

「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域 領域活動・評価報告書  
 —平成22年度終了研究課題—

研究総括 中西 重忠

1. 研究領域の概要

本研究領域は、生命システムの動作原理の解明を目指して、新しい視点に立った解析基盤技術を創出し、生体の多様な機能分子の相互作用と作用機序を統合的に解析して、動的な生体情報の発現における基本原理の理解を目指す研究を対象とします。具体的には、近年の飛躍的に解析が進んだ遺伝情報や機能分子の集合体の理解をもとに、細胞内、細胞間、個体レベルの情報ネットワークの機能発現の機構、例えば生体情報に特徴的な非線形で動的な反応機構などを、新しい視点に立って解析を進めることによって生命システムの統合的な理解をはかる研究を対象とします。さらには、生体情報の発現の数理モデル化や新しい解析技術の開発など基盤技術の創成を目指した研究も対象としますが、生命現象の実験的解析と融合した研究を重視するものです。

2. 研究課題・研究者名  
別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は「生命システムの動作原理と基盤技術」領域に設けた選考委員10名と研究総括で行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、募集要項に示した選考基準を基本としたが、下記の点に特に留意した。

研究者は、論文数(過去の実績)ではなく、自らの研究であるか、将来性にかけることができるかを重視する。研究として同じレベルであれば女性研究者や地方大学・私立大学・企業に所属する研究者を採択したい。

4. 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー10名、外部評価者2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、採用候補者を選定した。

選 考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	257 名	25 名	10 名

なお、今回の終了課題の対象者は、ライフイベントのため、18年度採択の細川千絵が 1 年延長で参入し、19年度採択の小早川令子が次年度に延長した。

5. 研究実施期間

平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

6. 領域の活動状況

領域会議: 7回

CREST 公開シンポジウム(2010.6.1)ポスター参加

報告会: 1回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問: 研究開始時に、研究総括と技術参事、事務参事が研究者を訪問し、指導教授への本研究領域の説明、協力を要請した。本人からは、研究内容、設備、施設の状況の説明を受け、動機付け、進路、注意事項などを助言、指導した。その後、技術参事、事務参事が、異動の際や知財相談や大型機器納品など具体的な要件の度に、適宜、訪問し、支援した。

## 7. 評価の手続き

研究総括が研究者の研究終了報告会での報告、質疑応答、そして報告書・自己評価表を基に、アドバイザーの意見も参考にして行った。

(評価の流れ)

平成 22 年 12 月	研究報告会開催
平成 23 年 2 月	研究報告書提出
平成 23 年 3 月	研究総括による評価
平成 23 年 3 月	研究期間終了

## 8. 評価項目

- (1) 研究開始時の研究構想を基準に研究の達成度
- (2) 外部発表(学術論文、口頭発表など)、特許など研究成果の発信状況
- (3) 学術賞、学会招待講演、新聞記事発表など外部からの評価状況
- (4) 得られた研究成果の科学技術への貢献

## 9. 研究結果

研究者は、生命システムという新しい研究分野に、分子生物学、生体工学(ノックアウト、トランスジェニック)、電気生理学、行動科学、数理モデル解析、バイオイメージングなどの最新の基盤技術を駆使して、各課題の動作原理の探求とそれに用いる新しい基盤技術の開発を進めてきた。対象は、脳神経細胞系(4)、脳情報行動系(2)が主流となったが、免疫、単細胞生物、植物、線虫、など、広範囲に及んでいる。研究者も、25名、翌年38名と増加したこともあり、アドバイザーの適切な助言やCREST研究者やさきがけ研究者間での横断的で、自由な情報交流により、生命システム全体としてネットワークができ、大きな成果を生む結果となった。海外での招待講演も8件と多く、国際的に活躍している研究者も多く見受けられる。

【細川 千絵】光捕捉・蛍光測定システムを構築し、神経細胞シナプス領域の顕微蛍光イメージングの実験系を確立した。神経細胞のシナプス領域に近赤外レーザー光を照射すると、光放射圧により神経細胞内シナプス小胞群が捕捉され、集合することを見出した。光捕捉力と捕捉粒子濃度には相関があり、捕捉力を考慮した理論式によりシナプス小胞群の捕捉過程を考察した(論文 revise 中)。細胞内シナプス動態の蛍光相関分光解析により、集光スポット内のシナプス小胞群の運動が光捕捉力の増大にともなって1.5倍程度束縛されることを見出した(論文投稿準備中)。高濃度 KCl 添加によるシナプス放出刺激を行い、高レーザー光強度条件において光捕捉による細胞内操作がシナプス小胞の放出を抑制できることを示した。神経細胞ネットワーク解析のための多点電位計測・顕微分光システムを構築した。以上の成果により、集光レーザービームの光捕捉・集合により、神経細胞のシナプス領域の分子集合を直接操作することに成功した。

【秋山 泰身】胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導するサイトカインレセプターとして RANK と CD40 を同定できた。またそれらのシグナルが TRAF6 などのシグナル伝達因子を介して RelB など NF- $\kappa$ B を活性化することで分化を誘導することを証明した。その成果は Immunity 2008a, Immunity 2008b で報告した。さらに独自に開発した In vitro 分化誘導系を用いて胸腺髄質上皮細胞の分化や機能を制御する転写因子候補を得ることができた。また胸腺また胸腺髄質上皮細胞の分化・維持を制御する機構として RANKL-RANK-OPG-RANKL のループよりなるネガティブフィードバック機構を発見することができた。またレンチウイルスベクターを用いると胸腺髄質上皮細胞に外来遺伝子を導入できることが判明した。

【岩崎 秀雄】トランスクリプトーム解析を行った結果、連続明期で 50%程度の遺伝子に明瞭な概日振動が見られ、主観的黄昏および主観的夜明けをピークとする二峰性の位相分布を示すこと、暗期(夜)では既知のすべての時計関連遺伝子群を含む 9 割以上の遺伝子の転写が速やかに抑制され、12 時間以内に約 8 割の総 mRNA 量が消失すること、およそ 10%の遺伝子群は暗期に発現し続けること、kaiC 遺伝子の過剰発現は従来の仮説と異なり、主観的夜明けの時刻に時計を停止させることを見出した(PNAS, 2009)。そこで、従来解析されてこなかった「時計遺伝子発現の停止する夜間における概日時計と転写の関連性」に着目して解析を行った結果、暗誘導遺伝子の半数は kai 遺伝子に基づく時刻依存的な暗誘導が見られること、連続暗期中でも複数の遺伝子に約 24 時間周期の減衰振動発現が見られること、連続明期中で高振幅発現を示す複数のシグマ因子の破壊株では上記の時刻依存的暗誘導や減衰振動が大きく影響を受けることを示した。

【木津川 尚史】マウスの運足のタイミングを計測するタッチセンサをホイール装置に装着することに成功し、マウスの運足の精密な計測が可能になった。このことにより、マウスは複雑なパターンを走行しているときでも、運足に周期性(リズム)が存在していることを明らかにした。運足の測定と同時に、走行するマウスの大脳皮質、線条体から複数の神経細胞活動の同時記録を行うことに成功した。走行時に観察された周期的運足をリズムと定義し、3回以上の周期的運足と神経活動との関係性を解析する手法を開発した。その結果、特に線条体の神経活動が周期的運足と関連性が高いことがわかってきた。

【小村 豊】意思決定の霊長類モデル作成では、複合的な視覚刺激を用いて、複数の解釈が可能な行動パラダイムを開発した。実際に、3頭のサルに、本課題を習得させることに成功し、同一の視覚入力に対して、異なる情報の読み出しを行っていることを行動学的に担保できる実験系を確立できた。視床枕は、ほとんどすべての大脳皮質と解剖学的結合があるにも関わらず、その機能的意義については、ほとんど不明であったが、本研究の結果、視床枕ニューロンの視覚応答の多くは、視覚特徴が統合された後の知覚の曖昧さに感受性を示した。この性質は、従来、多くの視覚皮質で認められた、個々の視覚特徴(ある特定の色や動きなど)に選択性を示す情報処理とは、次元の異なる新規の脳内表現であることが分かった。

【田中 敬子】小脳 LTD において、ポジティブフィードバック機構の中の主要分子、プロテインキナーゼ C (PKC)と MAP キナーゼ(MAPK)が相互に働く、つまりポジティブフィードバック機構を形成していることを明らかにした。PKCとホスホリパーゼ A2の抑制剤を LTD 誘発後の様々な時間に投与することにより、ポジティブフィードバック機構が LTD の発現相で必要であることがわかった。加えて、RKIP のリン酸化が LTD に必要であること、さらにこれは MAPK の上流で働いていることを示す知見を得ている。

【原田 伊知郎】マイクロレイ型培養基板として2光子励起重合法を用いてハイドロゲルの合成方法を確立した。さらに、合成したマイクロハイドロゲルの光ファイバー化を行い、細胞がマイクロピラー上を移動するような加工を行うことに成功した。また、移動に伴う力の計測が可能になり、生体内組織に存在する細胞が接着している足場である細胞外マトリクスの物性を認識するシステムの解明に大きく近づいた。

【東山 哲也】卵装置が突出するユニークな植物であるトレンシアを用いて、卵細胞のとなりにおいてガイドンス分子(誘引物質)を分泌する助細胞を顕微鏡下で集め、EST 解析を行った。その結果、ディフェンシンに類似のペプチド LURE1 および LURE2 を、花粉管ガイドンス分子として同定することに成功した。140 年来の謎を解くものとして、Nature 誌の表紙を飾る成果として発表できた。興味深いことに、LURE はわずか 1000 分子程度でも *in vitro* で花粉管を誘引できることが明らかとなった。助細胞 EST データをもとに探索を続けると、さらに多くの LURE 遺伝子が存在することが示唆され、助細胞によるガイドンスシグナルは、多種の LURE ペプチドの混合であることが明らかとなってきた。また、モデル植物でもゲノムワイドな解析から、LURE 遺伝子を同定することに成功し、LURE が広く植物の花粉管ガイドンス分子として働いていることが示された。

【深田 優子】LGI1 の作用機構の根幹となる分子経路および LGI1 の個体レベルの生理機能を明らかにすることができた。この結果、LGI1・ADAM リガンド・受容体複合体は、脳の興奮性を制御するシステムを構築しており、正常脳ではてんかん発生を抑制する‘抗てんかん原性’複合体として機能していることを提唱した(Fukata et al.PNAS2010)。さらに、「LGI1 欠損による AMPA 受容体機能低下により、なぜてんかんが生じるのか。」について、分子レベルと神経回路レベルの解析を進め、LGI1・ADAM リガンド・受容体の機能低下が、とくに海馬特定領域の AMPA 受容体機能低下を引き起こし、これが直接、海馬の異常興奮を惹起し、てんかんの原因となることを明らかにしつつある。

【松井 広】グリアは神経組織の中で細い突起を張り巡らせており、二光子イメージングにより、形態が刻々と変化する様が観察することができたことにより、神経からグリアに向けてのグルタミン酸の放出があり、グリアの受容体が活性化されて形態が制御されていることが示唆された。グリアに発現するトランスポーターは、神経細胞間のシナプス伝達を修飾するが、グリア突起のシナプス包囲率に従って、修飾の程度が変化することが明らかになった。シナプス伝達は、神経活動に伴って可塑的に変化するが、神経細胞に光感受性分子を特異的に発現させ、光刺激することでシナプス伝達の長期可塑性を誘導することに成功した。シナプス伝達の可塑性を追って、シナプスの構造も変化することが明らかになった。グリアを選択的に光刺激することにより、グリアが活性化すると、グリアからグルタミン酸や各種イオンが放出され、周囲の神経細胞の活動を変化させることも明らかにすることができた。

これらの成果を礎に、CREST 研究者や「生命モデル」領域研究者とのネットワークを活用し、議論を深め、さら

に、大きな発展を期待する。アドバイザー共々関係者で今後も支援のための連携を進めていく。

## 10. 評価者

研究総括 中西 重忠 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所 所長

### 領域アドバイザー氏名(五十音順)

岡田 清孝 自然科学研究機構・基礎生物学研究所 所長

川人 光男\*1 (株)国際電気通信基礎技術研究所 脳情報研究所 所長

郷 通子\*2 お茶の水女子大学長

後藤 由季子 東京大学分子細胞生物学研究所 教授

近藤 滋 大阪大学 大学院生命機能研究科 教授

榊 佳之 国立大学法人 豊橋技術科学大学 学長

桜田 一洋 (株)ソニーコンピュータサイエンス研究所シニアリサーチャー

笹井 芳樹 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター グループディレクター

武藤 誠 京都大学 大学院医学研究科 教授

垣生 園子\*3 順天堂大学 医学部 客員教授

平野 俊夫 大阪大学 大学院生命機能研究科 教授

\*1 平成18年6月～平成22年3月まで参画

\*2 平成18年6月～平成18年12月まで参画

\*3 平成19年3月～参画

### (参考)

#### (1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	9	40	49
口頭	90	47	137
その他	12	0	12
合計	111	87	198

※平成23年2月現在

#### (2) 特許出願件数

国内	国際	計
2*	0	2

\*内、1件は、平成23年3月末までに企業より出願予定。

#### (3) 受賞等

・岩崎 秀雄

文部科学大臣表彰若手科学者賞(H20.4)

9th Spiral Independent Creators Festival ハワード・リクター賞(H20.5)

日本ゲノム微生物学会学術奨励賞(H23.3)

・小村 豊

文部科学大臣表彰若手研究者賞(H21.4)

・田中 敬子

日本神経回路学会論文賞(H20.9)

・東山 哲也

日本植物形態学会平瀬賞(H21.9)

日本学術振興会賞(H22.3)

・深田 優子

文部科学大臣表彰若手研究者賞(H21.4)

#### (4) 招待講演

国際 11件

国内 11件

## 「生命システムの動作原理と基盤技術」領域 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 (応募時所属)	研究費 (百万円)
秋山 泰身 (兼任)	胸腺依存的な免疫寛容を制御する基盤技術の開発 (東京大学 医科学研究所)	東京大学 医科学研究所 准教授 (同上 講師)	41
岩崎 秀雄 (兼任)	環境適応に関わる時空間パターン形成現象の分子ネットワーク (早稲田大学 理工学術院)	早稲田大学 理工学術院 准教授 (同上)	41
木津川 尚史 (兼任)	リズムカルな連続運動の神経基盤の解析 (大阪大学大学院生命機能研究科)	大阪大学大学院生命機能研究科 准教授 (同上)	40
小村 豊 (兼任)	脳内を縦横に結ぶ意思決定リンク (独)産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門	(独)産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門 主任研究員 (同上)	40
田中 敬子 (兼任)	小脳長期抑制を発現・維持する分子機構の時間的・空間的制御 (韓国科学技術研究所機能コネクティクスセンター)	韓国科学技術研究所機能コネクティクスセンター 主任研究員 (Duke University Medical Center Research Associate)	40
原田 伊知郎 (兼任)	生体内細胞の周辺環境物性認識システムの解明 (東京工業大学 大学院生命理工学研究科)	東京工業大学 大学院生命理工学研究科 助教 (同上 助手)	40
東山 哲也 (兼任)	花粉管ガイダンスの動的システムの解明 (名古屋大学 大学院理学研究科)	名古屋大学 大学院理学研究科 教授 (同上)	40
深田 優子 (兼任)	シナプス強度を決定する基本原理の解明 (自然科学研究機構 生理学研究所)	自然科学研究機構 生理学研究所 准教授 (同上 研究員)	40
細川 千絵* (兼任)	レーザー誘起光集合制御による神経細胞内分子動態の時空間ダイナミクスの解明 (独)産業技術総合研究所 健康工学研究部門	(独)産業技術総合研究所 健康工学研究部門 研究員 (同上 セルエンジニアリング研究部門 研究員)	41
松井 広 (兼任)	脳細胞光制御を用いた神経グリア相互作用の解明 (自然科学研究機構 生理学研究所)	自然科学研究機構 生理学研究所 助教 (同上)	40

(\*前年度採択者1名がライフイベント後に復帰参画。今年度採択者1名がライフイベントで1年間延期。)

# 研究報告書

## 「レーザー誘起光集合制御による神経細胞内分子動態の 時空間ダイナミクスの解明」

研究期間：平成18年10月～平成23年3月

研究者：細川 千絵

### 1. 研究のねらい

生命現象は多様な機能分子の活動に応じて生体情報ネットワークを形成し、時空間的にダイナミックな制御を受けている。これまでにプロテオーム解析や X 線構造解析により生体分子の静的な構造が解明されており、今後それらの機能分子の細胞内分子動態を単一分子から分子集合体レベルで捉え、細胞内の内部状態を変化させ、機能を発現するかを明らかにすることは、生命システムの動作原理やそれに関わる多数の因子の作用を理解する上で必要不可欠となる。そこで本研究では、従来の光ピンセット技術を分子系に展開し、集光レーザービームにより誘起される光集合を神経細胞の局所機能操作に応用することにより、細胞内分子動態の時空間ダイナミクスの解明を行った。

### 2. 研究成果

神経細胞は電気的結合とシナプス結合を介した情報伝達を行い、細胞ネットワークを動的に変化させることにより、脳の情報処理を実現している。このような神経細胞内、細胞間における相互作用を理解するためには、細胞内の個々の分子動態から細胞ネットワークにおける時間的、空間的挙

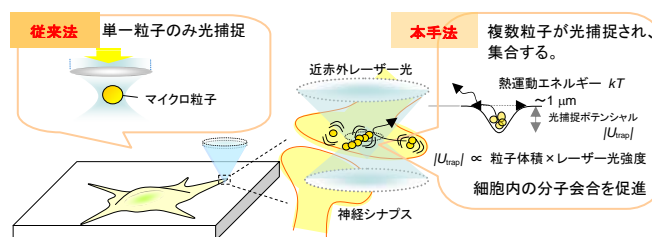


図 1. 光ピンセットを用いた神経細胞内分子集合操作の模式図

動を明らかにする必要がある。本研究では、神経回路網の能動操作を、単一シナプスレベルで可逆的に行う手法として、光ピンセットに着目した。光ピンセットは、これまで主にマイクロサイズの単一粒子を非接触、非破壊に捕捉し、操作する手法として利用されてきた。捕捉対象がナノサイズとなると、その大きさがレーザー光の集光スポット径より小さいために複数の分子やナノ粒子が捕捉、集合することが見出されており、光ピンセットがいわゆるマニピュレーションにとどまらず、分子集合体の作製や局所反応制御に有効であることが示されている。そこで本研究では、神経シナプスの局所領域に集光レーザービームの光捕捉・集合を誘起することにより、単一シナプス動態を制御し、分子動態から細胞ネットワークに至る時空間ダイナミクスの解明を目指した(図 1)。具体的な研究項目およびその成果を以下に示す。

#### 1) 光ピンセットを用いた神経細胞内単一シナプスの操作

神経回路網を構成する神経細胞のシナプス内の分子集合を集光レーザービームの光捕捉・集合を誘起することにより直接操作することに成功した。ラット胎児脳から調整した海馬神経細胞に、シナプス活動依存的に取り込まれる蛍光色素 FM1-43 を用いてシナプス小胞群を染色した。神経シナプス部位と思われる領域に波長 1064 nm の近赤外レーザー光を集光すると、集光領域からの発光が観測された(図 2a、b)。分光測定によりこの発光はレーザー光による FM 色素からの二光子励起蛍光であることが示された。二光子励起蛍光強度はレーザー照射時間とともに増加したことから(図 2c)、光捕捉によりシナプス小胞群が集光スポット内に集合することが明らかとなった。また、この蛍光強度の増加は照射レーザー光強度が高いほど顕著にみられた。レーザー光照射直後の蛍光強度とレーザー光強度との関係を調べたところ、120 mW 以下の低レーザー光強度で



は、蛍光強度はレーザー光強度に対して約 2 次で与えられ、観測している蛍光が光ピンセット用の近赤外レーザー光の二光子励起過程であることと対応づけられた。これに対し、高レーザー光強度では、蛍光強度の照射レーザー光強度依存性は 2 次以上となり、捕捉粒子数の増加に相当することが示唆された。このことから、照射レーザー光強度が高い程、光放射圧により神経細胞内のシナプス小胞群がより多く捕捉され、集合することを見出した。

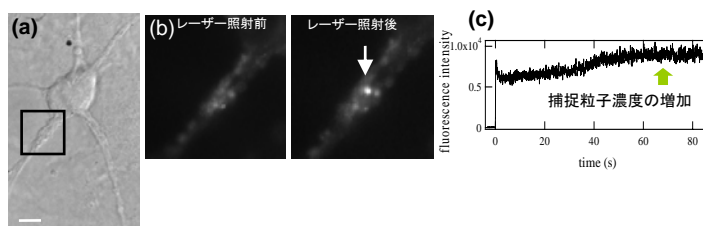


図 2. シナプス領域を蛍光色素(FM1-43)で染色したラット海馬神経細胞の透過像(a)、蛍光像(b)。レーザー照射後、集光スポットからの二光子励起蛍光が確認された。(c)シナプス領域の蛍光強度変化。

## 2) 光捕捉された神経細胞シナプス領域の蛍光相関分光測定と捕捉、集合機構の検討

光捕捉された細胞内シナプス小胞群の運動特性を明らかにするため、蛍光相関分光測定を行った。レーザー光を神経細胞シナプス領域に照射し、蛍光相関分光測定によりシナプス小胞群の細胞内動態を調べたところ、蛍光強度の自己相関関数は、捕捉用レーザー光強度が高い場合において減衰時間が長くなる傾向がみられた。自己相関関数の減衰時定数はレーザー光強度とともに増加したことから、集光スポット内のシナプス小胞群の運動が光捕捉力の増大にともなって束縛されたと考えられる。シナプス領域内の粒子運動は、レーザー照射により約 1.5 倍遅くなることを明らかにした。さらに、光捕捉ポテンシャルエネルギーを考慮することにより、シナプス小胞群が捕捉可能な条件を数値計算により求め、シナプス小胞群の捕捉・集合機構の検討を行った。粒径 40 nm の単一シナプス小胞は、レーザー光強度が高くとも捕捉が困難であることがわかった。シナプス領域では複数個のシナプス小胞がクラスターを形成していることが知られており、レーザー光の集光領域内にシナプス小胞のクラスターが局在するならば、捕捉ポテンシャルの増大が期待される。計算の結果、10 個、および 20 個のシナプス小胞クラスターの光捕捉ポテンシャルエネルギーは粒子の熱運動エネルギーよりも大きくなり、20 個の小胞クラスターでは安定に光捕捉される条件を上回ることも見出された。以上の計算結果は、レーザー光強度が高い程、集光スポット内の粒子濃度の上昇が顕著にみられたという実験結果をよく説明しており、細胞内シナプス小胞クラスターが捕捉可能であると考察した。

## 3) 光ピンセットによる神経細胞単一シナプスの放出制御

神経細胞にレーザー光を照射した状態で、高濃度 KCl 添加により神経細胞の脱分極を誘導し、シナプス小胞の放出刺激を試みた。レーザー光強度が 180 mW では、高濃度 KCl 添加後 80 秒以内において蛍光強度の消滅が観測されたことから、集光スポット内のシナプス小胞が放出されたと考えられる。これに対し、レーザー光強度が高い場合(370 mW)では、同時間経過後においても蛍光強度の消滅がみられなかった。このことから、光捕捉力の強い高レーザー光強度条件においてのみ、光ピンセットによる細胞内操作がシナプス小胞の放出を抑制できることを示した。

## 4) 神経細胞ネットワークの時空間ダイナミクスの解明のための基盤技術開発

光ピンセットにより単一シナプス動態を操作し、分子動態から細胞ネットワークに至る時空間ダイナミクスを明らかにするため、神経細胞ネットワーク内の特定の細胞を操作する基盤技術を開発した。

集光フェムト秒レーザーを用いて、二次元多点電極皿上で培養した神経回路網を、電極を損傷することなく局所領域を分断することに成功した(図 3a)。フェムト秒レーザーを神経細胞に照射すると、集光点において多光子吸収に基づく数  $\mu\text{m}$  程度のバブル発生が確認され、軸索が切断された。フェムト秒レーザーは焦点以外での光吸収がなく、深部到達性が高い特徴から比較的厚みのある細胞集合体の局所切断が可能となる。さらに、神経回路網の分断に伴い、分断したそれぞれのエリアで独立した活動リズムが発現し、分断した神経回路網が機能再生することを見出した

(図 3b)。本手法は、神経回路網の局所領域の再生機能を定量評価できることから、神経再生を促進する新規化合物のスクリーニング技術への応用が期待される。

また、空間的に制御された神経回路網における細胞間の機能的結合特性を評価することを目的として、細胞外電位計測皿上への神経細胞のパターニングに成功した。高強度フェムト秒レーザーをシリコンゴムに集光してラインスキャンすることにより線状にくり抜かれたマスクパターンを製作し、8×8個の電極アレイ上に配置し、その上からラット胎児脳より調整した海馬神経細胞を全体に播種した。培養日数の経過とともに、ライン状の流路内において神経細胞が個々に軸索や突起を伸ばし、ネットワークを形成している様子が観測された。また、神経回路網の自発的活動電位測定により流路内に沿って神経細胞ネットワークを形成していることが示された。本手法により、空間的に制御された神経回路網の機能的結合特性を評価することが可能となる。

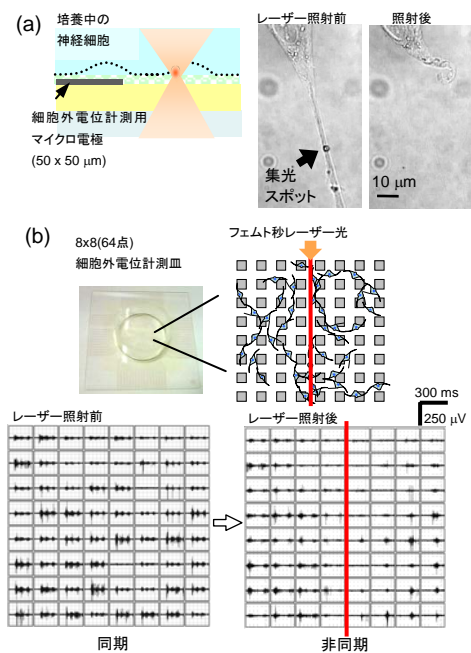


図 3 (a) 単一神経細胞の集光フェムト秒レーザー切断。神経突起の一部を選択的に切断した。(b) 神経細胞ネットワークのレーザー切断による自発的活動電位変化。レーザー照射後、細胞が切断され、右側左側における活動リズムの同期性が失われた。

### 3. 今後の展開

神経シナプス伝達効率を非接触、ラベルフリーに制御することが可能な技術として本手法を発展させることにより、従来の遺伝子操作を補完する脳機能操作や、脳疾患治療の標的分子に注目した細胞レベルでの光治療研究への展開を目指している。

### 4. 自己評価

本研究では、神経シナプスの局所領域に集光レーザービームの光捕捉・集合を誘起することにより、単一シナプス動態を制御し、分子動態から細胞ネットワークに至る時空間ダイナミクスを解明することを目標として研究を推進した。その結果、神経細胞のシナプス領域に近赤外レーザー光を照射すると、光放射圧により神経細胞内シナプス小胞群が捕捉され、集合することを初めて見出すことができた。また、神経細胞内シナプス小胞群の運動が光捕捉力の増大にともなって束縛されることを明らかにした。以上のことから、本研究の主要課題である、光ピンセットを用いた神経細胞内単一シナプスの操作を実証することができた。一方、光ピンセットによる操作が神経細胞ネットワークのシナプス伝達制御を可能とするかという課題に関しては、研究期間内において実験系の改良に時間を有したため、今後も引き続き明らかにしていく必要がある。また、実験結果をもとにした神経回路網の情報処理モデルの構築も検討課題である。今後、本手法を基盤技術として確立し、神経システムの動作原理の解明に迫ることを目標としている。

本研究期間中において総括やアドバイザー、さらには領域研究者と議論することにより、本研究課題を改善しつつ進めることができました。また、ライフプランに伴う研究期間延長の際にも的確なアドバイスを賜りました。ここに御礼申し上げます。

### 5. 研究総括の見解

単一シナプスの動態の制御機構解明の実験系を開発し、技術基盤の確立の目途が出来てきたと評価している。神経ネットワークの分子動態のダイナミクスを解析するとともに、この技術を広める上での生物学的な検証も進めることを期待したい。



## 6. 主要な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1.	S. N. Kudoh, C. Hosokawa, A. Kiyohara, T. Taguchi, and I. Hayashi, "Biomodeling System - Interaction between Living Neuronal Network and Outer World", Journal of Robotics and Mechatronics, Vol. 19, No. 5, pp. 592-600 (2007).
2.	C. Hosokawa, S. N. Kudoh, A. Kiyohara, Y. Hosokawa, K. Okano, H. Masuhara, T. Taguchi, "Laser Micro-Patterning of Neuronal Network on Multi-Electrode Arrays", Proceedings of Multi-Electrode Array (MEA) meeting, pp. 300-301 (2008).
3.	C. Hosokawa, S. N. Kudoh, A. Kiyohara, and T. Taguchi, "Resynchronization in Neuronal Network Divided by Femtosecond Laser Processing", NeuroReport, vol. 19, pp. 771-775 (2008).
4.	C. Hosokawa, S. N. Kudoh, A. Kiyohara, Y. Hosokawa, K. Okano, H. Masuhara, and T. Taguchi, "Femtosecond Laser Modulation of Living Neuronal Network", Applied Physics A, vol. 93, pp. 57-63 (2008).
5.	C. Hosokawa, S. N. Kudoh, M. Suzuki, A. Kiyohara, Y. Hosokawa, K. Okano, H. Masuhara, and T. Taguchi, "Micro-channel Fabrication by Femtosecond Laser to Arrange Neuronal Cells on Multi-Electrode Arrays", Applied Physics A, vol. 101, pp.57-63 (2010).
6.	C. Hosokawa, S. N. Kudoh, A. Kiyohara, and T. Taguchi, "Optical Trapping of Synaptic Vesicles in Neurons", Applied Physics Letters (accepted).

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

発 明 者: 細川 千絵、工藤 卓、田口 隆久

発明の名称: 神経回路再生機能の解析装置、解析方法およびスクリーニング方法

出 願 人: 独立行政法人産業技術総合研究所

出 願 日: 2007/11/19

### (3) その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. "光圧による液中ナノ粒子の捕捉・集合ダイナミクス"、細川千絵、吉川裕之、増原宏、光アライアンス, Vol. 18, No. 7, pp. 19-24, 日本工業出版 (2007).
2. "Focused Femtosecond Laser Processing of Cultured Neuronal Network", C. Hosokawa, A. Kiyohara, S. N. Kudoh, and T. Taguchi, The 9th International Conference on Laser Ablation (COLA 2007), 24-28 September, Tenerife, Spain (2007).
3. "Regeneration of Neuronal Network Divided by Femtosecond Laser Processing", C. Hosokawa, A. Kiyohara, S. N. Kudoh, and T. Taguchi, The 37th annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), 3-7 November, San Diego, California, USA.
4. 「光ピンセットを用いた神経細胞内単一シナプスの操作」、細川千絵、工藤卓、清原藍、田口隆久、第 23 回生体・生理工学シンポジウム、名古屋大学、愛知県、2008 年 9 月 28 日
5. 「レーザー光を活用した神経回路網の操作技術」、細川千絵、第 10 回次世代医療システム産業化フォーラム 2008、神戸市商工会議所、兵庫県、2009 年 1 月 27 日
6. 「光ピンセットを用いた培養神経細胞シナプス操作過程の蛍光解析」、細川千絵、大西映里子、工藤卓、田口隆久、第 33 回日本神経科学大会合同大会(Neuro2010)、神戸コンベンションセンター、兵庫県、2010 年 9 月 3 日

# 研 究 報 告 書

## 「胸腺依存的な免疫寛容を制御する基盤技術の開発」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：秋山 泰身

### 1. 研究のねらい

難治性自己免疫疾患やアレルギー疾患は、自己の組織あるいは個体に有害でない外来抗原に対して免疫系が過剰に反応した状態である。これらの免疫系疾患は日本社会で急速に増加しつつあり、放置できない重要な問題となっている。健康な個体の免疫系において、自己の組織や有害でない非自己に対する過剰な応答を抑制し、恒常性を維持する機構が免疫寛容である。

健康な個体は複数の免疫寛容機構を有している。その一つが T リンパ球を産生する器官である胸腺における免疫寛容である。胸腺での免疫寛容機構はさらに 2 つに分類される。一つはアポトーシスによる自己反応性 T 細胞クローンの除去であり、もう一つは免疫応答を抑制する制御性 T 細胞の産生である。これらの免疫寛容の誘導において、胸腺ストローマ細胞の一部である髄質上皮細胞が重要であると考えられている。胸腺髄質上皮細胞は、本来は末梢組織にのみ発現する様々な自己由来タンパク質（以下、組織特異的抗原と略）を、ごく微量であるが異所的に発現するというユニークな特色を持つ。さらにヒト自己免疫疾患の原因遺伝子産物として同定された Autoimmune regulator (Aire) はこれら組織特異的抗原の異所的発現を制御することが判明している。胸腺はこの異所的な発現により、末梢組織の自己タンパク質に反応する T リンパ球の除去や、自己抗原を認識し免疫応答を抑制する制御性 T 細胞の産生を行っていると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは不明である。

本研究課題は、胸腺髄質上皮細胞の分化、組織特異的抗原の発現、自己免疫寛容機構を分子レベルで解明し、さらに得られた知見を利用して、免疫寛容機構を制御する技術の開発を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 胸腺髄質上皮細胞の分化を制御するサイトカインレセプターの同定

胸腺髄質上皮細胞の分化を制御する因子として転写因子 NF- $\kappa$ B やその活性化を誘導するシグナル伝達因子 TRAF6 などが知られていたが、それらをシグナル伝達因子や転写因子を活性化するサイトカインが不明であった。これらの因子が TNF レセプターファミリーにより活性化することに着目し、その関与を探索した。その結果、

(A) TNF レセプターファミリーである Receptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK) と CD40 の2つのシグナルが欠損するマウスでは成熟した胸腺髄質上皮細胞がほぼ完全に欠損していた。

(B) さらに、RANK と CD40 からのシグナルが欠損するマウスでは自己臓器に反応するリンパ球が産生していた。

(C) また RANK リガンドと CD40 リガンドの組み換えタンパク質は、胎仔胸腺ストローマにおいて成熟した胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導した。

以上の事実から、TNF レセプターファミリーである Receptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK) と CD40 の2つのシグナルが協調して働くことで胸腺髄質上皮細胞分化増殖させ、自己免疫寛容を誘導していると結論した。

#### (2) 胸腺髄質上皮細胞の遺伝子発現を制御する転写因子候補の探索

胸腺髄質上皮細胞で他の細胞にない特徴は、組織特異的抗原の異所的な発現である。この発現には核タンパク質である Aire が関与することが知られている。しかしながら、Aire 欠損マウスでは、一部の組織特異的抗原の発現しか不全にならないこと、さらに Aire による発現制御機構が未だ不明なことから、他の転写制御機構の関与が示唆される。

そこで(1)で得られた知見を基に RANK シグナルで活性化される転写因子候補の同定を目指し、以下の知見を得た。

- (A) 胎仔胸腺ストローマに組み換え RANK リガンドタンパク質を処理した際に誘導される mRNA をマイクロアレイ法で解析した。ついで誘導される遺伝子のプロモーター領域について *in silico* 解析を行い、誘導遺伝子の発現を制御している転写因子候補として STAT1 を得た。
- (B) RANK リガンドを処理した胎仔胸腺ストローマでは STAT1 のリン酸化が亢進しており、STAT1 の転写活性化が誘導されていた。
- (C) RANK リガンドを処理した胎仔胸腺ストローマでは、STAT1 結合配列をプロモーター領域に持つインターフェロン誘導遺伝子が多量発現していた。

以上の事実から、RANK シグナルは胸腺髄質上皮細胞において、STAT1 の活性化を介してインターフェロン誘導遺伝子の発現を制御していると予想される。

### 3. 今後の展開

本研究によって、髄質上皮細胞の分化や増殖を誘導させる因子、および機能を制御する転写因子候補が同定された。この結果は、自己免疫疾患発症のメカニズム解明につながる可能性がある。また胸腺髄質上皮細胞の機能を誘導する分子メカニズムをさらに詳細に解明し利用することで、自己免疫疾患の原因解明やアレルギー・癌などの治療方法の開発へと展開する可能性がある。

### 4. 自己評価

本研究課題は、(1)胸腺髄質上皮細胞の分化および機能発現の分子メカニズム解明 および (2) 免疫寛容を人為的に制御する基盤技術の開発 の2つをテーマとして研究を行った。(1) に関しては胸腺髄質上皮細胞の分化を制御するサイトカインの発見、および分化や機能を制御する転写因子候補の探索により、多くの有用な知見が得られた。(2)に関しては現在検証中であるものの、将来的にさらに発展させる上で、重要な知見が得られた。

### 5. 研究総括の見解

胸腺髄質上皮細胞の分化誘導と機能発現のプロセスを、複数の遺伝子操作マウスを利用し、システムとしての細胞内情報系を明らかにしたこと、また、免疫寛容の誘導機能解明に向けた基盤形成に貢献したことは高く評価出来る。細胞生物学的な研究も進展することを期待している。

### 6. 主要な研究成果リスト

#### (1)論文(原著論文)発表

1. <u>Akiyama T*</u> Shimo Y, Yanai H, Qin J, Ohsima, D, Maruyama Y, Asaumi Y, Kitazawa J, Takayanagi H, Penninger JM, Matsumoto M, Nitta T, Takahama Y, & Inoue J. “The Tumor necrosis family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance” <i>Immunity</i> , 29, 423-437 (2008).
2. Hikosaka Y, Nitta T, Ohigashi I, Yano K, Ishimaru N, Hayashi Y, Matsumoto M, Matsuo K, Penninger JM, Takayanagi H, Yokota Y, Yamada H, Yosikai Y, Inoue J, <u>Akiyama T</u> , & Takahama Y. “The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator” <i>Immunity</i> , 29, 438-450 (2008).
3. Shimo Y., Yanai H., Ohshima D., Qin J., Motegi H., Maruyama Y., Hori S., Inoue J., and <u>Akiyama T*</u> . “TRAF6 directs commitment to regulatory T cells in thymocytes” <i>Genes Cells</i> , in press
4. Mouri Y., Yano M., Shinzawa M., Shimo Y., Hirota H., Nishikawa Y., Nii T., Kiyonari H., Abe T., Uehara H., Izumi K., Tamada K., Chen L., Penninger JM., Inoue J., <u>Akiyama T*</u> , and Matsumoto M., “Lymphotoxin Signal Promotes Thymic Organogenesis by Eliciting RANK Expression in the Embryonic Thymic Stroma” <i>J. Immunol.</i> , in press

#### (2)特許出願

出願1件 予定(H23.3) (非公開)

#### (3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

第 29 回日本炎症・再生医学会 2008 年 東京 (招待講演)

第 27 回日本骨代謝学会 2009 年 大阪 (招待講演)



第 32 回日本分子生物学会 2009 年、横浜（招待講演）

第 33 回日本分子生物学会年会／第 83 回日本生化学会大会 2010 年、神戸（招待講演）

# 研 究 報 告 書

## 「環境適応に関わる時空間パターン形成現象の分子ネットワーク」

研究期間：2007年10月～2011年3月

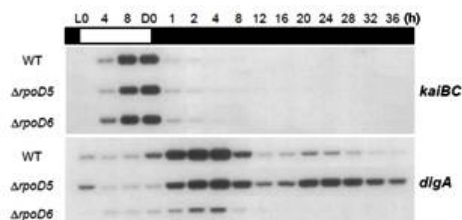
研究者：岩崎 秀雄

### 1. 研究のねらい

生物は外環境の情報を刻一刻と感知し、場合によっては予測しながら環境に応じて自己の内部環境を調節し、ときに自らの姿さえ変えながら生き延びています。この研究では、こうした生物の在りように着目し、シンプルさと多様性を備えたシアノバクテリアを用いて、主に①一細胞レベルで起こる時間的プログラム、②一個体の内部の細胞間相互作用を含む細胞分化・パターン形成プログラムとその外環境との関わりについて調べました。

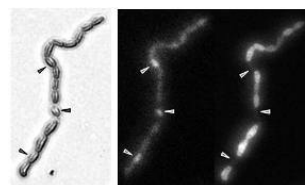
### 2. 研究成果

**【時計遺伝子の転写翻訳フィードバックを欠く条件での概日転写リズムの発見】**私たちは、従来概日振動の普遍的な振動発生原理と想定されていた時計遺伝子(概日リズムを生じる原因となっている遺伝子群)の転写翻訳フィードバックを欠く条件でも、単細胞性のシアノバクテリア *Synechococcus* の時計蛋白質 KaiC のリン酸化振動は正常に持続することから、酵素反応的蛋白質間相互作用に基づく振動発生様式を見出しています。そこで、時計蛋白質 KaiABC 複合体による概日時計が外界の明暗サイクルに応じてゲノムワイドな転写をどのように調節するのかを調べました。その結果、暗期中では時計遺伝子を含む殆どの遺伝子の発現が停止し、夜明けまでに8割以上の mRNA が消失して一見休眠状態になること、それにもかかわらず KaiC リン酸化リズムは持続し、一部の遺伝子発現に時計の影響が及んでいること、その制御にシグマ因子が重要な役割を果たしていること、場合によっては顕著な概日転写リズムが起こることなどを明らかにしました(右図)。これは、「時計遺伝子の転写を欠く条件でも概日時計が転写リズムを駆動できる」という初めての報告です。



なお、私たちが見出した「転写翻訳フィードバックを含まない翻訳後修飾レベルの概日リズム」は、しばらくシアノバクテリア固有の現象と看做されがちでしたが、2011年に入って微細藻類やヒト赤血球の中でも見られる普遍的な現象であることが見出され、真核生物の概日制御の研究にも重要な影響と示唆を与えることが出来ました

**【バクテリアの細胞分化パターニングの解析】**多細胞性シアノバクテリアの *Anabaena* が窒素欠乏条件下で約10細胞に1つの割合で窒素固定に特化する細胞(ヘテロシスト)を分化する空間パターン形成に着目し、一個体レベルで形態変化や分化制御遺伝子、光合成活性をリアルタイムモニターする観測系を構築し、世界で初めてバクテリアの細胞系譜を作成しました。これにより、分化細胞の位置が初期値に依存することなく細胞間相互作用を介して動的に決定されていく過程を明らかにしました。さらに、従来の常識を覆し、細胞分裂を阻害剤で停止させた状態でも細胞分化が起こることや、その状態ではヘテロシスト間の栄養細胞数は激減するものの物理的な距離はそれほど変化しないことを見出しました(右図)。また、多細胞シアノバクテリアにおいても概日リズムの基礎的な性質を調べる系を立ち上げ、基本的な概日リズム特性が保存されていることを確認し、細胞間同調を解析するための一細胞顕微操作系(マイクロデバイス技術を援用)の開発を行いました。

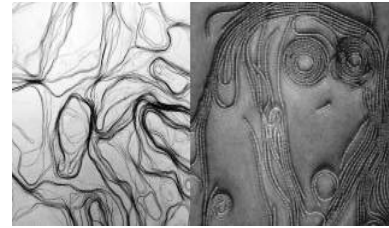


細胞分裂阻害下でのヘテロシスト形成:左から明視野、分化遺伝子 *hetR* の発現 (GFP 蛍光)、光合成活性 (フィコビリジン蛍光)



### 【運動性シアノバクテリアのコロニーパターン形成】

動性の多細胞シアノバクテリアの個体群が見せる動的で複雑なコロニーパターン(次図)に着目し、タイムラプス撮影や流体力学的な解析手段を用いてその動的なパターン形成過程を観察し、環境・栄養依存性や細胞間協調作用などについても解析しました。その結果、特に



*Geitlerinama* と呼ばれるバクテリアで見出したリング状のコロニーパターン形成と非常に安定な運動軌道構造安定化には、個体レベルの振動運動、粘液を介した協調的並進運動、出来るだけ交差を避ける性質などが関与するとの仮説を導きました。

### 3. 今後の展開

このさきがけ研究では、細胞内で時間情報を生成する概日リズム、細胞間連絡を用いて個体内で空間的な分化パターンニングを起こすヘテロシスト分化、そして個体間相互作用を介する高次の集団行動としてのコロニーパターン形成という、それぞれに特徴のある時空間パターン形成現象を扱いました。今後は、一見異なる現象に見えるこれらのパターン形成現象を貫く物理学的・数理的性質を炙り出していくことが重要であると考えています。また、生物学的に重要なことは、これらの空間パターン形成は、いずれも環境適応型であるはずだ、という点に特徴があります。自然条件下あるいは生態学的特性を踏まえ、こうしたパターン形成の生理学的・生態学的意義を含めて記述する「生命システムの原理の解明」をさらに求めていきたいと考えています。そのために着目しているのは、これらのパターン形成は、いずれも特定の刺激やパラメータ(生理的には環境条件など)に応じてその振る舞いが変わる一種の相転移現象を見せる、ということです。相転移の近傍において、それぞれの系でどのような変化が起こっているのかを、分子レベルにせよマクロレベルにせよ定量的に観測、記載することで、別個に見える現象を、共通した視座に基づいて類型化することを目指したいと思っています。

### 4. 自己評価

当初の目標は、概日転写リズムを生じる機構と細胞分化パターンダイナミクスの解析でした。前者については、概日転写リズムを生じる条件について当初想定していなかった「転写翻訳フィードバックを欠く条件での転写リズム」の発見や、シグマ因子の関与などが明らかになり、出力系についてはかなり理解が進むとともに新たな課題が浮かび上がってきたと考えています。細胞分化パターンについても、計画通り細胞系譜解析を行い、細胞分裂と分化に関わる新たな知見や分化促進因子の遺伝子発現パターンについて知られていなかった知見を得ることが出来ました。その間、マイクロデバイス工学を援用した観測系の開発など、技術開発も試み、それによって細胞系譜解析が効率化しました。しかし、一方で当初目標としていたバクテリアの一細胞レベルの顕微操作技術の開発は想定以上に困難であることがわかり、期間中の完成は叶いませんでした。しかしながら、その過程で得られた経験的知見は多く、デバイスが完成した際に得られる研究の幅の広がりには明らかなため、反省を踏まえつつさらにシステム開発に尽力していきたいと思っています。また、当初は想定していなかったプロジェクトとして、コロニーパターン形成に関わるダイナミクスの解析も始めています。これは、さきがけ研究を通じて、「システムを理解すること」には階層性はある意味で障害にならず、むしろ階層性を超えて様々な生命現象を見渡せる視座を学んだことから来ています。そして、それが可能なのは出来るだけシンプルな体制をもつバクテリアならではあること、さらに生態環境における複雑な生命の営みに迫る上で、より高次の集団パターンの振る舞いの理解は概日リズムや細胞分化の研究にもフィードバックしうると考えたためでもあります。単に発散するのではなく、「より面白く深い研究」を目指して、テーマをある程度絞りながら研究を続けて行きたいと思っています。



## 5. 研究総括の見解

環境により影響を受ける概日リズムを独創的な視点でシアノバクテリアを観察することで、今まで知られていない現象を次々に見出している点を高く評価している。興味深い現象も見出しているが、少しテーマが分散している印象も受けるので、焦点を絞ることを考える必要がある。

## 6. 主要な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. H. Asai, S. Iwamori, K. Kawai, S. Ehira, J. Ishihara, K. Aihara, S. Shoji, H. Iwasaki (2009) "Cyanobacterial cell lineage analysis of the spatiotemporal <i>hetR</i> expression profile during heterocyst pattern formation in <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120" <i>PLoS ONE</i> , 4(10): e7371
2. H. Ito, M. Mutsuda, Y. Murayama, J. Tomita, N. Hosokawa, K. Terauchi, C. Sugita, M. Sugita, T. Kondo, H. Iwasaki (2009) "Cyanobacterial daily life with Kai-based circadian and diurnal genome-wide transcriptional control in <i>Synechococcus elongatus</i> " <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 106:14168-14173
3. H. Tozaki, T. Kobe, K. Aihara, H. Iwasaki (2008) "An attempt to reveal a role of a transcription/translation feedback loop in the cyanobacterial KaiC protein-based circadian system by using a semi-synthetic method" <i>Int. J. Bioinform. Res. Appl.</i> , 4: 435-444
4. S.R. Mackey, JS. Cho, Y. Kitayama, H. Iwasaki, G. Dong, S.S. Golden (2008) "Proteins found in a CikA-interaction assay link the circadian clock, metabolism, and cell division in <i>Synechococcus elongatus</i> " <i>J. Bacteriol.</i> , 190: 3738-3746
5. A. Seki, M. Hanaoka, Y. Akimoto, S. Masuda, H. Iwasaki, K. Tanaka (2007) "Induction of a group 2 sigma factor, RpoD3, by high light and the underlying mechanism in <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942" <i>J. Biol. Chem.</i> , 282: 36887-36894
6. 岩崎秀雄 「バイオメディア・アート:美学的見地から見た合成生物学の可能性」(2010) 『科学』2010年7月号 747-754 頁(岩波書店)

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

#### Invited Review Articles:

Iwasaki H (2009) "A posttranslational chemical circadian oscillator in cyanobacteria" *Systems Biology: The Challenge of Complexity* (Eds. Nakanishi,S., Kageyama,R., Watanabe,D), Springer

Iwasaki H (2009) "Factors involved in transcriptional output from the Kai-protein-based circadian oscillator" *Bacterial Circadian Programs* (Eds. J. Ditty, S. Mackey, C.H. Johnson), Springer

#### 国際会議での招待講演(主要なもののみ)

H. Iwasaki "From cyanobacteria to synthetic cells: their time, shape and art" *SymbioticA Interanational Symposium on "Unruly Ecology: Biodiversity and Art"* (2010.11.27, Perth, Australia)

H. Iwasaki "Systems Analyses on Cyanobacterial Spatio-Temporal Pattern Formations and Responses to Light-Dark Cycles" *AESF-EMBO Symposium "Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria: Towards Systems Biology Level of Understanding"* (2008.4.3 Sant Feliu, Spain)

H. Iwasaki "Spatio-Temporal Pattern Formation in Cyanobacteria: From Rhythms to Morphogenesis" *American Society for Cell Biology* 年次総会 (2007.12.5 Washingt DC)

#### 受賞

- ・文部科学大臣表彰若手科学者賞(2008)
- ・9th Spiral Independent Creators Festival ハワード・リクター賞(2008)
- ・日本ゲノム微生物学会学術奨励賞(2011)

# 研 究 報 告 書

## 「リズムカルな連続運動の神経基盤の解析」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

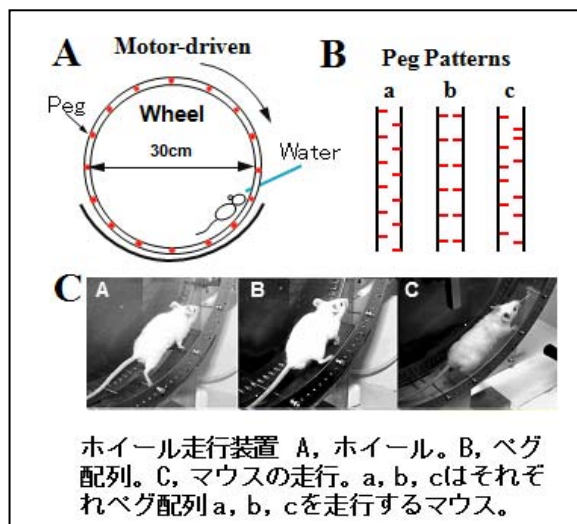
研究者：木津川 尚史

### 1. 研究のねらい

歩行や発話、楽器の演奏など、我々が行う運動の多くは連続運動である。そのような連続運動には、単一運動にはない制御機構があるはずである。実際、熟練した連続運動は見る者にリズムを感じさせる。しかし、運動が「リズムカルである」ということがどのようなことなのか、そしてそれが神経系によってどのように作り出されているのかについては、わかっていないことが多い。そこで、マウスに複雑な連続ステップを行わせるホイール走行装置を開発して、走行するマウスの足の運び(運足)と神経活動を計測し、走行中にリズムがどのように現れるのか、その際の神経活動がどのようにになっているのかを解析することにより、連続運動の制御の鍵を見いだすことを目指した。

### 2. 研究成果

どのようなときに「リズム」が生まれるか解析するために、リズムが自然に生まれるような行動実験装置の開発を行った。具体的には、マウスに複雑な連続ステップを遂行させるホイール走行装置を作製した。このホイール走行装置では、モーターにより一定のスピードで回転するホイール中を、マウスは報酬となる水を摂取しながら一定のスピードで走行する。マウスの足場になるのはホイールに取り付けられているペグで、マウスはペグの配列に従って運足しなければならない。したがって、マウスはペグの到来するタイミングに合わせて四肢を動かして走るように訓練される。訓練されたマウスの走行は、複雑なペグパターンを走行しているときであっても非常にリズムカルに見える。そこで、マウスの足がペグに接触したタイミングを測定するためのタッチセンサをすべてのペグに取り付けて運足タイミングを計測した。その結果、マウスが複雑なペグパターンを記憶していること、ペグの配置は複雑であるにもかかわらず運足が周期的になる部分があること、その部分ではマウスの左右の足の位置関係(位相)が比較的保存されることなどがわかってきた。この周期・位相性はリズムが現れた状態と考えられ、複雑な連続運動の遂行のなかでリズムが産まれていることが確認された。また、走行時に大脳皮質などから計測した神経細胞のなかには、運足が周期的になっているときに活動が亢進する細胞が観察された。このことは、周期性を検知また構築するような神経機構が存在することを示唆している。



### 3. 今後の展開

ホイールを走行するマウスの運動をさらに詳細に解析することにより、連続運動の中に周期性が存在するとどのような利点があるのか明らかになると期待される。例えば、周期性が観察されているときに運動の正確性が上がるなどの可能性が考えられる。

運足パターンの中で一定スピードで走行するチャンクにあたる部分があること、周期的運足はチャンク内で多く見られること、チャンクの切れ目の部分では左右の足の相対的な配置が

大きく変化することなどが明らかになった。このことは、リズムとチャンクが密接に関連している可能性を示している。また、報酬である飲水のリズムと運足のリズムは周期は異なるが位相が相関することが明らかになった。このことは、複数のリズムを統合する機構の存在を示しており、非常に興味深い。

本研究を遂行する中で、連続運動が周期と位相の制御により組み立てられているとの観念を強く持つに至った。ヒトを含む動物の体の動きは構造上の制限からどうしても反復運動になる。たいていの運動では体の複数の部位で異なる反復運動をすることになる。それらの反復運動が、お互いの周期と位相を束ねあうことにより調和している可能性がある。本研究においては、マウスの運足と飲水という一見独立している2つの反復運動が、周期・位相により関連づけられていたという知見がこれを示唆している。また、運動失行の病態の多くがコーディネーションがうまくいかないことにより引き起こされていることが知られている。周期・位相の形成に関与する脳内機構を明らかにすることは、運動のコーディネーションを作り上げる機構を明らかにすることに繋がると考えられる。

#### 4. 自己評価

連続運動を解析する行動実験系「ホイール走行装置」の作製により、連続運動の解析、「リズム」の解析が可能にできたこと、その結果、連続運動の周期・位相構造の存在を明らかにできたことは、予想以上の成果であったと考えている。一方、その神経基盤の解析は着実に進行させてはきたものの、まだ中途段階にある。この理由としては、運動の周期・位相構造が明らかになったのは研究期間の半ば以降であり、これを解析するための行動実験パラダイムを組むことができてからまだ日が浅いことがあげられる。現在、神経活動の記録を精力的に行っており、早期にこの神経基盤を明らかにできることを期待している。

#### 5. 研究総括の見解

ユニークな発想から独自の解析装置を開発して、位相性、周期性のリズムに反応する神経細胞を同定しつつあり、大変興味ある成果をあげつつある。今後、モデルの構築とその検証がなされることを期待する。

#### 6. 主要な研究成果リスト

##### (1)論文(原著論文)発表

現在、投稿中。

##### (2)特許出願

なし。

##### (3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

・永田雅俊、野村真樹、青柳富誌生、山森哲雄、Graybiel Ann M.、木津川尚史  
「マウスを用いた複雑な連続ステップ走行における運足の解析」 Step timing analysis of mice performing complex stepping in a running wheel 第32回日本神経科学大会、名古屋(2009年9月18日)

・M. Nagata, M. Nomura, T. Aoyagi, T. Yamamori, Y. Kubota, A. M. Graybiel, T. Kitsukawa  
“Sequential timing control of complex stepping in mice” 39<sup>th</sup> Society for Neuroscience Annual Meeting, 米国、シカゴ(2009年10月17日)

# 研 究 報 告 書

## 「脳内を縦横に結ぶ意思決定リンク」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：小村 豊

### 1. 研究のねらい

意思決定とは、複数の選択肢から、ある一つのもを決定する高次脳機能である。いわゆる反射とは対照的に、同一の感覚入力に対しても、臨機応変に解釈し、その解釈に基づいて、行動が変化しうることが、最大の特徴である。本研究では、霊長類の動物モデルを用いて、意思決定の神経機構を明らかにしたい。

### 2. 研究成果

#### (1)意思決定の霊長類モデル作成

複合的な視覚刺激を用いて、複数の解釈が可能な行動パラダイムを開発した。実際に、複数のサルに、本課題を習得させることに成功し、同一の視覚入力に対して、異なる情報の読み出しを行っていることを行動学的に担保できる実験系を確立できた。

#### (2)意思決定の脳内表現の同定

視床枕は、ほとんどすべての大脳皮質と解剖学的結合があるにも関わらず、その機能的意義については、ほとんど不明であった。本研究の結果、視床枕ニューロンの視覚応答の多くは、視覚特徴が統合された後の知覚の曖昧さに感受性を示した。この性質は、従来、多くの視覚皮質で認められた、個々の視覚特徴(ある特定の色や動きなど)に選択性を示す情報処理とは、次元の異なる新規の脳内表現である。

### 3. 今後の展開

私たちの心は、脳から生まれる。しかし、脳から、どのようにして心が生まれるのかについて、分かっていることは、非常に限られている。本来、目にみえないはずの心の世界を、ニューロンレベル、神経回路レベル、行動レベルの現象を繋ぎ合わせ、背景にある原理を見出すことで、目に見える形としてとらえていきたい。

### 4. 自己評価

我々は、日常生活において、度々、複数の選択肢から、ある一つのもを決定しなければならない。その過程において、私たちの心のなかには、「迷い」が生じる。本研究は、動物が意思決定課題を遂行しているときの、個々のニューロン活動を記録するという実験手法と、ニューロン活動のゆらぎが、動物行動の何を説明しているのかという視点にたった解析法を組み合わせて、意思決定の本質である「迷い」の神経基盤を抽出することに成功した。

### 5. 研究総括の見解

実験モデル(ニホンザル)の訓練を含めて時間のかかる地道な研究を行い、視床枕に、知覚情報に対する「確信度」という機能があることを明らかにした点は大きな成果であり、高く評価する。今後、行動学的な解析系を駆使して、主観と知覚をマッチングさせる仕組みの理解が深まることを期待したい。

### 6. 主要な研究成果リスト

#### (1)論文(原著論文)発表

現在、投稿中

--

(2)特許出願  
なし。

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

- ・“Internal monitoring of perceptual uncertainty in primate visual pathway”, 第 88 回日本生理学大会 (2011.3)
- ・“Cross-modal cueing provides a priming influence on a decision process”, International Workshop on multimodal perception (2010.4)
- ・“The pulvinar codes perceptual salience of one object in the competitive scene”, 38<sup>th</sup> Society for Neuroscience Meeting (2008.11)
- ・“Attention recruits the thalamic activities for perceptual organization”, International Workshop on Neural Control of Attention, Perception and Learning (2008.1)

受賞

- ・文部科学大臣表彰 若手科学者賞 「初期知覚系による情報の選択・統合の研究」(2009.4)



# 研 究 報 告 書

## 「小脳長期抑制を発現・維持する分子機構の時間的・空間的制御」

研究期間：平成20年1月～平成23年3月

研究者：田中 敬子

### 1. 研究のねらい

神経細胞間の連絡をつかさどるシナプスにおいて、特定の刺激が与えられた後に神経伝達効率が長期（数時間～数日）にわたって増強（long-term potentiation, LTP）、あるいは抑制（long-term depression, LTD）される現象が見られ、シナプス可塑性と呼ばれている。このシナプス長期可塑性は、脳の様々なシナプスにおいて見られ、記憶や学習との関連が報告されている。したがって、シナプス可塑性の分子機構を解明することは、これに関連した脳機能の分子レベルでの機構解明に重要である。

小脳LTDは、プルキンエ細胞に入力している2種類の興奮性神経線維（平行線維（PF）と登上線維（CF））が、数分間、同調して繰り返し刺激された後、PFシナプスにおいて生じる現象であり、小脳の運動学習を成立させる上で重要な役割を果たしていると考えられている。この小脳LTDとは、シナプス刺激後に、シナプス後膜のAMPA型グルタミン酸受容体が細胞内に取り込まれ、その結果、神経伝達効率が減少するもので、プロテインキナーゼC（PKC）による受容体のリン酸化に依存する。この分子機構として、PKC以外にも様々なシグナル分子の関与が報告されている。中でも、多くのシナプス可塑性と同様、細胞内カルシウム（ $Ca^{2+}$ ）の重要性は疑う余地がない。しかし、 $Ca^{2+}$ 濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）上昇は数分間のLTD誘導刺激中のみに限定されるのに対し、LTDはその後数十分かけて徐々に誘発され、さらに数時間維持される。このような、短時間の刺激によって引き起こされる一過性のシグナル活性化から、LTPやLTDといった長期的なシナプス調節が起こることは、ほとんどの長期的シナプス可塑性に共通した重要な特徴であるが、なぜこのような時間変換がなされるのか不明である。

一般に神経細胞は形態的に特殊化した巨大な細胞であることから、一つの神経細胞であってもその中で区画化（compartmentalization）されており、細胞内シグナルは空間的に制御されていると考えられている。小脳LTDは刺激を受けたシナプスとその周辺にのみ限定されているが、一方で、広範囲な細胞内シグナル、たとえば、シナプスと核を結ぶシグナルも必要とされると考えられている。このようなLTDの空間的特徴は、学習における特異性を考える上で重要である。しかしながら、LTDの分子機構に関する空間的な情報は乏しいのが現状である。

本研究課題のねらいは、小脳LTDに、どのような分子が関わっているか、という静的な問いではなく、短時間の誘発刺激後、どのような分子がどのように働くことによって長期的、かつ特異的なLTDという現象が引き起こされるのか、という動的な疑問に答えることにより、小脳LTDの脳機能への役割を考える上で重要な時間的・空間的特性のカギを解いていこうというものである。

### 2. 研究成果

上述のように、LTDを引き起こすために一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が必ず必要なシグナルであることは、多くの研究により示され、また、この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こす様々な機構についても明らかになっている。従って、一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降にどのような機構がどのように働くかを知ることが重要となる。本研究課題に取り組む前に我々は、以下に述べる研究により、PKC、MAPキナーゼ（MAPK）、ホスホリパーゼA2（PLA2）を含むポジティブフィードバック機構が、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降に働く重要な機構である可能性を示してきた。

- $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降に働く機構の特性に関して、我々は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とLTDとの関係を調べることにより、正の協同作用を生み出すことのできるもの、かつ、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の時間成分を蓄積するLeaky integratorの性質を持つことを示した。

- 以前に、上述のポジティブフィードバック機構が、LTDを維持するために働くという理論モデルが提唱されていた。この理論モデルを利用して $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とLTDとの関係を調べたところ、実験結果を見事に再現することに成功した。
  - さらに、ポジティブフィードバック機構を止める処置を行うと、理論モデル、実験、いずれの場合にもLTDの $Ca^{2+}$ に対する感受性が低下することがわかった。
- そこで、本研究課題では、ポジティブフィードバック機構が実際に働くこと、いつ、どのように働くか、さらにはこのポジティブフィードバック機構が働く機構の詳細について調べてきた。

(1) PKC, MAPK を含むポジティブフィードバック機構が小脳 LTD のシグナルとして働く。

ポジティブフィードバック機構が働くということは、PKCとMAPKがお互いに上流でも下流でも働くということになる。このことを示すため、<a> PKCはMAPKの上流で働く、<b> MAPKもPKCの上流で働く(図1A)、という二つを示すための実験を行った。LTDを誘導する刺激を与えた際にプルキンエ細胞内で見られるMAPK活性化は、PKC抑制剤(bisindolylmaleimide I)によって抑えられ(図1B)、また、PKC活性化物質であるホルポールエステル(TPA)投与により引き起こされるLTDは、MAPK経路抑制剤(U0126)により抑えられた(図1C)。これらのことから、

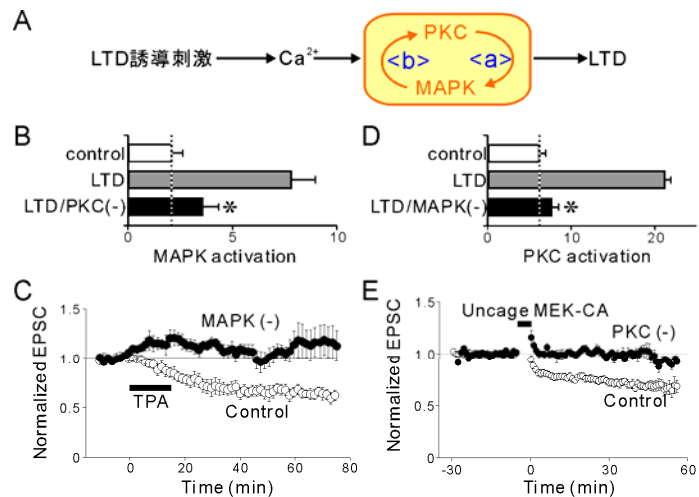


図1. PKCとMAPKの相互活性化はLTDに必要な。A: ポジティブフィードバック機構の簡略図。図中<a>と<b>の経路をそれぞれ結果B, Cと結果D, Eにより明らかにした。B: LTD誘導刺激によって見られるMAPK活性化はPKCを抑制することにより抑えられる。C: TPAによってPKCを直接活性化した際に見られるLTDは、MAPK経路を抑制することにより起こらなくなる。D: LTD誘導刺激によって見られるPKC活性化はMAPK経路を抑制することにより抑えられる。E: ケージ恒常的活性型MEKによってMAPKを直接活性化した際に見られるLTDは、PKCを抑制することにより起こらなくなる。

MAPKはPKCを介して活性化され、このPKCによるMAPK活性化はLTDに必要なということがわかった。つまり、PKCがMAPKの上流で働くという<a>経路を示したことになる。一方、LTD刺激によりプルキンエ細胞で見られるPKC活性化はU0126により抑えられ(図1D)、MAPKを直接活性化した際(下記参照)に引き起こされるLTDはPKC抑制ペプチドにより抑えられた(図1E)。これらの結果により、MAPKもPKCの上流で働くという<b>経路を示すことができた。

このように、LTD誘発におけるPKCとMAPKの相互活性化が明らかになり、したがって、ポジティブフィードバック機構がLTDを引き起こすために働くという結論を得た。

この研究において、TPAを用いることでPKCを直接活性化することは可能であったが、MAPKを直接活性化するためのツールが必要であった。そこで、ケージ恒常的活性型MEK(MEK-CA)蛋白を作製した。MEKはMAPKの上流のリン酸化酵素であり、定常状態の細胞ではMEKのMAPK結合部位を介してMAPKと結合している。MAPK結合部位には、その結合に重要な3つのリジン残基が存在する。細胞にMEKを活性化する刺激が加わると、活性化したMEKは結合しているMAPKをリン酸化し、MAPKは活性化される。MEK-CAとは、MEKのキナーゼ部位に変異を入れたもので、刺激がなくても恒常的に活性化する。このMEK-CAの活性を光照射で調節することを目的とし、精製したMEK-CA蛋白をNVOCという光感受性物質で標識(ケージ)した。NVOCは、塩基性アミノ酸を特異的に標識する物質なので、MAPK結合部位のリジンも標識されるであろう。従って、ケージMEK-CAは、MAPKと結合できないためにMAPKを活性化できないが、光照射後には活性が回復する

のではないかと考えた。そして実際に *in vitro* で、作製したケージ MEK-CA と、これに UV 照射を施したアンケージ MEK-CA との MAPK リン酸化活性を調べたところ(図2A)、アンケージ MEK-CA は約10倍高濃度のケージ MEK-CA と同程度の活性を示した(図2B)。不活性型の MEK(MEK-KD)を使用した場合、ケージを入れたものでもアンケージしたものでも全く活性は見られなかった(図2C)、これは MEK による特異的な MAPK の活性を見たものであり、UV 照射による副次的な活性ではないことも確かめられた。また上述のように、ケージ MEK-CA を投与した細胞では、UV 照射によって LTD が観察されたのに対し、ケージ MEK-KD を投与した細胞では、LTD は引き起こされなかった(図2D)、アンケージ MEK-CA による LTD は MAPK 活性に依存したものであると考えられる。

### (2) ポジティブフィードバック機構は LTD 発現に必要

上述の研究から、ポジティブフィードバック機構が LTD を引き起こす上で働いていることがわかったが、LTD の誘導に必要であるのか、あるいはその後の発現・維持にも働くのか明らかではない。以前提唱された理論モデルでは、誘導後60-90分間の発現・維持において必要であると予測された。そこで、実際にいつポジティブフィードバック機構が働くのか、LTD 誘導後の様々な時間に PKC 抑制剤を投与することにより検討した。

図3Aに誘導直後、10分後、30分後に PKC 抑制剤を加えた場合の結果を示す。刺激終了直後に加えると、LTD はほぼ完全に抑制される。LTD が発現し始めた10分後に PKC 抑制剤を投与した際には、LTD の発現が抑制されるのみではなく、神経伝達効率が元のレベルに回復する傾向が見られた。一方、30分後に加えた場合、コントロールと同様の LTD が観察された。まとめとして、PKC 抑制剤を加えた時間とその際に見られる LTD 量との関係を図3B に示す。これらの結果から、PKC は誘導刺激後20-30分まで必要であることがわかった。このような長期間必要とされる PKC 活性がポジティブフィードバック機構によって維持されていることを確かめるため、ポジティブフィードバック機構に含まれる別の分子、PLA2 の抑制剤を用いて同様の実験を行った。その結果、PLA2 抑制剤も PKC 抑制剤と同様の効果を持つことがわかった(図3C)。すなわち、LTD 誘導刺激後、ポジティブフィードバック機構が働くことによって PKC 活性を20-30分間維持し、これにより LTD が成立すると結論付けることができた。

この LTD 誘導刺激後20-30分という時間は、LTD が徐々に発現する時間である。従って、以上の研究によりポジティブフィードバック機構は LTD の発現相で働くことが明らかになった(図4)。

### (3) Raf キナーゼ抑制蛋白は PKC による MAPK 活性化を仲介する

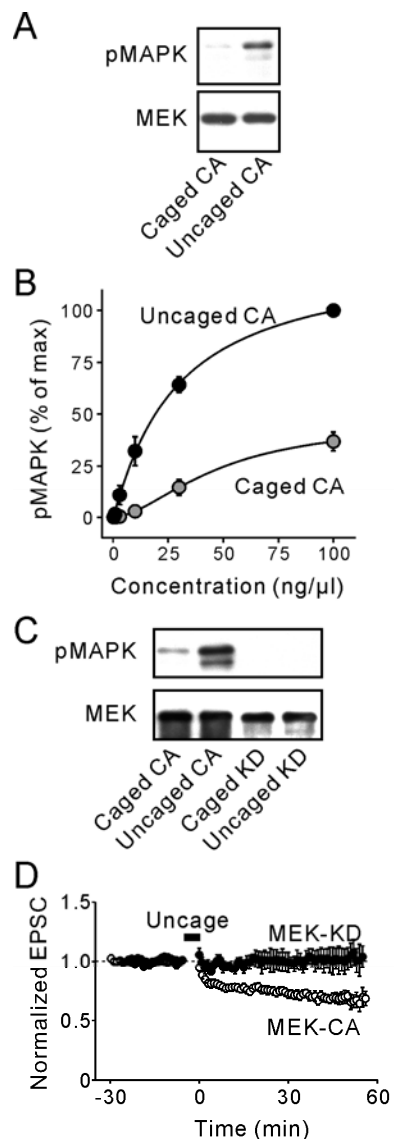


図2. ケージ MEK-CAは UV 照射後に MAPK 活性化を引き起こす。A: MEKによる MAPK リン酸化の *in vitro*での解析。作製したケージ MEK-CAに UVを照射してアンケージすると MAPK を強くリン酸化する。B: MEK-CAによる MAPK リン酸化の容量反応曲線。C: MEK-KD をアンケージしても MAPK リン酸化は見られない。D: ケージ MEK-CA を細胞内に投与したときのアンケージにより LTD が観察される。従って、この LTD は MAPK 活性化によるものである。



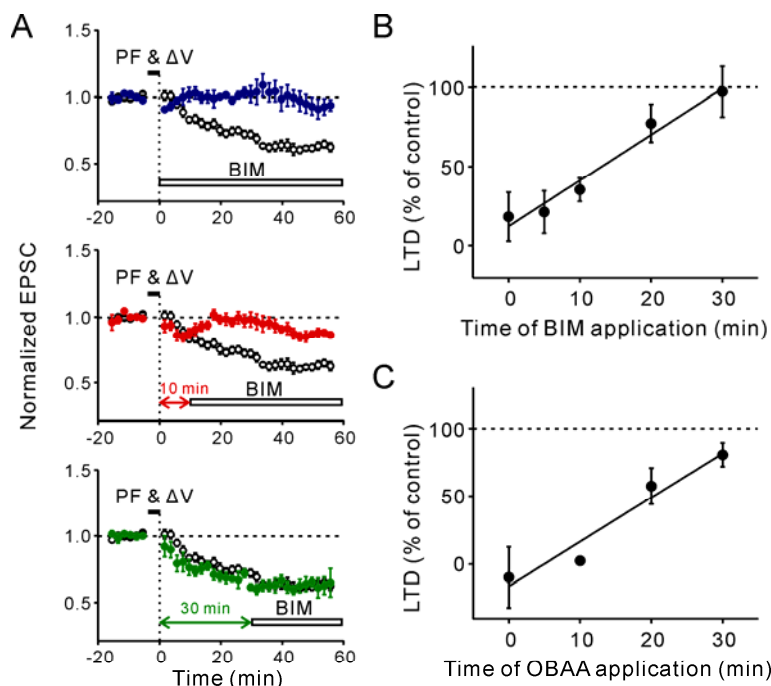


図3. ポジティブフィードバック機構により維持される持続的PKC活性はLTD発現に必要である。A: LTD誘発直後、あるいは10分後にPKC抑制剤を投与するとLTDは抑制されるが、30分後に加えた場合には影響を受けない。B: PKC抑制剤を加えたLTD誘発後の時間と、その際に見られるLTD量との関係。LTD量は、コントロールを100%とした場合の相対値を示す。C: PKC抑制剤の代わりにPLA2抑制剤を用いて、Bと同様の関係をとった図。

直接 PLA2 をリン酸化して活性化すること、活性化した PLA2 が産生するアラキドン酸 (AA) が PKC に結合して活性化させること、が示されている。PKC 依存性に MAPK が活性化されることに関しては、古くから多くの細胞で示されてきているし、我々の研究(1)で示したように、プルキンエ細胞でも LTD 刺激をした際に起こっている。しかしながら、PKC は MAPK、その上流の Raf や MEK を直接活性化することができない。したがって、何らかの分子が PKC 依存性の MAPK 活性化を仲介しているはずであるが、一般的な知見はない。そこで、プルキンエ細胞で LTD を引き起こす際に働くポジティブフィードバック機構の全体像を明らかにするため、PKC と MAPK をつなぐ分子について検討を行った。

そこで着目したのが、Raf キナーゼ抑制蛋白 (RKIP) である。RKIP は、その名の通り、定常状態において Raf と結合して Raf の活性を抑制している蛋白である。この RKIP が PKC によってリン酸化を受けると、Raf から離れて Raf が活性化できる状況になる、ということが培養細胞系で示された。RKIP に着目した理由は、RKIP がプルキンエ細胞に多量に発現しているからである。小脳スライスで RKIP 抗体で染色すると、多くの部分はプルキンエ細胞のマーカーであるカルビンディン抗体のシグナルと一致して、鮮明にプルキンエ細胞が染色される。

まず、RKIP が LTD を引き起こす機構に含まれるかを調べた。RKIP の PKC によるリン酸化を受けない変異体は、PKC 活性に関わらず Raf を抑制することが知られている。そこで、この変異

ポジティブフィードバック機構は、短時間の誘導刺激中に引き起こされる一過性のシグナルから、長期的な LTD という現象を実際に成立させるために必要な時間変換を担うシステムである。このポジティブフィードバック機構に含まれる分子の詳細を図4に示している。これら個々の分子が LTD を引き起こす機構に含まれることは、様々な研究により明らかになっている。また、培養細胞などを用いたシグナル経路の研究により、MAPK が

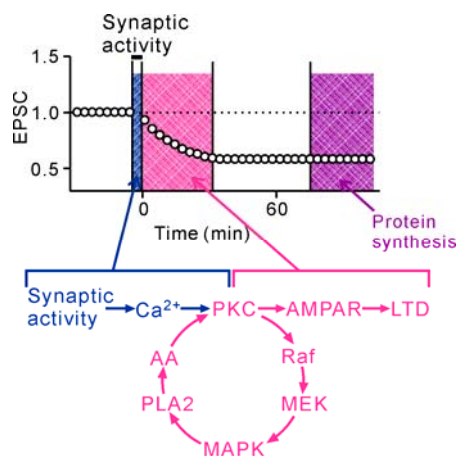


図4. LTDの経過に沿って変化するシグナル経路。LTDを誘導する数分間のシナプス刺激により一過性の $[Ca^{2+}]$ 上昇が引き起こされる。この一過性の $[Ca^{2+}]$ 上昇によりPKC活性が誘導され、ポジティブフィードバック機構が働き始める。したがって、 $[Ca^{2+}]$ がもとのレベルに戻った後も、ポジティブフィードバック機構によりPKC活性化が持続するので、LTDが徐々に発現する。その後何らかの機構により、新たな平衡状態、すなわち維持相が保たれると考えられる。

体(RKIP-TV)蛋白と野生型の RKIP(RKIP-WT)蛋白を in vitro で精製し、プルキンエ細胞に導入後 LTD を観察した。その結果、RKIP-WT を導入した際には、LTD はコントロールと同程度に引き起こされたが、RKIP-TV を導入した際には LTD は抑制された。この結果は、in vitro で精製した蛋白を導入する代わりに、ウィルスベクターを用いてプルキンエ細胞内で発現させた場合にも再現された。したがって、RKIP のリン酸化が LTD に必要であると結論付けられる。免疫沈降実験において、実際に RKIP と Raf との結合が LTD 刺激により減少する結果を得ており、RKIP がリン酸化されて Raf から解離するという経路が LTD を引き起こすために働いていると考えられる。

さらに、本当に RKIP が PKC から MAPK を活性化する経路で働いているかを検討するため、PKC を直接活性化した際に見られる LTD(PKC-LTD)と、MAPK を直接活性化した際に見られる LTD(MAPK-LTD)に対する RKIP-TV の効果を調べた。MAPK-LTD は RKIP-TV 存在下でもコントロールと同様に引き起こされるが、PKC-LTD は抑制された。この結果から RKIP は PKC の下流、かつ MAPK の上流で働くと言いうことができる。したがって、RKIP は PKC 依存性の MAPK 活性化を仲介する、ポジティブフィードバック機構の一員であると結論付けることができる。

### 3. 今後の展開

はじめに述べたように、短時間の刺激によって引き起こされる一過性のシグナル活性化から長期的なシナプス調節が引き起こされることは、長期的シナプス可塑性に共通した重要な特徴である。それにもかかわらず、この時間変換機構についてはほとんどわかっていなかった。我々の研究によりポジティブフィードバック機構という興味深い機構が小脳 LTD において時間変換機構として働くことがわかったが、なぜこのような性質を生み出すことができるのかは不明である。そこで今後、ポジティブフィードバック機構活性の時空間的特性を調べることによりこの疑問を解明していこうと考えている。さらに、このポジティブフィードバック機構は、LTD が徐々に発現する際に働くこともわかった。その後の維持には直接は関わっていないようであるが、発現相が成立してはじめて維持相に入るので、ポジティブフィードバック機構の下流の分子が維持に関与する可能性もある。今後の研究により、どのような機構により、LTD が維持されるのか、検討していく予定である。

### 4. 自己評価

まず、LTD を引き起こすためにポジティブフィードバック機構が働くこと、また、この機構を必要とする時間、に関しては、初めの段階で一部の予備データがあったこともあり、当初の目標通りに検討を進めることができ、実際に早い段階で論文に仕上げることができた。また、RKIP の役割についての検討については、予定していたより時間はかかってしまったが、ほぼ終了し、論文を近い将来に投稿することができるであろう。一方、LTD の空間的情報に関する検討と維持相の機構に関する検討は、準備段階で終了した。しかし、これらの検討は、新しい技術や挑戦的な実験を必要とするものなので、さきがけ研究期間中に準備が整ってきたことは、今後の研究を考える上で大きな成果であると考えている。

### 5. 研究総括の見解

ケージ恒常的活性型 MEK 蛋白の作製システムを構築し、プルキンエ細胞の PKC,MAPK の feed-forward activation に関して、確実に研究を遂行している点を評価する。今後、LTD の新しい生理機能など、LTD に対する新しい知見を積み重ねて新しい研究の展開がなされることを期待する。

### 6. 主要な研究成果リスト

#### (1)論文(原著論文)発表

1. Tanaka, K., Augustine, G. J., "A positive feedback signal transduction loop determines timing of cerebellar long-term depression." *Neuron* 59: 608-620, 2008

(2)特許出願  
なし。

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

学会発表

- ・脳と心のメカニズム 第8回冬のワークショップにて招待講演, “小脳長期抑制の持続相を決定するポジティブフィードバックメカニズム” 2008.1.11
- ・第33回日本神経科学会(神戸市), シンポジウム“小脳回路:発達と可塑性の最前線”にて発表。“Molecular mechanisms regulating temporal aspects of cerebellar long-term depression” 2010. 9. 4

受賞

- ・2008年度日本神経回路学会論文賞 2008.9  
(受賞論文; Tanaka, K., Khiroug, L., Santamaria, F., Doi, T., Ogasawara, H., Ellis-Davies, G., Kawato, M., Augustine, G. J. (2007) Ca<sup>2+</sup> requirements for cerebellar long-term synaptic depression: role for a postsynaptic leaky integrator. Neuron 54; 787-800)

著作物

- ・田中(山本)敬子, 黒田真也 “シナプス可塑性における Raf と Raf キナーゼ抑制蛋白の役割”生体の科学, 61 巻, 5 号, 2010
- ・田中 敬子, George J. Augustine, 「ポジティブフィードバック機構が小脳長期抑圧の時間変換スイッチとして機能する」実験医学 Vol. 27, No. 1, 2009



# 研 究 報 告 書

## 「生体内細胞の周辺環境物性認識システムの解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：原田 伊知郎

### 1. 研究のねらい

体の臓器や組織の機能主体は細胞である。しかし、単に様々な種類の細胞が塊となつて一つの臓器が構成されているわけではない。細胞は細胞外マトリクスと呼ばれる巨大な分子からなる足場に接着し、それによって整頓された形で存在している。コラーゲンも代表的な細胞外マトリクスの一つである。細胞外マトリクスは組織や細胞をつなぐ単なる糊のような存在であると思われていたが、近年、細胞はインテグリンと呼ばれるレセプターを介して様々なマトリクス分子に接着・認識することで本来の機能を発揮していることが明らかにされてきた。加えて、細胞は同一のマトリクスに接着していても、その足場の固さをも認識して、増殖・分化・移動などの機能を調整していることが明らかになってきた。細胞は足場との接着点に常に力を加え、その力に対してどの程度マトリクスが変形するのかという物理的な情報を取得していると考えられている。

現在までこのような足場の固さを認識する分子センサーモデルが考案されているもののその具体的な機構については明らかにはなっていない。また、足場の固さ依存的に特異的に活性化する分子機構の存在についても見出されていない。足場の物性が異なるときに観察される分子挙動としてもっとも顕著なことは、接着点に局在化する分子の集合・解離の速さが著しく異なるということであり、それらの平均的な活性化量については大きな変化として検出されない。本研究では、そのような分子の動的挙動に着目し、それら分子の「局在・解離の“ゆらぎ”がセンサーになっているのではなか」という作業仮説を出発点に、細胞が周辺環境の物性を認識する機構の解明を目指した。

細胞が力や歪みのような物理情報をどのように化学的な情報へと変換しているのか、メカニズムの解明をもっとも困難にしているのは、“細胞の力”という物理情報と生化学的な知見との対応である。そこで本研究では、細胞が接着点にかける力と接着点に關与する分子との関係を明らかにするために、光ファイバーを歯ブラシのようにポストをアレイ化したマイクロ加工培養基板を創製し(図1)、細胞が接着点にかける力の大きさと、そこに局在するシグナル分子との相関関係から、細胞が足場の物性をどのように検出・認識しているのかを明らかにすることを目標とした。

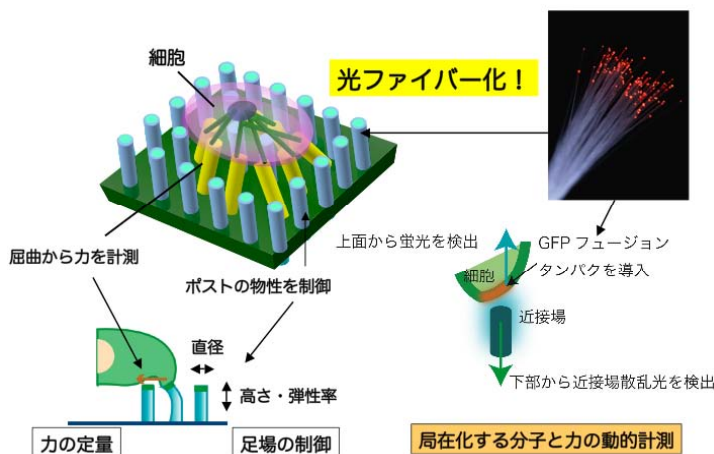


図1 本研究のねらい。細胞の力と接着点局在分子の動的挙動を同時計測する培養基板を開発し、周辺物性環境認識システムを動的モデルとして考察する。

## 2. 研究成果

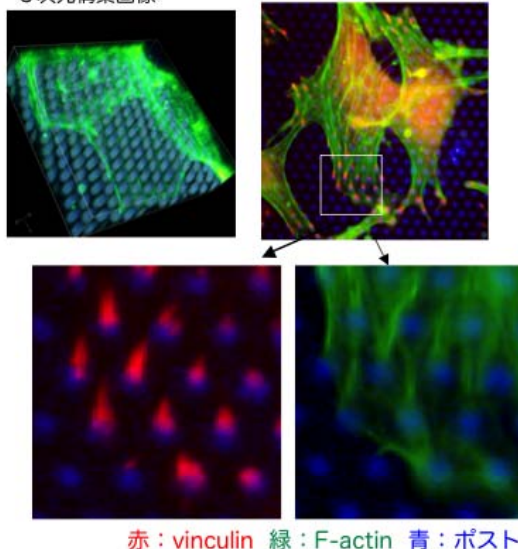
### (1) 計測手法の確立

細胞が接着点にかける力の大きさと、そこに集結するシグナル分子局在の時間変化との相関関係を検出する方法として、新しいタイプの微細加工培養基板の開発を試みた。現在まで、様々なマイクロパターン培養基板が開発されている。しかし、本研究の目的を達成するためには現在まで開発されているものに加え、1. 足場となるポスト自体の固さが可変可能、2. 蛍光分子の観察が可能、3. 細胞が分泌する細胞外マトリクス等の非特異的吸着がない、という条件を満たすものでなくてはならない。そこで、本研究では屈折率の高い水ゲルを、直接基板となるカバーガラスから林立させた培養基板の開発を試みた。水ゲルであれば原料となる架橋剤の仕込み量を変えることで固さの調整が可能であり、タンパク質の非特異的吸着を回避できる。また、ガラスから直接ポストを林立させることで、ポスト一つ一つを光ファイバーのような光源とし、接着点のみの蛍光分子局在の観察が期待できる。しかし、鋳型を用いる従来のマイクロパターン基板の作製方法では柔らかい水ゲルを直接ガラス上へ林立させることは難しい。そこで、本研究では2光子励起重合法という重合技術を用いることで、新しいタイプの培養基板の作製を行った。2光子励起重合法による水ゲル重合の一般的な方法はないため、様々な光重合開始剤と素材となるモノマー、及び架橋剤との組み合わせによる材料選定を行った。その結果、水溶液中のモノマーを重合させるためには、架橋剤と数種類の光重合剤の組み合わせが存在することが明らかになった。水溶液のまま光照射によって重合できる水ゲルは、培養液のような塩濃度中においても透明であり、加えて高い屈折率を有していることも分かった。ポストの形状は高さ5~10 $\mu\text{m}$ 、直径1~2 $\mu\text{m}$ の高アスペクト比のものが作製可能であった。また、本技術によって作製した培養基板上において細胞の培養も可能であり、ポスト先端に細胞が接着することが分かった(図2)。

### (2) 細胞の力計測と局在分子観察

力の計測方法は、作製したポストの形状、及び弾性率を原子間力顕微鏡にて計測し、理論値による算出を行った。この方法では、ポスト先端部位の変位を画像解析により計測することで力を算出するため、リアルタイムで計測することが可能である。この一連のプロセスを自動処理するプログラムを作製することで、細胞の力の動的変動を計測することが可能になった。しかし、計測されたものは作製した基板評価に基づく間接的な算出であったため、直接細胞が力をかけた様子を実験的に再現することで、ポストの屈曲と力の関係を実測する必要性があり、今後の課題である。また、実際に計測するものは「ポストの変形」であり、力がかかってもそれらが釣り合っている場合については判定ができない。このことは、領域会議でも議論された力の計測の本質的な問題点である。現時点では、細胞が接触しているポスト全ての変形量から予測できるのではないかと考えているが、その理論的予測についても今後の課題である。

共焦点顕微鏡による  
3次元構築画像



赤：vinculin 緑：F-actin 青：ポスト

図2 開発した水ゲル3次元パターンニング培養基板上の線維芽細胞培養結果。細胞はポストの先端に接着点分子複合体を形成して力をかける様子が観察された。

作製した培養基板を光ファイバーのような光源として用いることも可能であることが確認された(図3)。図に示すように、アクチンファイバーが集結するところにのみ強い蛍光が観察された。このような光ファイバー型としてのリアルタイム計測について現在行っている。

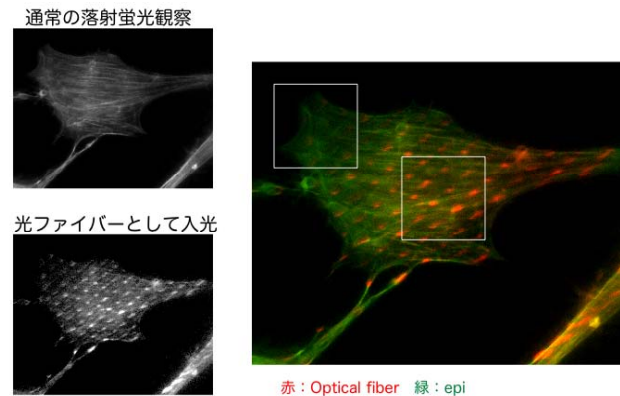


図3 開発した培養基板を光ファイバーとして観察。GFP-actinを導入し全反射蛍光顕微鏡によって観察した結果、接着点のみの観察が可能であった。

### (3) 蛍光タンパク質導入の検討

細胞内タンパク質のリアルタイムイメージングでは蛍光タンパク質を付加した分子を導入するのは一般的な方法である。しかし、細胞外マトリクスとの接着点に局在化する分子の発現量は、分子複合体の形成・解離のキネチクスに影響を与える可能性が考えられる。このため本研究の開始と同時に、様々な分子の過剰発現による細胞移動などの影響について検討を行ってきた。その結果、接着点局在分子である vinculin, focal adhesion kinase, talin は分子複合体形成のキネチクスに影響を与えてしまうことが分かった。また paxillin, zyxin のようにそれらの発現量の大小に対して、キネチクスに大きな影響を与えないアダプタータンパク質も存在することが分かった。このような分子を複合体マーカーとして力の同時計測が可能であると考えられる。また、これらの予備的検討中において、細胞が発揮する力から依存して分解を受ける分子が存在し、その分解プロセスが分子複合体形成プロセスにおいて重要な役割を果たしているということが、予期せぬ結果として得られた(現在投稿準備中)。

### 3. 今後の展開

細胞の足場に対する物性認識システムは単に正常な機能を維持するだけでなく、創傷治癒や様々な疾患、癌細胞の移動など病態に関わる現象に関与することが多い。今後は開発した細胞の物性認識計測方法を用いることによって、様々な生理機能との関わりについて応用展開するとともに、細胞の発揮する力がどのように化学的な情報へと変換していくのか、その一般的なシステムについて明らかにしていきたい。

### 4. 自己評価

本研究開始当初の出発点は培養基板を用いることで細胞の発揮する力と分子複合体形成のキネチクスの同時動的計測が前提であったが、予想以上に計測技術の確立に多くの時間を費やしてしまい、具体的な分子モデルの追求には至らなかった。しかし、本研究を通して、細胞が発揮する力の動的な変動に対して接着点に形成される分子複合体の動的変動は著しく速いことが明らかになり、本研究のねらいであった、分子複合体形成過程そのものにセンシング機構の実体があることが示唆された。研究開始時と比較し、現時点における接着点からのシグナル伝達について、その動的な変動が注目されるようになってきている。そのようななかにおいて、本研究で達成した力と分子の同時動的計測技術は、今後物性認識メカニズムの解明に大きく貢献できると考えている。また、開発した培養基板は作製に非常に特殊な技術が必要であるものの、細胞を観察し計測するためには特殊な技術を必要としない汎用性の高いものとすることができた。今後はその汎用性を生かし、細胞の機械的なパラメータと生理的機能を関連づけることによって、生理機能の新しい計測技術への応用展開も目指したい。



## 5. 研究総括の見解

細胞が接着点にかける力と接着点に関与する分子との関係の解明に向けてのユニークな系の確立ができた。今後、本技術を利用して、足場の物性を認識する仕組みの理解が進むことが期待出来、楽しみである。

## 6. 主要な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Yamaki K, Harada I, Goto M, Cho CS, Akaike T., Regulation of cellular morphology using temperature-responsive hydrogel for integrin-mediated mechanical force stimulation., <i>Biomaterials</i> . <b>30</b> (7), 1421-7 (2009)
2. Machida S, Watanabe-Nakayama T, Harada I, Afrin R, Nakayama T, Ikai A, Direct manipulation of intracellular stress fibres using a hook-shaped AFM probe., <i>Nanotechnology</i> ., <b>21</b> (38), 385102-8 (2010)
3. Watanabe-Nakayama T, Machida S, Harada I, Sekiguchi H, Afrin R, Ikai A., Direct detection of cellular adaptation to local cyclic stretching at the single cell level by atomic force microscopy. <i>Biophys J.</i> , <b>100</b> (3), 564-72. (2011)

### (2)特許出願

なし。

### (3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

#### 学会発表

- ・原田伊知郎、八巻和正、赤池敏宏“Force dependency of generation and annihilation behavior of molecular complex at Extracellular matrix adherence point.” 第61回 日本細胞生物学会大会(2009.6)
- ・原田伊知郎、赤池敏宏第”Analysis of Mechanical Interaction between Cell- Extracellular Matrices by 3D micro patterned culture substrate.” 46回日本生物物理学会年会(2008.12)
- ・原田伊知郎、八巻和正、赤池敏宏”Quantitative analysis of focal adhesion turnover dependent on elastic property of the ECM.”第62回日本細胞生物学会大会(2010.5)

#### 招待講演

- ・Ichiro Harada “Fabrication of Microneedle Arrayed Substrate for Regulation and Analysis for Cell- ECM Mechanical” Interaction.International Symposium on Engineering Micro-/Nano-Materials based on Self-Assembling and Self-Organization (ISEM2008 Returns)(2008.12)
- ・原田伊知郎「マイクロ加工培養基板を用いた細胞と細胞外マトリクスとの力学的相互作用の解析」第8回日本再生医療学会総会(2009.3)
- ・原田伊知郎「生体内細胞の力学環境場に対する応答性」第55回低温生物工学会(2010.7)

#### 国内学会誌・総説等

- ・原田伊知郎、赤池敏宏 「細胞機能の力学的制御と細胞外マトリクス工学」生体の科学 第59巻 第2号
- ・原田伊知郎 「弾性体としての細胞外マトリクスと細胞機能の力学的相互作用」再生医療 2008 Vol5 No2 pp32-37
- ・原田伊知郎 培養基盤表面のナノ・マイクロ加工技術による細胞の環境物性制御 遺伝子医学 MOOK 別冊 第2章2節 (2009)

# 研 究 報 告 書

## 「花粉管ガイダンスの動的システムの解明」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

研究者：東山 哲也

### 1. 研究のねらい

花粉管ガイダンスは、植物の生殖や穀物生産を支える重要な機構です。その精巧なシステムを理解することは、植物の生殖機能のデザインのみならず、化学屈性の真の理解や、ナノマシンへの応用など、様々な貢献が期待できます。本研究では、これまで世界をリードして進めてきた花粉管ガイダンスの研究、特に 140 年来の謎とされる花粉管誘引物質の同定を基盤に、花粉管ガイダンスを生命システムとして解明することを目指しました。

### 2. 研究成果

本研究では、トレニアという卵装置が裸出するユニークな植物を用いて、ガイダンス分子（誘引物質）を分泌する「助細胞」という卵細胞のとなりにある細胞を顕微鏡下で1つ1つ回収し、どのような遺伝子が働いているか調べました。その結果、助細胞で特異的かつ多量に作られる小さなタンパク質（ペプチド）が、ガイダンス分子であることを突き止めました。その構造は、ディフェンシンというヒトや昆虫にも存在する抗菌タンパク質に似ていました。その物質をルアーと名付け、140 年以上にも渡る探索のすえに遂に発見に至ったとして、Nature 誌の表紙を飾る成果として発表しました。当初想定していなかった成果として、ルアーは 1 つの植物に複数（多数）の種類が存在し、そのカクテルが精確に同種の花粉管をガイドすることがわかりました。また培養実験系では、たった 1000 分子程度のルアーを置くだけで、花粉管を誘引できることもわかり、花粉管の精密な応答能力が示唆されました。誘引シグナルを単純に誘引物質の濃度勾配と想定することに疑問を投げかける結果です。ルアーを活性のあるまま蛍光ラベルすることにも成功し、誘引物質が正確な誘引シグナルを形成する仕組みの研究基盤ができました。トレニアでのルアーの発見を基盤に、モデル植物など他の植物での誘引物質の同定にも成功し、アミノ酸配列は変化しながらも、普遍的に同じ種類のペプチドが誘引物質として働いていることを示しました。以上の成果から、卵装置への花粉管ガイダンスにおける誘引シグナルの実体を解明することができました。

### 3. 今後の展開

ルアー分子の1つ1つを蛍光物質で可視化することで、多種のルアーのカクテルがいかにして花粉管の伸長方向を制御するのか、さらに研究が展開すると期待されます。少量のルアー分子が活性をもち、しかも花粉管細胞の応答をリアルタイムで観察できることから、1分子解析の格好のモデル系に発展することが期待されます。花粉管のどの部位に何分子ルアーがつくと、細胞間シグナリングを経て、花粉管の伸長方向角度が何度曲がるのかといった解析が可能になると予想されます。また、ルアーを標識して花粉管による受容を解析することは、花粉管の先端にあると予想される受容体の同定にも大きく貢献します。将来的には、花粉管ガイダンスシステムの制御により、植物育種技術や穀物生産の向上につながることを期待されます。

### 4. 自己評価

本研究により、長年の謎とされてきました、花粉管誘引シグナルの実体を解明することができました。複数のペプチドがカクテルとなって花粉管に位置情報を与えているという仕組みが明らかとなりました。さらに、その誘引物質の挙動を直接可視化することも可能となりました。こうした成果は、花粉管ガイダンスを動的システムとして理解するという、当初目標に対する大きな進展であり、高く評価できると考えます。

## 5. 研究総括の見解

独自に見出した花粉管ガイダンスのシグナルと応答の仕組みを分子レベルで解析し、受粉のメカニズムに一つの大系を造り上げた。この成果は国際的に高く評価されている。ERATO でさらなる発展を期待する。

## 6. 主要な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1.Okuda S., Tsutsui H., Shiina K., Sprunck S., Takeuchi H., Yui R., Kasahara R.D., Hamamura Y., Mizukami A., Susaki D., Kawano N., Sakakibara T., Namiki S., Itoh K., Otsuka K., Matsuzaki M., Nozaki H., Kuroiwa T., Nakano A., Kanaoka M.M., Dresselhaus T., Sasaki N., Higashiyama T. Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. Nature vol.458 357-361 (2009)
2.Goto H., Okuda S., Mizukami A., Mori H., Sasaki N., Kurihara D., and Tetsuya Higashiyama. Chemical Visualization of Attractant Peptide, LURE. Plant Cell Physiol. Vol.52 49-58 (2011)
3.Hamamura Y., Saito C., Awai C., Kurihara D., Miyawaki A., Nakagawa T., Kanaoka M.M., Sasaki N., Nakano A., Berger F., and Tetsuya Higashiyama. Live cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in <i>Arabidopsis thaliana</i> . Current Biology, in press

### (2) 特許出願

該当なし

### (3) その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

#### 主要な招待講演

- ・“Defensin-like Polypeptide LUREs are diffusible pollen tube attractants.” 20th International Conference on Plant Growth Substances, 2010年6月, スペイン
- ・“Live Cell Analysis of Pollen Tube Guidance and Double Fertilization” XXI International Congress on Sexual Plant Reproduction, 2010年8月, イギリス
- ・“Pollen tube guidance and peptide attractants in flowering plants” 2010 SDB-JSDB Joint Meeting, 2010年8月, アメリカ

#### 受賞

- ・日本植物形態学会平瀬賞 2009.9
- ・日本学術振興会賞 2010.3

#### 主要な著作物

- ・Berger F, Hamamura Y, Ingouff M, and Higashiyama T. Double fertilization –caught in the act. Trends Plant Sci. 13 巻 437-443 頁 (2008)
- ・Higashiyama T. Peptide signaling in pollen-pistil interactions. Plant Cell Physiol. 51 巻 177-189 頁 (2010)



# 研 究 報 告 書

## 「シナプス強度を決定する基本原理の解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：深田 優子

### 1. 研究のねらい

脳の神経細胞間のシナプス伝達の強さ(シナプス強度)は常に一定ではなく、外界刺激に応答して変化する。この柔軟な変化によって脳は記憶・学習・情動など重要な機能を果たし、また、このメカニズムが破綻するとてんかんや認知症など脳機能の異常が生じる。高次脳機能を理解するためには、シナプス強度を決定する基本原理を明らかにする事が必要不可欠である。脳内の主要な興奮性シナプス伝達を司るAMPA型グルタミン酸受容体 (AMPA受容体)は神経活動に応じてその活性(質)とシナプス発現(量)が時間・空間的に制御され、シナプス強度を規定している。したがって、AMPA受容体機能を制御する分子機構の解明は現在の脳科学の最重要課題の一つと考えられている。これまでに多くの研究者によりAMPA受容体の制御機構の解明が試みられてきたが未だ全容解明には至っていない。申請者はAMPA受容体に関連した脳内蛋白質複合体を精製することにより、AMPA受容体機能を特異的に促進する新規のリガンド・受容体LGI1/ADAM22を同定した(Fukata Y et al, Science 2006)。LGI1、ADAM22 いずれの変異もシナプス伝達の異常が原因と考えられるてんかん発作を引き起こすことから、LGI1 のシナプス伝達制御における重要性は遺伝学的にも強く支持されている。本研究では新規神経伝達修飾分子LGI1に焦点を当てAMPA受容体の制御機構を明らかにすることにより、シナプス強度を決定する基本原理を解明することを目指す。具体的には、1)LGI1の作用機構、2)LGI1の分泌制御機構、3)LGI1の個体レベルでの生理機能、4)LGIファミリーの機能多様性を明らかにし、新規神経伝達修飾分子LGI1によるシナプス強度の決定機構を統合的に明らかにする。

### 2. 研究成果

#### 1)LGI1の作用機構と個体レベルでの生理機能

本研究で私は遺伝学的手法と生化学的手法を組み合わせ、LGI1 遺伝子欠損マウスの表現型とLGI1 が組織する蛋白質ネットワークを解析した。まず、私はLGI1 遺伝子欠損マウスを作成し、全てのホモ接合型マウス(LGI1 KOマウス)が生後2～3週の間には致死性のてんかん発作を呈することを見出した。この表現型はLGI1の受容体と考えられていたADAM22の遺伝子欠損マウスで報告されているものと酷似していた。Thy1プロモーターを用いて神経細胞特異的にLGI1遺伝子を発現させる回復実験により、LGI1遺伝子欠損マウスのてんかん表現型は完全にレスキューされた。一方、LGIファミリーの他メンバーでADAM22結合活性がないLGI3の発現ではてんかん発症の抑止効果は認められなかった。すなわち、この表現型はLGI1 単一遺伝子の欠失による特異性の高いものであることを示した。さらに、ヘテロ接合型マウス(LGI1 発現が半量)においては自発的なてんかん発作は見られないものの、けいれん誘発への感受性が有意に上昇していた。このように本結果は、LGI1 変異が見出されたヒトの家族性部分てんかんが、LGI1の機能欠損(ハプロ不全)によっておこることを明確に示した(Y. Fukata et al. Proc Natl Acad Sci USA 2010)。

次に、上述の機能回復実験に用いたLGI1 トランスジェニックマウスを用い、TAP(Tandem Affinity Purification)法によりLGI1の脳内作用点を探索した。ADAM22とその類縁タンパク質ADAM23がLGI1の脳内の主要な作用点(受容体)であることが分かった(図1)。ADAM23欠損マウスもLGI1やADAM22欠損マウスと酷似した致死性のてんかん発作がおこることが報告されている。したがって、LGI1、ADAM22とADAM23は遺伝学的に共通経路上で機能していることが強く示唆された。実際、ADAM22とADAM23はLGI1を介して一つの複合体として存在していた。LGI1 KOマウスではシナプス画分のADAM22、ADAM23が激減し、ADAM22と

ADAM23間の結合が消失していた。さらに海馬において、ADAM22、ADAM23およびKv1の分子層からの脱局在が観察され、電気生理学的にもAMPA受容体を介したシナプス伝達の低下が認められた。このように、LGI1、ADAM22、ADAM23からなるリガンド・受容体複合体は脳の興奮性を制御する重要な相互作用であり、正常脳ではてんかん発症を抑制する‘抗てんかん原性’複合体として機能していると考えられた(図2、Y. Fukata et al. Proc Natl Acad Sci USA 2010)。本研究で作成したLGI1 遺伝子欠損マウスはヒトのてんかんモデルマウスとしても有用と考えられる。

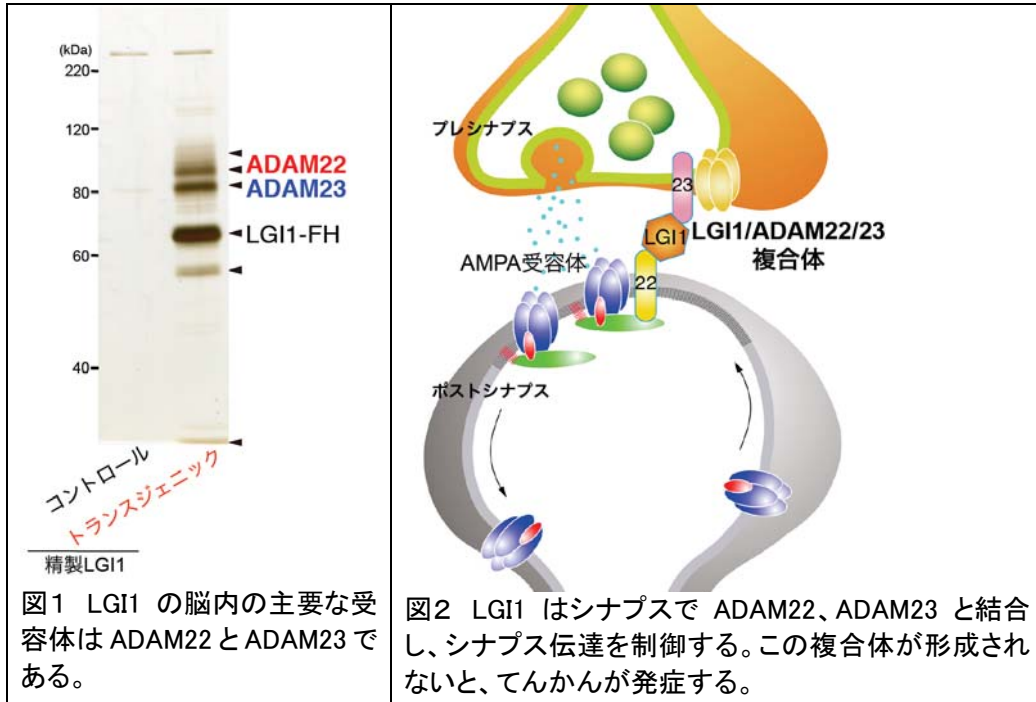


図1 LGI1 の脳内の主要な受容体はADAM22とADAM23である。

図2 LGI1 はシナプスでADAM22、ADAM23と結合し、シナプス伝達を制御する。この複合体が形成されないと、てんかんが発症する。

## 2) LGI1・ADAM 複合体の脳内作用の分子基盤とてんかん発症との関連

上記結果を受けて生じた新たな疑問「LGI1 欠損によりAMPA受容体による興奮性シナプス伝達が低下するにも関わらず、なぜ神経回路の過剰興奮状態であるてんかんが生じるのか」の解明に取り組んだ。まず、「LGI1 欠損により興奮性神経と抑制性神経がつくる複雑なネットワーク内に不均衡が生じている」可能性を考え、てんかん発症における責任神経回路を同定する実験系を構築した。上記のThy1 プロモーターを用いたLGI1 機能回復実験を応用し、脳の神経回路を構成する神経細胞「種」特異的に、LGI1 遺伝子を発現させるためのマウスシステムを作成した。また、LGI1 遺伝子欠損マウスの生化学的、組織化学的、電気生理学的な表現型解析をさらに進め、これまでに、LGI1・ADAMリガンド・受容体の機能低下が、とくに海馬特定領域のAMPA受容体機能低下を引き起こし、これが直接、海馬の異常興奮を惹起し、てんかんの原因となることを示唆する結果を得た(未発表)。

## 3. 今後の展開

進行中の神経細胞種特異的な LGI1 機能回復実験により、てんかん発症に関わる局所神経回路を決定する。てんかん病態における興奮性シナプス伝達異常という新しい側面が明らかになることが期待される。また、ヒト家族性てんかんで報告されている LGI1 変異体の性状解析によりLGI1 の分子機能、作用機構を詳細に明らかにする。作成されるLGI1 遺伝子変異マウスはてんかんモデルマウスとしても有用と考えられる。また、LGI1 のシナプス可塑性における役割を検討し、シナプス強度制御機構の原理と病態の全容を解明する。

## 4. 自己評価

さがけ研究により、LGI1 の作用機構の根幹となる分子経路および LGI1 の個体レベルの

生理機能を明らかにすることができた。この結果、LGI1・ADAMリガンド・受容体複合体は、脳の興奮性を制御するシステムを構築しており、正常脳ではてんかん発生を抑制する‘抗てんかん原性’複合体として機能していることを提唱した。この結果をもとに、現在神経回路レベルのLGI1機能を解析しており、生化学的手法を基盤とした分子レベルの研究を神経回路機能研究にまで発展させることができた。当初の研究計画をほぼすべて遂行し、本分野で主導的に研究を進めることができた。また本研究を通じて、国内外の共同研究を立ち上げ、新しい研究手法を取り入れることができた。一方で、LGI1・ADAMがAMPA受容体以外の分子経路を介して、シナプス伝達や脳の興奮性を制御する可能性も残っており、今後はLGI1と高次脳機能の間をつなぐミッシングファクターを確実に明らかにしていきたい。

## 5. 研究総括の見解

グルタミン酸受容体を介した興奮性シナプス伝達に関わる分子として同定したLGI1の生理機能を解析し、着実に成果を発展させている。なお多くが不明であるてんかんの発症機序の解明に挑戦し続け、基本機構を明らかにすることを期待する。

## 6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表: 主なものを抜粋。

1. <u>Fukata Y</u> , Lovero KL, Iwanaga T, Watanabe A, Yokoi N, Tabuchi K, Shigemoto R, Nicoll RA, Fukata M (2010) Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. Proc Natl Acad Sci U S A 107:3799-3804
2. <u>Noritake J</u> , <u>Fukata Y</u> , Iwanaga T, Hosomi N, Tsutsumi R, Matsuda N, Tani H, Iwanari H, Mochizuki Y, Kodama T, Matsuura Y, Brecht DS, Hamakubo T, Fukata M (2009) Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. J Cell Biol 186:147-160
3. <u>Tsutsumi R</u> , <u>Fukata Y</u> , <u>Noritake J</u> , Iwanaga T, Perez F, Fukata M (2009) Identification of G-protein alpha subunit palmitoylating enzyme. Mol Cell Biol 29:435-447

(2) 特許出願

該当なし。

(3) その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

・ Fukata Y “Role of the novel epilepsy-related protein network in synaptic transmission.” Japan-Taiwan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation (Kobe, Japan) (2009/11/11-11/12)

学会発表

・ Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, Yokoi N, Nicoll RA, Fukata M “Possible involvement of epilepsy-related ligand/receptors, LGI1/ADAM22/ADAM23 in trans-synaptic interaction.” Gordon Research Conferences-Cell Biology of the Neuron- (Waterville Valley, NH) (2010/6/27-7/2)

・ Fukata Y, Fukata M.”In vivo function of epilepsy-related ligand LGI1.” 11th International Neurochemistry Winter Conference (Solden, Austria) (2009/3/31-4/4)

・ Fukata Y, Watanabe, A, Iwanaga, T, Fukata, M. “In vivo function of epilepsy-related ligand LGI1.” 36th International Congress of Physiological Sciences (Kyoto, Japan) (2009/7/27-8/1)

・ Fukata Y, Watanabe A, Iwanaga T, Fukata M “Physiological role of epilepsy-related ligand LGI1 in synaptic function.” The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting (San Francisco, CA) (2008/12)

#### 受賞

・平成 21 年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞 “蛋白質複合体解析による高次細胞機能の制御機構の研究” (2009/4/14)

#### 著作物等

・ Fukata Y, Fukata M ”Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. “Nat Rev Neurosci 11:161-175 (2010)

・ 岩永剛、深田正紀、深田優子 「LGI1 が仲介するタンパク質複合体の破綻はシナプス伝達異常とてんかんを引き起こす」細胞工学VOL. 29, No.6, pp594-595:学研メディカル秀潤社(2010)

・ 横井紀彦、深田正紀、深田優子「シナプス伝達修飾分子LGI1 の機能異常による“てんかん”発症」Medical Bio VOL. 7, pp40-47:オーム社(2010)

・ プレスリリース「てんかん発症防ぐ蛋白質特定」毎日新聞(平成 22.1.26 朝刊 2 面)、日本経済新聞 (H22.1.26 夕刊)他

・ プレスリリース「脳の働きを正常に保つ2つの酵素の働き解明」科学新聞(平成 21.7.24 日 1 面)他



# 研 究 報 告 書

## 「脳細胞光制御を用いた神経グリア相互作用の解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：松井 広

### 1. 研究のねらい

脳には、神経細胞間を行き交う情報と並列して、グリア細胞の織り成す複雑なネットワークを伝える情報もあることが明らかになってきた。脳機能の多くは前者によって担われていると考えられがちであるが、グリアの状態は刻々と変化し、周囲の神経活動をモニターすると同時に、神経活動レベルを細かく遷移させていることが示唆されている。本研究の目的は、両細胞間にどのような信号の行き来があるのかを明らかにすることである。従来、神経およびグリアを選択的に刺激することは容易でなかったが、各細胞の活動を光で制御する方法を開発し、それを細胞間の相互作用のメカニズムを明らかにする足がかりとして、脳内で圧倒的な数を占めるグリアが脳機能においてどんな役割を持つのか、解明を目指した。

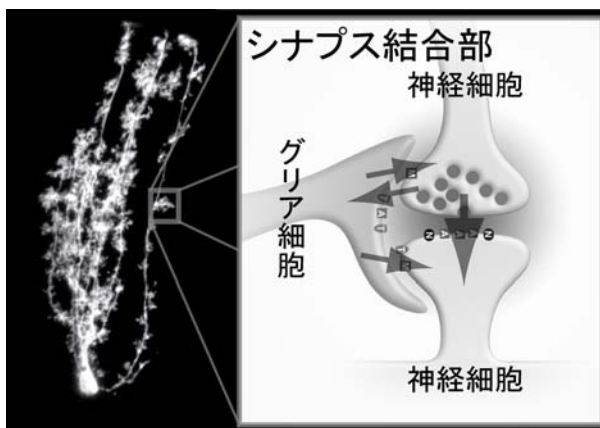
### 2. 研究成果

第一に注目したのは、神経組織内に張り巡らされたグリアの細い突起である。二光子イメージング法で、この突起の形態が刻々と変化する様が観察された。また、神経からグリアに向けてのグルタミン酸の放出があり、グリアの受容体が活性化されることが明らかになった。このグルタミン酸を介した神経-グリア間の信号伝達により、グリアの形態が制御されていることが、電気生理学的実験で示唆された。

グルタミン酸は、神経-グリア間の信号伝達だけでなく、神経細胞間の興奮性信号伝達に主要な役割を果たしている。グリアに発現するグルタミン酸トランスポーターは、細胞外に放出されたグルタミン酸を素早く回収することで、神経細胞間のシナプス伝達を修飾していると考えられる。グリアの伸ばす微細な突起がどの程度シナプスに接近しているのか、といった形態的特徴に従って、グリア細胞がシナプス伝達を修飾する程度も左右されている可能性が見えてきた。

神経細胞間のシナプス伝達は神経活動に伴って可塑的に変化を起し、これが学習や記憶の基盤となっていると考えられる。本研究では、神経細胞に光感受性分子を特異的に発現させ、神経細胞を光刺激することでシナプス伝達の長期可塑性を誘導することに成功した。シナプスにおける神経細胞間の信号伝達効率が変化してから数時間後には、グリアを含むシナプスの構造全体が変化することが分かり、記憶の定着化の過程が形態変化として観察できることが示唆された。

神経からグリアへの信号伝達だけでなく、グリアから神経への信号伝達も存在するはずであるが、これを精緻に調べる手段はこれまで存在しなかった。そこで本研究では、グリアを選択的に光感受性分子を発現させることで、神経細胞を刺激せずに直接グリア細胞を光刺激することに成功した。この手法は、グリアの活動が周囲の神経細胞に対して与える影響を直接検証することを可能にした。光刺激によるグリアの活性化に伴い、グリアから伝達物質や各種イオンが放出され、周囲の神経細胞の活動に影響を与えていることが明らかになりつつある。



【図】脳内のグリア細胞(左、二光子蛍光像)は、細かい突起を伸ばし、神経細胞間の信号の受け渡し過程(右)を修飾する。

### 3. 今後の展開

神経およびグリアを個別に光刺激できるという強力なツールができたので、今後は、生きたまの動物の脳内光刺激を行うことで、グリアの活動が脳機能において果たしている役割を明らかにしていきたい。神経光刺激に伴うシナプスの構造変化には数時間かかるため、構造変化へと至るまでの過程を解きほぐすのは容易ではなく、さきがけ期間を越えて追究する必要がある。またグリアの微細突起は、光学顕微鏡では解像できないほど細い箇所もある。そこで、連続超薄切片の電顕観察像から三次元再構築するにあたって、形態を定量的に解析するためのアルゴリズムを工夫している。グリアに光感受性分子を発現させることに成功し、神経細胞間の信号伝達に使われるのと同様の伝達物質が、グリア細胞から放出されるという新たな発見をしたが、次に、どのようにして放出が生じるのかを明らかにする必要がある。今後は、生きたまの動物の脳内光刺激を行うことで、グリアの活動が脳機能に及ぼす影響を明らかにすることを目指す。

### 4. 自己評価

脳内では、神経細胞より圧倒的に数の多いグリア細胞は、神経細胞ほど高速ではないが、様々な場面において活性化され、情報を伝え合っており、何らかの脳機能を担っていることが示唆されてから長らく経つ。しかしグリアを伝える情報の本質、情報伝達の手段、神経細胞を伝える情報との相互作用等は明らかにされていない点が多い。それは専ら、個々の細胞を効果的に刺激し分け、応答を記録する手法が成熟していなかったことに由来する。本研究では、各細胞を光で制御し、活動や形態変化を光で計測する手法を開発することに成功した。今後、光制御・光計測法は、電極を使って脳内ネットワークシステムの動作原理を解析する方法と並んで、広く用いられる手法に発展するに違いなく、そのための基盤技術を提供するのに貢献できたと自負している。グリア細胞は、情報を電氣的に表現しているのではなく、カルシウム等のイオン濃度変化で表現している可能性が高く、そういった点でも、光計測法の対象に適している。さきがけ研究員として採用された期間を通じて、こういった手法の開発のみならず、今後追求すべきテーマの糸口をつかむことができた。その内容は、グリアの自発的形態変化、シナプス可塑性に伴う形態変化、グリアに発現するトランスポーターの役割、グリアから神経へ伝わる信号の性質等、多岐に渡る。残念ながら、論文という形で成果を公表できるのは、多くはさきがけ期間後になってしまうが、今後の展開・発展のために、3年半を有意義に使うことができたと考えている。

### 5. 研究総括の見解

神経細胞とグリア細胞の interaction を形態の時間変化で追跡する系を開発し、それをを用い、その間の分子の動きを明らかにし、シナプスにおけるグリア細胞に光を当てた成果として評価できる。今後、これらのミクロな現象が、どのように高次の脳機能と関連しているのかを明らかにする研究へと発展することを期待する。

### 6. 主要な研究成果リスト

#### (1) 論文(原著論文)発表

1. Tarusawa E, <u>Matsui K*</u> , Budisantoso T, Molnar E, Watanabe M, Matsui M, Fukazawa Y, Shigemoto R (2009) Input-specific intrasynaptic arrangements of ionotropic glutamate receptors and their impact on postsynaptic responses. <i>J Neurosci</i> <b>29</b> :12896–12908. * Corresponding author.
2. Jiang Y, Nishizawa-Horimoto N, Imura K, Okamoto H, <u>Matsui K</u> , Shigemoto R (2009) Bioimaging with two-photon-induced luminescence from triangular nanoplates and nanoparticle aggregates of gold. <i>Adv Mater</i> <b>21</b> :1–5.

#### (2) 特許出願



なし。

(3) その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

学会発表

・ 松井広 「神経グリア細胞間相互作用機構の解明」第 85 回日本生理学会大会(東京)(2008.3)

・ 釜澤尚美、松井広、Timotheus Budisantoso、重本隆一 “Development and function of glutamate receptor clustering in the calyx of Held synapses” 第 36 回国際生理学会(IUPS、京都)(2009.7)

・ 釜澤尚美、松井広、Timotheus Budisantoso、重本隆一 “Developmental clustering of glutamate receptors in the calyx of Held synapses” 第 32 回日本神経科学学会大会(名古屋)(2009.9)

・ 松井広、Timotheus Budisantoso、釜澤尚美、深澤有吾、重本隆一 “Presynaptic, postsynaptic, and morphological determinants of signal transmission at the retinogeniculate synapse” 第 33 回日本神経科学学会大会(神戸)(2010.9)

著作物等

・ 深澤有吾、足澤悦子、松井広、重本隆一(2008)「グルタミン酸受容体のシナプス内分布とその生理的意義」*蛋白質核酸酵素*, 53(4):435-441.