

「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發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： 1件(うち、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 23 年 10 月～平成 27 年 3 月(※平成 29 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 26 年 12 月 評価会開催

平成 27 年 1 月 研究総括による事後評価

平成 27 年 1 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) 研究課題等の目的達成に向けた研究の進捗状況及び今後の見込み
- (2) 研究課題等の目的達成に向けた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)

6. 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、本領域の研究課題は方法論的に生理学的、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。領域研究者は領域会議や懇親会などで議論をとおして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。松田研究者も積極的に議論を行い、また多様な研究者とネットワークを築いてきた。平成25年11月には電気通信大学准教授として独立を果たし、今後がさらに期待される。

1. 松 信爾 研究者「光による細胞内輸送とシナプス可塑性の制御」

シナプスの可塑性を分子レベルで解明するために小脳や海馬のシナプス長期抑圧(LTD)および長期増強(LTP)が特に注目され研究されてきた。松田研究者は先にこの現象におけるシナプス後部の AMPA 受容体の選択的エンドサイトーシス/エキソサイトーシスを解析し、初期エンドソーム/後期エンドソームと AMPA 受容体結合蛋白や AP-2 および AP-3A の関与を明らかにしているが、さらにこれらの小胞トラフィッキングを光遺伝学的に操作することにより LTD/LTP を操作するという独自の着想を得た。本研究では、小脳 LTD において後シナプスの AMPA 受容体のトラフィッキングの時間経過など特性を確認した上で、初期エンドソームに局在化するプロトンポンプを作成し、HEK293 細胞でその動作を確認したのち培養神経細胞に発現さ

せ、光照射後の AMPA 受容体をライブイメージング解析し、LTD 誘導刺激による細胞表面の AMPA 受容体量の減少が光照射によって阻害されることを実証したものである。このように本課題研究期間の半ばで主要な成果を挙げており、残りの期間においては特定神経細胞の初期エンドソームに光依存性のプロトンポンプを発現するノックインマウスマウスの脳において LTD を光操作することにより記憶や学習におけるその関与を証明することが期待できる。さらに関連成果としてゴルジ体、ミトコンドリアなど他の膜小胞の機能を制御する技術開発にも成功できれば、インパクトの非常に高い成果となろう。

7. 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 (独)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・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 1 月末現在。

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	3	3
口頭	2	1	3
その他	0	0	0
合計	2	4	6

(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 0 件

国内 1 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27年3月末現在) (応募時所属)	研究費(3年間) (百万円)
松田 信爾 (兼任)	光による細胞内輸送とシナプス 可塑性の制御 (慶応義塾大学医学部)	電気通信大学 准教授 (慶応義塾大学医学部講師)	64

研究報告書

「光による細胞内輸送とシナプス可塑性の制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成29年3月

研究者: 松田 信爾

1. 研究のねらい

速い興奮性伝達は AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) によって担われる。神経活動の変化によってシナプス伝達効率が長期的に低下ないし増強する現象は長期抑圧 (LTD) および長期増強 (LTP) と呼ばれ、神経回路レベルにおける記憶・学習の実体であると考えられている。LTD や LTP の分子実体は、神経活動によって引き起こされるシナプス後部における AMPA 受容体の選択的エンドサイトーシスやエキソサイトーシスであることが近年明らかとなった。しかし、このようなシナプスにおける分子レベルの変化 (AMPA 受容体の輸送) と回路レベルの変化 (LTD や LTP) と個体レベルにおける記憶・学習過程の関係については未だ十分に明らかではない。例えば、AMPA 受容体のサブタイプを変異させたマウスでは、確かに分子レベルではリン酸化やエンドサイトーシス過程が障害され、脳切片において検討すると LTD や LTP が障害され、さらに個体レベルでは記憶・学習過程が変化する。しかし、分子の変化や回路の変化が直接に個体レベルでの記憶・学習を変化させたのかどうかについてはこれらの相関的な解析方法では明らかではない。

近年、光遺伝学の進歩により、膜電位を光照射によって制御し、個々の神経活動の変化と回路や個体レベルでの変化を直接的に対応づけることが可能となってきた。そこで申請者は個々のシナプスにおける可塑性変化そのものを光照射によって制御できないかと着想した。このためにまず、シナプス可塑性を引き起こす AMPA 受容体の小胞による輸送の詳細な分子機構を解明することが必須となる。たとえば神経細胞が長期抑圧誘導刺激を受けると何分後にどの小胞に AMPA 受容体が含まれているかといった点を解明することが必要となる。また、小胞体輸送はエンドソームにおける pH 変化によってリソソーム方向への輸送が制御されることに着目し、エンドソームの pH を光遺伝学を用いて制御する技術を開発する。さらにこの技術を用い、またシナプス可塑性誘導時の AMPA 受容体の細胞内輸送過程の知見を活かし、神経細胞内において AMPA 受容体輸送を光照射によって制御することにより、記憶・学習過程を分子・回路・行動レベルにおいて初めて直接的に統合的に解明することをねらいとして研究を行っている。また本技術を応用して、ゴルジ体やミトコンドリアの機能を光照射で制御する技術も開発する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、AMPA 受容体の細胞内輸送を個体レベルで光によってコントロールし、記憶・学習と AMPA 受容体の細胞内輸送との関係を直接的に解明したいと考えている。この目的を達成するため、初期エンドソームの機能を光によって阻害し、細胞表面の AMPA 受容体

数の減少を食い止め LTD の誘導を阻害する技術を開発する。

このことを可能にするためにはまず、LTD 誘導時の AMPA 受容体の細胞内輸送の詳細（例えば、LTD 誘導後、何分後に AMPA 受容体が初期エンドソームに存在しているか、あるいは何分後にリソソームまで輸送されているか等）を解明することが前提となる。申請者はこれまでに小脳と海馬の両方の系を用いて LTD の分子機構の解明を行ってきた（論文1, 2）。特に海馬では、LTD 誘導刺激を受けた後3分後には、既に初期エンドソームに AMPA 受容体が局在していること、また10分後には AMPA 受容体は後期エンドソームに局在していることを明らかにした（論文2）。さらにこの LTD 誘導時、AMPA 受容体は、TARP (Transmembrane AMPA receptor Regulatory Protein) を介して AP-2 に結合し初期エンドソームへ輸送され、その後 AP-3A に結合して後期エンドソーム・リソソームへと輸送されるという順序で引き起こされていることが明らかになった。また AP-3A による輸送を阻害すると AMPA 受容体は細胞表面へリサイクルされることも明らかにした。さらに Rab8 が AMPA 受容体の細胞内輸送に関与しているか否かを解析した（論文3）。また、光依存性のプロトンポンプを初期エンドソームに発現させた HEK293 細胞では光により初期エンドソームの酸性化が阻害されること、そしてデキストランの取り込み量が減少することが定量的に示された。

以上の結果を踏まえ、神経細胞の初期エンドソームに光依存性のプロトンポンプを発現させ、光を照射し、LTD 誘導刺激を加えた際の細胞表面の AMPA 受容体の量の減少が阻害できるか否かを免疫組織化学的手法、ならびにライブイメージングによって解析した。その結果、LTD 誘導刺激による細胞表面の AMPA 受容体量の減少が光によって阻害されることが明らかとなった。

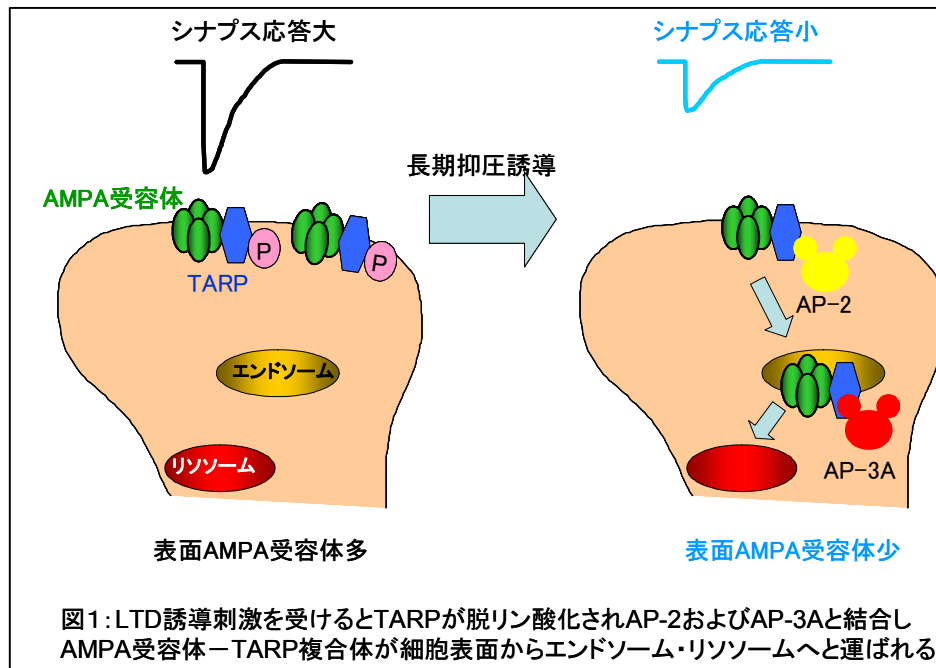
(2) 詳細

(A) 長期抑圧の分子機構の解明

LTD の制御技術を開発するためには大前提としてその分子機構を解明する必要がある。LTD は小脳と海馬の両方の系で、よく研究がなされており、本研究ではその両方の制御を目指している。小脳には海馬には発現していない δ 型グルタミン酸受容体 (δ 受容体) が発現しており、またこの受容体が小脳 LTD の誘導に必須であることが知られている。そこでこの δ 2 受容体がどのように小脳 LTD に関与しているのかを解析した。その結果 δ 2 受容体は AMPA 受容体のリン酸化状態を制御し、LTD に必須の役割を果たしていることが明らかになった（論文1）。AMPA 受容体は基底状態ではシナプスにおけるアンカータンパク質と結合しており、LTD 誘導刺激を受けてリン酸化されるとこのアンカータンパク質と解離し、その後エンドサイトーシスによって細胞内へと取り込まれることが知られている。つまり δ 2 受容体は AMPA 受容体がエンドサイトーシスされるための前段階に必要であることが明らかになった。このことから本研究で開発するエンドサイトーシス自体を光で制御する技術は小脳・海馬ともに適用可能であることが示唆された。

次に海馬の系を用いて LTD の詳細な分子機構の解析を行った。神経細胞表面の AMPA 受容体は単独で存在しているわけではなく TARP と呼ばれるタンパク質と強固な複合体を形成していることが知られている。本研究では LTD 誘導刺激によりこの TARP が脱リン酸化されると、アダプタータンパク質複合体の AP-2 と結合するようになり、この AP-2 との結合によ

って AMPA 受容体—TARP 複合体が初期エンドソームへと刺激後約3分で輸送されることが明らかになった。その後 TARP は別のアダプタータンパク質 AP-3A に結合することで LTD 誘導刺激後約10分で後期エンドソームへと輸送されることも明らかにした(図1参照)。さらに TARP-AP3A 間の結合が阻害され、後期エンドソームへと輸送されなかった AMPA 受容体は細胞表面へとリサイクルされることも明らかにした。



(B) 長期抑圧制御技術の開発

すでに光依存性のプロトンポンプに変異を導入し、初期エンドソームに局在化させることには予備実験によって成功していたため、このプロトンポンプをまず培養 HEK293 細胞に発現させ、光により初期エンドソームの酸性化が阻害されるか否かを解析した。pH に依存して蛍光強度の変化する GFP (SEP)を用いて光照射前後で HEK293 細胞の初期エンドソームの pH をライブイメージングによって解析したところ、光照射前は6程度であった pH が光照射して10分後には6.5程度にまで上昇した。さらに光を照射した HEK293 細胞ではデキストランの取り込み量が減少することが定量的に示された。

以上の結果を踏まえ、神経細胞の初期エンドソームに光依存性のプロトンポンプを発現させ、光を照射し、LTD 誘導刺激を加えた際の細胞表面の AMPA 受容体の量の減少が阻害できるか否かを免疫組織化学的手法、ならびにライブイメージングによって解析した。光を照射した神経細胞、あるいはしていない神経細胞に LTD を誘導する NMDA 刺激を加え、10 分後の細胞表面に存在する AMPA 受容体の量を免疫組織化学的手法を用いて定量したところ光を照射していない神経細胞では NMDA 処理により細胞表面の AMPA 受容体の量は減少していたが、ひかりを照射した細胞では減少は見られなかった。また、pH 感受性の GFP である SEP を細胞外領域に融合させた AMPA 受容体 GluA2 サブユニットを神経細胞に発現させ、NMDA 刺激を与え、SEP の蛍光変化をライブイメージングによって観察した。光を照射していない神経細胞では NMDA 刺激後 SEP の蛍光の低下が見られた。これは SEP を融合させた

GluA2 サブユニットがエンドサイトーシスによって酸性の細胞内小器官(エンドソーム・リソソーム)へ輸送されたことを示している。ところが光を照射した神経細胞では NMDA 刺激後も SEP の蛍光の変化は見られなかった。以上の結果より、LTD 誘導刺激による細胞表面の AMPA 受容体量の減少が光によって阻害されることが明らかとなった。

3. 今後の展開

これまでの3年間でシナプス可塑性の1つである LTD の分子機構を解明し、培養神経細胞を用いて LTD 誘導時の AMPA 受容体のエンドサイトーシスを光によって阻害する技術を開発してきた。これらの結果を踏まえ、残りのさきがけ研究期間で記憶・学習過程をマウス個体の行動レベルにおいて解明していく。このためには、特定の神経細胞の初期エンドソームに光駆動性のプロトンポンプを発現するノックインマウスを作成する必要がある。まず、ROSA locus にエンドソームに局在するプロトンポンプをコードする cDNA を挿入し、この遺伝子は Cre recombinase で切断されたときにのみ発現するように設計しておく。このノックインマウスと特定の神経細胞に Cre recombinase を発現するマウスとを交配することにより、特定の神経細胞の初期エンドソームに光駆動性のプロトンポンプを発現するマウスを作成する。このマウスの小脳、あるいは海馬のスライス標本を用いて電気生理学的な LTD の誘導を光で阻害できるか否かを確認する。さらにこのマウスに光を照射した状態あるいは照射していない状態で様々な学習タスクを与え、AMPA 受容体のエンドサイトーシスが個体レベルの記憶や学習に直結しているのか否かを明らかにしていく。

さらに、ゴルジ体およびミトコンドリアの光による制御技術の開発も続ける。これらの細胞内小器官の機能を制御するため、光依存性のプロトンポンプと様々なタンパク質との融合タンパク質を作成し、目的とする細胞内小器官に最も効率よく輸送されるようにする。これらのタンパク質が完成した後、実際に光によってこれらの細胞内小器官の pH あるいは機能を制御できるかを解析していく。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究によって、まず長期抑圧の分子機構の詳細がかなり明らかになってきたと考えている。長期抑圧の分子機構の解明は脳神経分野における非常に重要な課題のひとつであり、実際、海馬の長期抑圧の分子機構を詳細に解析した論文(論文2)は、F1000Prime の推薦論文に選ばれている。このことは本研究の重要性を裏付けるものと考えられる。

また、これらの研究成果を基盤として光によって AMPA 受容体のエンドサイトーシスを制御する技術の開発も着実に進んでいる。現在までのところ、培養細胞を用いた系ではエンドソームの酸性化を光によって制御して、LTD 刺激によって誘導される AMPA 受容体のエンドサイトーシスを阻害することに成功している。

これらの研究結果はさきがけ研究費によって購入した設備備品、消耗品を駆使して得られたものであり、研究費は有効に使用できていると考えている。

今後、生きたマウスにおいて LTD を光によって阻害し、シナプス可塑性と個体レベルの学習

との関連性を直接的に解明することを目指していく。現在既に、特定の神経細胞の初期エンドソームに光依存性のプロトンポンプを発現するノックインマウスの作成に着手しており、今後の2年間で本研究の大きな課題である AMPA 受容体の輸送と記憶・学習との関係性を直接的に解明することが十分可能であると考えている。このノックインマウスの作成もさがけ研究費で行っているが、研究の重要な点に効率的に資金を使っているものと考えている。

2014年11月からは電気通信大学・情報理工学研究科において独立し、研究室をセットアップ・運営する中でのさがけ研究実施となる。これまで以上にさがけの支援を受けながらも、最大の成果を得たいと考えている。

また、今後、ゴルジ体、ミトコンドリアの制御技術の開発も目指していくが、特にゴルジ体の制御技術については、上述のアンジェルマンシンドロームの病態の理解につながる可能性があり積極的に開発を目指していきたい。

(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)

シナプスの可塑性を分子レベルで解明するために小脳や海馬のシナプス長期抑圧(LTD)および長期増強(LTP)が特に注目され研究されてきた。松田研究者は先にこの現象におけるシナプス後部の AMPA 受容体の選択的エンドサイトーシス/エキソサイトーシスを解析し、初期エンドソーム/後期エンドソームと AMPA 受容体結合蛋白や AP-2 および AP-3A の関与を明らかにしているが、さらにこれらの小胞トラフィッキングを光遺伝学的に操作することにより LTD/LTP を操作するという独自の着想を得た。本研究では、小脳 LTD において後シナプスの AMPA 受容体のトラフィッキングの時間経過など特性を確認した上で、初期エンドソームに局在化するプロトンポンプを作成し、HEK293 細胞でその動作を確認したのち培養神経細胞に発現させ、光照射後の AMPA 受容体をライブイメージング解析し、LTD 誘導刺激による細胞表面の AMPA 受容体量の減少が光照射によって阻害されることを実証したものである。このように本課題研究期間の半ばで主要な成果を挙げており、残りの期間においては特定神経細胞の初期エンドソームに光依存性のプロトンポンプを発現するノックインマウスマウスの脳において LTD を光操作することにより記憶や学習におけるその関与を証明することが期待できる。さらに関連成果としてゴルジ体、ミトコンドリアなど他の膜小胞の機能を制御する技術開発にも成功できれば、インパクトの非常に高い成果となろう。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kohda, K, Kakegawa W, **Matsuda S**, Yamamoto T, Hirano H, Yuzaki M. The delta2 glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites. Proc Natl Acad Sci U S A 110(10): E948–57 (2013).
2. **Matsuda S**, Kakegawa W, Budisantoso T, Nomura T, Kohda K, Yuzaki M. Stargazin regulates AMPA receptor trafficking through adaptor protein complexes during long-term depression. Nat Commun, 4: 2759 DOI: 10.1038/ncomms3759 (2013)
F1000Prime RECOMMENDED

3. Sato T, Iwano T, Kunii M, **Matsuda S**, Mizoguchi R, Jung Y, Hagiwara H, Yoshihara Y, Yuzaki M, Hrada R, Harada A. Rab8a and Rab8b are essential for multiple apical transport pathways but insufficient for ciliogenesis. J Cell Sci (2014) 127: 422-31.

(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)

(主要な学会発表)

松田信爾 AMPA 受容体のエンドサイトーシス制御機構

生理研研究会「シナプス可塑性の動作原理」招待講演 2012年6月14日

Shinji Matsuda, Michisuke Yuzaki

Stargazin regulates AMPA receptor trafficking from plasma membrane to early endosome and lysosome during long term depression.

The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan

Korea-Japan-Chine Joint Symposium. 2013

松田 信爾、柚崎 通介

シナプス可塑性の制御技術の開発

Development of the technology for controlling synaptic plasticity

第36回日本神経科学大会 (Neuro2013) 2013