

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域「光の特性を活用した生命機能の時空間
制御技術の開発と応用」

研究課題「シナプス光遺伝学を用いた脳領域間シ
グナル伝播機構の解明」

研究終了報告書

研究期間 2017年10月～2023年3月

研究代表者：磯村 宜和
(東京医科歯科大学 大学院医歯学総
合研究科、教授)

§1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究課題では、研究代表者(礒村宜和)が考案した脳領域間のスパイク情報を細胞単位かつミリ秒単位で追跡できるマルチリンク(Multi-Linc)法の次世代化のために、主たる共同研究者(大塚稔久・渡部文子)の専門技術を活かして、投射細胞の軸索終末(プレシナプス)に集積し、光応答性の高いプレシナプス光刺激ツールと、シナプスの開口放出を光抑制するプレシナプス光抑制ツールを開発することを目指した(研究項目 A1, B1)。これらのツールを脳の広範囲に発現させて(研究項目 A3)、時間的にも空間的にも計測精度と低侵襲性を大幅に向上させた次世代マルチリンク法を確立することを主な目標とした(研究項目 C1, C2)。さらに、本研究で生み出される光刺激/抑制ツールの有用性・汎用性を実証するため、未だ謎多いシナプス伝達・可塑性の機構(研究項目 A2)と情動回路機構(研究項目 B2)に狙いを定め、分子-シナプス-回路-行動レベルにわたる脳機能の仕組みの解明に挑むことも目指した(研究項目 C3)。

まず大塚グループでは各種のプレシナプス局在タンパク質の一部をタグとしてチャンネルロドプシンに付加し、培養神経細胞の軸索終末に集積する改変分子をスクリーニングした。それらの候補分子に対して、渡部グループがインビトロ・ホールセル記録により光活性化の機能評価を行い、mGluR2C タグと PAST 配列と ATE 配列を組み合わせたプレシナプス光刺激ツール ChR2-YFP-mGluR2-PEST-ATE(PA)を選び出した。礒村グループでは ChR2-YFP-mGluR2-PA が実際にラットの大脳皮質に対するマルチリンク法に有用であることを実証した。3グループの連携プレーが狙い通りに結実した研究成果となった。

大塚グループでは引き続きプレシナプス光刺激/抑制ツールの開発を推進しており、例えば Synprint タグや CAST タグやナノボディを利用したり GtCCR4(神取チームとの共同研究)や GtACR1 などの光感受性エフェクターを利用したり SNARE 複合体を構成する Syntaxin に LOV2 を結合させたりと作用機序の異なる光刺激/抑制ツールの作成と評価を系統的に進めてきた。

また、そのツール開発の過程で、グルタミン酸放出のライブイメージング技術や、CAST・ELKS ノックインマウス、RIM-1・Munc13-1 ノックインマウス、Thy1-ChR2-mGluR2-PA ノックインラット、プレシナプス研究に有用なモノクローナル抗体など、神経科学に有用な研究リソースも整備し活用している。

渡部グループでは光刺激/抑制ツールをもちいた情動回路の研究を分子レベルから行動レベルまで幅広く進めている。例えば腕傍核-扁桃核経路や腕傍核-視床下部 PSTN 経路の光操作により恐怖行動や摂食行動が顕著に変化することを明らかにした。腕傍核-腹側被蓋野経路の光操作によっても誘引や忌避行動が生じることも見出した。このような行動変化には情動回路のシナプス可塑性が重要な役割を担っており、bPAC ツールを利用したシナプス可塑性の研究も進めている。

礒村グループは次世代マルチリンク法の確立のために、多点光刺激装置を含むハードウェアの開発と、逆行性スパイク検出と瞬時のスパイクコリジョン試験を実現するソフトウェアの開発に取り組み、128 チャンネルのスパイクコリジョン試験を完全に自動化・並列化したデジタル型マルチリンクシステムを完成させ、実際にラットの大脳皮質を使った実証実験に成功した。

また、(当時はアナログ式の)マルチリンク法による投射先同定を採り入れた応用研究も並行して実施した。過去の報酬に基づく行動選択に対する大脳基底核の直接路と間接路の役割や黒質緻密部のドーパミン投射細胞の作用について明らかにした。海馬や嗅内野における行動と結果(報酬の有無)への応答性に関する興味深い現象も見出している。

以上のように、本研究課題の5年間を通じて、各研究グループが連携してあるいは個別に研究活動を推進して、実験技術の面でも生物学という面でも幅広く着実に研究成果を得ることができた。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 報酬に基づく行動選択を担う大脳基底核の直接路と間接路の機能的活動の解明 (Nonomura S *et al.*, *Neuron*, 2018)

概要: 大脳基底核の直接路または間接路に特異的に ChR2 を発現させたラットに報酬に基づく行動選択課題を遂行させ、アナログ(手動) マルチリンク法のスパイクコリジョン試験を使用して、両経路が表現する行動の種類、報酬の有無、次行動の選択に関する情報を評価し、行動選択の神経回路基盤を解明した。*Neuron* 誌に掲載後、引用数が順調に伸びており、国際的にも高い評価を得ている。

2. プレシナプス光刺激ツール ChR2-YFP-mGluR2-PA の開発とマルチリンク法への応用 (Hamada S, Nagase M, Yoshizawa T, Hagiwara A *et al.*, *Comm Biol*, 2021)

概要: 大塚グループ、渡部グループ、磯村グループの連携によりプレシナプスに集積するチャネルロドプシンの開発を試み、いくつもの候補分子のうちから mGluR2 タグと PEST 配列と ATE 配列を付加したプレシナプス光刺激ツール ChR2-YFP-mGluR2-PA を選び出し、その局在と機能を評価した。さらに、ラットの大脳皮質においてスパイクコリジョン試験を実施し、同ツールがマルチリンク法にも有用であり、過興奮ノイズを低減する効果も併せもつことを実証した。現在、Thy1 プロモータ下で ChR2-YFP-mGluR2-PA を発現するノックインラットを作出中である(阿部学研究室との共同研究)。

3. 恐怖による摂食抑制に関する神経回路とその制御メカニズムの解明 (Nagashima T *et al.*, *Nat Commun*, 2023)

概要: 腕傍核-PSTN 経路による嫌悪シグナルは PSTN の PACAP 陽性細胞を介して伝達されることを電気生理および行動実験により示し、嫌悪シグナルによる摂食調節の中枢回路の一端を解明した。腕傍核から PSTN への回路が負情動制御と摂食制御の相互作用のハブとして機能しストレス等による摂食抑制に関与することを示唆する研究成果である。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 一連のプレシナプス光刺激/抑制ツールの開発

概要: 本研究課題で系統的に開発している各種のプレシナプス光刺激/抑制ツールは、さまざまな特性を活かして、神経科学の研究ツール群としてだけでなく、将来的には疾患治療や創薬の足掛かりとして貢献することも期待される。

2. 多チャンネルのリアルタイム制御によるデジタル(自動化)マルチリンクシステムの開発

概要: 次世代マルチリンク法の開発として、多領域にわたる多チャンネルのスパイクコリジョン試験の完全自動化と並列化に挑み、ソフト・ハード両面で 128ch 自動マルチリンクシステムの完成とラットの大脳皮質を対象とした実証実験に世界で初めて成功した(Mitani K, Kawabata M *et al.* *iScience* 2022)。また自動化・並列化の基礎概念も特許が認められた(特許 6970957)。

<代表的な論文>

1. Nonomura S, Nishizawa K, Sakai Y, Kawaguchi Y, Kato S, Uchigashima M, Watanabe M, Yamanaka K, Enomoto K, Chiken S, Sano H, Soma S, Yoshida J, Samejima K, Ogawa M, Kobayashi K, Nambu A, Isomura Y*, Kimura M*. (2018) Monitoring and updating of action selection for goal-directed behavior through the striatal direct and indirect pathways. *Neuron* 99(6): 1302-1314.

概要: <優れた基礎研究としての成果>に記載の通り

2. Hamada S[†], Nagase M[†], Yoshizawa T[†], Hagiwara A[†], Isomura Y*, Watabe AM*, Ohtsuka T*. (2021) An engineered channelrhodopsin optimized for axon terminal activation and circuit mapping. *Communications Biology* 4(1): 461-461.

概要: <優れた基礎研究としての成果>に記載の通り

3. Nagashima T, Tohyama S, Mikami K, Nagase M, Morishima M, Kasai A, Hashimoto H, Watabe AM*. (2022) Parabrachial-to-parasubthalamic nucleus pathway mediates fear-induced suppression of feeding in male mice. *Nature Communications* 13: 7913.

概要: <優れた基礎研究としての成果>に記載の通り

§3 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 磯村グループ

研究代表者: 磯村 宜和 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授)

研究項目

- C1. 高速2波長多点光照射装置の確立
- C2. プレシナプス光刺激/抑制ツールのインビボ最適化
- C3. 次世代 Multi-Linc 法の確立・実証研究(スパイク情報解読)

② 大塚グループ

主たる共同研究者: 大塚 稔久 (山梨大学 大学院総合研究部 教授)

研究項目

- A1. プレシナプス光刺激/抑制ツールの系統的開発
- A2. プレシナプス光刺激/抑制ツールによるシナプス放出機構の解明
- A3. 遺伝子改変動物の作成・提供

③ 渡部グループ

主たる共同研究者: 渡部 文子 (東京慈恵会医科大学 医学部医学科 教授)

研究項目

- B1. プレシナプス光刺激/抑制ツールのインビトロ評価
- B2. プレシナプス光刺激/抑制ツールによる情動回路機構の解明

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

1) ChR2-YFP-mGluR2-PEST-ATE(PA)の提供

Comm Biol 誌に発表した軸索移行型 ChR2-YFP-mGluR2-PA について、国内外の 11 研究室からの依頼に応じ、共同研究を開始した(2022 年 10 月現在)。

2) CREST 神取チームとの連携研究

神取チームにて発見されたオプシン GtCCR4 の哺乳類神経細胞への発現にむけた改良を行った。改良型 GtCCR4-TSER-muGFP の機能解析を神取チームと連携して進めている。

3) CREST 和氣チームの鍋倉グループとの連携研究

同グループの揚妻特任准教授(生理学研究所)と、培養脳スライス標本を用いたシナプス応答の計測実験系の確立に取り組んだ。

4) CREST 松本チームの高田グループとの連携研究

同グループの井上謙一助教(京都大学)と、プレシナプス光操作ツールの霊長類への応用研究に取り組んだ。

5) 生理学研究所の小林憲太准教授との連携研究

プレシナプス光操作ツールの開発および活用のために、高純度の AAV ベクター試料液の調整を委託している。

6) 福島県立医科大学の小林和人教授との連携研究

磯村グループがマルチリンク実験に使用する各種の細胞型特異的 Cre 発現ラットや AAV ベ

クターの供与を受けている。

7) 新潟大学の阿部学准教授との連携研究

完成したプレシナプス光操作ツールをゲノム編集技術や生殖工学技術を用いてマウスやラットにノックインする連携研究を推進している。

8) 山梨大学の長友啓明講師との連携研究

アクティブゾーンタンパク質の遺伝子にゲノム編集技術や生殖工学技術を用いて特異的なタグを付加したマウスを作製している。