流で普遍的に使われているのかを検討することで、シグナル集約点として働く分子であるかを見たい。その上で、ガイダンス応答過程での軸索成長円錐および樹状突起先端部の高詳細なイメージングおよびそれに基づいた数理モデル解析を行うことにより、突起が様々なガイダンス情報を汲み取って最終的に自らの進路(あるいは伸長)を判断するに至る閾値(いわば、判断基準)を明らかにしたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では、さまざまな誘引性・反発性ガイダンス因子のシグナル統合地点としての R-Ras に着目し、その下流のエフェクターを2つ同定できた。さらにそのエフェクターはいずれも、細胞

形態調節で最も基本的役割をもつ、アクチン細胞骨格の再編成を直接的に制御する分子だった。さらに、軸索の形態制御だけでなく、樹状突起の形態制御においても共通に駆動されるシステムとしての R-Ras GAP システムの位置付けを明らかにすることができた。また、現段階では誌上公表には至っていないが、2期生の戸島拓郎博士(理研BSI)に技術的アドバイスをいただき、同定したエフェクターの軸索先端部成長円錐の局所での速い動きを全反射顕微鏡でイメージングすることに成功しており、さらにその局在がガイダンス因子刺激で制御されることを確認している。さらに、領域会議においてアドバイザーの先生からご意見をいただき、同定したエフェクターの *in vivo* での役割を検証する必要性を感じ、1期生の松田孝彦博士(京都大学 iCeMS)に *in vivo* での遺伝子発現誘導システムの技術を学び、*in vivo* での機能解析実験にも着手し、成果を得ている。これらの研究はさきがけに参画していなかったら為し得なかったものであり、さきがけに参画したことで、今後長い研究人生の中での自身の研究の幅が大きく広がったことを実感しており、その点を期間中の論文発表実績以上に、自身では評価している。

本研究の成果は、一見すると地味な基礎研究である。しかしながら、損傷神経において損傷部位周辺では、神経細胞は一定期間生存しているものの、sema などの複数の反発性ガイダンス因子が発現誘導されることにより、損傷神経繊維の再生が阻害されることが明らかになっており、それぞれの反発性ガイダンス因子に対応する阻害剤の開発は既に、様々な研究者や企業によって進められているが、あくまでもそれらは、特定の因子に対する阻害作用をもつものでしかない。われわれの研究を発展させ、シグナル統合地点である R-Ras の活性操作およびその直下のエフェクターの活性制御をすることにより、再生阻害因子環境中においても効率良く機能的な神経繊維再生が可能になると信じている。

また、ガイダンス因子情報伝達に関する一連の成果の積み重ねにより、各種受賞に至ったことにも、この場に感謝の意を表したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

神経細胞の軸索や樹状突起がどうして正しい方向に伸長してゆくことができるのかは神経科学の長年の課題であり、多数の誘引性あるいは反発性ガイダンス因子が同定され細胞接着分子の関与が研究されてきたが、それらのシグナルが細胞内でどう処理、伝達、統合されるかについてはほとんど不明であった。生沼研究者らは先に低分子量 G 蛋白質 R-Ras の関与明らかにしてきたが、本課題は軸索に対する誘引性ガイダンス因子 netrin-1 刺激の下流において R-Ras が Afadin に結合して細胞膜への移行を引き起こし、アクチン細胞骨格再編成により軸索分枝を呈すること、一方樹状突起においては M-Ras がアクチン細胞骨格系制御に関わる Lamellipodin に結合すること、さらに反発性ガイダンス因子 Sema4D 受容体 Plexin-B1 の下流の R-Ras の関与は軸索と樹状突起に共通であることなどを、神経細胞プライマリーカルチャー系を用いた精力的な実験によって明らかにしたことは大きな成果であり、課題をほぼ達成したものと言える。これらの成果は論文発表も行っている。今後は同定したエフェクター系が他のガイダンス因子にも普遍的なものであるかの解明が注目されるとともに、軸索成長円錐および樹状突起先端部の詳細な解析と *in vivo* での検証が大いに期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Nariaki Iwasawa, Manabu Negishi, and * <u>Izumi Oinuma</u> (2012)
R-Ras controls axon branching through Afadin in cortical neurons.
<i>Molecular Biology of the Cell</i> 23:2793–2804. |
| 2. Gen-ichi Tasaka, Manabu Negishi, and * <u>Izumi Oinuma</u> (2012)
Semaphorin 4D/Plexin-B1-mediated M-Ras GAP activity regulates actin-based dendrite remodeling through Lamellipodin.
<i>The Journal of Neuroscience</i> 32:8293–8305. |
| 3. * <u>Izumi Oinuma</u> , Kana Kawada, Kiyoka Tsukagoshi, and Manabu Negishi (2012)
Rnd1 and Rnd3 targeting to lipid raft is required for p190 RhoGAP activation.
<i>Molecular Biology of the Cell</i> 23:1593–1604. |

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表、招待講演

1. 生沼泉
神経軸索ガイダンス分子セマフォリンの情報伝達機構
平成26年度日本生化学会奨励賞、受賞講演
2014年10月15日(国立京都国際会館)
2. 生沼泉
軸索形態調節におけるR-Rasの役割
第7回神経発生討論会
2014年3月14日(大阪大学)
3. 生沼泉、根岸学
軸索形態調節におけるR-Rasシグナル
第86回日本生化学会大会、シンポジウム
「神経回路形成のシグナル伝達クロストークを解くー神経再生応用に向けて」
2013年9月13日(パシフィコ横浜)
4. 生沼泉
神経軸索ガイダンス因子の情報伝達経路の解明
第15回花王研究奨励賞、受賞公演
2013年6月13日(花王芸術・科学財団)

5. Izumi Oinuma

R-Ras family GTPases in semaphorin signaling

日米脳科学情報交換セミナー

「Growth Cones and Axon Regeneration: Entering The Age of Informatics」

2012年10月10日(米国ニューオリンズ)

6. 生沼泉、根岸学

神経回路形成における R-Ras サブファミリーの役割

第31回日本神経科学大会、シンポジウム

「次世代の担い手による最先端脳科学」

2012年9月19日(名古屋国際会議場)

受賞

- 2014年 日本生化学会奨励賞
「神経軸索ガイダンス分子セマフォリンの情報伝達機構」
- 2013年 第5回 井上リサーチアワード
「神経ガイダンスの分子基盤の解明-神経再生応用に向けて」
- 2013年 第15回 花王研究奨励賞
「神経軸索ガイダンス因子の情報伝達経路の解明」

プレスリリース等

- 2012年6月13日
The Journal of Neuroscience に掲載された論文の内容に関して、京都新聞(夕刊6面)に、「神経細胞の成長制御-再生応用に期待」というタイトルの記事として報道された。(右の記事)
- 2012年8月6日

われわれの近年の semaphorin による神経軸索の伸長阻害作用の分子メカニズムに関する研究内容

MONDAY
の岡野栄
間報道さ
(下の記

脊髄損傷治療に光見える

セマフォリンは、神経が伸びてくるのを阻むことにより、無秩序な配線を防ぎたい。京都大の生沼泉助教らは、マウスの実験で、神経の突起の人格Vとなる物質を消失させて伸びを防ぐ仕組みを突き止めた。

脊髄損傷の場合は、この仕組みは、切れた神経の再生に邪魔になる。セマフォリンの働きを少し弱めてやれば、脊髄損傷の治療が可能になるかもしれない。

慶応大の岡野栄之教授らと大日本住友製薬は、セマフォリンの働きを阻害する化合物を発見。脊髄損傷のラットに4週間投与すると傷ついた神経が一部再生し、後ろ足の動きが改善したという。

(木須井麻子、今津博文)

神経細胞の成長制御

京大グループ発見 再生に応用期待

脳の神経ネットワークの田坂元一さんたちのグループが見つけた。樹状突起が、正しい向きや形に成長するように制御するタンパク質を、京都大生命科学研究所の生沼泉助教や根岸学教授、大学院生

樹状突起は木の枝のように分岐しており、樹状突起や信号を送り出す神経細胞の軸索が正しく伸びないと、神経回路が絡まって混乱が起こる。グループは軸索が伸びるときに「道しるべ」として働くタンパク質セマフォリンが、樹状突起でも道しるべとして働くことを突き止めた。マウスの胎児を使った実験で、セマフォリンの働きを阻害すると、脳の樹状突起の枝分かれが大幅に増えて絡み合うようになり、交差する状態になった。

セマフォリンは人にもあり、同様の働きをしている可能性が高いという。生沼助教は「セマフォリンの働きを阻害することで、事故などで損傷した神経の樹状突起の成長を促すことができるかもしれない。成長に関する他のタンパク質も見つけた」と話している。

(松尾浩道)

について、読賣新聞の科学(朝刊31面)において、慶応大学光之教授の研究成果とともに、新れた。事)



研究報告書

「神経細胞における膜タンパク質選別輸送システムの順遺伝学による 解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 佐藤明子

1. 研究のねらい

機能的な神経細胞ネットワークが形成されるためには、個々の神経細胞が軸索・シナプス・樹状突起などの高度に分化した機能ドメインを形成し維持する必要がある。その基盤として、それぞれの機能ドメインに特有のタンパク質を適切に輸送する選択的で調節性の細胞内選別輸送システムが必須である。しかし、そのような細胞内選別輸送の基本的な機構、ならびにその調節機構は、いまだ十分に解明されていない。

本研究では、複数の明瞭な機能ドメインを持つショウジョウバエ視細胞を用いて、各々の膜ドメインへの選別輸送に関わる因子を準飽和レベルで単離し、それを種々の神経細胞で解析することにより、単一神経細胞内の膜ドメインの分化機構と、**神経細胞の多様性実現と神経細胞ネットワークの形成において選別輸送システムが果たす役割**を解明することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

機能的な神経細胞ネットワークが形成されるためには、個々の神経細胞が軸索・シナプス・樹状突起などの高度に分化した機能ドメインを形成し維持する必要がある。その基盤として、それぞれの機能ドメインに特有のタンパク質を適切に輸送する選択的で調節性の細胞内選別輸送システムが必須である。しかし、そのような細胞内選別輸送の基本的な機構、並びにその調節機構は、いまだ十分に解明されていない。

私の研究グループでは、ショウジョウバエ網膜を用いての極性輸送機構の研究に取り組んでいる。ショウジョウバエ視細胞は、頂端面の一部が増幅した光受容膜・その周辺のストーク膜・側底面膜・軸索とシナプスという少なくとも 4 つの明瞭に分極化した細胞膜区画を持つ。さきがけ研究では、EMS 処理したハエについてロドプシンの光受容膜への合成・輸送に関わる因子の網羅的スクリーニングを試みた。さきがけ研究期間中にショウジョウバエの主な染色体腕 5 つのうちの 3 腕について準飽和レベルでスクリーニングを行うことに成功し、322 の変異体を単離した。本報告では、この内、2 グループの変異体についてその表現型と原因遺伝子、また、そこからわかってきたロドプシンの合成輸送に関する知見を紹介する。また、スクリーニングとは別に、側底面輸送の分子機構について新たな知見を得たので、こちらも紹介したい。

(2) 詳細

1) Rab6 は、2 つの頂端面への輸送に関与するが、側底面への輸送には関わらない。一段階的な選別機構が存在する

ロドプシンが光受容膜に蓄積しない変異体の 1 つ、546P 変異体についてロドプシン輸送開始実験(BLICS)を行い、ロドプシン輸送の阻害される過程を詳細に解析した。その結果、546P 変異体ではロドプシンは正常に合成されゴルジ体へ正常に輸送されたが、ゴルジ体から光受容膜への輸送が欠損していた。特に、ゴルジ体にロドプシンが蓄積した後、直接エンドソームマーカーを伴ってゴルジ体から出芽し、そのまま分解すると考えられた(図 1)。また、この変異体では光受容膜への輸送のみならず、ストーク膜への Crb, Eys の輸送も阻害されていたが、Na⁺K⁺ATPase の側底面への輸送は正常であった。表現型の原因となる変異を同定した結果、Rab6 遺伝子に入ったノンセンス変異が原因であることが分かった。546P 変異体に野生型の Rab6 を発現させることでレスキューされること、また Rab6 の別のヌル対立遺伝子でも同じ表

現型が観察されたため、546P 変異体の表現型の原因は Rab6 の欠損であると結論づけた。Rab6 はゴルジ体内部の輸送やポストゴルジ小胞の輸送に関わることが他のシステムにおいて報告されている(Barr, 2009 Semin. Cell Dev. Biol; Storrie, et al., 2010 Traffic)。Rab6 抗体を作成し、その局在を詳細に観察した所、ゴルジ体の trans 面から Rab11 で標識されるリサイクリングエンドソーム(RE)にかけて染色が見られた(図 2)。ゴルジ体の trans 面/TGN では側底面輸送に関わると考えられるクラスリンの重鎖との共局在が観察された。これらの結果から、ショウジョウバエ視細胞では、ゴルジのトランス面或いは TGN において側底面膜へ輸送されるタンパク質の選別が行われ、2 つの頂端面膜へ向かうタンパク質は Rab6 によって一緒に TGN から RE に送られた後、RE で選別されると考えられた(図 3)。これにより多方向へ送られる膜タンパク質の選別が段階的に起ることが明らかとなった(論文準備中)。

BLICS 90min Rab7 Rh1 p120

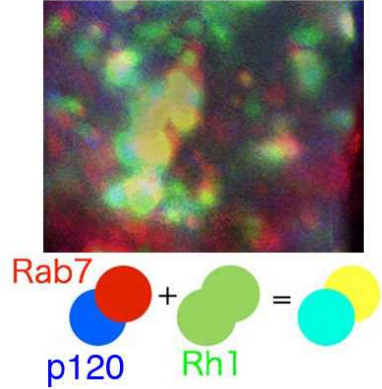


図 1 546P 変異体では輸送開始後 90 分では、ゴルジ体 (p120) とエンドソーム (Rab7) が隣り合って存在し、Rh1 は両方に分布している。

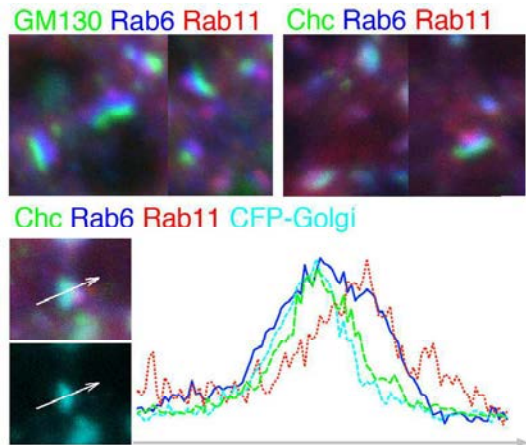


図 2 Rab6 は TGN から RE に局在する。CFP-Golgi は Trans 嚢/TGN マーカー。

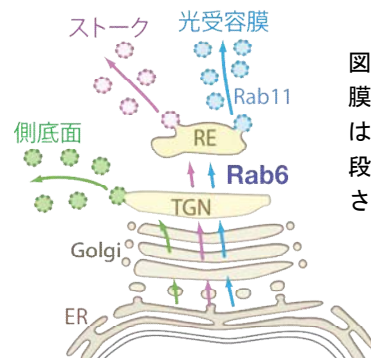


図 3 膜タンパク質は TGN, RE で段階的に選別される。

2) EMC は複数の膜貫通ドメインを持つ膜タンパク質の合成またはフォールディングに必要である。

真核生物のほとんどの分泌タンパク質・膜タンパク質は、ER 膜上のリボソームにより合成され、トランスロコンにより ER 内腔に輸送、あるいは ER 膜に組み込まれる。ER 膜での膜貫通ヘリックスの脂質二重膜への挿入は、新生鎖の翻訳に並行して随時行われると考えられており、この過程にはトランスロコンに加え TRAM や TRAP/SSR などが関与することが報告されているが、特に複数回膜貫通タンパク質の組み込みのメカニズムは完全に解明されたわけではない。

ロドプシンの光受容膜への合成・輸送に関わる因子の網羅的スクリーニングにより、酵母で同定された ER 膜内で複合体を形成する膜タンパク質群、EMC (ER membrane protein complex) のサブユニットである EMC3 の発現低下変異体 (後にヌル変異を作成)、EMC1、EMC8/9 のヌル変異体が単離された。EMC は、広く真核生物に存在し、その欠損が UPR (unfolded protein response) をひき起こすことなどから、膜タンパク質のシャペロン機能を持つと考えられている (Jonikas et al., 2009 Science; Richard et al., 2013 PNAS)。

我々の行った解析でも EMC1 は ER に局在しており、その欠損により UPR が誘導されたため、当初は EMC が専らフォールディングに機能すると期待した。ショウジョウバエロドプシンのフォールディングには、プロリン残基を異性化する NinaA が関与しており、NinaA の欠損ではロドプシン合成中間体が小胞体内部に蓄積するので、EMC 欠損細胞での合成中間体の観察を試みたが、その蓄積は全く観察されなかった。さらに EMC/NinaA 二重変異体でもロドプシン合成中間体の蓄積は観察されず、EMC は NinaA よりも早い段階で働くことが示された。このような EMC 欠損のロドプシン合成中間体に対する効果は カルネキシン変異体の表現型と一致している (Rosenbaum et al., 2006, Neuron)。さらに、免疫共沈降法では EMC1・EMC3 がカルネキシンと相互作用していることが分かった。一方、EMC とロドプシン合成中間体や Sec61 との結合は観察されなかった。さらに、EMC 欠損におけるロドプシン合成中間体の欠損が ERAD による分解のためであると考えて、ERAD 変異体との二重変異体の解析を行ったが、ロドプシンの合成中間体を蓄積させる事はできなかった。用いた ERAD 変異体の中には、実際にロドプシンのフォールディング変異体の膜からの引き抜きを阻止できる事が示されている VCP/ter94 の変異体も含まれている (Griciuc et al., 2010, PLoS Genet.)。これらの結果は、EMC は ロドプシンが膜に完全に挿入されてから作用するのではなく、全てのヘリックスが膜に挿入し終わる以前、おそらく新生鎖の段階で作用することを示唆している (図4)。

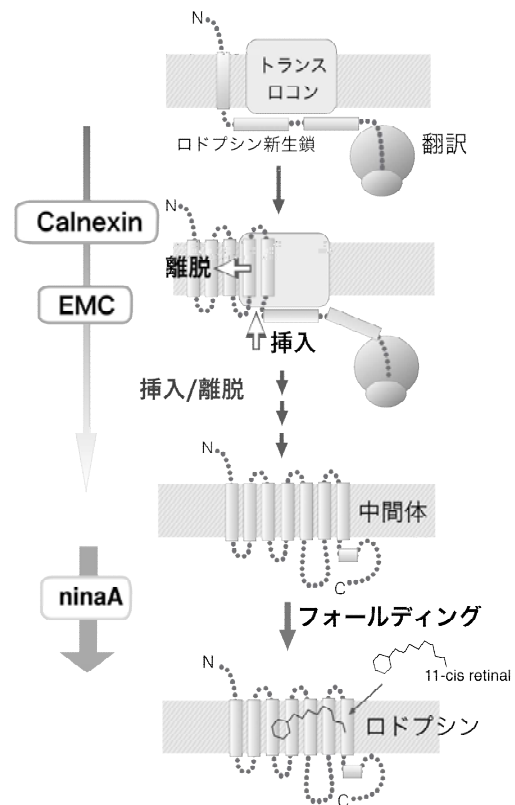


図4 EMC は複数膜貫通タンパク質の新生鎖のヘリックスの挿入/離脱に作用すると考えられる。

興味深い事に、EMC ヌル変異視細胞ではロドプシンだけでなく、調べた全ての**複数回膜貫通タンパク質**が発現していなかったが、対照的にI型, II型, IV型の1回膜貫通タンパク質や分泌タンパク質は正常に発現していた。これらの結果からEMCはER膜透過やフォールディングよりも、**複数の膜貫通ヘリックスを持つ新生鎖の ER 膜への挿入**に関与している可能性が高いと考えられた(論文準備中)。

3) ショウジョウバエ視細胞の側底面膜への極性輸送には哺乳類上皮細胞と同様に AP1 が関与する。

側底面膜への極性輸送については哺乳類の上皮細胞を用いた解析が進んでおり、既にAP1B, クラスリンが関与することが分かっている。ショウジョウバエで唯一の AP1 の欠損変異視細胞の解析を行った。その結果、光受容膜へのロドプシンの輸送やストーク膜への Crb, Eys の輸送は正常であったが、側底面へ輸送される Na⁺K⁺ATPase が誤ってストーク膜にも輸送され、正常よりも長いストークを形成していた。この結果は、ショウジョウバエ視細胞の側底面への輸送にも AP1 が関与することを示している (Sato et al, 2013)。

3. 今後の展開

今後は、ロドプシンの光受容膜への合成・輸送が欠損する変異として単離した 322 変異体のうち、まだ詳細な解析を行えていない変異体についてロドプシン輸送の欠損段階の同定や変異遺伝子の同定をすすめると同時に、側底面膜やストーク膜への輸送に関わる因子についても明らかにしていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

EMS により変異導入したハエについて網羅的スクリーニングを行い、重要と考えられる変異体に関して次世代シーケンサーを用いた全ゲノム再シーケンスとマッピングを簡便に行い、迅速に遺伝子同定を行うことに成功した。現在研究室主催の専門実習において学部3年生でも原因となる変異の同定が可能となった。しかし、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム再シーケンスは、さきがけ研究期間中に費用が著しく下がると予測されていたが、予想以上に技術革新は遅く、未だ1系統に10万円ほどかかっており、網羅的に多数の変異体について原因変異同定することはできなかった。また、表現型の解析は迅速化できず、1つ1つの変異体について膨大な時間を費やしながら評価を行っている。そのため、多数の候補変異体の中で、実際に論文を準備できる段階にまで解析が進んだのは2グループの変異のみであった。膨大な変異体資源と変異同定方法を確立できたので、今後の研究の発展が期待できている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

神経細胞においても細胞膜はその機能に応じたドメインに分かれており、それらを維持調整す

るための膜タンパクを積載した小胞のゴルジ体を経由する輸送は細胞内物流の大きな部分を占めている。ショウジョウバエ網膜の視細胞は頂端面の光受容膜をはじめ 4 個の明瞭に区別できる細胞膜区画を有するため、選別輸送システムの解析に有利な材料である。本研究はこれに着目し、ロドプシンの選別輸送の異常を指標として得ていた 300 以上の変異体の中から数個を選び、遺伝子の解析と細胞生物学的イメージングにより、Rab6 が頂端面への輸送に関与するが側底面への輸送には関わらないことを見出して段階的な選別機構が存在することを発見し、一方 ER 膜内で複合体を形成する膜タンパク質 EMC の 2 サブユニットの解析からは ER 膜におけるロドプシン分子の通過儀礼様式を解明したものである。これまでの成果の一部はすでに論文発表しており、国内学会の招待講演も行っている。今後は立ち上げた独自の系を足掛かりにしてこの細胞内選別膜系輸送システムのより広い展望が開け、またそれらの普遍的意義を明らかにする成果を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Satoh T, Inagaki T, Liu Z, Watanabe R, **Satoh A.K.†** (2013) GPI biosynthesis is essential for rhodopsin sorting at the trans-Golgi network in *Drosophila* photoreceptors. *Development*. 140, 385-94. doi: 10.1242/dev.083683.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 1) **佐藤明子** 分子生物学会 シンポジウム ”細胞の中で膜が動き、ちぎれ、誘導し、いのちが紡がれる”(パシフィコ横浜)(Nov. 24, 2014) 招待講演
“ショウジョウバエ視細胞において Rab6 は 2 つの頂端面への輸送に必要なだが側底面膜への輸送には必要ではない”
- 2) **佐藤明子** 日本学術会議公開シンポジウム(日本学術会議講堂)(July 26, 2014) 招待講演
“ショウジョウバエ視細胞の明暗順応をつかさどる色素顆粒運動の分子機構”
- 3) **Akiko K. Sato** ESF Symposium, Cell Polarity and membrane trafficking (Warsaw in Poland)(May 10, 2014) 口頭発表
“Rab6 is essential for plural apical transport pathways but not for basolateral transport pathway in *Drosophila* photoreceptors”
- 4) **佐藤明子** 細胞内ロジスティクス・シンポジウム(淡路夢舞台国際会議場)(Sept. 18, 2013) 招待講演
“ショウジョウバエロドプシンの合成・輸送の分子機構 –ロドプシン新規シャペロン EMC の同定とその欠損による網膜変性–

準備中の原著論文

1. Rab6 is essential for plural apical transport pathways but not for basolateral transport pathway in *Drosophila* photoreceptors. Iwanami, N. #, Satoh, T. #, Nakamura, Y., Liu, Z. and **Satoh, A.K. †** (in preparation)

2. dPob/EMC is essential for Rhodopsin formation / maturation in *Drosophila* photoreceptors.
Sato, T., Ohba, A., Liu, Z., Inagaki, T. and Sato, A.K. † (in preparation)

研究報告書

「霊長類の高次脳機能を担う大脳皮質神経回路の可視化と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年9月～平成27年3月

研究者: 佐藤 隆

1. 研究のねらい

我々の行動や認知機能を理解するために、脳内における感覚、運動情報変換の神経機構を理解することが重要である。眼球運動は感覚と運動を結びつける最も重要な現象のひとつである。「ものを見る」ためには、眼に入ってくる視覚情報を処理するだけでなく、眼を動かすことで、能動的に必要な視覚情報を収集する必要がある。また、眼球運動は注意などの認知機能とも密接に関係しており、例えば統合失調症の患者では眼球運動の異常が頻繁に見られることが知られている。

近年、視覚情報処理や認知機能のモデル系としてマウスが広く使われている。これは、光遺伝学、二光子顕微鏡によるイメージング、各種センサーおよびレポーター、Cre-LoxPなどの分子生物学的手法などのさまざまな技術がマウスを主な対象として開発されてきた結果であるが、その一方でマウスの行動課題は極めてプリミティブであり、ヒトの認知機能を調べる際に用いられるような行動課題はほとんど使用されてこなかった。とりわけ、ヒトで頻繁に用いられる眼球運動課題をマウスに用いた例はなく、その結果としてマウスの眼球運動に関わる神経回路およびその視覚や認知機能との関連は全くわかっていない。わずかに人間の衝動性眼球運動(サッケード)に似た動きを自発的に行うことがあるという報告が存在するのみであった。

本研究では、眼球運動が大脳皮質によってどのように制御されているかをマウスと霊長類で比較することを目的として研究を進めた。そのために、まずマウスに、ヒトや他の霊長類で使われる眼球運動課題を遂行させた。そして、光遺伝学、二光子イメージング、Cre-LoxP システムを用いることにより、神経回路レベルでの眼球運動制御メカニズムの解明を目指すと共に、霊長類研究にこれらの技術を導入することを目指した。この研究は、ヒトや霊長類の認知機能の研究とマウスを用いた神経科学を結びつける重要な一歩となると考えられる。

2. 研究成果

(1) 概要

我々は周囲の視覚情報を獲得するために、常に眼を動かしている。さらに、対象物に高速で視線を向けるサッケード(衝動性眼球運動)を行うことで、効率よく情報処理を行うことが可能になる。近年マウスの視覚系がシステム神経科学のモデル系として注目を集めているが、眼球運動に関する研究はほとんど行われていない。ヒトと同様にマウスもサッケードを行うことが知られているが、その神経回路網は未だ明らかにされていない。

そこで本研究では、マウスのサッケードに関連する神経メカニズムを、電気刺激、行動実験、光遺伝学、二光子顕微鏡イメージング、Cre-LoxP システムなどを用いて回路レベルでの解明を試みた。その結果以下のことが明らかになった。

第一に、電気刺激を用いて眼球運動制御に関わる領域(前頭眼野_{マウス})が前頭葉にあることを発見した。この領域を刺激すると、霊長類と同様に contraversive な(左半球刺激なら右方向、右半球刺激なら左方向)サックードを両眼で同時に起こすことができた。

第二に、マウスに眼球運動課題を遂行させ、眼球の動きを解析した。その結果、左眼の動きに追従して、右眼も同じ方向に動くことがわかった。ヒトと同様、マウスでも随意運動下では両眼が同時に動くことからマウスの眼球運動はヒトの眼球運動のモデルになりうることを示唆する。

第三に、前頭眼野_{マウス}の機能的意義を調べるため、光遺伝学を用いて片側の前頭眼野_{マウス}を抑制し、眼球運動に与える影響を調べた。課題遂行中に、光遺伝学を用いて片側の前頭眼野_{マウス}を抑制すると、contraversive な眼球運動が抑制された。

第四に、眼球運動課題中の前頭眼野_{マウス}の神経活動を、二光子カルシウムイメージング法により記録した。前頭眼野_{マウス}の細胞は眼球運動前に活動が上昇し、概して contraversive な眼球運動を行うときのほうが ipsiversive な眼球運動を行うときよりも活動レベルが高かった。

これらの結果から、マウスにおける眼球運動に関係する領域の同定(前頭眼野_{マウス})、神経細胞活動、機能的役割を明らかにすることができた。

(2) 詳細

研究テーマA 「マウスにおける眼球運動領域(前頭眼野_{マウス})の同定」

金属電極を用いてマウスの前頭葉を網羅的に刺激することで、サックード(衝動性眼球運動)を制御する領域を同定した。前頭葉の特定の領域を刺激することで、短時間の潜時で両眼を同時に動かすことに成功した。さらに左半球を刺激した場合は両眼とも右方向に(左目は鼻側に、右目は耳側に)、右側を刺激した場合は両眼とも左方向に(左目は耳側に、右目は鼻側に)動くことが明らかとなった。この結果、電気刺激は Contraversive なサックードを引き起こすことがわかった。

次に、この領域に赤い蛍光タンパク質を発現するウイルスを注入し、領域内にある神経細胞の投射経路を調べた。その結果、上丘や脳幹の眼球運動関連核へ投射していることがわかった。さらに高次視覚野への投射も見られた。これらの投射パターンが、霊長類で眼球運動を司る前頭眼野と呼ばれる領域と似ていることから、この領域を前頭眼野_{マウス}と名付ける。

研究テーマB 「マウスの眼球運動課題の確立」

マウスの眼球運動制御機構を明らかにするために、眼球運動課題の訓練を行った。眼球運動課題には、ヒトや他の霊長類でも使われている視覚誘導性サックード課題を用いた。具体的には、中心に提示される視覚刺激を注視した後、鼻側か耳側に次の視覚刺激が提示され、その方向に眼を動かすと報酬(水)がもらえるという課題である。マウスは2~3週間でこの課題を8割以上の成功率で遂行することが出来るようになった。

この課題遂行中の眼球運動を解析した結果、ヒトのサックードに似た動きをすることがわかった。さらに、両眼が連動して、同じ方向にサックードを行っていることがわかった。つまり、左眼が右方向(鼻側)に動くときは、右眼も同時に左方向(耳側)に、左眼が左方向(耳側)に動くときは、右眼も同時に左方向(鼻側)に動いた。このことから、マウスでもヒトと同様に随意運

動の際には両眼は同方向に同時に動くことが明らかになった。このことはマウスの眼球運動がヒトのそのモデルとなりうることを示唆している。

研究テーマ C「光遺伝学を用いた前頭眼野マウスの抑制実験」

眼球運動における前頭眼野_{マウス}の役割を調べるため、光遺伝学を用いて眼球運動課題遂行中の前頭眼野_{マウス}の神経細胞活動を抑制し、眼球運動に与える影響を調べた。実験には、パルブアルブミン陽性な神経細胞に特異的にクレレコンビナーゼを発現したマウスを用いた。このマウスの片半球の前頭眼野にクレレコンビナーゼ依存的に光感受性タンパク質(チャンネルロドプシン)を発現するウイルスを注入した。これによりチャンネルロドプシンを片側の前頭眼野_{マウス}の介在細胞特異的に発現させることが出来る。このマウスの前頭眼野_{マウス}に青色光を照射することで、介在細胞に活動電位が引き起こされ、周囲の錐体細胞の活動を抑制する。これにより、片側の前頭眼野_{マウス}の活動を空間・時間特異的に抑制することが出来る。この手法を課題遂行中のマウスに適用したところ以下の知見が得られた。

(1) 左半球の前頭眼野_{マウス}を抑制すると、マウスは左目を右方向(鼻側)に動かすことは出来ないが、左方向(耳側)に動かすことは可能であった。これに伴って、右目も右方向(耳側)には動いたが、左方向(鼻側)には動かなかった。

(2) 右半球の前頭眼野_{マウス}を抑制すると、マウスは左目を左方向(耳側)に動かすことは出来ないが、右方向(鼻側)に動かすことは可能であった。これに伴って、右目も左方向(鼻側)には動いたが、右方向(耳側)には動かなかった。

これらの結果と、電気刺激のデータ(実験テーマ A)を総合的に考えると、前頭眼野_{マウス}は contraversive な眼球運動を制御していると考えられる。

研究テーマ D「2光子イメージングを用いた前頭眼野マウスの活動の研究」

眼球運動課題遂行中の前頭眼野_{マウス}における神経細胞活動を調べるために、二光子顕微鏡を用いてカルシウムイメージングを行った。ウイルスを用いて遺伝子コード型のカルシウムセンサーを前頭眼野_{マウス}に導入し、2週間後に、この領域から二光子顕微鏡を用いてイメージングを行った。この結果、前頭眼野_{マウス}には眼球運動の前に活動レベルが上昇する細胞が多くあることがわかった。さらに、それらの細胞の多くは、contraversive な眼球運動前の方が高い活動レベルを示すことがわかった。この知見は、前頭眼野_{マウス}が contraversive な眼球運動を制御していることを強く示唆する。

研究テーマ E「前頭眼野の神経活動の可塑性の研究」

上述したテーマ A-D の結果から、前頭眼野_{マウス}における神経回路は contraversive な眼球運動を制御していると考えられる。しかし、この半球のラテラルリティと眼球運動の方向の関係は固定されたものか、可塑的なものかは明らかでない。この疑問に答えるために以下の実験を行った。

(1) 左半球の前頭眼野_{マウス}を抑制すると、その期間中、左眼が右方向に動かなかった。

(2) 同じ実験を数日続けると左眼は右方向に動けるようになった。

この学習に反対側(右半球)の前頭眼野_{マウス}が関与しているという仮説を検証した。この為

に学習前と後での反対側(右半球)の前頭眼野_{マウス}の細胞活動を調べた。すると、学習前では多くの細胞が左方向の眼球運動に高い活動を示していたのに対して、学習後には右方向の眼球運動に高い活動を示す細胞が多数現れた。また、左右の両前頭眼野_{マウス}を抑制すると左眼は再び右方向には動けなくなった。このことは右半球が右方向への運動を制御できるようになったことを示唆する。

3. 今後の展開

今回の研究で、マウスの大脳皮質における眼球運動制御機構はヒトや霊長類のものと似ていることがわかった。今後は、霊長類で同様の課題を遂行し、神経回路の活動様式の違いを調べ、マウスと霊長類の感覚認知機構や運動制御の違いを回路と言う観点から調べていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

短期間に効率よく、予算増額の必要もなくインパクトの高い仕事を成し遂げることが出来たと考えている。また、本研究で得られた結果は、今後の高次機能研究の方向性に大きな影響を与える可能性が高いと考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究はもともと霊長類の前頭眼野に着目して、眼球運動の意志に関わる神経回路が様々な情報を統合して運動指令を出す様子を解明しようとする提案であったが、準備中に所属研究機関のサル施設が感染事故により停止したため、マウスの眼球運動に関わる大脳皮質回路の解析に向かったものである。ところが、両眼視の比重が小さいと見られ眼球運動研究から顧みられなかったマウスを解析してみると霊長類と類似した特性が続々と発見され、新たな分野を単独で開拓する成果となった。本研究により、マウス大脳皮質にも霊長類の前頭眼野に相当する部位が存在すること、その刺激で霊長類と同様なサッケード眼球運動が惹起されることなどを明らかにし、またいくつかの特性を解析できた。これらの成果は光遺伝学、二光子顕微鏡イメージング、Cre-LoxP システムなどが適応できるマウスにおいても、ヒトの眼球運動の基本原理に迫る研究ができる可能性を示すものであり、事実数ヶ所からセミナーに呼ばれるなどその研究が注目されている。今後はこの領野の感覚認知系統などの入力や眼球運動制御様式などを含め興味深い進展が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

論文投稿準備中

(2)特許出願

研究期間累積件数:なし

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

Sato TR. Application of GCaMP6 to in vivo calcium imaging. Janelia Farm Research Campus Conference, Fluorescent Proteins and Biological Sensors IV, Sep 28th – Oct 1st, 2014 (口頭発表).

招待講演

Neural circuits underlying motor control in mouse frontal cortex. (2014) Caesar, Max Planck Institute in Bonn, Germany. April 29th, 2014

Dynamic representation of saccades in mouse frontal cortex. (2014) National Institute for Physiological Sciences, Japan. June 3rd, 2014.

Neural Circuits underlying motor control in mouse frontal cortex. (2014) Humboldt University, Berlin, Germany. Nov 11th, 2014.

Dynamic representation of saccades in mouse frontal cortex. (2014) Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Switzerland. Nov 13th, 2014.

Optical approach to the cortical circuits underlying behavior. (2013) Neuroscience course, Distinctive educational program. Nagoya University School of Medicine, Japan. Nov 27th, 2013

研究報告書

「局所コネクティクス：抑制性局所神経回路発達の細胞種特異的解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 谷口 弘樹

1. 研究のねらい

脳の高次機能を担う大脳皮質を構成する神経細胞には、大きく分けて、興奮性、抑制性の二種類の細胞が存在する。興奮性錐体細胞は、異なる大脳皮質層、大脳領野、脳領域間の信号伝達を担うのに対し、抑制性神経細胞は局所回路を形成し、細胞レベル、回路レベルで神経活動の時空間パターンを制御している。脳内で情報は神経活動の時空間パターンとして表現されると考えられている。従って、抑制性神経細胞の機能、解剖、回路発達を明らかにすることは、大脳の機能、構築原理を理解するうえで極めて重要である。

興味深いことに、抑制性神経細胞には多様なサブタイプが存在し、それぞれのサブタイプは異なる解剖学的、電気生理学的特性を持っている。この多様性が、異なる抑制様式を与え、多様な神経活動パターンの生成に貢献し、神経回路が行う複雑な演算を可能にしていると考えられている。しかしながら、これまで、抑制性神経細胞サブタイプの機能、特にその基盤となる解剖学的特性に関する知見は、技術的困難から限られたものしかなかった。

大脳皮質錐体細胞は、各細胞区画(樹状突起、細胞体、軸索起始部)に決まった抑制性神経細胞サブタイプから局所入力を受けることが知られている。しかしながら、錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプの層分布、カラム分布といった解剖学的詳細は全く明らかになっていない。また、抑制性神経細胞サブタイプの細胞区画特異的神経支配に至る発達過程もほとんど不明である。このような抑制性神経細胞サブタイプの解剖学的詳細、発達を明らかにすることは、その機能を解明するためにも必須の課題である。

本研究では、大脳皮質錐体細胞に入力する抑制性神経細胞をサブタイプ特異的に標識する遺伝学的技術を開発し、抑制性局所神経回路の結合様式、発達様式を体系的に明らかにするための基盤を確立する。本研究により、これまで全く未知であった、単位回路における抑制性神経細胞サブタイプの空間編成、さらに細胞区画特異的神経支配の発達過程が明らかになっていくことが期待される。さらに、ここで開発された方法を精神疾患モデルマウスに適用することにより、これまで知られていなかった、抑制神経系における病理、病態が明らかになり、新たな治療法の開発につながる可能性が考えられる。

2. 研究成果

(1) 概要

大脳皮質抑制性神経細胞には、固有の解剖学的、電気生理学的特性を持つ極めて多様なサブタイプが存在する。異なるサブタイプは結合相手に対して異なる型の抑制効果を及ぼし、多様な神経活動パターン生成に寄与していると考えられている。しかしながら、これまで、単位回路内における興奮性錐体細胞と抑制性神経細胞サブタイプの結合性に関する詳細は

技術的制約からほとんど不明であった。そこで本研究では、まず、組み替え酵素 Cre をサブタイプ特異的に発現するマウスと狂犬病ウイルスを用いた逆行性経1シナプス標識法を組み合わせることにより、第 II/III 層錐体細胞に入力する抑制性神経細胞をサブタイプ特異的に標識する方法を開発した。さらに、この方法を用いることにより、第 II/III 層錐体細胞は、第 II/III 層のみならず、第 IV 層、第 V 層に位置する Parvalbumin (PV)陽性抑制性神経細胞から入力を受けていることを見出した。本研究で確立された方法を、他のサブタイプ、他の層に位置する錐体細胞、他の脳領域に適用することにより、大脳における抑制性神経回路の解剖学的詳細が体系的に明らかになることが期待される。

(2) 詳細

本研究では、興奮性錐体細胞に入力する抑制性神経細胞をサブタイプ特異的に標識する技術の開発を目標に研究を行った。その結果、以下に記述する成果を得ることができた。1) 本手技の基盤となる遺伝学的材料の作出と基本的特徴づけ。2) 本手技を用いた、大脳体性感覚野第 II/III 層錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプの可視化。3) 大脳体性感覚野第 II/III 層錐体細胞に入力する深層 PV 陽性抑制性神経細胞の発見。4) 単一錐体細胞へ入力する PV 陽性抑制性神経細胞の可視化。

1) 遺伝学的材料の作出と基本的特徴づけ

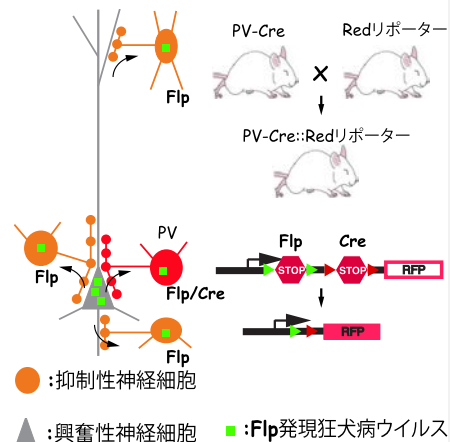
(狂犬病ウイルス)

RFP/Flp を発現する EnvA 偽型化狂犬病ウイルス (EnvA-RFP/Flp) と CFP/Flp を発現する EnvA 偽型化狂犬病ウイルス (EnvA-CFP/Flp) を作製した。EnvA-RFP/Flp は、既存の RFP/Flp-野生型ウイルスを偽型化後、増幅することによって得られた。EnvA-CFP/Flp は、DNA プラスミドの構築、CFP/Flp 野生型ウイルスの産生、偽型化、増幅を経て得られた。

なお、CFP/Flp 野生型ウイルスの産生は、Osakada 博士(元 Callaway 研究室ポスドク/ソーク研究所、現准教授/名古屋大学)との共同研究として行われた。TVA を恒性的に発現する培養細胞を用いた、感染実験の結果、両ウイルスとも良好なタイターを持つことが示された。

(リポーターマウス)

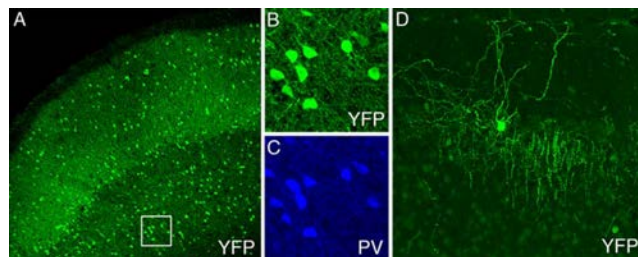
本研究では、Flp/Cre 依存性マウスを利用する (図1)。手技の確立には、既存の Dual-RFP リポーター (Zeng 博士/アレン神経科学研究所からの分与)、Dual-GFP リポーターを用いたが、Dual-RFP リポーターは蛍光退縮、利用可能抗体の制限(ウサギ由来抗体のみ利用可能)の問題があり、Dual-GFP リポーターは発現量の問題があることから、より明るく、抗体染色の選択性を豊富にする Dual-YFP リポーターの作出を試みた。Rosa26 座へのターゲティングコンストラクトのバックボーンは Dual-RFP リポーターと同様のものを用いた。このコン



(図1)興奮性神経細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプを標識する遺伝学的手法: この図では PV 陽性抑制性神経細胞が特異的に RFP を発現する。

ストラクトに4つの YFP を2A ペプチドで隔てて直列につないだものを組み込んだ。常法どおり、ES 細胞にこのコンストラクトをトランスフェクション後、Rosa26 座に正しくノックインされたクローンを PCR で同定し、陽性クローンをブラストシストに注入後、ノックインマウスを得た。次に、Dual-YFP リポーターの特徴づけを発現特異性、発現レベルの観点から行った。Dlx5/6-Flp (Flp を全抑制性神経細胞で発現)、PV-Cre、Dual-YFP を持つマウス大脳皮質を抗 PV 抗体で染色し、共発現を検討したところ、91%の YFP 陽性細胞が PV を発現していることがわかり、高い特異性が明らかになった (図2)。また、Dlx5/6-Flp、Nkx2.1-CreER (シャンデリア細胞の幹細胞で CreER を発現)、Dual-YFP を持つマウス大脳皮質でシャンデリア細胞を YFP 標識、抗 GFP 抗体で染色後、細胞の形態を観察したところ、シャンデリア細胞の特徴的な軸索形態まで高解像度で可視化されていることが明らかになった (図2)。これは現存する最も明るい緑色系リポーターである Cre 依存性 GFP リポーター (Ai47) と明るさにおいてほぼ同等であることを示唆する。

さらに、錐体細胞への抑制性入力をサブタイプ特異的にシナプスレベルで可視化することを目的として、Dual-Synaptophysin-YFP (SynYFP) リポーターを作製した。今後、このラインを特徴づけした後、狂犬病ウイルスと組み合わせ、抑制性神経細胞サブタイプの細胞区画特異的シナプス形成に関する詳細な解析を行う予定である。



(図 2) Dual-YFP リポーター : (A-C) PV-Cre::Dlx5/6-Flp::Dual-YFP マウス脳内における YFP (A、B) と PV (C) の共発現。B、C は A の四角内の拡大。(D) Nkx2.1-CreER::Dlx5/6-Flp::Dual-YFP マウス脳内で標識されたシャンデリア細胞。

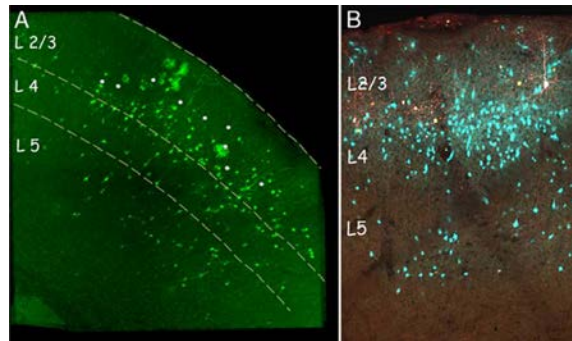
2) 大脳体性感覚野 II/III 層錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプの可視化

サブタイプ特異的 Cre ライン (PV-Cre、SOM-Cre、VIP-Cre) と Dual リポーター (Dual-RFP、Dual-GFP) を交配し、胎生 15 日にエレクトロポレーションで錐体細胞に H2BYFP-TVA-RG を導入後、EnvA 偽型化狂犬病ウイルス (EnvA-RFP/Flp、EnvA-CFP/Flp) を生後 14 日マウスの大脳体性感覚野に注入した (図1)。ウイルス注入後、7 日目 (生後 21 日) に観察したところ、注入箇所を中心にして広範なウイルス感染を確認することができた (ウイルス由来の蛍光タンパク発現に基づく) (図3)。また、期待どおり、ウイルス感染細胞の一部で Dual リポーター由来の蛍光タンパク発現が見られた (図3)。PV-Cre を用いた実験で、抗 PV 抗体で染色し、特異性を調べた結果、リポーター由来蛍光タンパク陽性細胞のうち約 60% が PV を発現していることがわかった。また、同様に、抗 GAD67 抗体で染色した結果、リポーター由来蛍光タンパク陽性細胞のうち約 55% が GAD67 を発現していることがわかった。一次感染錐体細胞以外のリポーター由来蛍光タンパク陽性細胞の形態で、錐体細胞様のもは皆無であること、ある種の神経ペプチドは狂犬病ウイルスの感染により発現抑制を受けること (共同研究者の Callaway 博士の観察) などから、PV、GAD67 の部分的共発現は、リポーター由来蛍光タンパクの非特異的発現というよりむしろウイルス感染細胞におけるこれらの分子の発現抑制によるものであると考えた。この可能性を支持するように、ウイルス注入後、4 日目に観察した場合、90% のリポーター由来蛍光タンパク陽性細胞が PV を発現していた。また、VIP 陽性細胞

は、錐体細胞ではなく、主に他の抑制性神経細胞に入力を送るという知見と一致して、VIP-Cre を用いた場合、一次感染錐体細胞以外でリポーター由来蛍光タンパクの発現は見られなかった（図3）。これらの結果は、本遺伝学的手法の高い特異性を示唆するものである。

3) 大脳体性感覚野第 II/III 層錐体細胞に入力する深層 PV 陽性抑制性神経細胞の発見

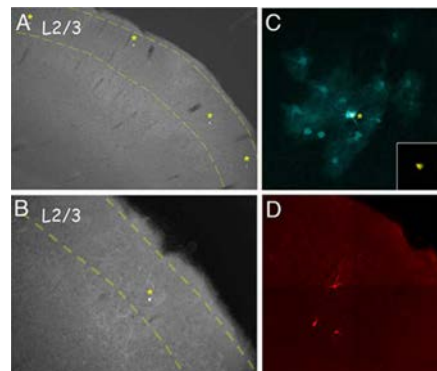
大脳体性感覚野第 II/III 層錐体細胞に入力する PV 陽性抑制性神経細胞の層分布を調べるため、本遺伝学的手法を PV-Cre マウスに適用し、解析を行った。その結果、第 II/III 層錐体細胞に入力する PV 陽性細胞は、同じ II/III 層のみならず、深層の IV 層、V 層にも存在することが明らかになった（図3）。これら深層の PV 陽性細胞から第 II/III 層錐体細胞への入力は、層をまたいだフィードフォワード抑制、もしくはフィードバック抑制に関与している可能性が考えられる。現在、一次感染第 II/III 層錐体細胞と深層 PV 陽性細胞の電気生理学的結合を検出する試みを行っている。また、第 II/III 層錐体細胞に入力する単一の深層 PV 陽性細胞にビオチンを注入後、染色することにより、これらの細胞の形態的特徴を解析していく予定である。



(図3)第 II/III 層錐体細胞に入力する PV 陽性抑制性神経細胞: (A)PV-Cre と Dual-GFP リポーターによる標識。一次感染 II/III 層錐体細胞 (白) と Dual-GFP リポーターで標識された PV 陽性抑制性神経細胞。II/III 層のみならず IV、V 層でも GFP 細胞が見られる。(B)VIP-Cre と Dual-RFP リポーターによる標識。一次感染 II/III 層錐体細胞 (黄色)、ウイルス感染した入力細胞 (水色)。一次感染錐体細胞のみで RFP 発現があり、VIP 陽性抑制性神経細胞で RFP の発現は見られない。

4) 単一錐体細胞へ入力する PV 陽性抑制性神経細胞の可視化

錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプの空間編成をより詳細に理解するため、単一の錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプを標識することを試みた。このために、まず、CreER の弱い活性を利用して、H2BYFP-TVA-RG を疎に広く発現する条件を検討した。その結果、直径300 μ m 以内に1-3個の H2BYFP-TVA-RG 発現錐体細胞が得られる条件を同定することができた(図4)。さらに、この H2BYFP-TVA-RG を疎に発現する PV-Cre マウスに EnvA-GFP/Flp を注入したところ、一個の一次感染錐体細胞と複数の RFP 陽性細胞(RFP はリポーター由来)が得られた (図4)。今後、3次元再構成法を用い、第 II 層錐体細胞に入力する PV または SOM 陽性細胞の空間配置の解剖学的詳細を解析してい



(図4)単一錐体細胞へ入力する PV 陽性抑制性神経細胞: (A、B) 疎に H2BYFP-TVA-RG を発現するための条件検討。0.01 μ g の CreER (A)、0.002 μ g の CreER (B)。(C)単一の一次感染錐体細胞。(D)RFP 標識された PV 陽性細胞。

く予定である。

3. 今後の展開

本研究で開発された遺伝学的手法により、興奮性錐体細胞に入力する抑制性神経細胞をサブタイプ特異的に標識することが可能になった。本方法を応用し、今後、以下の重要な課題に挑戦していく予定である。1)本研究では、体性感覚野に焦点を絞り解析を行ったが、今後、視覚野、前頭前野など他の領野でも同様の解析を行う。また、第Ⅴ層錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプにも解析を広げていく。これらの解析を通じ、領野ごとにどの程度共通の抑制性回路が存在するのか、もしくは、どのような特異的抑制性回路が存在するのかを明らかにしていく。本研究で見出した、深層PV陽性抑制性細胞から第Ⅱ/Ⅲ層錐体細胞への入力のような新たな抑制性回路の発見も期待できる。2)本研究では、単一錐体細胞に入力する抑制性神経サブタイプの可視化にも効率は低い成功している。今後、錐体細胞を機能によって分類し(例えば体性感覚野バレル構造の内に位置するか外に位置するかで分類する)、それぞれのクラスにおいて、抑制性入力細胞の特異的空間配置が見られるかどうか検討する。このような解析によって、抑制性神経細胞サブタイプの回路レベルでの機能に対する洞察が得られることが期待できる。3)本研究では、抑制性入力細胞全体を標識するためのリポーターマウスのみならず、抑制性入力細胞の前シナプス末端のみを標識するリポーターマウスも作製した。今後は、このシナプス特異的リポーターマウスを用い、第Ⅱ/Ⅲ層錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプのシナプス末端を標識し、錐体細胞上の細胞区画特異的シナプス編成を高解像度で解析する。また、細胞区画特異的シナプス編成の発達過程も明らかにしていく。これらの研究により、これまで未解明であった抑制性神経細胞サブタイプによって形成される細胞区画特異的シナプスの発達過程が明らかになることが期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究を通じて、錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプを特異的に標識することが可能になった。また、単一錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプを標識することにも成功した。この遺伝学的手法を用いて、第Ⅱ/Ⅲ層錐体細胞に入力するPV陽性抑制性細胞は同じⅡ/Ⅲ層のみならず、第Ⅳ層、第Ⅴ層にも存在することが明らかになった。この結果は、本手法が、これまで未知であった抑制性回路の結合性を明らかにするうえで非常に強力なものであることを示唆している。また、本手法の原理は、シナプスを特異的に標識するリポーターマウスと組み合わせることにより、錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプのシナプス週末を可視化することにも利用可能である。我々はすでにこのシナプスを特異的に標識するリポーターマウスも作製済みで、今後、このマウスの特徴づけを行った後、細胞区画特異的シナプスの発達過程を調べるのに利用する予定である。以上、述べたとおり、本研究期間中に抑制性神経細胞サブタイプの結合特異性を調べるための手技的基盤を確立することができた。本手法は、これまで解析不能であった、抑制性神経細胞サブタイプの結合特異性に関わる多くの疑問に答えるためのブレークスルーになることが期待される。

昨今の遺伝学的技術、顕微鏡技術の発展を基礎にして、脳の解剖学的詳細を体系的に明らかにするコネクトミクスプロジェクトが世界的に流行している。これらの試みは、特に、脳の領域間の結合性など、比較的マクロなレベルの結合性に関して一定の成果をあげてきた。しかしながら、大脳抑制性神経細胞に見られる多種多様なサブタイプの結合性に関して未だ多くの情報は得られていない。本研究で開発された遺伝学的手法を体系的に適用することにより、大脳皮質神経回路の細胞種特異的神経結合が細胞レベル、シナプスレベルで明らかになることが期待できる。

JST 職員をはじめとする関係者の方々のご協力により、海外での実施という難条件にも関わらず予算を適切に迅速に執行することができた。また、2012年8月の現所属独立ポジションへの移動に際しても多大なご協力を頂き、研究費の移行、それに引き続く執行をスムーズに行うことができた。移動から研究室の立ち上げに至る過程で若干の停滞があり、また、本研究の実験補助者が経験の浅い技術員のみであったこともあり、当初予定した全ての課題を遂行するには至らなかったが、核となる遺伝学的技術の確立と大脳皮質内の新たな抑制回路の発見を遂げることができたのは大きな進歩であると考え。今後、このプロジェクトに対して、ポスドク研究員を当て、さらなるテコ入れを行い、できる限り早い時期に論文発表ができるよう努力する所存である。

本研究成果により、大脳機能に必須の役割を果たす抑制性神経細胞の解剖学的詳細をサブタイプ特異的に可視化できるようになった。脳の構造と機能は密接な相関があるため、抑制性神経細胞の詳細な結合性を知ることにより、脳の機能の理解が一層進むことが期待できる。また、本研究で開発された技術を、精神疾患モデルマウスに適用することにより、抑制性神経回路における病態の発見に役立てることができる。このようなアプローチを糸口にして、治療の標的とすべき細胞種が明らかとなり、新たな薬や治療戦略の開発が促進されることが期待できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

大脳皮質の抑制性神経細胞には解剖学的、神経化学的および電気生理学的特性により区別される多様なサブタイプが存在すること、また興奮性の錐体細胞は各細胞区画(樹状突起、細胞体、軸索起始部)において特定の抑制性神経細胞サブタイプから局所入力を受けることが長く知られているが、それらの解剖学的細胞学的詳細や神経結合の発達などに関しては解析の困難から不明な部分が多く残されている。本研究は、これらのサブタイプを特異的に標識する遺伝学的技術を開発し、抑制性局所神経回路の結合様式と発達様式を体系的に明らかにしようとするものである。このために組み替え酵素 Cre をサブタイプ特異的に発現するマウスと狂犬病ウイルスを用いた逆行性経 1 シナプス標識法を組み合わせることにより抑制性神経細胞サブタイプ特異的な標識に成功し、たとえば第 II/III 層錐体細胞への各層の Parvalbumin 陽性抑制性神経細胞から入力の様相などを明らかにすることに成功し、また形態的サブタイプの一つシャンデリア細胞の全貌を詳細に可視化することにも成功した。これらの成果は大脳皮質の局所回路の解明の強力な基盤を開くものであり、その意義は大きい。今後他のサブタイプについても解析が進み、大脳皮質の神経回路の理解が大きく進展することが期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

該当なし。

(2)特許出願

該当なし。

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

2012 Taniguchi, H.”Origin and Organization of Chandelier Cells in the Mouse Neocortex”, MPFI/IBRO Neural Circuits Symposium, USA

2013 Taniguchi, H.”Genetic dissection of GABA neuronal subtypes”, NEURO2013 Satellite Symposium, Japan

2014 Taniguchi, H.”Genetic dissection of Inhibitory Circuits in Neocortex”, Florida Brain Project Symposium, USA

受賞

2013 Honorable mention recipient of the 2013 Daniel X. Freedman Award

著作物

Invited Review

Taniguchi, H. (2014)

“Genetic dissection of GABAergic neural circuits in mouse neocortex”

Front. Cell. Neurosci. 8:8. doi: 10.3389/fncel.2014.00008

研究報告書

「神経グリア相互作用としての概日リズム制御系の新たな理解」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 早坂 直人

1. 研究のねらい

脳機能研究は、主として神経細胞および神経ネットワークを対象としてこれまで進展してきたが、近年、グリアの重要性に光が当てられつつある。中でもアストロサイトについては、神経と類似した能動的な機能が明らかになり、脳機能発現のもうひとつの主体である可能性が示唆されている。しかし生体が行動を発現する過程で、神経とグリアの機能を分解し、それらの相互作用の実体とその意義を明らかにするには至っていない。本研究は、「脳機能＝神経とグリアの機能統合」という見地に立って、脳の複雑なネットワーク構造と機能を神経とグリアに切り分け、二者の機能分担や相互作用による脳機能発現の実体を明らかにすることを目的とする。

本研究では、生体の行動リズム制御システムをモデルとする。概日リズム制御系は、恒常条件下で中枢(視交叉上核、SCN)と出力(行動)の概日リズム周期や位相に一定の相関が認められる。従って、複雑な行動制御ネットワークの構造・機能研究において、中間経路を排除し、起点(制御中枢、SCN)と終点(出力、行動)を同一指標(リズム)で直結させたシンプルな経路として解析可能な優れたシステムであるといえる。環境変化に対する感受性と、柔軟性、堅牢性を併せ持つユニークなシステムであるが、それらの特性の基盤となるSCNのネットワーク構造や動作原理の解明が課題となっている。

本研究では以下の達成目標を設定する。

- ① 本研究では、アストロサイト特異的に遺伝子操作を行い、アストロサイトの機能破綻(時計破壊)が行動(リズム)に及ぼす影響について明らかにする。
- ② 本研究は、in vivo で行動(リズム)を形成する神経、グリアの機能分担や神経グリア相互作用を明らかにする。
- ③ 本研究は、環境適応制御システムにおいて、グリアが果たす積極的な役割について明らかにする。

本研究の実現は、リズム制御系の環境適応における様々な特性の基盤解明は元より、行動制御における神経グリアネットワークの普遍的な動作原理の一端に迫ることが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

前述の 3 つの目的を達成するべく、これまでに以下の 6 つのテーマについて研究を実施した。このうち一部については、現在も研究を継続中である。

研究テーマ A「培養アストロサイトの概日リズム同期と GAP 阻害剤の影響解析」

培養アストロサイトでは、他の細胞では報告がなかった、細胞間相互に概日リズム位相や周期を同期するメカニズムが存在し、培養細胞は 3～4 週の間リズムが同期して継続することを明らかにした。また、細胞間同期には GAP 結合が関与することを示唆した。

研究テーマ B「時計遺伝子 Bmal1 KO マウスの行動リズム解析」

概日リズム制御におけるアストロサイトの機能関与を明らかにするために、アストロサイト特異的に時計遺伝子を欠損したマウスを作製した結果、活動リズム周囲の有意な延長を観察した。この結果から、アストロサイトの時計機能がリズム制御に重要であることが示唆された。

研究テーマ C「Salt-inducible kinase 3 (SIK3) 欠損アストロサイトのリズム変容解析」

アストロサイトでも高発現する SIK3 の KO マウスで、行動リズムの不安定化と光同調の異常が観察された。また、培養アストロサイトでもリズム周期の変動と短周期化が見られた。SIK3 が時計タンパク質 PER2 の分解を介してリズム制御に関与することを示唆した。

研究テーマ D「*Sik3* KO マウスの概日リズム制御中枢における細胞間リズム同期変異解析」

Sik3 KO アストロサイトで、細胞間リズム同期が消失していることを明らかにし、更に *Sik3* KO SCN(概日リズム制御中枢)でも細胞間で見られるリズムが脱同期していることが明らかになった。従って、リズム同期の消失が活動リズムの不安定化に繋がると予測された。

研究テーマ E「アストロサイト特異的 *Sik3* KO マウスの作製とリズム解析」

生体内でアストロサイトに置ける SIK3 の機能を解析するため、アストロサイト特異的 *Sik3* KO マウスを作製した。現在活動リズムその他について解析中である。

研究テーマ F「リズム制御中枢で概日振動するケモカイン欠損が概日リズムに及ぼす影響」

アストロサイトが SCN において昼夜の局在を変化させる概日リズムを示すことを明らかにしたが、この遊走リズムを規定する分子を探索し、ケモカインのひとつを候補として同定した。このケモカインと受容体それぞれのアストロサイト特異的 KO マウスを作製し、解析中である。

(2) 詳細

研究テーマ A「培養アストロサイトの概日リズム同期と GAP 阻害剤の影響解析」

近年、脳内に神経細胞の数倍も存在するアストロサイトは、神経とは独立に興奮し、アストロサイト間、あるいは神経との相互作用により脳機能を調節していることが示唆されている。研究者らはこれまでに、概日リズム制御中枢である脳視床下部視交叉上核(SCN)において、光環境の変化(昼夜変動や光照射時間の変化)に応じてアストロサイトが局在を変化させることを見出した。この結果は、神経活動を調節するアストロサイトが概日時計の制御下にあり、昼と夜とで機能を ON/OFF させる「可変スイッチ」として機能していることを示唆している。そこでまず、複数のアストロサイト細胞株を樹立し、アストロサイトの概日リズムについて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、培養アストロ細胞では、時計遺伝子を始め、発現が概日振動する遺伝子が同定された。また、発現に概日リズムを示す時計遺伝子 *Per2* の遺伝子座にルシフェラーゼを挿入したノックインマウス(*Per2-luc* KI)由来の細胞株で、概日リズムを長期間測定したところ、これまでの他の細胞の報告の数倍に当たる 3~4 週間リズムが自律的に持続することを明らかにした。このことは、アストロサイト間に概日リズムを積極的に同期させる機構の存在を示唆しているが、リズムの長期継続が GAP 阻害剤で見られなくなったことから、アストロサイトは GAP 結合を介して相互に概日リズムを同期させることが示唆された。

研究テーマ B「時計遺伝子 *Bmal1* KO マウスの行動リズム解析」

脳内におけるアストロサイトの概日リズム制御への関与を明らかにするために、アストロサイト特異的遺伝子操作を用いて、複数のリズム関連遺伝子をアストロサイト特異的に欠

損したマウスを作製した。まず、概日リズム駆動に必須である時計遺伝子 *Bmal1* KO マウスを作製した。方法としては、Cre-loxP システムを用い、アストロサイト特異的に発現する GFAP 遺伝子の約 15 kb の上流域に組み換え酵素 Cre を連結したマウス(GFAP-Cre)と、*Bmal1* 遺伝子を2つの loxP サイトで挟んだ *Bmal1* floxed マウスを交配させた。行動リズム解析の結果、恒暗条件下で活動リズム周期が有意に延長した。このマウスでは神経の概日時計は正常であることから、アストロサイトの時計が生体の概日リズム制御に関与していることが示唆された。

研究テーマ C「Salt-inducible kinase 3 (SIK3) 欠損アストロサイトのリズム変容解析」

高塩処理したマウスの副腎で発現が誘導される遺伝子として同定された SIK には3つのアイソフォーム (*Sik1*, *2*, *3*) が存在し、それぞれ代謝に重要な役割を果たすことが報告されている。中でも進化的に保存性の非常に高い SIK3 は中枢神経系でも発現が高いが、機能についてはこれまで報告が無かった。研究者らは、このリン酸化酵素がアストロサイトに高発現していることを見出した。そこで、*Sik3* の機能に注目し、KO マウスを入手して解析を行ったところ、活動リズムが非常に不安定であり、また、昼夜の光条件の変化に十分に適応できない(光同調不全)マウスであることが明らかになった。このような概日リズムの劇的な異常を示すマウスはこれまで報告がなく、概日時計の安定性(堅牢性)や柔軟性(同調性)の維持に関与する重要な因子であることが示唆された。また、このマウスからアストロサイト株を樹立し、前述の *Per2-luc* リズムを測定したところ、活動リズムと同様に概日リズム周期の不安定性が観察された。更に興味深いことに、個体の活動リズムが延長したのに対して、細胞の平均リズム周期は数時間も短縮していることがわかった。以上の結果から、脳のリズム制御中枢において、アストロサイトは周期の安定化のみならず、リズム周期を厳密に規定する役割も果たすことが示唆された。SIK3 は特定の基質をリン酸化し、下流のシグナル伝達経路の調節を介して機能していることが示唆されているが、中枢神経系では報告が無かった。そこで、SIK3 の基質を探索した結果、時計タンパク質のひとつである PER2 をアストロサイトでリン酸化していることが明らかになった。更に、SIK3 は PER2 を時刻依存的にリン酸化し、PER2 の分解を促進していることがわかった。以上の結果から、SIK3 はアストロサイトにおいて、時計タンパク質の安定性を制御し、概日リズムの堅牢性を保障していることが示唆された。光同調性への関与については現在解析中である。

研究テーマ D「*Sik3* KO マウスの概日リズム制御中枢における細胞間リズム同期変異解析」

概日リズムの堅牢性(安定性)には、細胞毎に概日リズム周期が異なるとの報告があるため、細胞間リズム同期による周期の調整が重要であると考えられる。そこで、SIK3 欠損によるリズム周期の不安定化が細胞間リズム同期の破綻に起因するかどうかについて、解析を行った。まず、*Sik3* KO マウスから採取したアストロサイト株でシングルセル発光イメージングを行い、*Per2-luc* の発光リズムを指標として、細胞間のリズム同期をについて野生型細胞株と比較解析した。その結果、野生型アストロサイトでは、数週間細胞間の同期率が非常に高く、細胞全体のリズムが持続したのに対し、*Sik3* KO アストロサイトでは、徐々に細胞毎のリズム位相のずれが拡大し、各細胞のリズムがバラバラになった。従って、SIK3 は細胞間のリズム情報の伝達とリズム同期に必須の調節因子であることが示唆された。更に、*Sik3* KO マウスの SCN のスライス培養で、同様に細胞間リズム同期に関し

て発光リズムイメージングを実施したところ、正常では細胞間リズム同期が1か月以上持続するのにに対し、KO SCN では細胞間リズム位相がばらばらになり、約1週間でSCN 全体のリズムが消失することを見出した。以上の結果から、SIK3 はアストロサイト間で、また、SCN の神経とアストロサイトを含む細胞間で、細胞毎のリズム同期を制御しており、SIK3 の欠損により同期が失われてリズムが不安定化することが示唆された。

研究テーマE「アストロサイト特異的 *Sik3* KO マウスの作製とリズム解析」

既に述べたように、SIK3 はアストロサイトでPER2 の分解促進作用に関与し、概日リズムの堅牢性という概日時計の特性を規定するために不可欠な分子である。一方、SIK3 は神経にも発現し、光同調に関与している可能性がある。そこで、SIK3 がアストロサイトと神経でそれぞれどのような機能を持つのかを分子解剖の手法で明らかにすべく、アストロサイト特異的 *Sik3* KO マウスを作製した。このマウスを用いて、現在行動リズム解析を実施している。

研究テーマF「リズム制御中枢で概日振動するケモカイン欠損が概日リズムに及ぼす影響」

上述の研究と並行して、研究者らは SCN におけるアストロサイトの局在変化リズムを制御する分子の探索を行い、SCN で発現が概日振動するケモカインとその受容体に注目した。このケモカインは、血液幹細胞やリンパ球、神経細胞の一部で報告があり、ケモカインの濃度勾配に反応して、受容体を発現する細胞が特定の位置に遊走(移動)することが知られている。同じケモカインがSCN で夜高く昼間は低い発現リズムを示すことから、SCN に集積するアストロサイトの遊走を誘導する分子として有力であると考えた。そこで、このケモカインと受容体それぞれのアストロサイト特異的 KO マウスを作製した。最近マウスの作製に成功し、現在行動リズムや培養アストロサイトのリズム異常の有無について解析中である。

3. 今後の展開

今後は引き続き以下の研究を計画しており、SCN における神経とグリアの相互作用の詳細を明らかにする計画である。

(1)アストロサイト・神経特異的 *Sik3* KO マウスの行動リズムや概日リズム同期異常の解析

研究成果の項で述べたように、概日リズムの堅牢性と同調性を制御する SIK3 が、アストロサイトでどのように機能するのか、神経での機能との違いは何かを明らかにする手始めとして、アストロサイト特異的 *Sik3* KO マウスの解析を継続して行う。同様に、神経特異的 KO マウスの作製も計画しており、概日リズム制御の鍵となるリン酸化酵素の機能解析を通して、概日リズムを制御する2種の異なる細胞の機能分担や相互作用が明らかになると期待される。

(2)SIK アイソフォームの概日リズム制御への関与の解析

SIK ファミリーには、SIK3 以外に SIK1 と SIK2 というアイソフォームが存在し、いずれも代謝の調節に関与することが報告されている。中でも SIK1 は中枢神経系でも発現しており、研究者らはアストロサイトでの発現を確認している。*Sik1* mRNA は光照射したマウス SCN で発現の劇的な亢進が認められ、かつ発現に概日リズムを示すことから、概日リズム制御への関与、特に光入力系の制御との関連が示唆される。現在既に *Sik1* KO マウスを入手しており、活動リズムや培養アストロサイトでのリズム解析を実施し、*Sik3* KO マウスや細胞との比較解析を計画している。

(3)SIK3 の新たな基質の同定と異なるシグナル伝達経路を介した機能に関する解析

SIK3 の下流については、脳以外の組織や器官において複数の異なる基質が報告されている。その中には、転写の co-activator である CRTC (CREB-regulated transcription coactivator) や co-repressor の HDAC II (histone deacetylase class 2) がある。いずれも SIK3 によるリン酸化で機能が制御されるとの報告があり、それらの下流で転写調節を受ける遺伝子の一部も報告されている。脳では我々が同定した PER2 以外に報告はないが、これまでのアストロサイトを用いた実験で、研究者らは CRTC や HDAC 阻害剤で、細胞の分子リズムが変容することを見出している。他のリン酸化酵素でも報告されているように、SIK3 が複数の基質をリン酸化し、異なる機能を制御している可能性があるため、概日リズム制御に関与する別の基質(時間特異的にリン酸化が変化するタンパク質)をプロテオミクス研究の専門家との共同研究で同定する計画である。

(4) アストロサイトの遊走リズムを制御する分子解析と、局在変化の機能的意義の解明

成果の項で述べた概日振動ケモケインとケモカイン受容体がアストロサイトの局在変化の概日リズムを制御しているのか、そうであるとすれば、KO マウスでリズムが消失した場合、概日リズムにどのような変異が見られるのかを解析し、アストロサイトの遊走リズムの生理学的意義を明らかにする。また、神経とは異なる増殖、細胞移動、細胞間相互作用といった特性を裏打ちする分子機序を明らかにし、概日リズム制御以外の脳機能発現にも同様の機能を有するか否かについて、他の神経科学者との共同研究で明らかにする予定である。

(5) GAP 結合を介したアストロサイトの概日リズム同期制御の分子基盤解明

本研究でアストロサイトが細胞間で同期し、この性質が SCN 内の細胞間リズム同期と活動リズムなどの堅牢性の保持に繋がる可能性が示された。そこで、今後は GAP 結合が細胞間リズム同期や行動、生理リズム安定性に及ぼす影響について解析を行う。具体的には、アストロサイトの GAP 結合を構成する connexin43 の KO マウスやアストロサイトを用いて、細胞間同期や SCN ネットワークのリズム同期に異常が見られるかどうかについて検討する。また、KO マウスで活動リズムがどのように変容するのかを観察し、細胞間同期の消失が概日リズムに及ぼす影響を詳細に解析する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究のねらいの項で挙げた 3 つの目標達成を目指してこれまで研究を進めて来た。そのうち、①と③の目標については一定の結論を導き出すことに成功したと考えている。②に関しては、この3年間で5種の遺伝子改変マウスを作製あるいは入手し解析したが、更に少なくとも2種のマウスの解析が必要であり、来年度には実施可能であると考ええる。研究実施体制については、近畿大学では経験のある研究補助員2名の雇用で概ね順調であったが、山口大学では実験経験者が見つからず、一定の訓練期間を必要とした。また、遺伝子改変動物については、場所の移動の必要から約半年から1年の間実験が出来ない時期があった。このように、当初の計画通りとは行かなかったが、それでも期待以上の結果が出たことについては評価できると考える。論文については、これまでのさきがけ研究の成果を2報投稿準備中であり、年度内の投稿ないし出版を目指している。また、続報についても来年度には複数の論文にまとめる予定であり、さきがけ研究は順調に進展したと考える。

研究成果の科学技術および社会・経済への波及効果については、現在はまだ研究が進行中

であるため、具体的な効果について評価できる状況にはない。一方、現在の研究テーマである、脳におけるグリアの能動的寄与の解明研究は、神経科学研究界において立ち後れているグリア機能研究に新たな知見を提供するものである。アルツハイマー病の一部など、神経が原因で引き起こされると考えられて来た複数の脳疾患が、実はグリアの機能不全に原因があるということが最近報告されるなど、脳におけるグリア機能の研究は医学的見地からも重要性を増している。本研究で、概日リズム制御においてグリアが重要な機能の一端を担うことが示唆され、今後更にグリア機能の詳細が明らかになると期待される。本研究の成果が、神経科学の基礎研究の進展にグリア機能解明という点で寄与し、更には、グリアが関与する精神神経疾患の予防や治療戦略の基盤を提供する可能性は十分にあると考える。また、概日時計が関与する生活リズムは、その乱れが代謝疾患、免疫疾患、癌といった疾患に繋がるとの報告が増えて来ているが、本研究で扱っている概日リズム制御機構に関しても、リズムと代謝が同じ遺伝子変異で惹起される例を見出す(*Sik3* KO マウス)など、未だ解明されていない概日リズムと疾患とのリンクの解明に繋がる可能性を有する。この意味でも、本研究は将来の医学研究や医療の進展に寄与する可能性を包含すると考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

本研究は、マウスで概日リズム中枢である視床下部 SCN においてアストロサイトが昼夜で分布が変わるとする予備的データなどに基づいて、SCN 活動の概日リズムの発振・同調などにアストロサイトが関わるという興味深い可能性を検証する研究として提案されたものである。その後アストロサイト細胞株やプライマリーカルチャーを用いる解析、各種の遺伝子改変マウスの解析などを精力的に進めてきたが、十分に説得性あるデータはまだ纏まっていないようである。今後はテーマを絞り着実な実験を積み上げることにより、成果を論文として世に問うことが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hayasaka N.*, Aoki K., Kinoshita S., Yamaguchi S., Wakefield JK., Tsuji-Kawahara S., Horikawa K., Ikegami H., Wakana S., Murakami T., Ramabhadran R., Miyazawa M., Shibata S. Attenuated food anticipatory activity and abnormal circadian locomotor rhythms in *Rgs16* knockdown mice. PLoS ONE, 2011, 6: e17655.
2. Fukuda H., Tokuda H., Hashimoto S., Hayasaka N*. Quantitative analysis of phase wave of gene expression in the mammalian central circadian clock network. PLoS ONE, 2011, 6: e23568.
3. Hayasaka N.*, Nagai N., Kawao N., Niwa A., Yoshioka Y., Mori Y., Shigeta H., Kashiwagi N., Miyazawa M., Satou T., Higashino H., Matsuo O., Murakami T. In vivo diagnostic imaging using micro-CT: sequential and comparative evaluation of rodent models for hepatic/brain ischemia and stroke. PLoS ONE, 2012 7: e32342.

4. Miyoshi Y., Yoshioka Y., Suzuki K., Miyazaki T., Koura M., Saigoh K., Kajimura N., Monobe Y., Kusunoki S., Matsuda J., Watanabe M., Hayasaka N.* A New Mouse Allele of Glutamate Receptor GluD2 with Cerebellar Atrophy and Progressive Ataxia. PLoS ONE, 2014, 9: e107867,

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

- 1) 近大医学会賞受賞 2012年7月

学会発表(シンポジウム)

- 1) 早坂直人, 小浦美奈子, 松田潤一郎, 竹森洋
リン酸化酵素が概日リズムの位相を決める.
第116回日本解剖学会総会・全国学術集会・第88回日本生理学会大会合同大会シンポジウム 2011年
- 2) 早坂直人
概日リズムの安定性と同調性を制御する新たなリン酸化シグナル.
第19回日本時間生物学会学術大会シンポジウム 2012年
- 3) Hayasaka N.
A role for Salt-inducible kinase 3 in the central circadian pacemaker in mammals: phosphorylation-dependent degradation of the clock protein.
XIII Congress of the European Biological Rhythms Society (Symposium) 2013年

研究報告書

「グリシン作動性シナプスの活動依存的形成と臨界期の分子基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 平田 普三

1. 研究のねらい

神経細胞はシナプスとよばれる細胞間領域に神経伝達物質を放出して情報伝達を行う。シナプスは活動、すなわちシナプス伝達により、その形態、受容体密度、伝達特性が変化することが知られている。シナプスの活動依存的変化はシナプス可塑性とよばれ、興奮性のグルタミン酸作動性シナプスで精力的に解析され、長期増強や長期抑制といったシナプス可塑性現象の分子基盤や生理的意義が明らかにされてきた。抑制性の GABA 作動性シナプスやグリシン作動性シナプスにおいても、脱分極依存的増強や長期増強といったシナプス可塑性現象が報告されているが、その分子メカニズムや生理的意義には不明の点が多い。これら GABA 作動性シナプスとグリシン作動性シナプスは、神経伝達物質として使うアミノ酸が異なるだけで、構造や制御は似ていると考えられることが多かったが、近年の報告から、GABA 作動性シナプスとグリシン作動性シナプスでは脱分極に対する応答や制御機構が本質的に異なることも示唆されている。しかし、GABA 作動性シナプスやグリシン作動性シナプスを構成する分子の知見は未だに乏しく、興奮性シナプスに比べ、抑制性シナプスの理解は遅れている。私たちはゼブラフィッシュをモデルとして、運動の研究を行い、グリシン作動性シナプス伝達による抑制が運動に重要であることを報告してきた。また、グリシン作動性シナプスは遺伝的プログラムだけで形成されるのではなく、シナプス形成にグリシン作動性シナプス伝達そのものが必要であるという予備的知見を得た。これはグリシン作動性シナプスが活動依存的に形成される、つまり発生期のグリシン作動性シナプスに可塑性があることを示唆するものである。また、シナプス形成におけるグリシン作動性シナプス伝達の重要性は特に胚期や稚魚期で高く、臨界期が存在する可能性も示唆された。ゼブラフィッシュは発生が早く、胚期は体が透明なためライブイメージングに優れる脊椎動物であり、発生期のシナプス可塑性の研究に有用である。本研究で私たちは、グリシン作動性シナプスを構成、あるいは制御する分子を同定し、グリシン作動性シナプスの活動依存的変化の分子基盤の解明を目指す。また、グリシン作動性シナプスの可視化系を確立し、シナプス可塑性を生体内イメージングして、シナプス可塑性の操作にも挑戦する。さらに、グリシン作動性シナプスに可塑性があることの生理的意義の解明も目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

グリシン作動性シナプスを構成・制御する分子を探索し、足場タンパク Gephyrin の神経細胞特異的アイソフォームを同定し、それがグリシン受容体のシナプス凝集に必要であることを確認した。また、Dhx37 という DEAH-box 型 RNA ヘリカーゼがグリシン受容体 α サブユニットのスプライシングを調節することを見出し、RNA 制御の観点からグリシン作動性シナプスの制

御メカニズムを解明し、シナプスを操作する実験系を確立した。グリシン作動性シナプス伝達がグリシン作動性シナプスの形成に必要であることをゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 解析で発見し、このシナプス可塑性の動作原理として、グリシン放出→グリシン受容体活性化→ポストシナプスにおける CaMKII 活性化→Gephyrin リン酸化→グリシン受容体凝集増加が起きていることを明らかにした。さらに、グリシン作動性シナプス部位とグリシン受容体凝集を同時にゼブラフィッシュで生体内イメージングする実験系を構築し、ゼブラフィッシュに雨の音を聞かせてグリシン作動性シナプス可塑性が誘導される時に、グリシン受容体がシナプス部位に凝集する過程を可視化することに成功した。これはグリシン作動性シナプス可塑性を生体内可視化した初めての例である。グリシン作動性シナプス可塑性によりゼブラフィッシュは逃避行動を低下させるが、その生理的意義として本研究から、魚は通常上空の鳥の襲撃に晒されているが、雨の日には鳥が襲ってこないで逃避行動を低下させるという、環境適応仮説が提唱された。

(2) 詳細

研究テーマ「グリシン作動性シナプス可塑性の動作原理」

グリシン作動性シナプスを構成・制御する分子を探索し、多くの候補を得て Gephyrin、Dhx37 を詳細に解析した。Gephyrin は GABA 作動性シナプスとグリシン作動性シナプスの足場タンパクとして知られるが、本研究で Gephyrin のパラログ遺伝子 (Gephyrin a, Gephyrin b) や新規のスプライシングアイソフォーム (Gephyrin a 4 種類, Gephyrin b 3 種類) が単離され、神経細胞だけで発現する Gephyrin アイソフォームが同定された。私たちは Gephyrin のこれらアイソフォームがグリシン受容体のシナプス凝集を制御し、運動制御に必要であることを確認した (Ogino et al., 2011)。Dhx37 は DHAH-box 型 RNA ヘリカーゼとして命名されただけで、これまで機能解析はされてこなかった RNA 結合タンパクである。私たちは Dhx37 を欠くゼブラフィッシュ個体がグリシン作動性シナプスの機能欠如で特徴的に見られる、左右の筋を同時に収縮させて背側に反る異常運動をすることに注目し、Dhx37 とグリシン作動性シナプスの関連を解析した。Dhx37 を欠くゼブラフィッシュ個体ではグリシン受容体 α サブユニットが RNA レベル、タンパクレベルで減少し、グリシン作動性シナプス伝達が顕著に低下していた。その作用機序として、Dhx37 はグリシン受容体 α サブユニットの転写産物に結合し、RNA スプライシングを制御することが分かった。この研究は RNA 制御の観点からグリシン作動性シナプスの制御機構を解明した研究であると同時に、Dhx37 を発現制御することで、グリシン作動性シナプス伝達レベルの操作を可能にする実験手法として、その後の研究に生かされた (Hirata et al., 2013)。

ゼブラフィッシュ個体にグリシン受容体の特異的阻害剤であるストリキニーネを作用させるとグリシン作動性シナプスが形成されなくなることから、グリシン作動性シナプス伝達がグリシン作動性シナプスの形成に必要であることがゼブラフィッシュ個体を用いた *in vivo* 解析で示唆された (Hirata et al., 2011)。その動作原理解明を目指して、グリシン放出→受容体活性化→ポストシナプスでのシグナル伝達→受容体凝集という仮説を立て、その分子メカニズムを解析した。第一に、CRISPR/Cas9 というゲノム改変技術を用いて、プレシナプスに存在する2種のグリシンのトランスポーターを遺伝子破壊すると、グリシンの放出を阻害することができ、その個体ではポストシナプスにおけるグリシン受容体の凝集が見られなかった。このことから、

グリシンの放出がグリシン作動性シナプスの形成に必要であると言える。第二にストリキニーネを用いて受容体活性化を阻害すると、やはり受容体凝集は阻害されることが確認され、受容体活性化がグリシン作動性シナプスの形成に必要であると分かった。第三にポストシナプスでのシグナルに関わる分子を探索する目的で、種々の化合物をゼブラフィッシュに作用させて運動異常を引き起こす化合物を探索した。約1,000種の化合物のうち、20種でグリシン作動性シナプスの異常に見られる運動異常とやや類似した運動異常が観察された。これらの個体におけるグリシン作動性シナプスを解析し、NifedipineとKN93がグリシン作動性シナプス形成を阻害することを見出した。これら化合物はそれぞれL型カルシウムチャネルとCaMKII(カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素)の阻害剤であり、ポストシナプスにおけるカルシウム→CaMKIIというシグナル経路がグリシン受容体凝集に関与することが示唆された(Yamanaka et al., 2013)。第四にCaMKIIによる受容体凝集の分子メカニズムを解析するため、HEK293細胞を用いたグリシン受容体とGephyrinの結合実験を行い、両者の結合はCaMKIIにより強化されることを見出した。さらに、質量分析からCaMKIIがGephyrinをリン酸化し、このリン酸化によりグリシン受容体との親和性が高まることが確認された。以上の結果から、グリシン作動性シナプス伝達により、ポストシナプスでCaMKIIが活性化し、CaMKIIがGephyrinをリン酸化し、Gephyrinと受容体との結合が強まることからグリシン受容体がシナプス部位に凝集することが明らかにされた。本研究からグリシン作動性シナプスの可塑性の分子基盤について、その最重要部分が解明されたと言える。

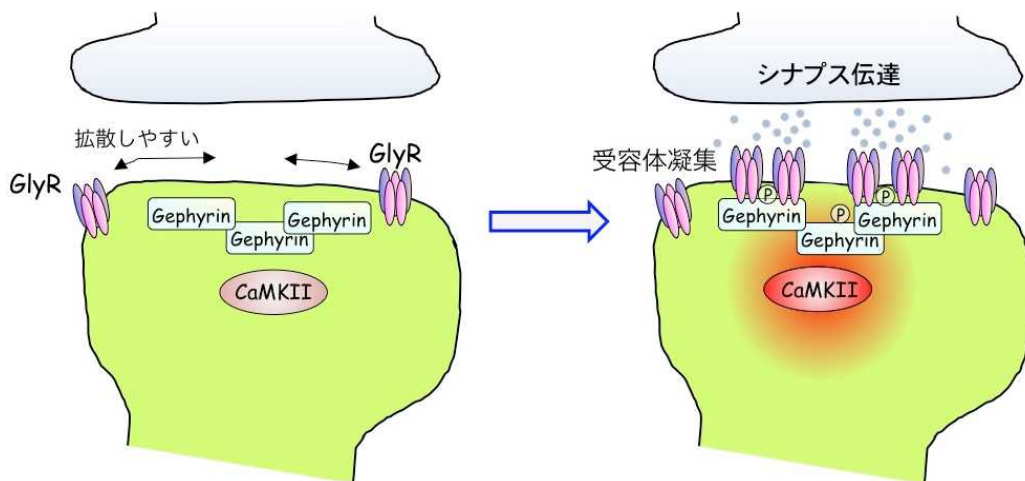


図 グリシン受容体はもともと細胞膜上を拡散しているが、シナプス伝達の反復により、ポストシナプスでCaMKIIが活性化し、シナプスの足場タンパク Gephyrin をリン酸化する。このリン酸化により、グリシン受容体と Gephyrin の親和性が高くなり、受容体はシナプス部位に凝集する。

研究テーマ「グリシン作動性シナプスの生体内可視化と可塑性の生理的意義」

名古屋大学の小田洋一教授らはキンギョに単一波長の音を聞かせると、グリシン作動性シナプスの増強が起きることを報告したが(Oda et al., 1998)、その続報はなく、分子メカニズムや生理的意義には多くの謎が残されている。私たちは遺伝子操作や薬理操作が容易なゼブラフィッシュ稚魚でこれを再現し、可塑性の操作と生理的意義の解明を目指した。まず、Venus タグしたグリシン受容体や RFP タグした Gephyrin をゼブラフィッシュに発現させ、グリシン受容体動態やシナプス部位を動物の脳内で非侵襲的に可視化することに成功した。ゼブラ

フィッシュに音を聞かせると逃避行動が低下するが、種々の音の中でもホワイトノイズ(多くの波長の混ざった音で、サーツという音として聞こえる雨の音と同じもの)を聞かせると逃避行動が顕著に低下することを見出した。グリシン作動性シナプスのライブイメージング系を用いて同一個体のシナプスを経時観察すると、ホワイトノイズを聞かせることで、シナプス部位でのグリシン受容体凝集が高まることが分かった。これはグリシン作動性シナプスの可塑性を可視化することに成功したものであり、この実験系はその後の研究に生かされた。遺伝子操作により、単一の神経細胞でCaMKII活性を上げたり、下げたりすると、その細胞におけるグリシン受容体凝集を増加させたり、低下させたりすることが可能で、それに合わせてゼブラフィッシュの逃避行動も変化することが確認された。これは単一の神経細胞でCaMKII活性を操作することで動物の行動を操作できることを示しており、私たちが解明したグリシン作動性シナプスの可塑性原理が生理的条件下でも使用されていることを示すものである。私たちはホワイトノイズを聞かせるとグリシン受容体凝集が増加して逃避行動が低下することについて、以下の「雨天適応」仮説を提唱するに至った。天気の良い日は鳥は上空から魚を見ており、魚は常に鳥の襲撃にさらされている。鳥が水中の魚を捕まえる時、水にダイブするが、魚は実際の襲撃よりも僅か前に鳥が水面に衝突する音(ポチャンという音)を聞くことになる。魚がこの音を聞いてすぐに体をひねれば、くちばし1つ分でも鳥の襲撃をよけることが可能で、魚は鳥の襲撃をかわすために耳をすましていると考えられる。しかし、雨の日には鳥は水面下の魚を見ることができないので水にダイブして魚を捕獲することはしない。魚は雨の日には音で逃避行動をとる必要はなく、雨の音を聞いてグリシン受容体凝集を増加させることで、不必要な逃避を低下させていると考えられる。本研究から提唱された、この「雨天適応」仮説は動物の行動変化を分子レベル(Gephyrinリン酸化)、シナプスレベル(グリシン受容体凝集増加によるシナプス増強)、行動レベル(逃避行動の低下)で説明する新しい環境適応仮説である。

3. 今後の展開

CaMKIIによるGephyrinリン酸化が明らかになったことで、グリシン作動性シナプス可塑性の動作原理の最重要部分は解明されたと考えている。しかし、CaMKII活性化に必要なポストシナプスでのカルシウムのソースなど、動作原理の完全理解に必要な課題は残っており、これらを解明して、シナプス可塑性の全容を解明したい。本研究から、グリシン作動性シナプス可塑性に臨界期があることも示唆されているが、その分子基盤の解明には至っていない。本研究ではグリシン作動性シナプス関連分子が多く単離されており、それらの解析を継続して臨界期のメカニズムにも迫りたい。

グリシン作動性シナプス可塑性の生理的意義として雨天に適応するという環境適応仮説を提唱したが、現段階ではこれは仮説に過ぎず、実験でこれを証明する必要がある。グリシン作動性シナプスを操作した個体を鳥に襲撃させる実験やもともと鳥の襲撃に備えていない深海魚を用いたシナプス可塑性や逃避行動の実験を計画している。これらの研究から、動物の環境適応仮説を検証できると期待される。本研究で得られた知見を応用すれば、野生の魚の行動を音で操作することも可能で、魚の捕獲という観点から漁業に貢献する研究になることも期待される。漁業の効率が高まれば、魚の単価は安くなり、日本の経済発展や食文化にも大きな影響を与えることになるだろう

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究者は名古屋大学助教から国立遺伝学研究所准教授に異動して、新設の研究室を主宰することになった少し後にさきがけに採択され、キャリア形成の最も重要な時期にさきがけ研究に従事することができたと言える。本研究を遂行するためにはシナプス可塑性のライブイメージングをする必要があり、高感度の共焦点レーザー顕微鏡が不可欠だったが、これをさきがけの研究費で購入できたことが本研究の成功に大きく寄与したことは間違いない。また、シナプス可視化やシナプス操作に必要なトランスジェニックゼブラフィッシュ系統をたくさん樹立して飼育する必要があったが、さきがけの研究費で研究補助者を雇用して、実験動物の飼育や研究データの収集・解析を補助してもらえたので、効率よく研究を進めることができた。

本研究でグリシン作動性シナプス可塑性の可視化や分子基盤解明に成功しており、当初の研究目的は既に達成している。また、本研究でグリシン作動性シナプスに可塑性があることについての生理的意義として雨天への環境適応仮説が提唱されており、今後はその証明が期待される。ゼブラフィッシュをモデル動物として神経科学の基礎研究であるが、深海魚の研究を含めた動物学的視点もあり、魚の行動を操作することによる魚の捕獲効率向上など、実験室にとどまらない漁業への産業応用への展開も秘めている。

さきがけ研究の研究成果は10報の査読付き原著論文(うち7報で筆頭著者あるいは責任著者)と1報の査読付き英文総説(責任著者)に発表されており、他に3報の論文(いずれも筆頭共著者あるいは責任著者)を投稿している。また、招待講演(国内13件、海外4件)を行い、海外の学会では座長を務め、研究会やシンポジウムを3件主催するなどした。隔年で開催される、研究室主宰者だけが参加できる国際学会(PI Meeting)に参加しているが、2013年に参加者による投票で Planning Committee に選出されるなど、分野の若手リーダとしての国際的評価を受けつつある。研究活動を一般向けに宣伝する活動にも力を入れており、市民公開講座での講演、未来館(東京都お台場)での小学生向けワークショップ、ゼブラフィッシュ研究の展示、新聞の科学欄でのコメントなど数多くのアウトリーチ活動を行ってきた。これら一連の研究活動は所属学会や文部科学省からも評価され、2011年の日本生化学会奨励賞、2012年文部科学大臣表彰(科学技術分野)若手科学者賞を受賞した。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

平田研究者は先にグリシン受容体のアンタゴニストであるストリキニンの作用下ではゼブラフィッシュのグリシン作動性シナプスが形成されないことを発見したことに基づき、本研究においてさらにこの可塑性の分子基盤の解明に挑んだものである。グリシン受容体に作用する候補分子を絞り込み Gephyrin(さらにはの神経特異的アイソフォーム)と Dhx37 を同定してそれらの作用を精力的に解析することにより、「グリシン放出→グリシン受容体活性化→ポストシナプスにおける CaMKII 活性化→Gephyrin リン酸化→グリシン受容体凝集増加」という図式を見出したことは大きい成果であり、課題を達成したものである。これらの成果は多数の論文として発表しており、国際的評価も受けつつある。今後は本研究から得られた他のグリシン作動性シナプス

関連分子なども活用して、臨界期も含めたグリシン作動性シナプスの生理的意義などの解明が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ogino, K., Ramsden, S. L., Keib, N., Schwarz, G., Harvey, R. J. and Hirata, H. (2011) Duplicated gephyrin genes showing distinct tissue distribution and alternative splicing patterns mediate Moco biosynthesis, glycine receptor clustering and escape behavior in zebrafish. *J. Biol. Chem.* 286: 806-817.
2. Hirata, H., Wen, H., Kawakami, Y., Naganawa, Y., Ogino, K., Yamada, K., Saint-Amant, L., Low, S. E., Cui, W. W., Zhou, W., Sprague, S. M., Asakawa, K., Muto, A., Kawakami, K. and Kuwada, J. Y. (2012) Connexin39.9 is necessary for coordinated activation of slow-twitch muscle and normal behavior in zebrafish. *J. Biol. Chem.* 287: 1080-1089.
3. Hirata, H., Ogino, K., Yamada, K., Leacock, S. and Harvey, R. J. (2013) Defective escape behavior in DEAH-box RNA helicase mutants improved by restoring glycine receptor expression. *J. Neurosci.* 33: 14638-14644.
4. Hirata, H., Nanda, I., van Riesen, A., McMichael, G., Hu, H., Hambrock, M., Papon, M.-A., Fischer, U., Marouillat, S., Ding, C., Alirol, S., Bienek, M., Preisler-Adams, S., Grimme, A., Seelow, D., Webster, R., Haan, E., MacLennan, A., Stenzel, W., Yap, T. Y., Gardner, A., Nguyen, L. S., Shaw, M., Lebrun, N., Haas, S. A., Kress, W., Haaf, T., Schellenberger, E., Chelly, J., Viot, G., Shaffer, L. G., Rosenfeld, J. A., Kramer, N., Falk, R., El-Khechen, D., Escobar, L. F., Hennekam, R., Wieacker, P., Hübner, C., Ropers, H.-H., Gecz, J., Schuelke, M., Laumonier, F. and Kalscheuer, V. M. (2013) Mutations of ZC4H2 are associated with arthrogryposis multiplex congenita and intellectual disability and through impairment of central and peripheral synaptic plasticity. *Am. J. Hum. Genet.* 92: 681-695.
5. Horstick, E. J., Linsley, J. W., Dowling, J. J., Hauser, M. A., McDonald, K. K., Ashley-Koch, A., Saint-Amant, L., Satish, A., Cui, W. W., Zhou, W., Sprague, S. M., Stamm, D. S., Powell, C. M., Speer, M. C., Franzini-Armstrong, C., Hirata, H.* and Kuwada, J. Y.* (2013) Stac3 is a component of the excitation-contraction coupling machinery and mutated in Native American myopathy. *Nature Commun.* 4: 1952. (*Corresponding authors)
6. Yamanaka, I., Miki, M., Asakawa, K., Kawakami, K., Oda, Y. and Hirata, H. (2013) Glycinergic transmission and postsynaptic activation of CaMKII are required for glycine receptor clustering in vivo. *Genes Cells* 18: 211-224.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

日本生化学会奨励賞(2011年10月)

文部科学大臣表彰(科学技術分野)若手科学者賞(2012年4月)

研究報告書

「遊泳運動を規定する神経回路の発生と動作原理の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 堀江 健生

1. 研究のねらい

神経系の機能を理解するためには、個体レベルで神経回路の全体像を明らかにするとともに神経回路を構成する一つ一つのニューロンの機能を解明することが重要である。しかしながら、脊椎動物の脳神経系は膨大な数のニューロンから構成されており、神経回路の全体像とその機能を一つ一つの細胞レベルで解明することは現時点ではほとんど不可能に近い。尾索動物ホヤ幼生の中枢神経系は脊椎動物の脳神経系の基本構造を備えているが、わずか 100 個程度のニューロンから構成されている。ホヤ幼生を用いれば、脊椎動物の中枢神経回路の全体像とその機能を細胞一つ一つのレベルまで掘り下げて解明することが可能である。本研究課題では、ホヤ幼生の中枢神経回路のうち、遊泳運動を規定する神経回路に着目し、その発生と動作原理を細胞レベル、遺伝子レベルでの解明することを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

尾索動物ホヤの幼生はオタマジャクシ型の形態をしており、背側に神経管が位置するなど脊椎動物の脳神経系の基本設計を備えているが、その中枢神経系はわずか 100 個程度と少数の細胞から構成されている。本研究課題では、ホヤ幼生の中枢神経回路のうち、遊泳運動を規定する神経回路に着目し、その発生と動作原理を細胞レベル、遺伝子レベルでの解明することを目的として研究を行った。

種々のニューロンを可視化したトランスジェニック系統を用いた形態学的な解析から、ホヤ幼生の遊泳運動神経回路は左右 5 対 10 個のコリン作動性ニューロンと 2 対 4 個の GABA/グリシン作動性の抑制性介在ニューロンの合計わずか 14 個のニューロンから構成されることが明らかとなっている。本研究課題では、このようなシンプルなホヤ幼生の遊泳運動神経回路について『神経回路の活動イメージング』、『ニューロンの機能を修飾した個体の遊泳運動解析』、『特定のニューロンを欠損、または置換させた個体の遊泳運動解析』、『遊泳運動変異体の神経回路と原因遺伝子の解析』以上 4 つの研究を行い、遊泳運動を規定する神経回路の発生とその動作原理の解明を試みた。その結果、遊泳運動に必須の役割をしているニューロン、繰り返し運動(リズム形成)に必須の役割をしているニューロンを同定し、ホヤ幼生の遊泳運動を生み出す神経回路メカニズムの一端を示すことに成功した。また、本研究の過程において、ホヤにおいて従来よりも高効率で突然変異体を作製する方法を開発することに成功した。以下にその詳細を記す。

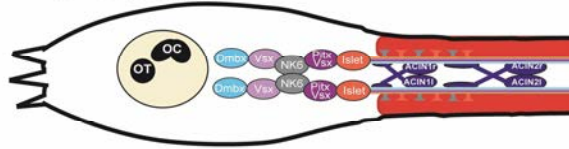
(2) 詳細

(1) 遊泳運動を規定する神経回路の活動イメージング

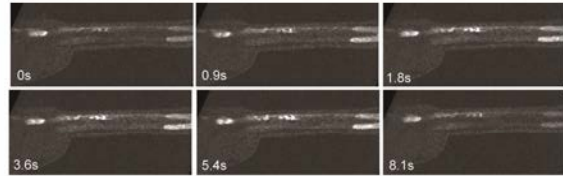
ホヤ幼生の遊泳運動神経回路は左右 5 対 10 個のコリン作動性ニューロンと 2 対 4 個の GABA/グリシン作動性の抑制性介在ニューロン (ACIN) から構成される (図 1A)。また、コリン作動性ニューロンはそれぞれ発現する転写因子が異なっており、転写因子のエンハンサーを利用することにより、コリン作動性ニューロンを 1 対ずつ区別してラベルすることが可能である (図 1A)。これらの 5 対 10 個のコリン作動性ニューロンと 2 対 4 個の抑制性介在ニューロン (ACIN) において、Ca²⁺ 指示蛍光タンパク質 GCaMP8 を個々のニューロンで発現させ、高速共焦点顕微鏡を用いて遊泳運動を行う際の神経活動イメージング

図1. 遊泳運動神経回路を規定する神経回路の活動イメージ

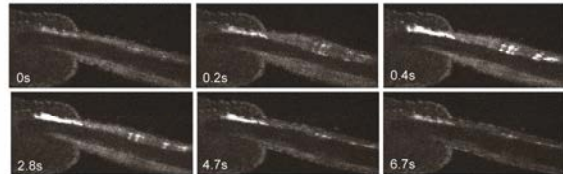
A: ホヤ幼生の遊泳運動神経回路



B: NK6 発現細胞の活動イメージング



C: Islet 発現細胞の活動イメージング

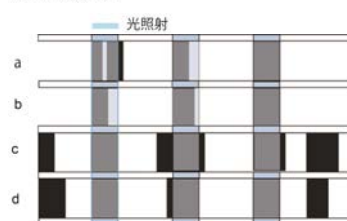


を行った。その結果、前方から3番目に位置する NK6 発現細胞、最も後方に位置する Islet 発現細胞が、遊泳運動を行う際に強く活動することが明らかとなった。この結果は、NK6 発現細胞、Islet 発現細胞が筋肉に対してエンドプレート形成しているという、形態学的な観察結果と一致しており、これら2対のニューロンが筋肉の収縮を生み出し、遊泳運動を制御していることを示唆している。一方、尾部の前端部に位置している ACIN についても神経活動イメージングを行ったところ、ACIN も遊泳運動を行う際に強く活動した。したがって、ホヤ幼生の遊泳運動はこれらのニューロンの活動によって生み出されることが示唆された。

(2)ニューロンの機能を修飾した個体の遊泳運動解析

ホヤ幼生が遊泳運動を行う際に強く活動する Islet 発現細胞において、光制御型チャネル/ポンプ (ChR2/NpHR) を発現するトランスジェニック個体を作製し、機能解析を行った。Islet 発現細胞において ChR2 を発現させた個体に青色光を照射し、Islet 発現細胞

A: ChR2発現



B: NpHR発現

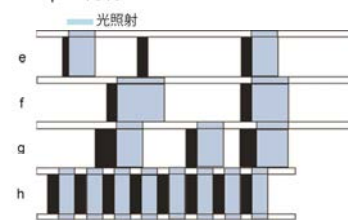


図2. Islet発現細胞の機能を修飾した個体の遊泳運動解析

A: ChR2発現: 光を照射により遊泳運動が引き起こされる。

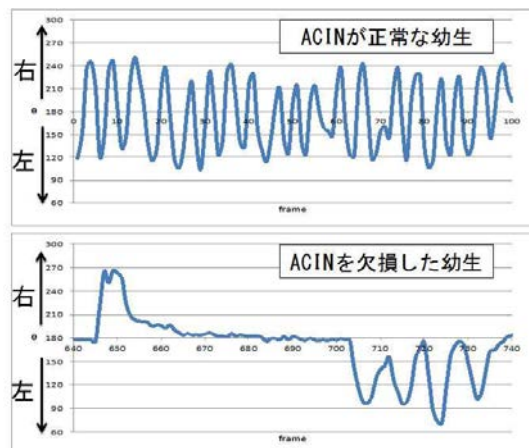
B: NpHR発現: 光を照射により遊泳運動が停止する。

縦軸の黒色のバーはホヤ幼生が遊泳していることを示している。

の活動を活性化したところ、実験を行った全ての個体において遊泳運動が引き起こされた (図 2A)。一方、Islet 発現細胞において NpHR を発現させた個体に緑色光を照射し、Islet 発現細胞の活動を抑制したところ、遊泳運動中の個体は急激に遊泳を停止した (図 2B)。以上の結果から、Islet 発現細胞は遊泳運動に必須の役割をしていることが示された。

(3)特定のニューロンを欠損、または置換させた個体の遊泳運動解析

特定のニューロンが欠損、または置換した個体を得ることを目的として、遊泳運動神経回路に存在するニューロンで発現する種々の転写因子について、機能阻害実験および過剰発現実験を行った。その結果、尾部前端部に存在する ACIN と名付けた 2 対 4 個の抑制性介在ニューロンが完全に欠損した個体を得ることに成功した。この個体では ACIN 以外のニューロンは正常に分化している。正常な個体と ACIN が欠損した個体について遊泳運動の解析、特に尾部運動の交互性と遊泳運動



の持続性について解析を行った。正常な個体は尾部を左右に交互にリズムカルに振ることにより遊泳運動を行う。一方、ACIN が完全に欠損した個体では尾部の振りの左右の交互性が失われてしまった。また、ACIN を欠損した個体は持続的な遊泳運動を行うことが出来なかった。以上の結果から、ACIN が左右の交互性を生み出し、リズムカルな遊泳運動を行うために必須の役割をしていることが明らかとなった。この結果は ACIN がリズムカルな尾部の振りを生み出す神経回路である Central Pattern Generator の重要な構成要素の一つであることを示唆している。

(4)遊泳運動変異体の神経回路と原因遺伝子の解析

遊泳運動や遊泳運動神経回路の形成に必須の遺伝子を同定することを目的として、遊泳運動に異常を示す突然変異体のスクリーニングを行った。我々は *Minos* トランスポゾンを用いた Gal4 エンハンサートラップ法を応用することによって、約 83% という高い確率で遺伝子の近傍や内部にトランスポゾンが挿入されるトランスポゾンベクターを構築することに成功している。約 3,000 個の卵のスクリーニングにより、計 48 系統の Gal4 エンハンサートラップ系統を単離した。得られた Gal4 エンハンサートラップ系統について、トランスポゾンの挿入箇所を TAIL-PCR 法により決定したところ神経特異的 RNA 結合タンパク質 *Musashi*、 Na^{2+} チャンネル、カニン酸受容体などいくつかの神経関連遺伝子を変異体の原因候補遺伝子として同定した。得られた Gal4 エンハンサートラップ系統について、ホモ個体を作製し表現型の解析を行ったが、明確に遊泳運動に異常のある変異体は得ることが出来なかった。しかしながら、今回の突然変異体のスクリーニングから心臓の拍動やエラの形成に異常のある変異体などいくつかの変異体を単離することは出来ており、今後はスクリーニングの数を増やすことにより遊泳運動の変異体を単離することが可能であると期待される。

3. 今後の展開

本研究では、ホヤ幼生の遊泳運動に必須の役割をするニューロン、繰り返し運動(リズム形成)に必須のニューロンを同定することに成功し、ホヤ幼生の遊泳運動を生み出す神経回路メカニズムについてその一端を明らかにすることが出来た。しかしながら、遊泳運動神経回路に存在

する全てのニューロンの機能を明らかにすることは出来ていない。今後は、ニューロンの人為的な操作を行った個体において神経活動イメージングを行うなど、本研究で別々に行っていた実験を統合して行うことにより、遊泳運動を生み出す神経回路の動作原理を1細胞レベルで解明したい。また、ホヤから得られた知見を、マウス、ゼブラフィッシュ、線虫、ショウジョウバエ幼虫などの他のモデル動物の知見と比較することにより、進化的に保存された運動神経回路の動作原理の解明につなげていきたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

当初の目標であった遊泳運動神経回路に存在する全てのニューロンの機能を1細胞レベルで解明することは出来なかったが、これまで技術的な困難さからほとんど研究が進んでいなかったホヤ幼生の神経回路の生理機能の研究にいくつかの新しい手法(神経活動イメージングや光遺伝学的)を取り入れることによって、遊泳運動を生み出す神経回路メカニズムについて一端を示すことは出来た。ホヤ幼生の尾部前端部に存在する抑制性介在ニューロン(ACIN)を介したリズムの形成機構は進化的に保存されたメカニズムであり、詳細な解析を進めることにより、脊椎動物の脊髄神経回路のシンプルなモデルになり得ると期待している。「遊泳運動変異体の単離と泳運動変異体の神経回路と原因遺伝子の解析」に関しては、遊泳運動変異体を得ることが出来ず、その目標を達成することが出来なかった。さきがけ研究期間中にホヤにおいてTALENやCRISPR/Cas9システムを応用することによって、組織・細胞特異的に遺伝子をノックアウトする方法が確立された。今後は、我々がカタログ化しているホヤ幼生の脳・神経系で特異的に発現する遺伝子群を、遊泳運動神経回路で特異的にノックアウトすることにより、当初の目標としていた遊泳運動や遊泳運動神経回路の形成に重要な遺伝子を単離することが出来ると考えている。そして、今後は、本研究で導入した方法を統合的に組み合わせ、当初の目標を達成出来るような研究を展開したいと考えています。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ホヤは脊椎動物と同じ基本設計を有する中枢神経系を持ちながら、その神経細胞数は約100個、特に遊泳運動に直接関わる回路は14個の神経細胞からなる。本研究はこの点に着目して、回路の活動イメージング、光遺伝学による特定細胞の活動操作、転写因子機能阻害による特定神経細胞の欠損または置換などの方法により、遊泳運動神経回路の動作原理の解明を意欲的に目論んだものである。実際に高速共焦点顕微鏡を用いたカルシウムイメージングにより、遊泳運動中の14個の神経細胞の活動様式を明らかにし、特定の細胞に光制御型チャネル/ポンプを発現させてこれを強制的に活性化または抑制して遊泳運動を自在に操作することに成功し、また特定の神経細胞を欠損した個体を作成してその遊泳運動における役割を証明したことは大きい成果であり、課題の骨格を達成したものと言える。またさきがけ領域会議を機にOISTの研究者との共同研究を展開している。上記の成果も早期に論文にまとめ、今後この神経回路の全神経細胞の役割を明らかにして、脊椎動物の遊泳・爬行様式の理解に新たな視点を開くことが期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kamiya C, Ohta N, Ogura Y, Yoshida K, Horie T , Kusakabe TG, Satake H, Sasakura Y. Nonreproductive role of gonadotropin-releasing hormone in the control of ascidian metamorphosis. <i>Dev. Dyn.</i> (2014) in press
2. Hozumi A, Yohida R, Horie T , Sakuma T, Yamamoto T, Sasakura Y. Enhancer activity sensitive to the orientation of the gene it regulates in the chordate genome. <i>Dev. Biol.</i> (2013), 375, 79–91.
3. Razy-Krajka F, Brown ER, Horie T , Callebert J, Sasakura Y, Joly JS, Kusakabe TG, Vernier P. Monoaminergic modulation of photoreception in ascidians:evidence for a proto- hypothalmo- retinal territory. <i>BMC. Biol.</i> (2013), 10, 45
4. Sasakura Y, Kanda M, Ikeda T, Horie T , Kawai N, Ogura Y, Yoshida R, Hozumi A, Satoh N, Fujiwara S. Retinoic acid-driven Hox1 is required in the epidermis for forming the otic/atrial placodes during ascidian metamorphosis. <i>Development</i> (2012) 139, 2156–2160.
5. Nishitsuji K, Horie T , Ichinose A, Sasakura Y, Yasuo H, Kusakabe TG. Cell lineage and <i>cis</i> -regulation for a unique GABAergic/glycinergic neuron type in the larval nerve cord of the ascidian <i>Ciona intestinalis</i> . <i>Dev. Growth Differ.</i> (2012) 54, 177–186.
6. Sasakura Y, Mita K, Ogura Y, Horie T . Ascidians as excellent chordate models for studying the development of the nervous system during embryogenesis and metamorphosis. <i>Dev. Growth Differ.</i> (2012) 54, 420–437.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 堀江健生 「脳・神経系の発生プログラムの多様化と進化機構の研究」筑波大学研究成果フォーラム 2013 -世界を切り開くグローバル研究拠点-, 2012年1月、東京
2. Horie T, Sasakura Y. 「Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells that form the adult nervous system」 1st JABMIO International Symposium, Tokyo, Japan (2012, 1)
3. 堀江健生 「ホヤ幼生における遊泳運動神経回路の発生とその動作原理」 第7回 Motor Control 研究会 ワークショップ 2013年9月、東京
4. 堀江健生、大倉正道、日下部岳広、中井淳一、中川将司 「Structural and physiological analysis for a central pattern generator controlling swimming locomotion of the ascidian larva」 第91回日本生理学会大会 シンポジウム 2014年3月、鹿児島

5. 堀江健生、大倉正道、日下部岳広、中井淳一、中川将司「ホヤ幼生の遊泳運動神経回路の構造と生理機能の解析」日本動物学会第85回仙台大会 シンポジウム 2014年9月、仙台

研究報告書

「個々の記憶情報をコードする神経回路の解析と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 松尾 直毅

1. 研究のねらい

記憶学習は動物が厳しい自然環境下で生き延びていく上で不可欠な能力であるばかりか、ヒトにとって精神活動の基盤ともいえる重要な基本生命機能のひとつである。では、個々の記憶情報は脳内でどのように区別して記録され、必要に応じて適切に読み出されるのか？ この極めて素朴な疑問に対して、現代の神経科学で広く信じられている有力な説明は半世紀以上も昔に心理学者 Hebb 博士により提唱された“cell assembly 仮説”である。この仮説では、「記憶情報は協調的な活動により形成される複数の神経細胞の機能的な集団(cell assembly)により符号化されている」とされている。この仮説は脳動作原理の根幹を為すものの一つであるにもかかわらず、実証は未だ為されていない。なぜならば、これらの集団は常に特定領域の特定細胞に局在しているのではなく、むしろ脳内でまばらに散らばっていると考えられるため、従来手法では、その同定さえも極めて困難であるからである。しかし、私たちが開発した“任意の時期に活動した神経細胞集団に選択的に任意の遺伝子操作を行うことが可能なトランスジェニックマウス”を用いれば、記憶の獲得(学習)時に活動した神経細胞集団の活動を選択的に操作することが可能であり、行動実験により直接その記憶との因果関係を個体レベルで検証することができる。このように、最先端のマウス遺伝学と行動心理学、イメージング等を組み合わせた融合的研究により、記憶情報が脳内のどこで、どのように区別して表現されているのか？という基本的な重要問題の解明に取り組む。

2. 研究成果

(1) 概要

任意の時期に活動した神経細胞集団に任意の遺伝子操作を行うことが可能な独自の遺伝子改変マウスを用いることにより、恐怖条件付け学習時に活動した特定の神経細胞集団の活動操作を行った。これらの神経細胞集団のシナプス伝達を遮断した状態で、文脈依存的恐怖記憶の想起テストを行ったところ、障害が見られた。一方、学習後に記憶消去訓練を行い、見かけ上の恐怖記憶が消えた状態で、学習時に活動した神経細胞集団の再活動を行ったところ、条件刺激無しの状態でも恐怖記憶が人為的に再生されることを見出した。これらの結果は、“記憶”と“学習時に活動した一部の特定神経細胞集団の活動”との間の因果関係(必要性と十分性)を示すもので、目に見えない記憶の実体を実験的に示すことができた。

(2) 詳細

近年の最初期遺伝子の神経活動依存的な発現を利用した神経活動マッピングや、多電極同時記録による *in vivo* 電気生理学的研究から間接的に、その神経活動が記憶と相関を示す神経細胞集団が見出されつつある。しかし、これらの神経細胞集団が実際に記憶情報を表現

しているのかどうかを明らかにするためには、その活動を選択的に抑制(もしくは賦活化)することにより、実際の記憶の表出が抑制(もしくは再生)されるかどうかの因果関係を示す必要がある。しかし、従来の薬理的・組織傷害的手法では、標的の脳組織内に存在する全ての細胞・回路に影響を与えまい、組織内に散在する一部の“記憶痕跡細胞集団”の活動を選択的に操作することは不可能である(図1)。そこで、本研究課題では、神経活動依存的に活動する最初期遺伝子の一つ *c-fos* 遺伝子のプロモーターとテトラサイクリン誘導発現系を用いた独自の遺伝子改変マウスのシステム(図2: Matsuo et al., *Science* 2008; Reijmers et al., *Science* 2007)を活用した。

図1

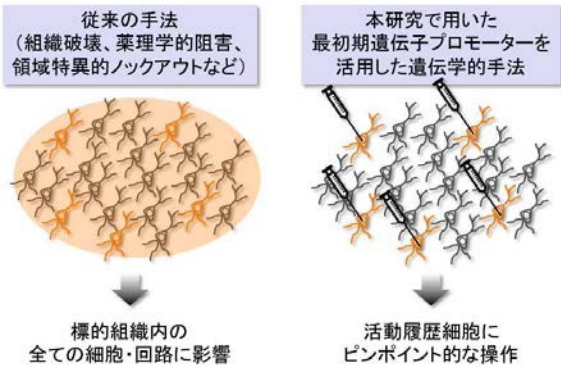
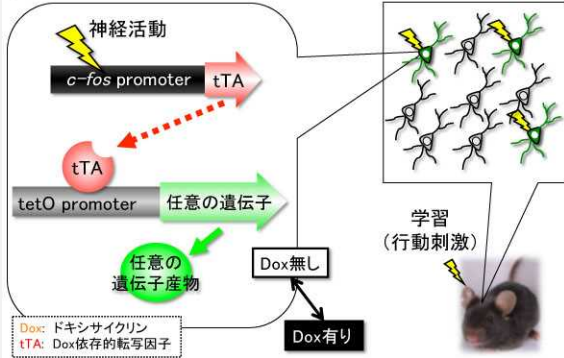


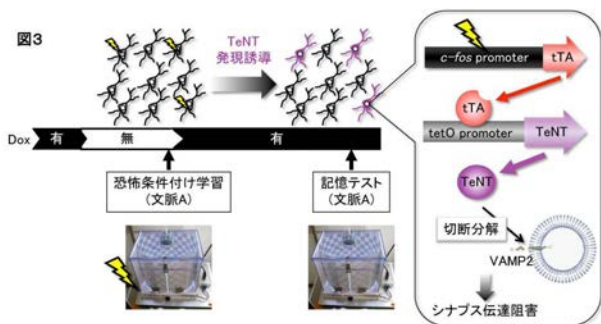
図2



①テタヌス毒素 (TeNT)を用いた記憶痕跡細胞集団の活動遮断の解析

c-fos-tTA マウスと、*tetO* プロモーターの制御下で tetanus toxin light chain (TeNT) を発現するトランスジェニックマウスを掛け合わせたダブルトランスジェニック (Tg) マウスの作製を行った。TeNT は神経活動依存的な前シナプス末端からのシナプス伝達物質

放出に不可欠な VAMP2 (synaptobrevin) を切断不活化することが知られている。そこで、*c-fos-tTA* x *tetO-TeNT-GFP* マウスを用いることにより、恐怖条件付け学習時に活動した神経細胞集団のシナプス伝達を選択的かつ一時的に遮断し、その記憶の表出に与える影響を行動学的に解析した(図3)。具体的には、Doxycycline (Dox) を含まない餌を与え始めて 3 日目に恐怖条件付け学習訓練を行った。TeNT mRNA に対する *in situ* hybridization および GFP に対する免疫組織化学染色の結果、海馬 CA1 領域、齒状回、大脳皮質、扁桃体外側核において、~5% の非常に疎らな発現が認められた。また、神経細胞マーカー NeuN や興奮性神経細胞マーカー CaMKII α と



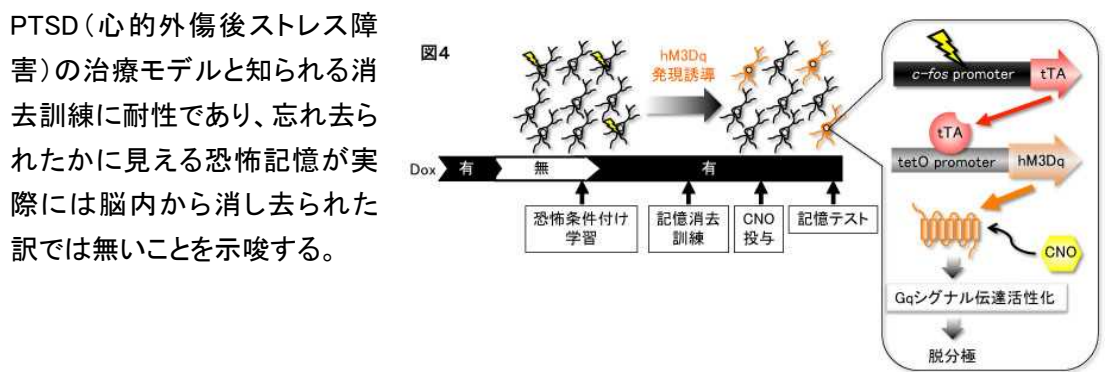
の二重染色の結果、ほぼ100%の TeNT-GFP 陽性細胞が興奮性神経細胞であることを明らかにした。訓練とは無関係な神経活動による TeNT の発現誘導を防ぐために、訓練後は再び Dox を含む餌を与えた。そこで、学習訓練の24時間後に文脈依存的な恐怖記憶の想起テストを行ったところ、対照群のマウスに比べて有意に低い freezing (すくみ反応) を示すことを見出した。しかし、学習時に誘導された TeNT 蛋白質が既に分解された28日後に同様の想起テストを行ったところ、対照群のマウスと同程度の顕著な freezing を示した。これらの結果は、学

習時に活動した神経細胞集団の活動を選択的に遮断することにより、記憶の想起が障害されたことを示唆している。つまり、学習時に活動した神経細胞集団の活動が、その記憶の想起に必要であるという因果必然性を示した (Matsuo, *submitted*)。

さらに、学習時に活動した神経細胞群のシナプス伝達が TeNT により阻害された状態で、再学習訓練を行った。対照群の野生型マウスでは再学習による記憶の強化 (freezing の増加) が認められたが、Tg マウスでは freezing の増加が認められなかった。学習障害の特異性を明らかにするために、異なる文脈に対する恐怖条件付け学習を行い、記憶想起テストを行ったところ、Tg マウスにおいても顕著な freezing を示したことから、特定の記憶情報を担う一部の神経細胞集団の活動を選択的に遮断していることが示唆された。これらの結果は、特定の記憶情報を担う神経細胞集団がいったん決定されて割り当てられると、その神経活動が障害されても代替りの細胞集団に記憶情報が割り当てられるという補償機構が生じないことを示唆する (Matsuo, *submitted*)。本研究により示唆される、同じ学習には優先的に同じ神経細胞集団が使われるという頑固な機構の存在は、繰り返し学習による記憶の強化を担保する重要なものであると考えられる。

②DREADD を用いた記憶痕跡細胞集団の人為的賦活化の解析

DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) システムを利用することにより、学習時に活動した神経細胞群の人為的な賦活化を行った。そのために、*cfos*-tTA マウスと *tetO*-hM3Dq マウスを掛け合わせたダブル Tg マウスを作製した。このマウスを用いて、Dox 除去期間中に恐怖条件付け学習訓練を行った。この時に活動した神経細胞集団を hM3Dq により標識した後、条件付けを行った環境にマウスを繰り返し暴露することにより記憶の消去訓練を行った。その後、CNO (clozapine-N-oxide) を投与することにより、hM3Dq 標識細胞集団の人為的な再活動を誘導した (図4)。その結果、対照群のマウスと比べて顕著なすくみ反応を示すことを見出した。つまり、恐怖条件付け学習時に活動した特定細胞集団を人為的に再活動させることにより、恐怖記憶を再生するのに十分であるという因果十分性を実証した (Yoshii, Hosokawa & Matsuo, *submitted*)。また、恐怖記憶の痕跡は、ヒトの PTSD (心的外傷後ストレス障害) の治療モデルと知られる消去訓練に耐性であり、忘れ去られたかに見える恐怖記憶が実際には脳内から消し去られた訳では無いことを示唆する。



3. 今後の展開

本研究により、記憶という実体の見えないものを自然科学の言葉で扱うことができる基盤を形成することができた。このことは、個々の記憶情報を担う細胞集団 (の一部) を脳内で可視化し、活動操作することが可能であることを意味する。今後は、これらの基盤に加えて、*in vivo* カルシ

ウムイメージング法なども組み合わせ、記憶痕跡細胞集団の特性を明らかにする研究を展開したい。例えば、無数に存在する神経細胞集団の中から、どのような仕組みによって、これらの一部の特定の細胞集団が学習過程において選択され、特定の記憶情報が割り当てられるのか？という問題。同一の脳領域内、もしくは複数の脳領域にまたがる cell assembly の相互作用の解析も重要な研究となる。また、記憶は時間経過や様々な経験により変化するが、これらの神経基盤と仕組みを明らかにしていきたい。記憶は私たちヒトの精神活動(心)の基盤とも言える重要な生命機能である。記憶メカニズムの理解は将来的に“心”というものの科学的・物質的基盤の理解の礎となることが期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究により、申請時の目標であった、記憶という実体の曖昧な目に見えないものの物質的基盤が脳内の特定の神経細胞群の活動にあることの因果関係を動物個体レベルで示すことができた。更に、個々の記憶情報がどのように区別して脳内で表現されているのか？という本研究課題に密接に付随した問題に関しても、記憶の汎化現象に着目して、独自の活動履歴可視化マウスを活用した解析を行い、似た情報の想起の際に区別を行っている脳領域の同定を行うことができた(Yokoyama & Matsuo, *in revision*)。当初の研究目標は競争に敗れたものの、責任著者である論文3報を投稿中・リバイス中であり(2014年11月現在)、関連した共同研究論文1本を *Science* 誌に公表できたことから、ほぼ達成できたと考えている。独自の遺伝子改変マウスを利用した研究は、これまで進まなかった“個々の”記憶情報の操作、および動作原理の解明という革新的な研究領域の開拓・進展に大きく貢献してきたと考えている。実際に、私たちが開発したトランスジェニックマウスを利用した記憶痕跡や記憶操作に関する画期的な成果が海外の有力研究室から次々と公表されている(Garner et al., *Science* 2012; Liu et al., *Nature* 2012; Ramirez et al., *Science* 2013; Redondo et al., *Nature* 2014 など)。このことは同時に、国内外の有力研究グループとの厳しい競争となっていることを意味し、いかにして小規模のグループで太刀打ちするのかの戦略を再考させられることとなった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

先に開発した、任意の時期に活動した神経細胞集団に任意の遺伝子操作を行うことができる遺伝子改変マウスを活用して、「記憶情報は協調的な活動により形成される複数の散在神経細胞の機能的な集団により符号化されている」という cell assembly 仮説の実験的検証に意欲的に挑戦したものである。TetOプロモーターを利用してシナプス伝達を可逆的に遮断できる毒素を薬物投与により発現するよう仕組んだ遺伝子改変マウスを作出して、状況空間を記憶させる恐怖刺激を与えたのちシナプス遮断を行うと記憶の想起が障害されること、遮断から回復する1ヵ月後に記憶想起も回復することを明らかにし、またその特異性も実証して、特定の記憶情報を担う一部の神経細胞集団が存在することを示し得たことは大きい成果であり、課題の根幹を達成したものである。世界的にも競争の激しいこの分野において小グループでこれを成し

遂げたことも注目される。今後は解剖学的解析も加えてこの記憶“痕跡”細胞集団の実体と特性を明らかにし、さらには複数の脳領域にまたがる記憶細胞集団の解析などから、記憶における各領域の機能とその制御の理解にも発展できればさらに大きな成果が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Takahashi N, Kitamura, Matsuo N, Mayford M, Kano M, Matsuki N, Ikegaya Y.
Locally synchronized synaptic inputs.
Science 335, 353–356 (2012)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<学会招待講演>

第 92 回日本生理学会大会 シンポジウム

「Visualization of Neural Representations of Memory」

平成 27 年 3 月 21 日、神戸市

第 88 回日本薬理学会年会 シンポジウム

「Dynamic Changes in Hippocampal Ensemble Activities Associated with Contextual Fear Memory Generalization」

平成 27 年 3 月 19 日、名古屋市

第 36 回日本神経科学大会 シンポジウム

「Manipulation of Memory Engram Using Chemical Genetics」

平成 26 年 9 月 12 日、横浜市

第 3 回大阪大学神経難病フォーラム

「情動記憶の脳内表現と制御」

平成 26 年 8 月 9 日、吹田市

生理学研究所 「情動研究会」

「情動記憶の脳内表現と表出の制御」

平成 25 年 9 月 3 日、岡崎市

第 36 回日本神経科学大会 シンポジウム

「Approach for Understanding the Mechanism Linking Multimodal Information to Emotional Behavior」

平成 25 年 6 月 20 日、京都市

第35回日本分子生物学会年会 ワークショップ

「神経活動操作による人為的記憶想起」

平成 24 年 12 月 11 日、福岡市

生理学研究所「記憶回路研究会」

「記憶痕跡の探究」

平成 24 年 11 月 21 日、岡崎市

東京大学大学院医学研究科 機能生物学セミナー

「遺伝子改変マウスを用いた記憶の実体の探究」

平成 24 年 10 月 29 日、文京区

The Second International Young Scientists Career Development Organization Symposium

「In Search of the Memory Engram Using Genetically Engineered Mice」

平成 24 年 2 月 1 日、京都市

<著作物>

北西卓磨、松尾直毅

「脳の空間認知システム」

ライフサイエンス領域統合レビュー

ライフサイエンス統合データベースセンター

松尾直毅

「記憶痕跡の可視化と操作より探る記憶情報の脳内表現」

ブレインサイエンスレビュー2014, 233-250 (2014)

クバプロ

松尾直毅

「記憶痕跡の可視化と操作」

生体の科学 64, 36-40 (2013)

医学書院

研究報告書

「シグナル分子の活性化観察と操作によるシナプス可塑性機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 村越 秀治

1. 研究のねらい

神経回路の形成・機能の基礎となるシナプス結合の可塑性は、シナプスの後端を形成するスパイン内の情報伝達系によって制御されていると考えられる。しかしながら、スパイン内の生化学反応システムについては、調べる方法論がないためにこれまで殆ど分かっていなかった。本研究では、海馬組織深部神経細胞のスパイン内分子活性化を2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法を用いて直接可視化する。このようにして、各種シグナル分子活性の時空間パターンを調べることで、シナプス可塑性を可能にするシグナル伝達システムを明らかにする。また、独自の光応答性シグナル分子を開発し応用することで、分子活性と機能の因果関係にまで迫ることを目標とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究により、光照射によってシグナル分子活性を操作することができる光応答性分子の新規開発に成功した。この分子を用いて、海馬神経細胞のシナプス可塑的変化惹起時のCaMKIIの役割を詳細に調べることで、CaMKIIが可塑的変化を誘起することが分かり、さらに活性化時間を光操作することで、表現型が変わることを見出した。一方で、分子活性化をモニターするための新規蛍光分子やシグナル分子プローブの開発にも成功しており、今後の2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法を用いた分子活性化イメージングを高精度・低毒性で行うことができるようになっただけでなく、in vivo イメージングへの応用の足掛かりができた。

(2) 詳細

研究テーマ1「光応答性 CaMKII 阻害分子の開発」

シナプス結合の可塑性は、学習や記憶の最小単位と考えられている重要な細胞現象である。中枢神経系の興奮性シナプスにおいて、後シナプスは、マッシュルームのような形をした直径0.5マイクロメートル程度の突起になっており、この構造をスパイン(棘突起)と呼ぶ。記憶学習の基盤となるシナプス可塑性は、スパイン内部の分子によるシグナル伝達によって発生すると考えられている。これまでに、スパイン構造が情報伝達タンパク質の局在や活性化を制御するうえで重要であると考えられており、実際にシナプス結合の増強や減弱に伴って、スパインの大きさも増大、縮小することが知られている。しかしながらどのような分子メカニズムによってこのような形態変化が起こっているのかは殆ど分かっていない。本研究では、Rho GTPase やアクチンを制御することでシナプスの可塑性にとって重要な役割を果たしていると考えられるCaMKIIに着目し、CaMKIIの活性化を光照射によって制御することができる分子を

開発し、これを用いてシナプス可塑性発現に対する CaMKII の役割を調べた。

1) 遺伝子工学を用いた光活性型 CaMKII 阻害分子の開発

CaMKII の活性を制御できるようにするため、植物の光受容タンパク質キナーゼである Phototropin1 の LOV2ドメインを用いた。LOV2ドメインは青色光照射によって、その分子構造が可逆的に変化する。本研究では、CaMKII の阻害ペプチドである AIP2 に LOV2 を遺伝子工学的に融合させ、光照射依存的に AIP2 の活性が変化するようにし、paAIP2 (photo-activatable AIP2)と名付けた(図 1A)。光照射依存的な paAIP2 の CaMKII への結合のタイムコースを詳細に調べるために、GFP を融合させた CaMKII と RFP を融合させた paAIP2 を HeLa 細胞に発現させ、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡により観察したところ、paAIP2 の CaMKII への結合が青色光照射後 30 秒以内に見られた(図 1B)。CaMKII に結合しない AIP2 の変異体(R5AR6A)では光照射を行っても結合は見られなかった(data not shown)。このことは光照射依存的に AIP2 の CaMKII への結合が起こっていることを示している。

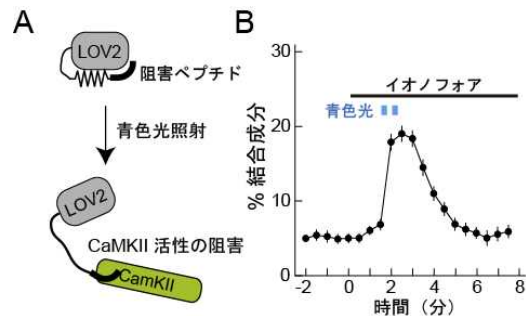


図 1. 遺伝子工学を用いた光活性型 CaMKII 阻害分子の開発
(A) 光活性型 CaMKII 阻害分子の構造。
(B) 青色光照射後の結合のタイムコース。

2) paAIP2 によるスパイン可塑的変化の阻害

次に光照射による CaMKII 阻害がケイジドグ

ルタミン酸刺激により誘起されるスパイン体積の可塑的な変化を阻害するかどうかを調べた。まず、海馬スライス CA1 領域にある神経細胞に遺伝子銃を用いて GFP と paAIP2 を発現させた。ケイジドグルタミン酸による 2 光子単一スパイン刺激 (0.5 Hz で 30 パルス) を行ったところスパイン体積は一過的に3倍程度増大した後、収縮し、刺激前よりも 2 倍程度の体積の状態を 20 分以上持続していた(図 2)。次に、スパイン体積の可塑的な変化を引き起こすのに必要な CaMKII 活性化の時間領域を調べるためにグルタミン酸によるスパイン刺激と青色光照射のタイミングを少しずつずらし

ながら実験を行った(図 2)。グルタミン酸刺激と青色光照射のタイミングを完全にオーバーラップさせた場合には、スパイン体積変化がほぼ完全に抑制された。次に、刺激と青色光照射のタイミングを 10 秒、30 秒、60 秒

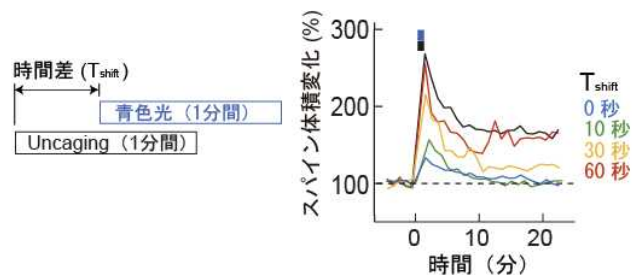


図 2. グルタミン酸によるスパイン刺激と青色光照射のタイミングをずらした時のスパイン体積変化をモニターした。

とずらしていったところ、Tshift が 30 秒のときに一過的な体積変化が回復し、Tshift が 60 秒で一過的な変化と持続的な変化が両方とも回復した。この結果は CaMKII は可塑的変化初期の段階で重要であることを示唆している。

研究テーマ2「新規 CaMKII FRET センサーの開発」

現在のところ、組織深部のシナプス内でタンパク質分子の活性化や分子間相互作用を直接

観察する最も有力な方法は2光子蛍光寿命イメージング法によって蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を観察することである。すなわち、興味のあるシグナル分子に2種類の蛍光タンパク質分子を融合させることで FRET センサーを作製し、細胞に発現させ、FRET を観察することによって分子の構造変化を可視化する。当然ながら、高感度な FRET センサーを用いれば精度の高い計測ができるため、これまでに様々な蛍光タンパク質の組み合わせやリンカー配列の最適化が試されてきた。しかしながら、シグナル分子自体に変異を導入し FRET センサーのフォールディング効率を高める試みはなされてこなかった。そこで本研究では、CaMKII の結合ドメインに着目し、エラー誘発 PCR によって下流の蛍光分子のフォールディング効率を高める変異体を作製した。これによって従来の FRET センサーと比べて個々の細胞のシグナルのバラツキを大きく減少させるとともに発現パターンも改善することに成功した。

1) ランダム変異導入による高感度 CaMKII FRET センサーの作製

CaMKII 自身に変異を導入し、下流の蛍光タンパク質のフォールディング効率を上昇させることによって、CaMKII FRET センサーを高感度化することを目的とした。このために、CaMKII の結合領域をエラー誘発 PCR によって増幅し、大腸菌ベクターに導入し大腸菌をトランスフォーメーションすることでライブラリーを作製した(図3)。ここから明るい赤色コロニーをピックアップしシークエンスすることによって、結合領域に4つの変異を同定した。

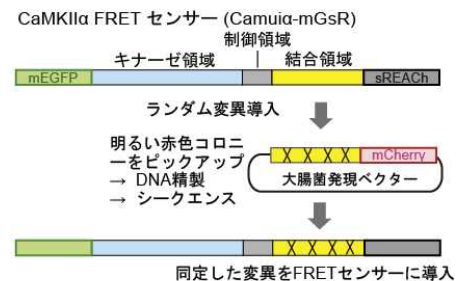


図3. CaMKII FRET センサーの分子進化。

2) 高精度 CaMKII FRET センサーによる活性化イメージング

同定した4つの変異を CaMKII FRET センサーに導入し、感度が上昇しているかどうかをテストした(図4)。FRET センサーを HeLa 細胞に発現させ、イオノフォアにより細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こす。これによって活性化した Calmodulin の結合により、CaMKII は活性化する(図4A)。これを2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡により観察することによって感度が上昇しているかどうかを調べた。この細胞での CaMKII 活性化を観察し、そのタイムコースを調べたところ、オリジナルの FRET センサー(図4C)と比べて、変異体の方(図4D)は、平均としては感度は上昇していなかったが、反応のバラツキが明らかに小さくなっていた。すなわち、細胞の反応を極めて高精度に測定することが可能になったと考えられる。反応のバラツキが小さくなった原因はおそらく、CaMKII の結合ドメインに変異を導入したことによる下流の蛍光タンパク質 (sREACH) のフォールディング効率の上昇によるものであると考えられるが、詳細は今のところ不明である。

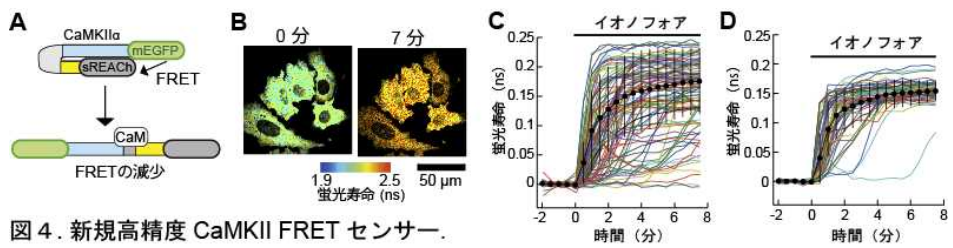


図 4. 新規高精度 CaMKII FRET センサー。

FRET センサーの変異体を神経細胞に導入しケイジドグルタミン酸による単一スパイン刺激を行ったところ、刺激したスパイン内で CaMKII の活性化が観察され、スパイン体積の増大も観察された(図5)。このことは本研究で作製した FRET センサーが神経細胞の微小コンパートメント内にも適用可能であることを示している。さらに、細胞毎の反応を高精度に捉えることができるので in vivo における多細胞の同時観察にも使用し易い。

ここで用いた方法は CaMKII の FRET センサーだけでなく、様々な FRET センサーにも適用可能である。

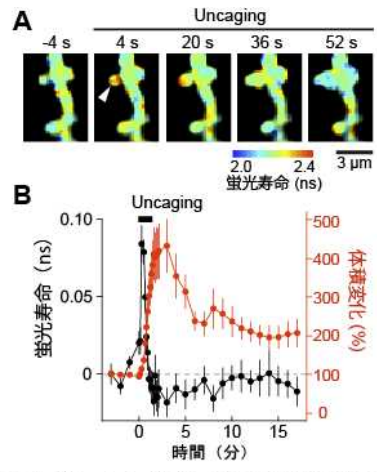


図 5. 単一スパイン内 CaMKII 活性化。

3. 今後の展開

本研究で、CaMKII 活性を光操作することが可能な分子を開発することに成功した。また、分子活性を高精度でモニターするための蛍光タンパク質やシグナル分子プローブの開発にも成功した。これらの光ツールは、生きた個体動物への応用も可能なものであり、今後、記憶・学習とシナプス状態の機能連関を明らかにしていきたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価 (研究者)

神経細胞シナプス内でシグナル分子活性を高時間分解能で光操作することに成功した。すなわち、植物タンパク質である Phototropin1 の LOV2 ドメインを用いることで CaMKII 活性を光操作することが可能な分子の開発に成功した。さらにこの分子をシナプス可塑性機構の研究に応用することで、CaMKII がスパイン体積増大の初期過程でのみ重要であること、また、CaMKII 活性化が変化の惹起に十分であることを見出した。これらの結果は、細胞内シグナル分子を直接活性化し、その細胞応答を計測するという新しいアプローチの確立に繋がるだけでなく、生きた個体動物への応用にも有用であると考えられる。また、一方で、分子活性化をモニターするための新規蛍光分子やシグナル分子プローブの開発にも成功しており、今後の2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法を用いた分子活性化の高感度イメージングや In vivo イメージング等を高感度・低毒性で行うための足掛かりができた。これらの結果はさきがけ研究の開始時より、実験装置が全くない状態から自作 2 光子蛍光寿命イメージング顕微鏡の構築を含む様々な工夫、試行錯誤の結果である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

脳の大型神経細胞の樹状突起にはシナプスを受ける小突起があり、このスパインは機能的にも形態的にも可塑性を示し、これがシナプス機能の調整に重要であると考えられている。本研究は、特にこのスパイン内で Rho GTPase やアクチンを制御してシグナル伝達の鍵を握るプロテインキナーゼ CaMKII に着目し、CaMKII の活性化を光照射によって制御することができる蛋白性分子を作出して、シナプス可塑性を局所的に操作する分子活性化イメージングを開拓しようとするものである。実際に植物由来の LOV2 ドメインを利用した光活性型 CaMKII 阻害分子 paAIP2 の作出に成功し、スパイン可塑性の特性を解析した。さらに蛍光共鳴エネルギー移動を利用した CaMKII FRET センサーを作成し改良を重ねて高感度高精度低毒性の活性化イメージングにも成功している。これらは本課題の根幹的技術開発を達成したものである。これらのツールを用いて培養細胞におけるスパインの形態的可塑性の特性を解析したが、今後は他にも開発している分子なども合わせて生体内でのイメージングに発展させ、国際的にも注目される成果が十分に期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Uezu A, Okada H, Murakoshi H, Del Vecovo CD, Yasuda R, Diviani D, Soderling S. A Modified SH2 Domain to Phototrap and Identify Phosphotyrosine Proteins from Subcellular Sites within Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109, E2929– E2938 (2012).

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国内学会 招待講演

1. 村越秀治 「神経細胞シナプス内生化学反応の可視化と光操作」
第 87 回日本生化学会大会 京都 2014 年 10 月
2. 村越秀治 「CaMKII によって活性化された Rho GTPase の協同的作用によるシナプス可塑性誘起」 第 52 回日本生物物理学会 北海道 2014 年 9 月
3. 村越秀治 「2 光子励起技術による単一スパイン内生化学反応の可視化と操作」
Neuro2014 (第 37 回日本神経科学学会) 横浜 2014 年 9 月

4. 村越秀治 「シナプス可塑性に関与するシグナル分子活性化の可視化・制御」
第 119 回解剖学会 栃木 自治医科大学 2014 年 3 月

5. 村越秀治 「Imaging and controlling the activity of signaling molecules in dendritic spines of hippocampal neurons」 第 51 回日本生物物理学会 京都 2013 年 10 月

6. 村越秀治 「Optogenetic manipulation of CaMKII activity in neuron」
Neuro2013 (第 36 回日本神経科学学会) 京都 2013 年 6 月

受賞

2011 年 日本生物物理学会若手奨励賞受賞

国際学会 招待講演

Hideji Murakoshi Imaging Rho GTPases activation in single dendritic spines by 2-photon fluorescence lifetime imaging microscopy.

The 8th Asian Biophysics Association Symposium. Jeju, Korea, May 2013.

著作物・総説

1. 村越秀治「シナプス内シグナル分子動態イメージング」

ブレインサイエンスレビュー ブレインサイエンス振興財団 (in press)

2. Murakoshi H. Optogenetic imaging of the activity of signaling molecules in synapse by 2-photon fluorescence lifetime imaging. *Optogenetics*, Springer. (in press)

3. 村越秀治 「第三篇第1章6節 オプトジェネティクスによる神経細胞シナプス内シグナル伝達分子活性化イメージング」 オプトジェネティクス(光遺伝学) (株)エヌ・ティー・エス 2013 年 4 月 p235-243

4. Murakoshi H, Yasuda R. Postsynaptic signaling during plasticity of dendritic spines. *Trends in Neurosci.* 35, 135-143 (2012)

5. 村越秀治 「二光子蛍光寿命イメージングによる Rho GTPase 活性化の単一シナプスレベル可視化解析」生物物理 2012 年 6 月 52(3) p158-159

研究報告書

「中枢シナプスオーガナイザーによる標的認識と特異的シナプス形成の調節機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 吉田 知之

1. 研究のねらい

私達の脳機能発現の基盤となる神経細胞ネットワークの形成と再編は発達期及び記憶学習の際に起こる極めて重要なイベントの1つである。神経細胞ネットワークの形成の一端はシナプスオーガナイザーと呼ばれるシナプス前終末と後終末の分化誘導能を持つ一部の細胞接着分子や受容体分子群が担うと考えられている。多様なシナプス結合の特異性を保証するためには様々な脳部位、層構造、神経回路もしくは神経細胞種特異的な標的認識分子と共役してシナプスオーガナイザーが機能する必要があるが、これまでに報告されているシナプスオーガナイザーは高々10種類ほどである。どのようにしてこれらの限られたシナプスオーガナイザーによってシナプスの特異性が維持され、多様でかつ整然としたシナプスの形成が進められるのかは全くわかっていない。また、一方で、複数のシナプスオーガナイザーの組み合わせによる調節や機能補完などシナプスオーガナイザー間の相互作用も特異的シナプス形成に重要と考えられる。本研究では多様な中枢シナプス結合の特異性を保証するプロテインコードとしてのシナプスオーガナイザーの機能解明とシナプスオーガナイザー間の相互作用によるシナプス形成の調節原理の解明を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

シナプス形成は軸索終末及び樹状突起に存在するシナプスオーガナイザー分子の活性化によって開始されることが知られている。私たちの同定したシナプス前部オーガナイザー、PTP δ は、その細胞外領域イムノグロブリン様(Ig)ドメイン内に2カ所のスプライスサイトを持ち、それぞれに挿入されるペプチドの種類と組み合わせによって多様なスプライスバリエーションを創出することを見出した。これらの PTP δ スプライスバリエーションはそれぞれ興奮性および抑制性シナプスの誘導特性が異なり、それぞれに特異的なリガンド分子を持つことを明らかにした。PTP δ リガンドは PTP δ スプライスバリエーション特異的なものと非特異的なものに大別され、前者はいずれもシナプスオーガナイザー能を有していた。このことから PTP δ の細胞外領域 Igドメインは標的選別とシナプス誘導シグナルの惹起双方に重要な役割を担い、その多様なスプライスバリエーションに対応したリガンドを介して標的依存的なシナプス形成を保証している可能性が示唆された。

シナプス前部オーガナイザーは Neurexin (NRXN)及び 2A 型受容体チロシン脱リン酸化酵素(2A 型 RPTP: LAR, PTP δ , PTP σ)がその主要なものとして報告されている。PTP δ 遺伝子欠損マウス由来神経細胞においては NRXN を介するシナプス誘導能が促進されており、逆に PTP δ を強制発現させた神経細胞では NRXN を介するシナプス誘導能が低下して

いたことから NRXN 及び 2A 型 RPTP は互いにバランス関係を保ち、シナプス形成を調節することが明らかとなった。このシナプスオーガナイザー間の抑制には PTP δ の細胞内ドメインが不可欠であった。異なるシナプスオーガナイザー間の抑制は細胞もしくはシナプスごとに主要なシナプスオーガナイザーを決定し、混線を防ぐことに寄与すると推測された。

(2) 詳細

PTP δ のスプライス多様性による特異的シナプス結合の創出機構

1) PTP δ スプライスバリエント特異的リガンドの同定

PTP δ の細胞外領域 Ig 様ドメイン内には2カ所のスプライスサイト(A site, B site)があり、A site には3, 6, もしくは9アミノ酸よりなるミニエクソン(me) A ペプチドが、一方 B site には4アミノ酸よりなる me B ペプチドが挿入されることによって少なくとも8種類のプライスバリエントが作られる(図 1)。研究当初に既に同定していた IL1RAPL1 はこのうち A, B site にそれぞれ 9 及び 4 アミノ酸の挿入のあるバリエント(以後このバリエントを PTP δ と表記)に最も良く

結合した。IL1RAPL1 によるシナプス前終末誘導は PTP δ 遺伝子欠損マウス由来神経細胞に対しては完全に消失した。一方、PTP δ によるシナプス後終末誘導能は IL1RAPL1 遺伝子欠損マウス由来神経細胞でも半分程度維持されたことから (Yasumura

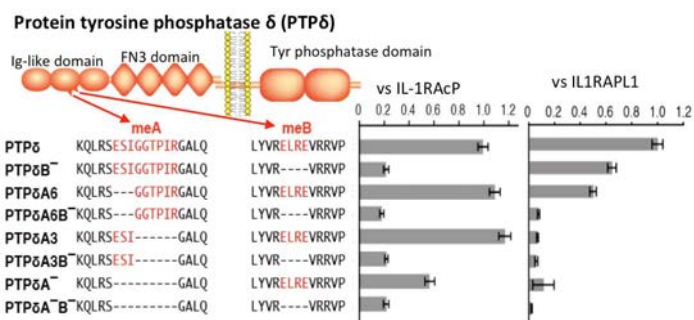


図1 PTP δ の Igドメインに挿入される mini-exon(me) A 及び B 配列(左)と各スプライスバリエントに対する IL-1RAcP, IL1RAPL1 の結合活性(右)

et al., 2014)、IL1RAPL1 以外に PTP δ によるシナプス後部誘導を担うオーガナイザーが存在することが示唆された。そこで構造上 IL1RAPL1 の分類される IL-1 受容体ファミリー分子を候補としてシナプス誘導能及び PTP δ 結合能のスクリーニングを行った。これまでに報告されている9つの IL-1 受容体ファミリー分子のうち Interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) と IL1RAPL2 にシナプス前終末誘導活性があることを見出した(Yoshida et al., 2012)。IL-1RAcP は meB ペプチドの挿入を持つ PTP δ スプライスバリエントに選択的なりガンドであった。また、PTP δ によるシナプス誘導能は IL1RAPL1 及び IL-1RAcP ダブルノックアウトマウス由来神経細胞に対して 25%程度まで減少したことから、PTP δ によるシナプス後部誘導の際には IL1RAPL1, IL-1RAcP がリガンドとして主要な役割を担うことが明らかとなった。meA, meB の挿入の有無によって生じるいずれの PTP δ スプライスバリエントにもシナプス後部誘導能が認められた。B site への挿入の有無は興奮性・抑制性いずれのシナプスを誘導するかに寄与し、A site へのペプチドの挿入は誘導能の大きさに影響を与えることが明らかとなった。これらのバリエントによるシナプス後部誘導時のリガンドを系統的に単離するために、細胞外領域組換えタンパク質をコートした磁気ビーズを作製した。これらのビーズを神経細胞と共培養し、シナプス後部を誘導した際に架橋試薬によって磁気ビーズから神経細胞膜表面の PTP δ リガンドまでのシナプス形成複合体を架橋、単離し、質量分析によりリガ

ンド候補分子を同定した。種々の結合解析によって既知の分子を含めて9種類の PTP δ リガンドを同定した。これらはドメイン構造上極めて多様なものであった。これらのうち4種類は特定のスプライスバリエントに選択的な結合特性を示し、残りはいずれのスプライスバリエントにも結合した。特定のスプライスバリエントに選択的な結合特性を示したリガンドはいずれも神経細胞-線維芽細胞共培養系でシナプス前終末を誘導するシナプスオーガナイザーであることが判った。一方、顕著なスプライスバリエント特異性を持たない PTP δ リガンドにはシナプスオーガナイザー能は認められなかった。このことから PTP δ の細胞外領域 Igドメインは標的選別とシナプス誘導シグナルの惹起双方に重要な役割を担うことが示唆された(図2)。一方、シナプス誘導能を持たないリガンドについては今後の機能解析が必要である。

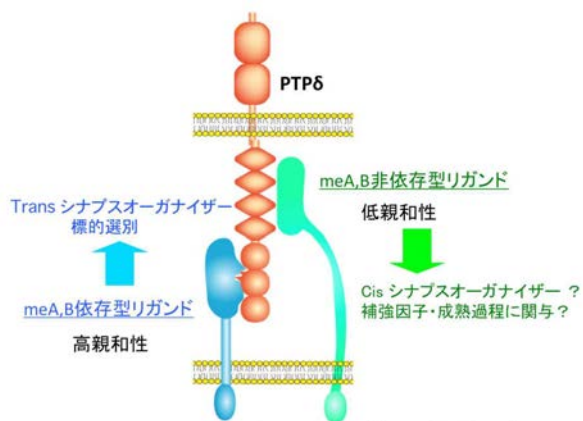


図2 PTP δ とそのリガンドによるシナプス形成調節モデル

2) PTP δ スプライスバリエント及びスプライスバリエント特異的リガンドの発現回路の同定

PTP δ スプライスバリエントを発現する神経細胞及びシナプスを検出する目的で meA, meB ペプチドの挿入の有無を特異的に認識する抗体の作出を試みた。これまでのところ組織染色に使用可能な抗体は得られていない。そのため PTP δ スプライスバリエントとその特異的リガンドがシナプス前終末, 後終末の対応関係で発現する神経回路の同定には至っていない。

3) me A 及び me B ペプチドの持つプロテインコードの構造生物学的基盤

IL1RAPL1, IL-1RAcP, PTP δ の細胞外領域の組換えタンパク質を哺乳類細胞より大量に発現・精製し、PTP δ -IL1RAPL1 複合体、PTP δ -IL-1RAcP 複合体結晶のスクリーニング、X 線結晶構造解析を行った。それぞれの複合体について 4.4 Å、3.3 Å の分解能で構造決定した。これらの複合体においては IL1RAPL1, IL-1RAcP の1番目の Igドメイン(IgD1)を PTP δ の IgD2 と IgD3 が挟み込む形で結合し、PTP δ IgD2 内に存在する meA は結合面に存在した。一方、PTP δ の IgD2 と IgD3 のヒンジに存在する meB は IL1RAPL1, IL-1RAcP の IgD1 を挟み込むためのリンカーとして機能することが示唆された(図3)。複合体構

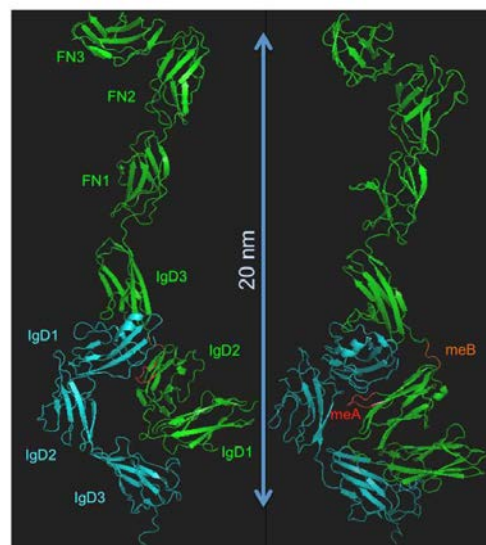


図3 PTP δ -IL1RAPL1 複合体の結晶構造
meAは結合面に存在し、meBはリンカーとして機能

造モデルから推定される結合面に存在し、水素結合、疎水性相互作用に寄与するアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体はいずれも複合体の形成とシナプス誘導に顕著な影響を与えたため、複合体構造モデルの妥当性が検証された。構造科学的解析からも PTP δ の細胞外領域 Ig ドメインは標的選別とシナプス誘導シグナルの惹起双方に不可欠であることが示された。

異なるシナプスオーガナイザーシグナルの相互作用によるシナプス形成調節の分子機構

シナプスオーガナイザーは NRXN/NRXN リガンド及び 2A 型 RPTP/2A 型 RPTP リガンドに大別される。2A 型 RPTP の1つ PTP δ 遺伝子欠損マウス由来神経細胞では NLGN によるシナプス誘導が亢進することから、通常は PTP δ が NRXN によるシナプス形成シグナルを抑制していることが明らかになった。更に PTP δ を強制発現させた神経細胞においては NRXN を介するシナプス誘導が全く起こらないことが分かった。このことは複数のシナプスオーガナイザーの中で細胞ごと、もしくはシナプスごとに特定のシナプスオーガナイザーが働くと、他のシナプスオーガナイザーが抑制されるような排他的な制御があることを示唆する。

PTP δ 遺伝子欠損神経細胞に対する種々の NRXN リガンド及び 2A 型 RPTP リガンドを用いたシナプス誘導能の比較から、PTP δ による他のシナプスオーガナイザーシグナルの抑制範囲は NRXN 系に限局されることが明らかになった。

この PTP δ による NRXN 系の抑制が PTP δ 欠損神経細胞における NRXN 分子の転写レベル、翻訳レベル、翻訳後の修飾のいずれの段階の相互作用に起因するのかを調べた。その結果、NRXN1,2,3 いずれの mRNA 発現量、タンパク質発現量(脳全体とシナプトソーム分画)共に野生型、PTP δ 欠損細胞の間に差は認められなかった。また、NRXN の下流でシナプス前終末の誘導に関与すると考えられる CASK, Mint1, Syntenin 等の mRNA 発現量にも差は認められなかった。

PTP δ 欠損神経細胞における IL1RAPL1 によるシナプス前終末誘導能の欠損と NRXN-NLGN シグナルの増強は PTP δ を遺伝子導入することでレスキューされたが、細胞内領域 D2ドメインを欠く PTP δ 変異体ではレスキュー出来ないことから、このドメインがシナプス前終末誘導と NRXN 抑制に関わることが明らかとなった(図4)。IL1RAPL1 ビーズによって PTP δ を介して人工的に

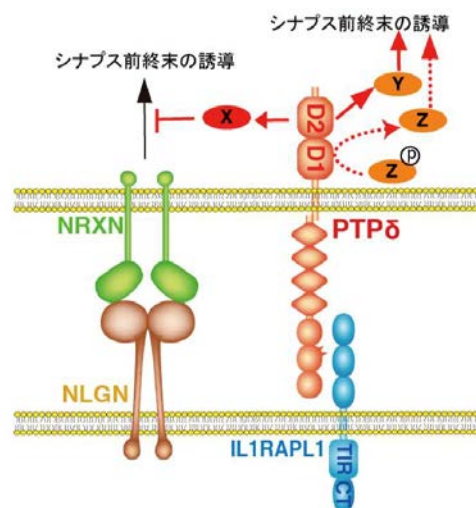


図4 PTP δ によるシナプス前終末誘導、及びNRXN シグナルの抑制モデル
PTP δ 欠損神経細胞に対して種々のドメイン欠損型PTP δ を導入し、NLGN1によるシナプス前終末誘導能亢進表現型及びIL1RAPL1によるシナプス前終末誘導能欠損表現型をレスキューするか否かで、機能ドメインを抽出した

シナプス前終末を誘導した際に細胞膜透過性架橋試薬を投与し、PTP δ D2 ドメインを介する NRXN 抑制シグナル分子を架橋し、芋蔓式にシグナル分子を単離する方法を開発した。この

方法で単離した分子の 1/3 は直接 PTP8D2 ドメインに結合した。現在これらの分子について NRXN シグナルの抑制に関わるか否かについて解析中である。

異なるシナプスオーガナイザー間の排他的相互作用は細胞もしくはシナプスごとに主要なシナプスオーガナイザーを決定し、混線を防ぐことに寄与する可能性が考えられる。

3. 今後の展開

本研究ではシナプスオーガナイザーのスクリーニングを通して、シナプス前部オーガナイザー PTP8 はスプライシングによって多様性を増やし、スプライスバリエントに厳密に対応した構造上多様なリガンドがシナプス後部オーガナイザーとして機能することを明らかにした。このことはシナプスオーガナイザーがシナプス誘導に関わるだけでなく標的選別にも関わることを示唆するものである。これらのシナプスオーガナイザーセットが個体内でどのように使い分けられ、多様なシナプス形成を調節するかを理解することが今後の課題の1つである。そのためには PTP8 スプライスバリエント発現の可視化、特定のスプライスバリエント欠損マウスの作出などの新たな研究ツールの作出が不可欠である。また、本研究から見出した異なるシナプスオーガナイザー間の抑制的な相互作用によるシナプス形成調節の生理的意義について回路、個体レベルでの解析を今後進めていきたい。

シナプスの形成と再編は発達期のみならず成体脳でも引き続き起きており、記憶・学習成立の重要ステップの1つと考えられている。実際に私たちの作出したシナプスオーガナイザー欠損マウスでは発達期のシナプス形成の遅れの他に遠隔記憶形成の顕著な障害が認められた。今後、シナプスオーガナイザー活性化機構の理解と活性化神経回路の同定を通して、記憶回路痕跡や記憶回路の遷移機構の解明へ向けた研究へと発展させたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究課題の PTP8 スプライスバリエント特異的リガンドの同定(新規シナプスオーガナイザーの単離)、シナプス誘導の細胞内シグナル分子の単離、異なるシナプスオーガナイザーシグナルのクロストークに関わるシグナル分子の単離、PTP8 スプライスバリエント/meA, meB による標的認識の構造学的解析については予定通りに研究が進行し、当初の目標を達成した。中でも系統的な PTP8 のリガンドスクリーンから、スプライスバリエント特異的リガンドのみがシナプスオーガナイザー活性を持つことを見出したことは概念的に重要な発見であった。従来より、「標的認識分子群による標的選別の後にシナプスオーガナイザーが働き、シナプス形成へと移行する」と考えられていたが、シナプスオーガナイザー自体が標的認識を担う可能性が強く示唆された。さらに PTP8-IL1RAPL1 複合体の構造解析から 2A 型 PTP の Ig ドメインがリガンド結合とシナプス誘導双方の責任ドメインであることが明らかとなり、標的認識とシナプス誘導は切り離せないことが構造科学的にもサポートされた。構造科学的手法を取り入れたことが本研究の進展に大きく寄与したと言える。

一方、PTP8 スプライスバリエント発現回路の同定、脳内シナプス形成における PTP8 スプライスバリエントの意義については本研究期間にまとまった成果を得ることが出来なかった。特異的抗体の作出や単一神経細胞での発現解析など従来法でのスプライスバリエント発現の検出が

難しく、今後は遺伝子改変マウス等の作出によりスプライスバリエント発現を可視化するなどの新しい方法論の確立が必要である。

本研究遂行にあたり開発した人工的シナプス誘導系を用いたシナプス機能分子の解析法は、これまでに機能解析の困難であった脳内の多様なシナプス結合を単純系に落とし込み、均質なシナプスにおいて、機能分子の時空間的な挙動や機能を網羅的に解析することを可能にした。更に、従来の生化学的な分画法では不可能であったシナプス前部と後部の構成因子を別個に単離することを可能にした。同様の方法論はシナプス機能に限らず、様々な機能分子の探索において有効と考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

神経結合の特異性の分子的基盤は Sperry の chemoaffinity 説以来半世紀以上にわたる神経科学の重要問題であるが、この間にガイダンス分子や接着分子が多数同定されたにも拘わらずシナプスにおける分子メカニズムは解明からほど遠い。本研究は、先にゼブラフィッシュ胚でシナプス形成促進因子のスクリーニングにより IL1RAPL1 や PTP δ などを見出していたことに基づき、これらのシナプスオーガナイザー分子の構造、特にスプライスバリエントの結合特異性における意義に着目して、巧みな実験系を工夫して IL1RAPL1—PTP δ 系の機能に深く詳細な解析を加え、さらにこの結合系と NRXN—NLGN 結合系の間の抑制関係の発見とその解析を行ったものである。これらの成果により、シナプス結合特異性の分子メカニズムの様相の主たる特徴が明らかになり、この問題への方法論のモデルとなるばかりでなく、今後の組織学的あるいは行動学的生理学的展開や、神経回路の維持調整メカニズムや神経疾患の研究に新たな見通しを提示した意義も大きい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yoshida T, Shiroshima T, Lee S, Yasumura M, Uemura T, Chen X, Iwakura Y, Mishina M. Interleukin-1 receptor accessory protein organizes neuronal synaptogenesis as a cell adhesion molecule. *J. Neurosci.* 32, 2588–2600, (2012).
2. Lee S, Uemura T, Yoshida T, Mishina M. GluR δ 2 assembles four neuroligins into trans-synaptic triad to trigger synapse formation. *J. Neurosci.* 32, 4688–4701, (2012).
3. Yasumura M, Yoshida T, Lee S, Uemura T, Joo J, Mishina M. Glutamate receptor δ 1 induces preferentially inhibitory presynaptic differentiation of cortical neurons by interacting with neuroligins through cerebellin precursor protein subtypes. *J. Neurochem.* 121, 705–716, (2012).
4. Hayashi T, Yoshida T, Ra M, Taguchi R, Mishina M. IL1RAPL1 associated with mental retardation and autism regulates the formation and stabilization of glutamatergic synapses of cortical neurons through RhoA signaling pathway. *PLoS One.* 8, e66254, (2013).
5. Yasumura M, Yoshida T, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Kanno K, Uemura T, Takao K, Sakimura K, Kikusui T, Miyakawa T, Mishina M. IL1RAPL1 knockout mice show spine

density decrease, learning deficiency, hyperactivity and reduced anxiety-like behaviours. *Scientific Reports* 4, 6613, (2014).

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表(シンポジウム・ワークショップ・口頭発表)

1. 吉田知之、城島知子、李聖眞、安村美里、植村健、陳西貴、岩倉洋一郎、三品昌美
第35回日本神経科学大会 名古屋 2012年9月20日

Interleukin-1 receptor accessory protein functions as a neuronal cell adhesion molecule to organize synaptogenesis

2. 吉田知之

代償脳研究会セミナー 富山 2014年1月30日

シナプスオーガナイザーによる中枢シナプス形成の調節

3. 吉田知之

東京工業大学・バイオサイエンスシンポジウム 横浜 2014年2月18日

シナプスオーガナイザーによる中枢シナプス形成の調節

4. 吉田知之、森寿、三品昌美

日本生化学会北陸支部 第32回大会 富山 2014年5月24日

IL-1受容体共通サブユニットIL-1RAcPIは中枢シナプス形成を担うシナプスオーガナイザーとして機能する

5. 吉田知之

生理学研究所研究会「グリア細胞機能から迫る脳機能解明」岡崎 2014年10月23日

インターロイキン-1受容体ファミリー分子群による中枢シナプス形成の調節

6. 吉田知之、城島知子、山崎真弥、阿部学、山形敦史、深井周也、森寿、崎村建司、岩倉洋一郎、三品昌美

第37回日本分子生物学会年会「免疫受容体による細胞間コミュニケーションの新しい地平線」
横浜 2014年11月26日

インターロイキン-1受容体ファミリータンパク質による中枢シナプス形成の調節機構

総説・著作物

1. Mishina M, Uemura T, Yasumura M, **Yoshida T**. Molecular mechanism of parallel fiber-Purkinje cell synapse formation. *Front Neural Circuits*. 6, 90, (2012), 総説

2. Mishina M, Yoshida T, Yasumura M, Uemura T. Synapse Formation in the Brain.
Cortical Development. Kageyama R, Yamamori T, editors: Springer; 229–247, (2013), 著書
3. 深井周也, 植村健, 吉田知之. シナプス形成を誘導する膜受容体の機能と構造.
実験医学32 (10) 92–97, (2014), 著書