

研究課題別 事後評価結果

1. **研究課題名:** 遺伝子改変細胞キメラ培養による神経回路網形成機構の解明

2. **研究代表者:** 津本 忠治 (理化学研究所 脳科学総合研究センター ユニットリーダー)

3. 研究内容及び成果

本研究は、複数の遺伝子改変神経細胞のキメラ培養標本を作製し、脳由来神経栄養因子 (BDNF; Brain Derived Nerve Growth Factor) の移行が神経回路網形成に果たす役割の解明を目指した。

神経細胞培養標本では、生理的な大脳皮質の神経回路網が失われてしまい、人工的な回路網の機能を観測しているという問題点も存在することから、本研究ではキメラ培養標本の他に、大脳皮質視覚野の回路網の大部分をそのまま維持しているスライス培養標本や動物丸ごとの *in vivo* 標本まで、種々の遺伝子改変細胞を組み込んだ神経回路網を作成し、その機能を解析した。

その結果、以下の成果が得られた。

1) 単一細胞遺伝子改変標本による神経回路網形成機構の解明

大脳皮質の基本的神経回路が保存されている視覚野皮質のスライス培養標本を使用し、BDNFが神経回路網形成、特に抑制性回路網の形成にどのような作用を及ぼすかを調べるため、皮質回路網の中で1個の細胞だけBDNFを欠損させ、その細胞を標的としているGABA (Gamma-AminoButyric Acid) シナプスの発達がどのような影響を受けるかを解析した。その結果、標的細胞にBDNFが欠損しているとその細胞に接触するGABAシナプス数が大きく減少するが、同じGABAニューロンから出て他のBDNF保有細胞に接触するGABAシナプス数は減少しないことが明らかとなった。この結果は、GABAシナプスの形成、維持には活動的な標的細胞から放出されるBDNFが局所的に重要な役割を演じていることを示している。本研究によって、入力を受けないシナプスが退行するメカニズム、特にその分子機構を明らかにする手がかりが示された。

本研究は比較的正常な神経回路網を保持しているスライス標本において、種々のタンパク質を欠損した単一細胞ノックアウト標本を比較的容易に作ることを示した点でも大きな意義がある。

2) RNA干渉による特定の細胞の遺伝子発現ノックアウト法の開発とその長期増強におけるプロスタグランジンの役割解明

線虫で発見されたRNA干渉は、その後哺乳類でも生じ、比較的短時間でタンパク質発現を阻止することが明らかとなった。哺乳類の脳にRNA干渉を適用しようとする場合、最大の問題点はsiRNA (small interfering RNA) をいかに標的の神経細胞に注入するかであったが、本研究では、電気穿孔法を改良した方法を使って特定の脳部位の神経細胞にsiRNAを効率的に注入する方法を

開発することに成功した。また、この方法を利用して、大脳皮質視覚野に豊富に存在することが知られているプロスタグランジンおよびその受容体のシナプス長期増強における役割を明らかにした。

3) 神経細胞樹状突起および軸索における BDNF 動態の解析

先行した CREST 研究において開発した、GFP によって標識された BDNF の cDNA を神経細胞の核内に直接注入する方法を使い、BDNF を培養神経細胞に発現させ、軸索のみならず樹状突起内の動きをも解析した。さらに、BDNF と神経成長因子で移動様式が異なるかどうかを明らかにするため、BDNF を CFP (Cyan Fluorescence Protein) で、NGF を YFP (Yellow Fluorescence Protein) で標識し、BDNF と NGF の動態の相違を解析した。すなわち、波長の異なる 2 種の蛍光タンパク質で BDNF と NGF を標識し、軸索や樹状突起内でのそれぞれの動態を同時に観測した。その結果、BDNF と NGF の移動は異なる分泌制御系に依存していることが明らかとなった。この成果は、異なる分子の動態を同時に可視化する方法を示すとともに、同じ neurotrophin でも BDNF と NGF では異なる機能的役割を担っていることを示唆したものである。また、本研究で示した、異なる蛍光タンパク質を使い複数の分子の動態や相互作用を解明する方法は今後広く応用されると思われる。

4) 遺伝子改変マウス視覚野における GABA ニューロン光反応性の *in vivo* 解析

in vivo の状態でも蛍光顕微鏡下で GABA ニューロンを比較的容易に同定出来る GAD67-GFP ノックインマウスを使用し、視覚野興奮性ニューロンと GABA ニューロンの光反応性、特に方位選択性の違いを 2 光子走査蛍光顕微鏡による *in vivo* カルシウムイメージング法を使って調べた。その結果、大脳皮質視覚野の興奮性ニューロンは非常に強い方位選択性を持つが、GABA ニューロンは方位選択性を持たないことを発見した。この発見は、GABA ニューロンが興奮性ニューロンの反応性を全体的に抑えることによって、興奮性ニューロンの方位選択性を発現させていることを示唆している。

遺伝子改変マウス脳に 2 光子励起機能的カルシウムイメージング法を適用出来ることを示した本研究によって、今後、異なるタイプの神経細胞からなる大脳皮質神経回路網の情報処理原理を解明する研究への応用が期待される。

以上のように、BDNF が神経回路網の形成に関与するメカニズムの解明を目指して研究が行われ、そのために必要とされる新たな研究手法が開発された。特に、siRNA の *in vivo* 脳特定領域神経細胞への注入法や、2 光子機能的イメージング法の遺伝子改変マウスへの適用等は、当該研究以外の幅広い神経科学領域での応用が期待される手法であり、本研究の成果として極めて高く評価される。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

査読付きの国際誌に多数の論文を発表する等、外部発表は適切に行われていると考えられる。また、この分野の研究論文の海外雑誌への掲載は、研究終了後、データ解析、投稿、レフェリーとのやり取り等でかなり時間がかかるので、すでに口頭やポスターで発表されている本研究の成果が今後順次、雑誌に掲載されていくことが期待される。

特許は「変異BDNF遺伝子導入ノックインマウス」等で出願があり、適当であったといえる。

研究代表者らが開発した単一細胞における特定遺伝子のノックアウト法やsiRNAの脳特定領域神経細胞への導入法等の技術は、神経科学分野の研究に大きなインパクトを与える極めて優れた成果である。

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

単一細胞遺伝子ノックアウト法、 Plasmid cDNAの核内直接注入法、 siRNAの*in vivo*脳特定領域神経細胞への注入法 2光子機能的イメージング法の遺伝子改変マウスへの適用等、斬新な研究手法を開発し、興味深い研究成果を上げている。これらの研究手法は広い神経科学分野の研究に大きな科学的・技術的インパクトを与えるものと考えられる。

また、今後これらの手法を用いることで神経回路網形成機構の解明が進むと考えられる。

4 - 3. その他の特記事項(受賞歴等)

研究期間における成果のうち、新聞報道された主なものを記す。

“神経栄養因子の変異による神経変性”、読売新聞、平成17年7月(記事)

“異なる働きの3種類の脳細胞 色分けして観察”、日刊工業新聞 平成19年2月22日(記事)

“脳細胞 種類別色分け観察 情報処理解明に道”、科学新聞 平成19年3月2日(記事)