

礪村 宜和

玉川大学脳科学研究所  
教授

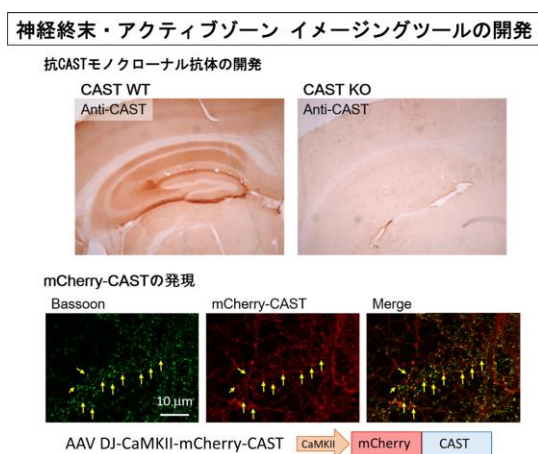
## シナプス光遺伝学を用いた脳領域間シグナル伝播機構の解明

### § 1. 研究成果の概要

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

平成 30 年度(第2年度)、大塚グループは研究項目 A1(プレシナプス光刺激/抑制ツールの体系的開発)の取り組みを継続し、プレシナプスのアクティブゾーン AZ 周辺に存在する各種タンパク質の結合ドメインとチャネルロドプシン ChR2 を融合させた遺伝子コンストラクトを作成して AAV ベクターに組み込み、培養神経細胞に発現させることにより AZ 周辺や軸索終末への局在性を評価した。また、AZ 局在分子 CAST に蛍光タグを付加することにより、従来は困難であった、生理的条件下で AZ 微細構造の経時的変化を観察(ライブイメージング)するのに有用な分子ツールを開発した(図)。この改変分子は、チャネルロドプシンと結合させる基質としても活用できることが期待される。AZ 研究に有用な抗 CAST モノクローナル抗体も開発した。これらの開発過程の一環として、AZ 局在分子 CAST や ELKS の機能を解明し論文として発表した(Ohara-Imaizumi 2019; Hagiwara 2018)。さらに、研究項目 C2(プレシナプス光刺激/抑制ツールのインビボ最適化)として遺伝子改変マウスの作成にも取り掛かっている。渡部グループは、研究項目 B1(プレシナプス光刺激/抑制ツールのインビトロ評価)として、培養細胞で局在発現を示した候補コンストラクトを組み込む

だ AAV ベクターの供与を受け、それらの光活性化能を電気生理学的に定量化する性能評価を進めている。マウスの特定の脳領域に AAV ベクターを微量注入し、扁桃体への入力経路特異的に対象遺伝子を発現させたうえで脳切片標本を作製し、その発現効率と局在化、光照射で誘発される興奮性シナプス後電流を評価した。磯村グループは、研究項目 C1(高速2波長多点光照射装置の確立)および C2(プレシナプス光刺激/抑制ツールのインビボ最適化)のために、次世代マルチリンク法の要となる多チャンネルのコリジョン試験の自動化を実現するリアルタイム制御システムをハードウェア・ソフトウェア両面で構築し、実際の生体脳を使って動作確認を実施した。また、アナログ駆動式のマルチリンク法を活用した、大脳基底核の直接路・間接路機能に関する研究成果を報告した(Nonomura 2018)。



#### 【代表的な原著論文】

1. Mica Ohara-Imaizumi\*, Kyota Aoyagi, Hajime Yamauchi, Masashi Yoshida, Masayuki X. Mori, Yamato Hida, Ha Nam Tran, Masamichi Ohkura, Manabu Abe, Yoshihiro Akimoto, Yoko Nakamichi, Chiyono Nishiwaki, Hayato Kawakami, Kazuo Hara, Kenji Sakimura, Shinya Nagamatsu, Yasuo Mori, Junichi Nakai, Masafumi Kakei and Toshihisa Ohtsuka\*, “ELKS/Voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel-  $\beta$  Subunit Module Regulates Polarized  $Ca^{2+}$  Influx in Pancreatic  $\beta$ -Cells”, *Cell Reports*, vol. 26, No. 5, pp.1213–1226, 2019
2. Akari Hagiwara, Yosuke Kitahara, Chad Paul Grabner, Christian Vogl, Manabu Abe, Ryo Kitta, Keisuke Ohta, Keiichiro Nakamura, Kenji Sakimura, Tobias Moser, Akinori Nishi and Toshihisa Ohtsuka\*, “Cytomatrix Proteins CAST and ELKS Regulate Retinal Photoreceptor Development and Maintenance”, *Journal of Cell Biology*, vol. 218, No. 1, pp.3993–4006, 2018
3. Satoshi Nonomura, Kayo Nishizawa, Yutaka Sakai, Yasuo Kawaguchi, Shigeki Kato, Motokazu Uchigashima, Masahiko Watanabe, Ko Yamanaka, Kazuki Enomoto, Satomi Chiken, Hiromi Sano, Shogo Soma, Junichi Yoshida, Kazuyuki Samejima, Masaaki Ogawa, Kazuto Kobayashi, Atsushi Nambu, Yoshikazu Isomura\*, Minoru Kimura\*, “Monitoring and Updating of Action Selection for Goal-Directed Behavior through the Striatal Direct and Indirect Pathways”, *Neuron* vol. 99, No. 6, pp. 1302–1314, 2018

## § 2. 研究実施体制

### (1) 礪村グループ

- ① 研究代表者:礪村 宜和 (玉川大学 脳科学研究所 教授)
- ② 研究項目
  - 研究項目 C1. 高速2波長多点光照射装置の確立
  - 研究項目 C2. プレシナプス光刺激／抑制ツールのインビボ最適化

### (2) 大塚グループ

- ① 主たる共同研究者:大塚 稔久 (山梨大学 大学院総合研究部 教授)
- ② 研究項目
  - 研究項目 A1. プレシナプス光刺激／抑制ツールの系統的開発
  - 研究項目 A3. 遺伝子改変動物の作成・提供

### (3) 渡部グループ

- ① 主たる共同研究者:渡部 文子 (東京慈恵会医科大学 医学部医学科 教授)
- ② 研究項目
  - 研究項目 B1. プレシナプス光刺激／抑制ツールのインビトロ評価