

「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22年度中間評価実施研究課題－

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. 中間評価対象の研究課題・研究者名

件数： 3件（うち、通常型3件、大挑戦型0件）

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 研究実施期間

平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月（※平成 28 年 3 月終了予定）

4. 中間評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会（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。

（中間評価の流れ）

平成 25年 11～12月 評価会開催

平成 26年 2月 研究総括による中間評価

平成 26年 3月 被評価者への結果通知、研究計画見直し

5. 中間評価項目

- (1) 研究の進捗状況と今後の見込み
- (2) 研究成果の現状と今後の見込み
- (3) 得られた研究成果の科学技術への貢献度

6. 評価結果

現在においてもその解明が初期段階にある脳神経分野を対象とする当領域は上記の概要にもあるように様々な角度からアプローチを行う多様な研究を採択してきた。その中で、本中間報告が対象とする3つの研究課題では神経回路としては鳥類の聴覚系、マウスの運動系と嗅覚系、ショウジョウバエのリズム系を対象として、電気生理学的、遺伝学的手法、あるいは高速機能イメージングを駆使しながら独自の解析を展開し、独創性の高い研究を推し進めている。3名ともさきがけ課題の成果は国際的にも高く評価されている。今後2年のうちにさらにこれらを発展させた成果が期待できる。尚、2名は既に欧米の研究機関でPIとして活躍しており、残る1名もさきがけ期間中に教授に就任した。

以下に各研究者の研究進展状況を要約し、評価については研究者ごとの研究報告中「研究総括の見解」で記す。

1. 久場 博司 研究者「聴覚神経回路での入力依存的な神経活動制御」

脳の神経回路機能の可塑性は従来シナプス伝達効率の変化によると考えられてきたが、久場はトリの聴覚神経回路を用いて神経細胞の軸索起始部の分布が、神経回路への入力レベルに応じて変化するというのを見いだした。本研究ではその特性と分子機序、さらに機能意義を調べることを目指した。その結果、内耳除去により聴覚入力を遮断すると脳聴覚中枢神経細胞の軸索起始部が長くなって膜興奮

奮性が亢進するが、それはカリウムチャンネルの密度がそのサブタイプによって異なる変化をすることによることを明らかにした。さらに発達期にはこの軸索起始部が最適化されてゆくのに聴覚入力が必要であることも解明した。これら現象の分子機構を薬理学的および遺伝子操作により解明するため、培養系の開発と最適化を進め、これまでに細胞の生存率と AIS の形成率が非常に高い切片培養標本の確立に成功している。また遺伝子ベクターの構築も進展しており、カルシウム動態、軸索裏打ち分子に着目した分子的・細胞化学的解析、ならびに計算モデルの併用により、分子・細胞レベルにおいてもこの新奇な可塑性のメカニズムが近く解明されることが大いに期待できる。

2. 小宮山 尚樹 研究者「大脳皮質の微小回路の学習に関連した可塑性」

脳部位間の神経回路に比して数百マイクロメートル程度の局所内の微小回路の実体と機能については未だ不明な部位が多い。本課題ではマウスの嗅球と大脳皮質運動野に着目して、近年進歩の著しい二光子顕微鏡を用いてカルシウムイメージングを無麻酔・安定的・長期的に適用できるシステムを短期間に立ち上げ、嗅球については、におい反応の数週間にわたる可塑的变化のにおい特異性とその麻酔による消失を明らかにし、さらに局所における出力細胞とインターニューロンの機能的関係を解析し、とくにパルブアルブミン細胞の活動はにおい分子種に対するチューニングが広く出力レベルを制御する機能が主要であることを見出し、これらはすでに2報の論文として報告していることは顕著な成果である。大脳皮質運動野については、運動学習課題を設定して300個程度の神経細胞の活動（カルシウムイメージング）を2週間にわたって記録することを可能にしており、学習に関係する微小回路の変化とその特性の解析を開始している。今後嗅覚系においては中枢からの入力によるにおい情報表現の制御動態の解明など、運動野については神経細胞サブタイプの同定などを含め、さらに詳しい細胞的分子的基盤が明らかになることが十分に期待できる。

3. 名越 絵美 研究者「行動の概日リズムを制御する神経回路構築の分子基盤」

ほとんどの生物の生命活動には日周リズムが備わっており、人においてその変調は多くの生活習慣病や精神疾患と深く関わっている。しかし、その時計のメカニズムについては広く動物界に共通性が高いと考えられている以外には不明な部分が多い。本研究はその脳にあるとされる時計の基盤となる神経回路を比較的単純な脳を持つショウジョウバエを使って解明を目指している。当初は Nocturnin という分子に着目したが、ハエ脳で時計ニューロンとされているものの内 LN_vs 細胞に絞ってその発現遺伝子スクリーニングを大規模に実施したところ、unf 遺伝子を同定し、その阻害により概日リズムが消失することを証明した。また unf は、直接時計機構に関わるだけでなく機能的神経回路の協調にも働くことを発見して、論文発表できたことは大きい成果である。さらにこのような unf の機能の分子的基盤を分子生物学的に解析して、UNF が分子時計の鍵である period 遺伝子および別の新規遺伝子に作用することを見出し、その解析を意欲的に進めている。近い将来に UNF の機能が解明され、またこれらの神経細胞が構成する神経回路の実体にも踏みこんだ成果が期待できる。

7. 評価者

研究総括 村上 富士夫 大阪大学 大学院生命機能研究科・教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成26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 理化学研究所 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 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 准教授
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 教授

(参考)

件数はいずれも、平成 26 年 2 月末現在。

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	1	9	10
口頭	11	23	34
その他	0	0	0
合計	12	32	44

(2) 特許出願件数

国内	国際	計
0	0	0

(3) 受賞等

なし

(4) 招待講演

国際 10 件

国内 4 件

別紙

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

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成26年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (3年間) (百万円)
久場 博司 (兼任)	聴覚神経回路での入力依存的な 神経活動制御 (名古屋大学 大学院 医学系研究科)	名古屋大学 大学院 医学系研究科 教授 (京都大学 大学院 医学研究科 准教授)	89
小宮山 尚樹 (兼任)	大脳皮質の微小回路の学習に 関連した可塑性 (米国 カルフォルニア大学 サンディエゴ校)	米国 カルフォルニア大学サンディエゴ校 Assistant Professor (同上)	77
名越 絵美 (兼任)	行動の概日リズムを制御する 神経回路構築の分子基盤 (ジュネーヴ大学 理学部)	スイス ジュネーヴ大学 理学部 准教授 (スイス ベルン大学 細胞生物学研究所 グループリーダー)	84

研究報告書

「聴覚神経回路での入力依存的な神経活動制御」

研究タイプ：通常型

研究期間：平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者：久場 博司

1. 研究のねらい

我々の複雑な脳機能が発現するためには、神経回路機能が最適化され、維持されることが必要である。この過程で神経活動は重要な役割を担うことが示唆されているが、その詳細はまだよく分かっていない。脳神経回路の可塑性は二つに大別される。一つは、長期増強や長期抑圧と呼ばれる学習や記憶の発現に関与する可塑性であり、もう一つはその回路の定常性を維持しようとする可塑性である。後者は恒常的可塑性といわれ、回路の神経活動を適切なレベルに調節するよう働き、回路機能の最適化や維持に関わると考えられている。従来、これらの可塑性はシナプス伝達効率の変化によって生じると考えられてきた。我々は近年、神経細胞の軸索起始部(axon initial segment, AIS)の分布が、神経回路への入力レベルに応じて変化するという新たな恒常的可塑性を見いだした。AISは活動電位の発生部位であることから、この可塑性は神経活動を効果的に調節することが可能であり、神経回路機能の最適化・維持に深く関わる可能性が示唆される。従って、本研究では構造と機能が明確なトリ脳幹の聴覚神経回路を対象として、AISに生じる恒常的可塑性の特性と分子機序、さらに機能意義を調べることにより、神経細胞における活動レベルの制御機構を理解するとともに、特定の神経回路機能が入力依存的に獲得され、維持される分子・細胞基盤を明らかにすることを目指している。

2. 研究成果

(1) 概要

トリの大細胞核(nucleus magnocellularis, NM)は哺乳類の蝸牛神経核に相当する神経核であり、聴神経からのシナプス入力に対して正確なタイミングで活動電位を発生することにより音の時間情報のコードに関わる。これまで我々は、孵化後のヒヨコにおいて内耳除去により聴覚入力を遮断すると、NMの神経細胞ではAISが長くなり、膜興奮性が増すことを見いだした。このことはAIS分布の入力依存的な変化が、恒常的可塑性として神経活動の調節に関わることを示している。神経活動は神経回路機能の最適化・維持に重要なことが知られている。従って本研究では、このAIS可塑性が内耳障害時にNM細胞の神経活動を亢進し、聴神経活動の消失を代償することで、聴覚中枢神経回路の構造と機能の維持に関わるという仮説のもと研究を行っている。

AIS可塑性の働きを理解するためには、まずその特性を明らかにする必要がある。本研究では、入力遮断によるAIS可塑性時にAISの電気的特性がどのように変化するのか、また、AIS可塑性の表現型は細胞種や脳領域、さらに発達過程に応じてどのように異なるのかについて検討を行っている。これまでのところ、AIS分布の延長に伴ってNaチャンネルのサブタイプ

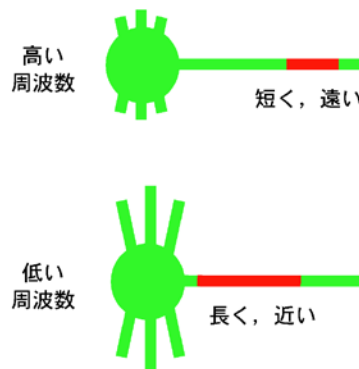
や密度は変化しないのに対して、K チャネルの密度はサブタイプ特異的に変化し、このことにより AIS 局所の膜電位と興奮性が巧妙に調節されていることを明らかにした。また、NM 細胞の投射先である層状核(nucleus laminaris, NL)では、成熟期の AIS は聴覚入力の影響を受けないのに対して、発達期の AIS はその分布が最適化される過程で聴覚入力が必要なことも明らかにした(研究成果 6)。AIS 可塑性の分子機構については、薬理阻害や遺伝子導入の容易な培養実験系を用いて効率的に実験を進めることを目指している。これまでに NM 細胞の生存率と AIS の形成率が非常に高い切片培養標本の確立に成功した。現在はこの系を用いて AIS 可塑性の誘導因子の検索を行っている。AIS 可塑性の機能意義としては、NM の神経活動が上位の神経回路の維持に関わる可能性を検討してきた。これまで NM 細胞を除去することにより NL 細胞へのシナプス入力を完全に消失させた場合、NL 細胞の樹状突起がほぼ消失することを明らかにした。

(2)詳細

AIS 可塑性の特性 1 (細胞種と時期特異性)

NL は哺乳類の内側上オリブ核に相当する神経核であり、両側の蝸牛神経核(大細胞核, NM)からの時間情報を統合することにより音源定位に関わる。これまで我々は、両側内耳を除去することによりこれら神経核へのシナプス入力を回路成熟後に遮断した場合、AIS の可塑性が NM では生じるのに対して、NL では生じないことを明らかにした。すなわち、入力遮断に伴って NM では AIS の長さが延長するのに対して、NL では AIS の長さや細胞体からの距離に変化はみられない。このことは AIS 可塑性の発現が神経核(細胞種)毎に異なることを示している。

一方、NL には周波数局在構造があり、高い特徴周波数をもつ細胞ほど高頻度のシナプス入力を受ける。さらに、NL では特徴周波数に応じて細胞の AIS 分布が異なる。すなわち、高い特徴周波数をもつ細胞ほど AIS は短く、細胞体から離れており、このことにより NL における正確な時間情報統合が可能となる。そこでさらに、この NL における AIS 分布の形成過程には入力依存的な AIS の制御機構が関わるのではないかと考え、NL 細胞の AIS 分布の発達過程とこの過程に対する聴覚入力の関与について検討を行った。NL 細胞の



NLでの特徴周波数に応じたAIS分布の違い

AIS は、聴覚入力開始前には細胞体近くに長く分布し、その分布に特徴周波数による違いはみられなかった。一方、聴覚入力開始後からこの AIS 分布には特徴周波数に応じた変化がみられた。すなわち、AIS の長さは短縮し、かつ細胞体からの距離は延長し、これらの変化は高い特徴周波数をもつ細胞ほど大きかった。さらに、発生初期に聴覚原基を除去することで聴覚入力を遮断したところ、聴覚入力開始後にみられた AIS の短縮は抑制された。以上のことから、NL 細胞では AIS 可塑性に臨界期があり、この可塑性は特に発達期に AIS 分布を調節することで回路機能の最適化に関わることを明らかにした(研究成果 6)。

AIS 可塑性の特性 2 (K チャネルの変化)

AIS はその分布だけでなくその電気的特性も、細胞の興奮性に大きく影響する。従って、膜特性の重要な決定要因である K チャネルに焦点を絞って、その AIS 可塑性に伴う発現変化を解析している。これまで、NM 細胞の AIS では聴覚入力の遮断に伴って Kv1 が減少し、Kv7 は増加することを免疫染色により明らかにした。Kv1 は活性化の閾値が低く、速度も速いため、Kv7 に比べて活動電位の発生を抑える効果が強い。従って、これらの K チャネルの相補的な発現変化が静止膜電位を大きく変えることなく、膜興奮性を増加させるしくみとして働く可能性を考えて、さらに各 K チャネル成分の電流と膜興奮性に対する関与を検討した。NM 細胞の K 電流は非常に大きいため、通常の K イオン濃度では正確な電流記録が困難である。従って、電極内液に K チャネル透過性の低い Cs イオンを用いることで詳細な解析を行った結果、聴覚遮断により Kv1 を介した電流成分は減少するのに対して、Kv7 を介した電流成分は増加することを明らかにした。聴覚遮断後の NM 細胞では活動電位の閾値が低下し、膜抵抗は増加する。また、この細胞で Kv7 電流を阻害した場合、細胞体の静止膜電位には変化が見られないのに対して、活動電位の閾値と振幅は減少する。さらに、聴覚遮断後の NM 細胞にみられる自発神経活動の頻度は、Kv7 を活性化させると減少し、Kv7 を阻害すると増大する。これらの結果は、聴覚遮断時には Kv1 の発現を減らすことにより細胞の興奮性を増加させる一方で、Kv7 の発現を増すことにより膜電位は維持するという上記仮説を強く支持する所見である。現在はこれら K チャネルの AIS 局所での働きについてさらに検証を行っている。

AIS 可塑性の分子機構

AIS 可塑性の誘導因子や分子経路の同定については、薬理阻害や遺伝子導入の容易な培養実験系を用いることで効果的に実験を進めることができると考えられる。これまで、NM 細胞の切片培養標本と分散培養標本の作製を試みてきた。切片培養と分散培養を併用することにより、NM 細胞周囲のグリアを含めた環境の効果についても明らかにすることができると考えている。切片培養については NM 細胞の生存率と AIS の形成率が非常に高い標本を確立した。一方、分散培養については、動物の年齢、培地、添加物(成長因子)、基質、共培養などを含む様々な条件検討を行った結果、NM 細胞の生存率は向上したが AIS の形成率は低いため、現在さらなる検討を行っている。一方、AIS 可塑性の過程を同一細胞で経時的に観察するために、AIS 移行シグナル(Nav II-III)を付加した YFP の発現ベクターを作製した。また、分子機構の解析を in vivo でも行うために in vivo での遺伝子導入法の確立を目指しており、ウイルスベクターとして avian adeno-associated virus (A3V) や replication competent avian splice (RCAS) を用いたコンストラクトの作製を行った。また、transposon を用いたプラスミドベクターを in ovo electroporation で導入することも試みている。

3. 今後の展開

K チャネルによる AIS 局所の膜電位と活動電位の制御機構については、AIS 局所への阻害剤投与(2光子もしくは単光子 uncaging, 電気泳動)、コンピューターモデルによる解析を行うことで、さらに検討する。また、AIS 可塑性の分子機構については、主に切片培養標本を用いて解析を行う。具体的には、(1)高濃度の K イオン環境下での培養、(2)グルタミン酸存在下で

の培養, もしくは (3) ウィルスベクター (A3V) を用いて ChR2 を導入した細胞の光刺激, により AIS の可塑性を誘導し, 種々の薬理的解析を行うことでその誘導因子と下流の分子経路を検討する. 神経活動は AIS の Ca チャネルを活性化すると考えられるため, 特に AIS 局所の Ca 動態に着目して実験を進める. 近年, AIS の遠位端の位置決定は, ankyrinG と ankyrinB の発現量の相対的なバランスが重要だという報告がある. 従って, 可塑性の発現前後におけるこれらの分子の発現量と細胞内局在を調べるとともに, その活動依存性との関係を解析する. また, 可塑性の発現前後における遺伝子プロファイルを比較することにより候補遺伝子を検索することも行う予定である.

4. 評価

(1) 自己評価

これまで, AIS 可塑性の特性については, いくつかの新たな知見を得ることができた. 一方, AIS 可塑性の分子機構については培養実験系の確立と AIS の可視化手法の改善を主に行ってきたが, AIS 可塑性の誘導因子や分子経路を同定するには至っていない. しかしながら, 実験遂行のための環境が整ってきたことから, 今後, 大幅に研究を進展させることができると考えている. また, 音入力との関係を含めて AIS 可塑性の生体内での役割についての理解も十分に進んでいない. これまでの NM における AIS 可塑性は内耳除去により全周波数帯域の聴覚入力を遮断した場合に観察されている. しかしながら, 音響障害や薬剤などによる一般的な感音性難聴では特定の周波数領域が障害されることが知られている. 従って, 音響障害により特定の周波数領域の内耳を選択的に障害した場合にも NM 細胞の AIS に可塑的変化が生じるのか否かを検証することを考えている. 感音性難聴時には耳鳴りを発症することが知られている. 従って, 障害された周波数領域での自発神経活動の有無についても検討していきたいと考えている.

(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、中間評価を行った)。

脳の神経回路機能の可塑性は従来シナプス伝達効率の変化によると考えられてきたが、久場はトリの聴覚神経回路を用いて神経細胞の軸索起始部の分布が、神経回路への入力レベルに応じて変化するというを見いだした。本研究ではその特性と分子機序、さらに機能意義を調べることを目指した。その結果、内耳除去により聴覚入力を遮断すると脳聴覚中枢神経細胞の軸索起始部が長くなって膜興奮性が亢進するが、それはカリウムチャネルの密度がそのサブタイプによって異なる変化をすることによることを明らかにした。さらに発達期にはこの軸索起始部が最適化されてゆくの聴覚入力が必要であることも解明した。これら現象の分子機構を薬理的および遺伝子操作により解明するため、培養系の開発と最適化を進め、これまでに細胞の生存率と AIS の形成率が非常に高い切片培養標本の確立に成功している。また遺伝子ベクターの構築も進展しており、カルシウム動態、軸索裏打ち分子に着目した分子的・細胞化学的解析、ならびに計算モデルの併用により、分子・細胞レベルにおいてもこの新奇な可塑性のメカニズムが近く解明されることが大いに期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Grubb MS, Shu Y, Kuba H, Rasband MN, Wimmer VC, Bender KJ Short- and long-term plasticity at the axon initial segment. J. Neurosci. 2011. 31: 16045-16055.
2. Taruno A, Ohmori H, *Kuba H Inhibition of presynaptic Na(+)/K(+)-ATPase reduces readily releasable pool size at the avian end-bulb synapse. Neurosci. Res. 2012. 72: 117-128.
3. *Kuba H Structural tuning and plasticity of axon initial segment in auditory neurons. J. Physiol. (Lond.) 2012. 590: 5571-5579.
4. Yamada R, Okuda H, Kuba H, Nishino E, Ishii TM, Ohmori H The cooperation of sustained and phasic inhibitions increases the contrast of ITD-tuning in low-frequency neurons of the chick nucleus laminaris. J. Neurosci. 2013. 33: 3927-3938.
5. Okuda H, Yamada R, Kuba H, Ohmori H Metabotropic glutamate receptors improves the accuracy of coincidence detection by presynaptic mechanisms in the nucleus lamirnaris of the chick. J. Physiol. (Lond.) 2013. 591: 365-378.
6. *Kuba H, Adachi R, Ohmori H Activity-dependent and activity-independent development of the axon initial segment. J. Neurosci. in press.

(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)

和文総説

1. 久場博司

軸索起始部による聴覚回路機能の制御

日本神経精神薬理学雑誌, in press

学会発表

1. Kuba H

Coupling between synaptic inputs and axonal Na channels in auditory neurons

3rd European Synapse Meeting, 2011.10.14, Blatonfured

2. Kuba H

Homeostatic regulation of axon initial segment in an avian auditory neuron

Neuroscience meeting 2011, 2011.11.15, Washington DC

3. Kuba H

Roles of axon initial segment in auditory brainstem circuits.

生理研国際研究集会: Cutting edge in synapse research, 2011.12.8, 岡崎

4. 久場博司

軸索起始部の神経活動依存的制御

第 117 回日本解剖学会総会, 2012. 3. 28, 甲府

5. 久場博司

軸索起始部発達過程における神経活動の効果

第 89 回日本生理学会大会, 2012. 3. 29, 松本

6. 久場博司

発達期における軸索起始部の空間分布制御

第 36 回日本神経科学大会, 2012. 9. 18, 名古屋

7. Kuba H

Structural tuning and plasticity of axon initial segment in auditory neurons

Kyoto University GCOE International Symposium, 2012.10.05, 淡路

8. Kuba H

Activity-dependent regulation of ion channel distribution in an auditory neuron.

64th Annual Meeting of the Korean Physiological Society, 2012.10.26, Seoul

9. 久場博司

音源定位の神経回路機構

第 21 回鶴舞耳鼻科会, 2013. 2. 22, 名古屋

10. 久場博司

聴覚時間情報処理における Na チャネルと Na/K ポンプの役割

第 37 回日本神経科学大会, 2013. 6. 20, 京都

11. 久場博司、安達良太

聴覚神経回路における軸索起始部の発達制御

第 60 回中部生理学会, 2013. 10. 25, 岐阜

12. 久場博司

軸索起始部による聴覚回路機能の制御

第 56 回脳の医学生物学研究会, 2014. 2. 15, 名古屋

13. 久場博司, 山田玲, 石黒剛

中枢聴覚神経細胞におけるカリウムチャネル発現の恒常的制御

第 91 回日本生理学会大会, 2014. 3. 16, 鹿児島

研究報告書

「大脳皮質の微小回路の学習に関連した可塑性」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 小宮山 尚樹

1. 研究のねらい

我々の行動は、個々の神経細胞の調和の取れた活動の下に成り立っている。神経細胞の活動を決定する重要な単位の一つは、神経細胞同士が数百 μm の中で複雑な回路を形成する、微小回路である。しかし、微小回路が行動中、特に学習中にどのように活動し、どのように変化するのは、ほとんどわかっていない。研究者は、マウスがタスクを学習する間に、リアルタイムで微小回路の活動を二光子顕微鏡で可視化する方法を開発し、学習に関連して微小回路の活動が変わっていく様子を可視化することに成功した。本研究では、この系を用いて、微小回路の可塑性の細胞レベルでの機構の解明、そして学習行動との関連の解明を目指している。特に、嗅覚系の嗅球の微小回路に注目し、細胞のタイプごとの結合特異性、反応特異性並びに可塑性の違いを明らかにしている。また、大脳皮質運動野での長期間の運動学習中に見られる変化を解明している。これらの研究によって、経験ならびに学習が脳神経回路をどのように調節しているのかという重要な問いに対する答えを追求している。

2. 研究成果

(1) 概要

覚醒中の、頭を固定したマウスにおける嗅球からの二光子機能的イメージングをセットアップした。トランスジェニックマウスを用い、嗅球のいくつかの主要な細胞タイプそれぞれに特異的に Ca センサーを発現させ、数週間にわたって同じ細胞群から匂い反応をイメージングすることが可能になった。この手法を用いて、嗅球の主要出力である Mitral cell のにおい反応の、経験による可塑性を明らかにした。また、この可塑性は麻酔下では見られず、麻酔下と覚醒中の嗅球の活動は大きく異なることがわかった。(論文 1) また、嗅球の抑制系回路に着目し、中でも特定のマーカー分子を発現する細胞群のにおい情報処理に対する寄与を詳細に調べた。(論文 2)

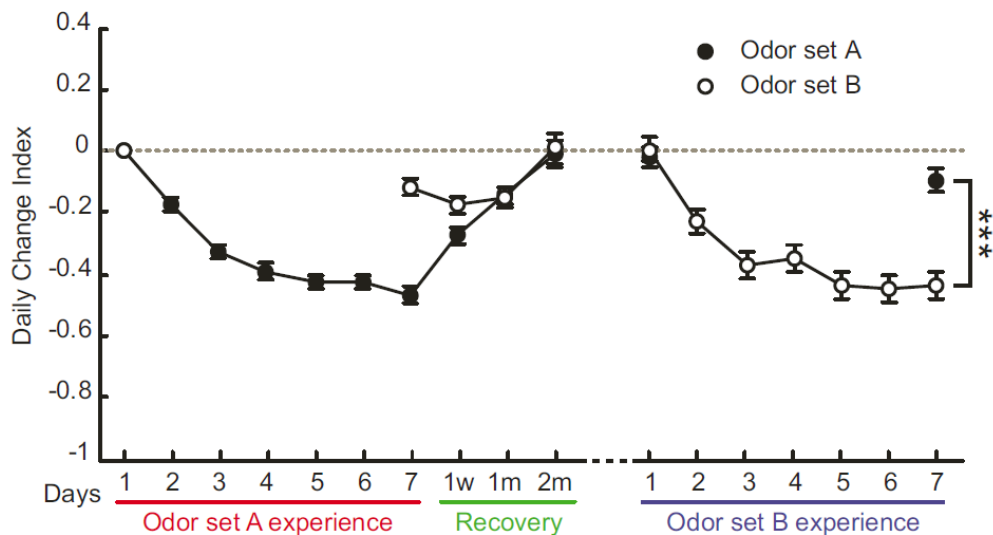
(2) 詳細

研究テーマ A 「嗅球のにおい反応の可塑性」

トランスジェニックマウスを用い、嗅球の主要出力細胞である Mitral cell に Ca センサーを発現させ、数週間にわたって同じ細胞群から匂い反応をイメージングすることが可能になった。この手法を用いて、マウスに数種のおいを一日数回、数秒ごと嗅がせていく間に Mitral cell のにおい反応をイメージングしたところ、Mitral cell のに

おい反応は経験につれて徐々に弱まった。この可塑性はにおい特異的であり、同一の Mitral cell は、未経験のにおいへの反応は強く保たれていた（下図）。この可塑性は数週間にわたって維持される一方、麻酔下では見られないことも分かった。これらの結果は、覚醒中の動物における Mitral cell の活動が、過去の経験によってダイナミックに調節され、嗅球の反応の強さは刺激の新規性に大きく影響されていることを示している。（論文1）

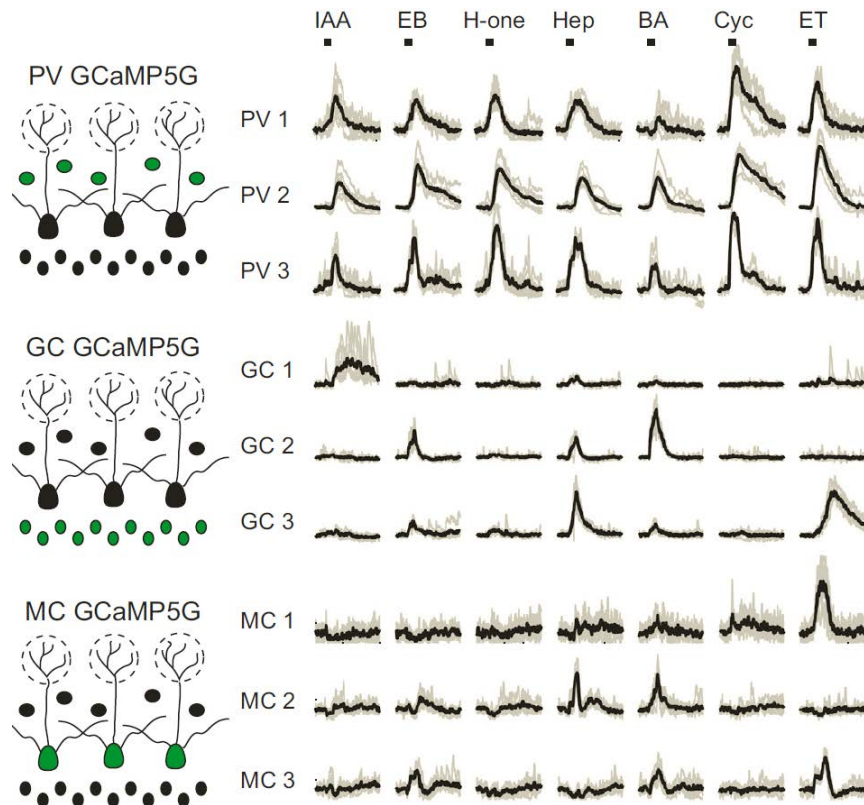
また、Mitral cell と、嗅球の主要な抑制系神経である Granule cell の活動を麻酔下と覚醒中で比べたところ、Mitral cell は覚醒中にはにおい反応が麻酔下に比べてかなり弱く、粗であることがわかった。Granule cell は逆に、覚醒中では活動が高いが、麻酔下では活動が非常に弱くなっていた。これらの結果は、覚醒中には Granule cell の活動が非常に高いため、Mitral cell による匂い情報の表現は麻酔下と比べて弱くなる、また、麻酔下における嗅球のレコーディングでは Granule cell の寄与を過小評価してしまう、という可能性を示唆している。（論文1）



研究テーマ B 「嗅球の抑制系神経のサブタイプ」

嗅覚情報の処理の仕組みを解明するため、嗅球における微小回路が匂い刺激の入力をどのように処理しているのか調べている。その第一歩として、External plexiform layer に局在する、Parvalbumin (PV) を発現する抑制性神経の結合性並びに機能を調べた。PV cell は、External plexiform layer にまばらに局在している。PV cre のマウスラインを用いて、特異的に PV cell を特定することができる。スライスでの実験で、PV cell は主要興奮性細胞である Mitral cell と非常に密に高い確率で結合していることがわかった。In vivo で匂い刺激に対する反応をカルシウムイメージングで見ると、個々の PV cell は様々な種類の匂い刺激に幅広く反応することが示された。この結果は、Mitral cell との高い結合率 (Convergence) と一致しており、PV cell は Mitral cell や Granule cell よりもかなり広い tuning を示す（下図）。PV cell の活動を特異的に抑制すると、

Mitral cell の匂い刺激に対する反応が線形的により強くなることから、PV cell は Mitral cell の匂い反応の Gain を制御していることが示唆された。今までの嗅球の抑制性細胞の研究はおもに Granule cell と Periglomerular cell に注目しているが、今回の結果は嗅球において様々な種類の抑制性細胞が複雑に匂い情報の表現を制御していることを示唆している。(論文2)



研究テーマ C 「運動学習中の運動野の可塑性」

運動学習が脳のどのような変化を伴うのかという問いに着目して、頭を固定したマウスにおける運動学習行動をセットアップした。前肢を用いたタスクで、2週間の間に徐々に行動が改善される様子が観察されている。この学習の間に、運動野の活動がどのように変わるのかを調べるために、運動野からの二光子機能的イメージングをセットアップした。Resonant scanner を搭載した二光子顕微鏡を用い、Full field の 300 程度の細胞から 30Hz でのイメージングが可能になっている。トランスジェニックマウスを用い、細胞種を同定した中で、GCaMP5G を用いて二週間にわたって安定したイメージングを行っている。タスクに関連した活動を示す細胞を同定し、タスクと神経活動の関連が学習中にどのように変わるのかを現在解析中である。

3. 今後の展開

嗅球の抑制系回路のサブタイプの解析をより詳細に進める。また、においの意味づけによっ

て嗅球におけるにおい情報の表現がどう変わるのか調べる。運動学習に関しては、学習に関連した変化をより詳細に調べる。また、その変化の分子のおよび細胞的な機構を突きつめていく。

4. 評価

(1) 自己評価

研究室の立ち上げ、また安定した長期的イメージングのための技術開発に時間がかかったものの、現在は有能な研究補助者にも恵まれ、研究成果が上がってきている。学習中の長期的な変化をイメージングを用いて細胞レベル、またシナプスレベルで同定する第一人者としての地位を築いていきたい。また、将来は観察にとどまらず、学習行動を可能にする回路レベルの詳細なメカニズムを明らかにしていきたい。

(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、中間評価を行った)。

脳部位間の神経回路に比して数百マイクロメートル程度の局所内の微小回路の実体と機能については未だ不明な部位が多い。本課題ではマウスの嗅球と大脳皮質運動野に着目して、近年進歩の著しい二光子顕微鏡を用いてカルシウムイメージングを無麻酔・安定的・長期的に適用できるシステムを短期間に立ち上げ、嗅球については、におい反応の数週間にわたる可塑的变化のにおい特異性とその麻酔による消失を明らかにし、さらに局所における出力細胞とインターニューロンの機能的関係を解析し、とくにパルブアルブミン細胞の活動はにおい分子種に対するチューニングが広く出力レベルを制御する機能が主要であることを見出し、これらはすでに2報の論文として報告していることは顕著な成果である。大脳皮質運動野については、運動学習課題を設定して300個程度の神経細胞の活動(カルシウムイメージング)を2週間にわたって記録することを可能にしており、学習に係る微小回路の変化とその特性の解析を開始している。今後嗅覚系においては中枢からの入力によるにおい情報表現の制御動態の解明など、運動野については神経細胞サブタイプの同定などを含め、さらに詳しい細胞的分子的基盤が明らかにな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. Kato, H.K.*, Chu, M.W.*, Isaacson, J.S.# and Komiyama, T.# (2012) Dynamic Sensory Representations in the Olfactory Bulb: Modulation by Wakefulness and Experience. *Neuron*, 76(5), 962-75.
2. Kato, H.K., Gillet, S.N., Peters, A.J., Isaacson, J.S.# and Komiyama, T. # (2013) Parvalbumin-expressing Interneurons Underlie a Local Inhibitory Circuit Regulating the Gain of Olfactory Bulb Output. *Neuron*, 80, 1218-31.

(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. **UCLA**, Los Angeles, CA, Jan 2014, invited seminar speaker.
2. **Osaka University**, Osaka, Japan, May 2013, invited seminar speaker.
3. **The Association for Chemoreception Sciences 35th Annual Meeting**, Huntington Beach, CA, April 2013, invited symposium speaker.
4. **California Institute of Technology**, Pasadena, CA, April 2013, invited seminar speaker.
5. **The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society**, Nagoya, Japan, September 2012, invited symposium speaker.
6. **University of California, Riverside**, Riverside, CA, November 2011, invited seminar speaker.
7. **Tenth Annual Southern California Learning and Memory Symposium**, UCLA, Los Angeles, CA, June 2011, invited symposium speaker.
8. **UCSD Neurosciences Program Retreat**, Lake Arrowhead, CA, May 2011, invited speaker.
9. **UCSD BioCircuits Institute**, San Diego, CA, December 2010, invited seminar speaker.

研究報告書

「行動の概日リズムを制御する神経回路構築の分子基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 名越 絵美

1. 研究のねらい

動物の行動は特異的な神経回路によって生み出され、外界からの感覚情報、体内の生理環境や経験によって調節を受ける。行動の異常は様々な精神・神経疾患において顕著にみられ、近年その理解と改善に対する期待が高まっているにも関わらず、行動を司る神経回路の構築と動作原理の殆どは謎に包まれている。本研究では、行動を司る神経回路の動作機構のロジックを解明することを長期的目標とする。地球上のほとんどすべての動物は、地球の自転と公転によって生み出される周期的な外界の環境変化に対応するために、約24時間周期にリズムに変動する活動のパターンを示す。このような行動の概日リズム(サーカディアンリズム)は人では睡眠-覚醒のリズムを司っており、そのリズム障害は不眠症、睡眠覚醒リズム障害として現れるだけでなく、肥満や高血圧、脂質異常症などの生活習慣病のリスクを増大し、うつ病や双極性障害などの精神疾患に伴って現れることが知られている。従って、概日リズム発現と調節のメカニズムの理解はリズム障害と様々な疾患との関係の理解にも貢献すると期待される。

ショウジョウバエは比較的簡単な神経系を持ちながら、脊椎動物にも共通する多様な行動を示す上に、分子遺伝学的手法によって特異的な細胞種や遺伝子の機能を *in vivo* で解析することが比較的容易に行える系である。本研究では、ショウジョウバエをモデルとして行動の概日リズムを生み出す神経回路の構築と動作原理を分子レベルで解明することを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、行動の概日リズムを司る脳内のサーカディアン回路の構築のロジックを総合的に理解することを目指している。ショウジョウバエの行動のサーカディアンリズムは分子時計機構を有する約150の時計ニューロンからなる神経回路(サーカディアン回路)によって生み出される。時計ニューロンには少なくとも7種類のサブタイプが存在し、その中でも、ventral lateral neurons (LNvs, M-cells)が回路全体のリズムを同調させ、行動のリズムの位相と速度をコントロールするマスターペースメーカーであると考えられてきた。しかしながら、LNvs がどのような機構でマスターペースメーカーとしての機能を発揮するかの詳細は明らかにされていない。細胞内の分子時計は細胞内の大部分の生理機能をリズムに調節することが知られているので、時計ニューロンでは分子時計が神経間の情報伝達機構に関わる様々な過程をコントロールすることによって時計ニューロン間の同調を促していると考えられてきているが、その仮説を裏付ける分子機構は未知である。我々は、サーカディアン回路が同調した

リズムを刻み行動発現を調節する機構を多角的に理解するために、(A) LNvs がマスターペースメーカーとしての機能発揮するために必要な分子機構と、(B) 時計ニューロンの神経間コミュニケーションと細胞内時計の相互関係を解析してきた。研究テーマ(A)においては、LNvs に特異的に発現する遺伝子の中から、その機能に不可欠な遺伝子 *unfulfilled* (*unf*) を同定し (論文1)、*unf* が LNvs の分子時計機構と時計のアウトプット経路に直接関わっていることを分子的に明らかにした。研究テーマ(B)においては、時計ニューロンのリズムの発生をリアルタイムで観察する系の立ち上げに成功し、時計ニューロン間のコミュニケーションがリズム発生に不可欠であるということを示してきた。

(2) 詳細

研究テーマ(A) LNvs の機能の分子解析

LNvs が 時計ニューロンのヒエラルキー内で上位の機能を担うのはなぜか。この問いに答えるため、ハエの脳内の特定の細胞を単離し、その細胞内の RNA 発現ゲノムワイドにマイクロアレイで検出するという独自の手法を用いて、我々はこれまでに LNvs に発現する全遺伝子のリスト、時計ニューロン内で LNvs にのみ特異的に発現する遺伝子を同定してきた (Nagoshi et al. Nature Neuroscience 2010. 13(1) 60-68)。LNvs に特異的に発現する遺伝子のなかでも特に高い特異的発現を示す遺伝子について、行動のリズム制御に関与するかどうかを変異体や RNAi などを利用して用いてスクリーニングをしたところ、核レセプター *unfulfilled* (*unf*; *DHR51*) 遺伝子をノックダウンするとハエのリズムは完全に消失することが明らかになった。UNF がどのように行動のリズムに関与するかを明らかにするため、時期特異的にコンディショナルな遺伝子ノックダウンを行なったところ、UNF は LNv の発生過程および、発生後の成虫のニューロンの両者で必要であることがわかった。*unf* コンディショナルノックダウンのよって LNvs の分子時計にどのような変化が起きたのかを、免疫染色によって調べたところ、発生中の *unf* ノックダウンも、成虫でのノックダウンでも、LNvs の分子時計は恒暗条件下のみで停止することが明らかになった。加えて、サーカディアン回路の他の時計ニューロンの分子時計のリズムにも変化が起きており、発生中の *unf* ノックダウンによっては他の全ての時計ニューロンの時計のリズムが消失し、成虫での *unf* ノックダウンによっては dorsal lateral neurons (LNds) の時計の周期が約2時間遅くなることが明らかになった。これらの結果から、UNF は、マスターペースメーカーである LNvs の時計機構に直接関わるだけでなく、他の時計ニューロンのリズムを同調させ、回路全体として統一されたリズムを生み出すことに必要であるという結論が導かれ、論文に発表した(論文1)。

UNF はリガンド依存的に遺伝子の転写を調節する核レセプターであるので、UNF の下流の遺伝子発現プログラムが LNvs の分子時計およびサーカディアン回路の同調機構を別々に調節するのであろうと考えられる。従って、UNF のこの機能の分子機構を解明するために、抗 UNF 抗体 (Tzumin Lee Lab) を用いた Chromatin IP-tiling array (ChIP-chip) による UNF ダイレクトターゲットの同定を行った。LNvs 内での UNF の発現レベルは ZT2 (2 hrs after light-on time) をピークとするサーカディアン変動を示すので、一日のうち4時間おきに採取したハエの頭部を材料にし、合計6タイムポイントの ChIP-chip データを採取し、ダイレクトターゲット遺伝子を同定した。UNF は mushroom body (MB) 内にも発現することが知られている

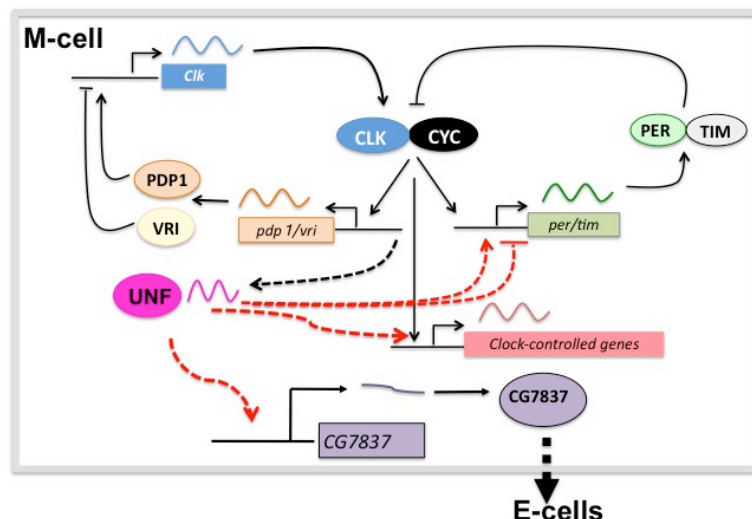
ので、UNF を MB 内でノックダウンしたハエを用いたネガティブコントロールサンプルについても2タイムポイントの ChIP-chip データを採取した。HHMI Janelia Farm の杉野 健 博士との共同研究によるデータ解析の結果、約470のターゲットサイト(約700のターゲット遺伝子を含む)が明らかになった。LNvs に特異的な UNF ターゲットは全体の約9%と少数であるが、分子時計機構の鍵である *period* 遺伝子座に強く結合することが明らかになった。我々は以前に UNF を成虫内の LNvs でノックダウンしたハエでは LNvs 内での PER タンパクの発現リズムが消失することを示しているので、この結果は UNF が *period* 遺伝子の転写を直接制御することによって時計の発振を調節していることを強く示唆する。加えて、*period* 遺伝子 内の UNF 結合サイトに、核レセプターE75 のほ乳類ホモログである Rev-erb α の既知のターゲットモチーフに類似した配列が同定された。この結果は、E75 と UNF がヘテロダイマーを形成して *period* 遺伝子の転写を調節する可能性を強く示唆する。Rev-erb α はほ乳類の分子時計機構に Rev-erb α が不可欠であるので、我々の新しい知見は Rev-erb α の分子時計での役割が進化的に保存されていることを裏付けるものである。

同定された UNF ターゲットが概日リズムの機能に関わるかどうかを調べるため、結合度の強い順に約50のターゲット遺伝子を選択し、LNvs に特異的なノックダウンと行動解析を行った。ノックダウンで行動のリズムに変化があったものに対し、LNvs と他の時計ニューロンの分子時計のリズムが変化するかどうか免疫染色によって調べた。結果、新規遺伝子 CG7837 が UNF

の下流で LNvs から他の時計ニューロンを同調する経路に関与することが示唆された。

以上の結果から、UNF が *period* 遺伝子を介して時計機構を直接調節するとともに、CG7837 を介して下流のニューロン群を同調させるアウトプットを調節するという2つの機能を持つことが見いだされた(右図)。

UNF はM-cellのマスターペースメーカーとしての機能を複数のレベルで調節する



研究テーマ(B) 時計ニューロンの神経間コミュニケーションと細胞内時計の相互関係

時計ニューロンの分子時計のリズムの同調には、細胞間コミュニケーションが大きな役割を果たすと考えられてきたが、その機構はこれまで明らかにされていない。我々は、リアルタイムで時計ニューロン内の分子時計のリズムを観察する系を立ち上げることによって、神経間コミュニケーションとリズムの関係を明らかにすることを目指している。これまでに、*period* 遺

伝子の転写リズムを VENUS 発現によって模倣するレポーターと、period タンパクの C 末に赤色蛍光タンパクの TdTOMATO を融合し、period タンパク質の発現と細胞内局在を模倣するレポーターの2種を構築し、それぞれを発現するハエの系統を作成した。さらに、ハエの脳と、分散培養ニューロンを リゾナンスキャナーコンフォーカル顕微鏡で長期間蛍光観察する系を立ち上げた。

両者のレポーターの挙動をライブイメージングで調べたところ、両者とも、培養脳内ではいくつかの時計細胞(主に Dorsal Neuron 群)では概日振動に近いリズムを刻むが、分散培養系では振動は観察されないことがわかった。これらの結果は、ハエの時計ニューロンがリズムを発振するためには、インタクテナ神経間ネットワークが必要であることを示唆している。

TdTOMATO レポーターは period タンパクと同様に、in vivo では時計ニューロン内で細胞質と核の間を行き来し、夜の後半には核内に局在する。しかし、分散培養ニューロンでは常に細胞質に存在することが明らかになった。分子時計は転写翻訳のネガティブフィードバックから構築されており、分子時計機構の中心的なリプレッサーである period タンパクの核輸送は分子振動の鍵となるステップである。われわれのライブイメージングの結果は、分散培養ニューロンでは period タンパクの核への輸送を調節する過程が阻害されているために、リズムが発振されないという可能性を示唆している。この可能性を検証し、時計ニューロン間のシグナル伝達がどのように period タンパクの核輸送を調節するのかを明らかにするために、分散培養系を用いた薬理学的手法によってこの過程に参与する神経伝達物質を同定する実験を行っている。

3. 今後の展開

研究テーマ(A)においては、これまでに UNF が LNvs 内で2つの独立した機能を持つ事を示した。今後は、UNF が重要な2つのターゲット遺伝子(period、CG7837)の転写を活性化するのか抑制するのか、また UNF がホモダイマーかヘテロダイマーを形成してその機能を発揮するのかという分子機構の詳細を明らかにする。これらの実験が完了次第、論文を投稿する。

研究テーマ(B)においては、時計ニューロンが分散状態でリズムを消失する原因を明らかにするため、薬理学的手法と分子遺伝学的手法を組み合わせ、リズム発振に重要な神経伝達物質と、period タンパクの核輸送を調節するシグナル伝達機構を明らかにする。

4. 評価

(1)自己評価

本研究は行動のサーカディアンリズムを司る神経回路の動作機構を解明することを目標にし、分子時計のリズム発生機構を分子レベルで追求するというミクロの視点と、神経回路の活動が個々の神経細胞のリズム発生機構にどう関与するかというマクロの視点から研究を進めてきた。研究開始当初は Nocturnin という分子に着目して細胞内時計が光入力に同調されるための分子機構の解析を行っていたが、様々な技術的困難のために停止をやむなくされた。しかしながら、同時に行っていたスクリーニングから UNF が細胞内時計に重要な役割を果たす事が明らかになり、論文発表につながる結果を得た。このように、具体的な研究内容は計画時とは異なるものの、研究目標に沿った結果が得られてきたと考えている。予想外の結果を

得たときにあきらめず、また小さな結果でもおろそかにせず追求することが必要であることを深く実感してきた。蛍光レポーターを用いたライブイメージング系は、さきがけ研究よりの開始より数年前に構想し、パイロット実験行っていたが、いくつかの技術的困難によって完成されていなかった。しかし、さきがけ研究によってハエの系統を新たに作り直し、パイロット実験時には未だ開発されていなかった顕微鏡システムを用いることによって、技術的困難を克服し、信頼性のあるデータがとれるようになった。新たに確立したこの実験系を用いることによって、さきがけ研究の後半には、これまでに得られてきた観察結果を裏付けるメカニズムを明らかにしたい。

(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、中間評価を行った)。

ほとんどの生物の生命活動には日周リズムが備わっており、人においてその変調は多くの生活習慣病や精神疾患と深く関わっている。しかし、その時計のメカニズムについては広く動物界に共通性が高いと考えられている以外には不明な部分が多い。本研究はその脳にあるとされる時計の基盤となる神経回路を比較的単純な脳を持つショウジョウバエを使って解明を目指している。当初は *Nocturnin* という分子に着目したが、ハエ脳で時計ニューロンとされているものの内 LN_vs 細胞に絞ってその発現遺伝子スクリーニングを大規模に実施したところ、*unf* 遺伝子を同定し、その阻害により概日リズムが消失することを証明した。また *unf* は、直接時計機構に関わるだけでなく機能的神経回路の協調にも働くことを発見して、論文発表できたことは大きい成果である。さらにこのような *unf* の機能の分子的基盤を分子生物学的に解析して、UNF が分子時計の鍵である *period* 遺伝子および別の新規遺伝子に作用することを見出し、その解析を意欲的に進めている。近い将来に UNF の機能が解明され、またこれらの神経細胞が構成する神経回路の実体にも踏みこんだ成果が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Beuchle, D., Jaumouillé E., and Nagoshi, E. (2012). The nuclear receptor *unfulfilled* is required for free-running clocks in *Drosophila* pacemaker neurons. *Curr. Biol.* 22(13):1221-1227.

(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. January 13, 2014. Department seminar at the University of Tübingen, The Werner Reichardt Centre for Neuroscience, Tübingen, Germany. Host: Dr. Takashi Sato. “*Fer2* loss-of-function as a new fly model of Parkinson’s disease“
2. September 5, 2013. Swiss Chronobiology meeting, University of Fribourg, Switzerland. Oral

- presentaion. “Molecular mechanisms underlying the role of unfulfilled in *Drosophila* circadian rhythms“
3. September 4, 2013. SKMB Gene regulation workshop. University of Lausanne, Switzerland. Invited talk. “Circadian rhythms: from genes to networks“
 4. September 2, 2013. Invited seminar at the Experimental Neurology Meeting, Host: Department of Clinical Research Neurology group, University of Bern. “Circadian rhythms from cells to networks“
 5. June 21, 2013. Invited seminar at CNRS, Paris, France. Host: Dr. Serge Birman. “*Fer2* loss-of-function as a new model of Parkinson’ s disease“
 6. June 6, 2013. Invited seminar at HHMI Janelia Farm Research Campus, Virginia, USA. Host: Dr. Ken Sugino. “Investigating the molecular and neural mechanisms of *Drosophila* behavioral circadian rhythms“
 7. June 2–4, 2013. Cell symposium (Genes, Circuits and Behavior). Toronto, Canada. Poster presentation. “Investigating the molecular mechanisms underlying the role of unfulfilled in the *Drosophila* circadian rhythms“ Edouard Jaumouillé, Ken Sugino and Emi Nagoshi
 8. May 6, 2013. Invited seminar at the Experimental Neurology Meeting, Host: Department of Clinical Research Neurology group, University of Bern. “*Fer2* loss-of-function as a new fly model of Parkinson’ s disease“
 9. December 3, 2012. Department Seminar at Kyoto University, Graduate School of Science, Kyoto, Japan. Host: Dr. Tokitaka Oyama and Dr. Nobuaki Tanaka. “Behavioral control in flies: functions and dysfunctions“
 10. March 16, 2013. Swiss *Drosophila* meeting. EPFL, Lausanne, Switzerland. Oral presentation. “*Fer2* loss-of-function mutant as a new fly model of Parkinson’ s disease“
 11. July 6, 2011. Invited lecture at the “Neurogenomics and Connectomics“ course in the StarOmics Doctoral program. University of Fribourg. Fribourg, Switzerland. “Circadian Clocks in the *Drosophila* Brain: From Genes to Neural Networks“
 12. April 20, 2011. Department Seminar at the Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Zürich. Zürich, Switzerland. Host: Dr. Steven Brown. “Circadian Clocks in the *Drosophila* Brain: From Genes to Neural Networks“