「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21年度採択研究課題－

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みます。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： ５件（うち、通常型４件、大挑戦型１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 21 年 10 月～平成 25 年 3 月（※平成 27 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 24 年 11 月　評価会開催
平成 25 年 2 月　研究総括による中間評価
平成 25 年 2 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
（４）大挑戦型については、さらに、大挑戦型として取り組む挑戦的な研究項目に対する進展についても評価項目とした。

６．研究結果（中間評価）

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、本中間報告が対象とする５人の研究課題も方法論的には分子論的、細胞生物学的、組織学的、から測定工学まで、問題設定も嗅覚回路から細胞移動、神経疾患など多彩な組み合わせとなっている。これらの研究者が領域会議や懇親会で他の領域研究者と議論しながら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いてきている。すでに研究が大きく展開した課題もあるが、いずれもあと2年のうちに成果の結実を期待できる。また５人のうち３人はさきがけ期間中これまでに研究機関を異動して教授またはチームリーダーに昇格している。

１．今井　猛研究者 「末梢入力に依存した神経回路形成のロジック」

長年に亘り成果を積み重ねてきた嗅覚系を用いて神経回路形成の論理を解明しようとする独自性が顕著なアプローチを展開してきた。嗅覚神経細胞軸索の投射における cAMP の関与、僧帽細胞の樹状突起の刈り込みにおける神経活動の関与などに関して、遺伝子改変マウスを巧みに利用して大きく解析を進展させたことが特に高く評価される。また技術開発にも力を注ぎ、組織透明化法や光学的蛋白質操作法などの開発を進めている。なかでも、僧帽・房飾細胞の投射先を解析する目的で開発したマウス全脳の透明化法は二光子イ

メージングと相まって一般的有用性も高い技術である。研究成果も着実に発表し、特許出願も行っている。今後神経活動の遺伝子発現レベルでの展開、またより高次の嗅覚中枢への回路構築ロジックの解明に向けた展開が大いに期待できる。

2. 川内　健史研究者 「細胞内機能ドメインが大脳皮質形成に果たす役割の解明」
大脳皮質の神経回路網構築に重要な神経細胞の移動のメカニズムを、オルガネラ・小胞・細胞接着装置などの細胞内機能ドメインの機能に関わる分子に着目し、子宮内エレクトロポレーションによる遺伝子操作などの方法により、独自性の高い分子細胞生物学的解析を進めてきたことは評価できる。放射状グリアの突起を伝わって細胞が移動する際に Rab5 分子を介するエンドサイトーシスが必須の働きをしていること、又その効果は移動細胞が発現するN-カドヘリン分子のエンドサイトーシス制御によることを明らかにした。またN-カドヘリンは、リサイクリングエンドソームを介して細胞膜へとリサイクルされる Rab11 依存性経路によって運ばれていることも明らかとなった。これらは2編の論文として発表している。さらに細胞移動の終結段階においては Rab7 の関与を見出すとともに、スライス培養技術を用いて細胞のロコモーションに Cdk5 などのキナーゼの関与をつきとめ、これらの解析も進めている。このような成果に基づき、今後は細胞移動のそれぞれの段階に対応するエンドソーム機能の転換の解析、および細胞移動におけるゴルジ体の役割の解析が順調に展開し、神経回路形成の基盤が明らかになることが大いに期待できる。

3. 田渕　克彦研究者 「精神発達障害原因解明のための Neuroligin/Neurexin モデルの確立」
シナプスの主要なオーガナイザーとして知られ、自閉症との関連性が高いことが示唆されている Neuroligin と Neurexin 分子に着目し、これらの病原性変異を導入した遺伝子改変動物を用いた解析を進めている。具体的には、neuroligin-3 R704C KI マウス、neurexin-3 KO マウス、neurexin-3 ss4 KI/KO マウスを作出し、その表現型の細胞レベルでの解析を進め、neuroligin-3 R704C KI マウスとneuroligin-3 R451C KI マウスでグルタミン酸受容体機能の異常を見出すなどの成果を挙げている。さらに neuroligin の結合相手である neurexin の役割についても解析を進めている。現在やや広がりすぎている感があるが、研究の焦点をよりシャープなものにし、疾患とのつながりの道筋をより明確にすることで、近い将来にこの解析がまとまって責任著者論文が出版され、自閉症のシナプス分子メカニズムが解明されて、治療法の開発に繋がることが期待される。

4. 筒井　秀和研究者 「膜電位の時空間計測における、次世代技術開発
神経回路を伝搬する信号の実体は細胞膜電位変化であり、これを高速高感度で時空間計測する技術の開発は重要である。このために開発した膜電位依存性蛍光電位プローブ蛋白質 Mermaid を用い、これを心筋細胞で発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作出し、無麻酔非拘束非侵襲的に心臓の鼓動にともなう電位の空間変化を計測することに成功したことは評価できる。また、さらに電位プローブの高速化高感度化をすすめ、反応速度、感度ともに格段に優れた機能を有するプローブ Mermaid2 の解発に成功した。これを用いて海馬神経細胞における活動電位や閾値下の膜電位、そして大脳皮質における聴覚刺激に対する応答を可視化する事にも成功している模様であり、当初の目標に近づきつつある。今後、プローブのさらなる高機能化と同時にまずは適切な脳内の神経回路に応用することにより、これが汎用性の高い技術として確立されることが期待される。

5. 山口　瞬研究者 「脳内分子変化と電気生理学的・行動学的変化の統合解析」(**大挑戦型**)
脳神経回路の特性はその活動にともなう遺伝子発現の変化によって変化してゆく。そのような遺伝子発現と活動特性の変化を in vivo で観測記録しようとする大胆な発想で、脳内の神経細胞の遺伝子発現を光学的にモニターするための小型 CCD カメラの開発を進め、照射強度補正法などの関連技術を開発し、マウス頭部への装着方法等を検討してきたことは評価される。また CCD カメラを用いる方法を補完する二光子顕微鏡観察を用いる方法も開発した。一方、*Arc-dVenus* マウスを用いた共同研究を積極的に展開し、アルツハイマーモデルマウスとの交配による老人斑近傍の神経細胞活性化パターンの病的変化の解明、空間作業記憶の低下の見られる *alpha-CaMKII* 遺伝子のヘテロノックアウトマウスの海馬歯状回の機能の異常の検出にも成功している。今後は、計画しているカルシウムイメージング・脳波テレメトリをも組み合わせた観測システムの構築、およびより高度なレポーターを組み込んだ遺伝子改変マウス／ラットの作出が成功するとともに、多岐に亙っている現在の研究の焦点がもっと明確なものになることで個人研究としての独創性が発揮され、責任著者論文が出版されることが期待される。

6.　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・教授

領域アドバイザー（五十音順。所属、役職は平成 25 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・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・生理学・教授

（参考）

件数はいずれも、平成２５年３月末現在。

（１）外部発表件数

	国　内	国　際	計
論　文	0	19	19
口　頭	36	28	64
その他	17	1	18
合　計	53	48	101

（２）特許出願件数

国　内	国　際	計
1	0	1

（３）受賞等

・川内　健史

Keio University Global COE Program "Center for Human Metabolomic System Biology", The Best Award for Excellent Paper （最優秀論文賞）　（平成 24.2.17）

（４）招待講演

国際　9 件

国内　19 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 25 年 3 月末現在） （応募時所属）	研究費（3 年間） （百万円）
今井　猛 （兼任）	末梢入力に依存した神経回路形成のロジック （（独）理化学研究所）	（独）理化学研究所　チームリーダー （東京大学　特任助教）	98
川内　健史 （専任）	細胞内機能ドメインが大脳皮質形成に果たす役割の解明 （慶應義塾大学）	JST　さきがけ研究者 （慶應義塾大学　講師）	73
田渕　克彦 （兼任）	精神発達障害原因解明のための Neuroligin/Neurexin モデルの確立 （自然科学研究機構/信州大学）	信州大学　教授 （　自然科学研究機構　准教授）	59
筒井　秀和 （兼任）	膜電位の時空間計測における、次世代技術開発 （大阪大学／理化学研究所）	大阪大学　助教 （同上）	53
山口　瞬 （兼任）	脳内分子変化と電気生理学的・行動学的変化の統合解析 （岐阜大学）	岐阜大学　教授 （神戸大学　准教授）	64

研 究 報 告 書

「末梢入力に依存した神経回路形成のロジック」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月
研 究 者： 今井 猛

1. 研究のねらい

我々哺乳類の神経系においてどのようにして特異的な神経接続が保証されているのか、という問題は、神経科学における大きな問題の一つである。近年の研究により、遺伝学的なプログラムによって規定される決定論的な神経接続の分子機構はかなり解明されてきたが、より高次の神経回路、たとえば、大脳皮質で入力情報に応じて異なる情報処理がなされるための神経回路がつくられる仕組みは、依然としてよく分かっていない。哺乳類の中枢神経系の回路形成においては、しばしば末梢からの入力や神経活動が重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、マウス嗅覚系をモデルとして、嗅覚受容体からの入力がどのようにして嗅神経細胞軸索投射を制御しているのか、さらにはどのようにして高次嗅覚回路の形成を制御しているのかを明らかにする。また、こうした研究を進める上では神経回路をカラム単位、感覚情報の入力・演算ユニット単位で遺伝学的に操作・可視化することが重要である。そこで本研究ではそのための新奇遺伝学ツールや可視化技術の開発も平行して進める。

2. 研究成果

（1）概要
マウス嗅覚系においては、個々の嗅神経細胞は 1, 000 種類ある嗅覚受容体遺伝子のなかから 1 種類のみを選択的に発現しており、また同種の嗅覚受容体を発現する嗅神経細胞の軸索は嗅球においては同一の糸球体へと収斂する。これまでの遺伝学的な解析から、この過程では嗅覚受容体から入力される cAMP シグナルが重要な役割を果たすと考えられているが、その cAMP シグナルの実体については不明であった。そこで、本研究ではマウス遺伝学、生化学、イメージングを組み合わせてその実体を明らかにすることを試みた。その結果、嗅神経細胞軸索の投射位置を規定する cAMP シグナルは、匂い認識の時とは異なる G タンパク質 Gs を介したリガンド非依存的な活性によって制御されている事を明らかにした。 1 つの嗅覚受容体から入力された匂い情報は、嗅球で 1 つの糸球体に収斂した後、20-50 個の僧帽・房飾細胞へと受け渡される。僧帽・房飾細胞は幼弱な時期には複数の糸球体からの入力を受けているが、生後の発達に伴い樹状突起の刈り込みを行い、最終的に単一の糸球体からのみ入力を受けるようになる。この樹状突起刈り込みの機構は長らく不明であったが、本研究によって、神経活動が重要な役割を果たすことが明らかとなった。既に他のグループにより、匂いの感覚刺激は刈り込みに必要無い事が示されていることから、この神経活動の実体は不明であり、現在その解明に取り組んでいる。 嗅球で 1 個の糸球体に入力された情報が嗅球内・嗅皮質でどのように情報処理されている

のかは、回路レベルではまだほとんど判っていない。そこで、本研究では単一の糸球体レベルでの回路標識、遺伝学的操作、全回路可視化に取り組んだ。一部の計画はまだ進行中だが、これまでに既に全回路可視化のための新規組織透明化試薬 SeeDB を開発し、長距離軸索投射の可視化、嗅球全体の可視化などができるようになった。SeeDB を用いて単一糸球体に接続する"姉妹"僧帽・房飾細胞の分布・形態を調べたところ、非常に多様性に富んでおり、姉妹僧帽・房飾細胞の間で情報のコーディングに多様性がある可能性が示唆された。この可能性を検証するべく、現在姉妹僧帽・房飾細胞のカルシウムイメージングに取り組んでいる。

（2）詳細

嗅神経細胞軸索投射を制御する cAMP シグナルの解析

嗅神経細胞軸索投射の過程で、嗅覚受容体は Type-I と Type-II という 2 種類の軸索ガイダンス・細胞接着分子の遺伝子発現を制御している。Type-I は幼弱な嗅神経細胞に発現しており、嗅球前後軸に沿ったおおまかな軸索投射位置の規定に関わっている。一方、Type-II はより成熟した嗅神経細胞に発現し、軸索間で局所的に作用して嗅神経細胞軸索の選り分けを行っている。我々の以前の研究から、Type-I、Type-II とも嗅覚受容体および G タンパク質を介した cAMP シグナルによって制御されている事が判っていたが、嗅覚受容体がどのようにして Type-I と Type-II の発現を独立に制御しているのかは大きな謎であった。特に、Type-II については鼻腔閉塞で発現が変化することから主に環境中からの刺激が関与していると考えられているが、Type-I についてはどのような cAMP シグナルが発現制御しているのか不明であった。

我々は幼弱な嗅神経細胞では Gs が、成熟した嗅神経細胞では Golf が発現していることからこれら G タンパク質に着目して解析を行い、嗅神経細胞特異的な Gs のノックアウトマウスでは Type-I 遺伝子の発現が影響を受け、Golf のノックアウトマウスでは Type-II 遺伝子の発現が影響を受けることを明らかにした。更に我々は、Gs と Golf が下流の cAMP シグナルを伝えるモードが異なる可能性を検討するため、嗅覚受容体を含むいくつかの GPCR と Gs/Golf の融合タンパク質を作製して、リガンドに対する応答特性を解析した。その結果、Gs はリガンド非依存性の basal activity を生じやすいのに対し、Golf では basal activity が低く、リガンド依存性の cAMP シグナルを伝達するのに適している事が判明した。鼻腔閉塞などの実験と併せて考えると、OR は Gs を介してリガンド非依存性のシグナルを生じることで Type-I 遺伝子の発現を制御し、ひいては軸索投射位置の規定を行っていると結論された。また、これらの結果に基づく簡単なシミュレーションから、Gs と Golf の違いだけで Type-I と Type-II 遺伝子の発現様式の違いを説明できることを明らかにした（論文投稿中）。

嗅神経細胞における自発発火の解析

それでは Type-II 遺伝子の発現はどのような cAMP シグナルによって制御されているのであろうか？Type-II 遺伝子の発現は鼻腔閉塞によって変化することから、環境中に存在する匂い分子によって制御されている可能性、鼻腔に空気が流れる事による自発的な神経活動が関与する可能性などが考えられる。近年、嗅覚受容体は空気の流れによる機械的な刺激

によって活性化される事が見出されていることから、我々はこの機械刺激による自発発火がType-II 遺伝子の発現を制御している可能性について検討した。

嗅神経細胞における神経活動をモニターするため、嗅神経細胞でカルシウムセンサーGCaMP3 を発現するトランスジェニックマウス OMP-tTA × TRE-GCaMP3 を作製し、気管挿入で人工吸気を行った時の反応を嗅球で（つまり嗅神経細胞軸索末端のカルシウム応答として）測定した。その結果、多くの糸球体で機械刺激（匂いを含まない空気の流入）に依存したカルシウム応答が確認できた。さらに機械刺激応答の大きさと、Type-II 遺伝子の一つ、Kirrel2 の発現相関について調べたが、期待したような明瞭な相関は見られなかった。今後は環境中の匂いが Kirrel2 の発現に関与している可能性について更に検討を行う。

この実験の過程で、興味深いことに、機械刺激によって興奮する糸球体が多くある一方、抑制を受ける糸球体も多く存在することが明らかになった。その後の詳細な解析により、匂い刺激によっても同様の抑制性応答が確認できた。この結果は、嗅球内の抑制回路が糸球体間で作用し、前シナプス性に側方抑制をかけている可能性を示唆しており、大変興味深い。現在さらにその検証および抑制性回路の同定を行っている。

嗅球僧帽細胞の樹状突起形成

嗅球の糸球体において、嗅神経細胞軸索から入力された匂い情報は 2 次神経細胞である僧帽・房飾細胞へと受け渡される。僧帽・房飾細胞は唯一の主樹状突起を単一の糸球体へと伸ばして興奮性入力を受け取ると共に、複数の側方樹状突起を伸ばして顆粒細胞から抑制性入力を受ける。このような樹状突起の形態形成は生後数日の間に確立される。我々は僧帽細胞をまばらに蛍光タンパク質で標識することにより、樹状突起の発達過程を記述した。その結果、生後 2 日目までは僧帽細胞の複数の樹状突起が複数の糸球体に伸びているが、生後 3-4 日目に樹状突起の刈り込みが起こり、生後 6 日目までにほとんどの僧帽細胞が単一の主樹状突起を有するようになることが判明した。このような刈り込みプロセスは、嗅球において匂い情報の”混線”を防ぐ上で極めて重要である。

これまでに、匂いを受容できない CNGA2 ノックアウトマウスの解析から、この刈り込みプロセスには匂い受容は必要ないことが示されていた。そのため、どのようなメカニズムで樹状突起の刈り込みが起こるのかは不明であった。我々は匂い刺激によらない、自発的な神経活動が樹状突起の刈り込みに関与している可能性を考え、内向き整流性 K^+チャネル Kir2.1 を過剰発現させ、神経活動を抑えたときの発達プロセスについて調べた。この結果、神経活動阻害をすることで僧帽細胞主樹状突起の刈り込みが阻害されること、側方樹状突起の伸長が阻害されることが明らかになった。更に、CREB 等を介した遺伝子発現がこれらのプロセスに関与している事が明らかとなった。現在自発的な神経活動のイメージングを行うと同時に、どのような遺伝子が神経活動によって制御されているのか、同定を試みている。

新規透明化試薬を用いた嗅球回路の解析

我々は、僧帽・房飾細胞の嗅球内回路・皮質投射の特異性が嗅神経細胞軸索の入力特異的に決まる機構に興味を持っているが、これまで特定の糸球体に接続する僧帽・房飾細胞を可視化するのは極めて困難であった。まず第一に、特異的な遺伝子プロモーターなどが存在

しないことから、特定の糸球体に接続する神経細胞のみを遺伝学的に標識するということが極めて困難であった。第二に、僧帽・房飾細胞は脳の広大な領域に樹状突起・軸索を伸ばしていることから、その接続様式を解明するには、大量の切片を作製して再構成するという膨大な作業が必要であった。

こうした問題を解決するため、我々は、第一に光を使って遺伝子発現や DNA 組換えを制御し、回路を制御・可視化するツールの開発を行っている(後述、非公開)。そして第二に、組織を透明化して、物理的な切片を作製することなく神経回路の全容をイメージングする手法の開発を行っている。蛍光タンパク質やデキストラン色素、DiI 等の神経トレーサーの蛍光を完全に保持し、神経細胞の微細な形態を保持しながら組織を透明化するための試薬の開発を行い、SeeDB と命名した(特許出願済み、論文投稿中)。例えば、SeeDB による透明化と 2 光子顕微鏡を組み合わせることで、3 週齢マウスの脳をまるごと表面から反対側までイメージングできるようになった。我々が特に興味を持っている嗅球も容易に全体像のイメージングが出来るようになった。

我々はこの透明化法を用いて、単一の糸球体に接続する 20-50 個の”姉妹”僧帽・房飾細胞の接続様式の解析を行った。単一の糸球体からデキストラン色素を注入することで姉妹僧帽・房飾細胞を標識し、その分布を解析したところ、それらの細胞体の位置は必ずしも糸球体の直下に集まっている訳ではなく、糸球体 20-30 個分の領域に広がって分布している事が判明した。さらに、姉妹僧帽細胞の側方樹状突起のパターンは互いに似ておらず、多様性に富んでいることが判明した。この結果は、姉妹僧帽細胞が異なる抑制性入力を受け、異なる応答特性を持っている可能性を示唆している。これについて検討するため、現在僧帽細胞の in vivo 2 光子カルシウムイメージングを行っている。

3.　今後の展開

嗅球僧帽細胞の樹状突起形成については 3 つの大きな課題が残っている。一つはどのような神経活動が樹状突起形成に関わっているのか、という点である。匂い依存的な神経活動は必要無いことが既に示されており、おそらく自発的な神経活動が重要であると考えられるが、嗅球における自発活動についてはほとんど研究がなされていない。我々は僧帽・房飾細胞特異的に GCaMP3 を発現するトランスジェニックマウスを作製し、in vivo の 2 光子イメージングを開始している。これまでの予備的実験によると、ケタミン麻酔下の動物ではほとんど僧帽細胞の自発発火が見られないのに対し、麻酔レベルの低い(覚醒に近い)動物では頻繁に自発発火が観察されることを見出している。現在、覚醒新生仔マウスの 2 光子カルシウムイメージングのセットアップを行っており、回路形成時の自発発火の動態を明らかにできると考えている。次の問題は神経活動がどのような遺伝子発現を介して樹状突起の刈り込みを行っているのかという点である。これに関しては、人為的に神経活動を抑えた僧帽細胞から mRNA を増幅し、マイクロアレイ解析を進めている。候補遺伝子についてはノックダウン実験を行うことで重要な遺伝子の同定を進める。最後に最も重要な問題は、一体何が生き残る樹状突起と刈り込まれる樹状突起を決めているのかという点である。これについてはオプトジェネティクスを使って神経活動の強さ、タイミングを操作することで検討していきたい。

嗅球僧房細胞の嗅球内回路、皮質投射についても特異性がどのように決まっているのかと

いうのは重要な問題であるが、この 3 年間ではあまり手を付けることが出来なかった。樹状突起の特異性が決まる機構については理解が進んできたので、今後は我々が独自に開発したツールも駆使しながら、嗅球内回路・皮質投射のメカニズム解明を進めたいと考えている。

4. 自己評価

本研究では、1) 嗅覚受容体からの入力に依存した嗅神経細胞軸索投射の分子機構の解析、2) 嗅覚受容体の種類に対応した僧帽・房飾細胞神経回路の形成過程の解析、3) 新奇遺伝学・可視化ツールの開発を目標とした。

1)については、特に嗅覚受容体から入力されるシグナルの実体の解明を目指し、おおまかな軸索投射位置を決めるType-I遺伝子と、局所的な軸索の選別を制御するType-II遺伝子の制御機構を解析した。Type-I 遺伝子については、嗅覚受容体 Gs を介し、リガンド非依存性のシグナルを伝えるという結論にたどり着くことが出来た。一方の Type-II 遺伝子の制御については、当初機械刺激(鼻腔中の空気の流れ)による自発発火の関与を想定してその検証を行ったが、機械刺激による発火のパターンと Type-II 分子の発現パターンの間には明瞭な相関は確認できなかった。今後は環境中の匂い分子が与える影響について検討する。

2)については、これまで僧帽細胞の樹状突起の接続プロセスに特に着目して研究を進めた。僧帽細胞の樹状突起発達は匂い刺激に依存しないことが知られており、神経活動の関与については否定的に考えられてきたが、我々の研究によって、神経活動が重要な役割を果たすということが明らかになった。僧帽細胞のアイデンティティーがどのように確立されるのかを考える上では、まず樹状突起の接続性の問題を理解する事が重要である。その意味で、樹状突起の発達機構の理解が進んだという点は大きな前進であると評価できる。一方で、何が生き残る樹状突起・刈り込まれる樹状突起を決めているのか、という本質的な問題にはまだまったくアドレスできていない。今後 2 年間でこの点に少しでも迫りたいと考えている。

3)については、技術開発が新しいアプローチ、新しい問題をもたらすとの考えのもと、さまざまなツールの開発に取り組んできた。多くの物は失敗に終わっているが、いくつかについては実現する道筋が付けられたと考えている。今後、これらを実用化し、駆使することで、嗅球の回路形成の問題に応用していきたい。

5. 研究総括の見解

長年に亘り成果を積み重ねてきた嗅覚系を用いて神経回路形成の論理を解明しようとする独自性が顕著なアプローチを展開してきた。嗅覚神経細胞軸索の投射における cAMP の関与、僧帽細胞の樹状突起の刈り込みにおける神経活動の関与などに関して、遺伝子改変マウスを巧みに利用して大きく解析を進展させたことが特に高く評価される。また技術開発にも力を注ぎ、組織透明化法や光学的蛋白質操作法などの開発を進めている。なかでも、僧帽・房飾細胞の投射先を解析する目的で開発したマウス全脳の透明化法は二光子イメージングと相まって一般的有用性も高い技術である。研究成果も着実に発表し、特許出願も行っている。今後神経活動の遺伝子発現レベルでの展開、またより高次の嗅覚中枢への回路構築ロジックの解明に向けた展開が大いに期待できる。

6. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Imai T, Sakano H, Vosshall LB. Topographic mapping--the olfactory system. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 Aug 1;2(8):a001776. Review
2. Tsuboi A*, Imai T*, Kato HK, Matsumoto H, Igarashi KM, Suzuki M, Mori K, Sakano H. (*equally contributed) Two highly homologous mouse odorant receptors encoded by tandemly-linked MOR29A and MOR29B genes respond differently to phenyl ethers. Eur J Neurosci. 2011 Jan;33(2):205-13.
3. Imai T, Sakano H. Axon-axon interactions in neuronal circuit assembly: lessons from olfactory map formation Eur J Neurosci. 2011 Nov;34(10):1647-54. Review
4. Imai T. Positional information in neural map development: Lessons from the olfactory system. Dev Growth Differ. 2012 Apr;54(3):358-65. Review

（2）特許出願

研究期間累積件数： 1 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）（内招待講演 14 件）

1) Takeshi Imai
Odorant Receptors and Neural Map Formation
CDB Seminar
2009.12.24. 神戸、兵庫県（理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター）

2) 今井猛、坂野仁
A Distinct cAMP signaling pathway mediates the odorant receptor-instructed coarse targeting of axons
包括脳ネットワーク・夏のワークショップ
ポスター発表、2010 年 7 月 29 日

3) 今井猛
阿波シンポジウム 2010 ワークショップ"生命科学研究の今後"
われわれの脳はどのようにして作られるのか？
2010 年 8 月 12 日、高松、香川県

4) 今井　猛
Olfactory map formation directed by the odorant receptor-derived cAMP signals
Hot Spring Harbor Symposium and joint with the 6th Global COE International Symposium
2010.8.20　九州大学生体防御医学研究所

5) 今井　猛. 鈴木　悟. 坂野　仁
A distinct cAMP signaling pathway mediates the odorant receptor-instructed coarse targeting of axons
第 33 回日本神経科学大会/第 53 回日本神経科学大会/第 20 回日本神経回路学会大会合同大会 Neuro2010
2010.9.2　神戸市（神戸コンベンションセンター）

6) 今井　猛
嗅覚神経地図の形成メカニズム
第 28 回東北大学脳科学 GCOE 若手フォーラム
2010.9.24　仙台市（東北大学）

7) 今井　猛. 坂野　仁
嗅細胞の多様性を生み出す cAMP シグナルの制御機構
第 36 回日本応用酵素協会研究発表会（財団法人　日本応用酵素協会主催）
2010.11.15　大阪市（ホテル阪急インターナショナル）

8) Takeshi Imai
Odorant receptor-instructed neuronal wiring in the mouse olfactory system
Workshop/ European Molecular Biology Organization/
Frontiers In Sensory Development
03-06May,2011 Barcelona Spain

9).今井　猛
嗅覚神経地図の形成メカニズム
平成 23 年度生理学研究所　研究会「シナプス可塑性の分子細胞基盤」
2011.06.16-17　岡崎市（生理学研究所）

10).今井　猛
脳の匂い地図ができる仕組み
第 13 回生命科学研究科シンポジウム
2011.07.07-08　京都市（芝蘭会館　稲盛ホール）

11).今井　猛

マウス嗅球僧帽・房飾細胞軸索投射の糸球による違いの解析
第 34 回日本神経科学会–こころの脳科学–
2011.09.14–17　横浜市（パシフィコ横浜）

12).Imai Takeshi
Odorant receptor–instructed axonal wiring in the mouse olfactory system
KAIST–RIKEN Joint Symposium on Cell and Developmental Biology
2011.11.30 Daejeon(KAIST) Korea

13).Imai Takeshi
Wiring specificity in the mouse olfactory circuits
NIPS International Workshop 2011`Cutting edge in synapse research'
2011.12.08–09 Okazaki (Okazaki Conference Center) Japan

14).Ke Meng–Tsen, Imai Takeshi
Simple and efficient optical clearing reagent for imaging fluorescent protein in mouse brain
The 10th International Student Seminar
2012.3.5–8 Kyoto University (Shiran Kaikan)Japan

15).今井　猛
「我々の神経回路はどのようにしてつくられるのか？」
高大連携事業「信州サイエンスミーティング」（高校生向け講演）
2012.3.17　松本市 （信州大学理学部）

16).今井　猛
"Wiring Specificity in the Mouse Olfactory Circuits"
嗅覚神経回路の特異性はどのようにして決まっているのか
大阪大学大学院　生命機能研究科　脳科学セミナー
2012.05.17　大阪府吹田市（大阪大学大学院生命機能研究科）

17).Imai Takeshi
Wiring specificity of mitral/tufted cells in the mouse olfactory bulb
ISOT 2012
2012.6.23–27 Stockholm, Sweden

18).今井　猛
嗅球内神経回路の特異性と匂い情報処理
第 4 回生命科学阿波おどりシンポジウム
2012.08.16　徳島市（徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター交流ホール）

19).今井　猛
嗅球僧帽細胞における樹状突起の発達メカニズム
嗅覚情報処理の神経基盤　ー匂い分子から嗅覚神経回路、行動・情動までー
2012.09.15　東京（東京大学医学部教育研究棟）

20) Meng-Tsen Ke, Takeshi Imai.
Differential wiring of sister mitral cells revealed by circuit tracing
in the cleared olfactory bulb
嗅覚情報処理の神経基盤　ー匂い分子から嗅覚神経回路、行動・情動までー
2012.09.15　東京（東京大学医学部教育研究棟）

21) Meng-Tsen Ke, Takeshi Imai.
Differential wiring of sister mitral cells revealed by circuit tracing
in the cleared olfactory bulb
Circuit construction in the mammalian cerebral cortex:
Genetic and imaging approaches　2012.12.15-16　静岡（国立遺伝学研究所）

22) Meng-Tsen Ke, Takeshi Imai.
Differential wiring of sister mitral cells revealed by a novel optical clearing agent
Axon Guidance, Synapse Formation and Regeneration,
September 18-22, NY

23) Meng-Tsen Ke, Takeshi Imai.
Differential wiring of sister mitral cells revealed by a novel optical clearing agent
第 4 回光操作研究会－動作原理の理解と行動制御への応用－
2012.9.27-28　名古屋　（自然科学研究機構岡崎カンファレンスセンター）

24). 今井　猛
神経回路の秩序と発生
理化学研究所と親しむ会　第 18 回セミナー
2012.11.7　東京（如水会館　松風の間）

25). Ryo Iwata, Takeshi Imai.
In vivo two-photon Ca2+ imaging of spontaneous neuronal activity
in the mouse olfactory bulb
Linda Buck　博士招聘高等研国際シンポジウム「感覚受容と神経回路」
2013.02.11-12　東京（東京大学本郷キャンパス伊藤国際学術研究センター）

26). Meng-Tsen Ke, Takeshi Imai.
Differential wiring of sister mitral cells in the olfactory bulb revealed by a novel optical

clearing agent, SeeDB
Linda Buck 博士招聘高等研国際シンポジウム「感覚受容と神経回路」
2013.02.11-12 東京（東京大学本郷キャンパス伊藤国際学術研究センター）

和文総説

1）今井 猛, 山﨑 崇裕, 坂野 仁
軸索間相互作用に基づく神経地図形成
実験医学 27(19):3123-3126, 2009

2）今井 猛, 山﨑 崇裕, 坂野 仁,
軸索間相互作用に基づく神経地図形成のロジック
細胞工学 29(1):78-85, 2010

研 究 報 告 書

「細胞内機能ドメインが大脳皮質形成に果たす役割の解明」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月
研 究 者： 川内 健史

1. 研究のねらい

脳の高次機能の基盤となる神経回路網は、特定の領域（層や神経核）に配置された神経細胞が軸索や樹状突起を伸ばして互いに連結することによって形成される。発生期の大脳皮質において、脳室近辺で誕生した神経細胞は、軟膜側に向かって多段階の移動を行い、この過程で軸索を伸長し、樹状突起形成を開始する。すなわち、神経細胞移動は「細胞体の適切な配置」のみならず、「軸索や樹状突起の形成」とも関連が深い。近年、神経細胞移動に関与する分子が少しずつ明らかになってきたが、分子と表現型の対応表を作るだけでは複雑な神経細胞移動のメカニズムを理解するには至らないのではないかと考えた。そこで本研究では、組織・個体レベルの表現型と個々の分子の間のギャップを埋めるために、オルガネラや小胞、細胞接着装置といった巨大な分子複合体（これらを「細胞内機能ドメイン」と呼ぶ）の役割に着目した解析を行い、神経回路網形成の基盤となる神経細胞移動のメカニズムを細胞生物学的な視点を通して理解することを目的として研究を進めている。

2. 研究成果

（1）概要

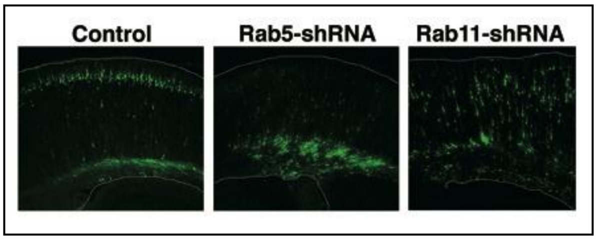
大脳皮質形成において、脳室近辺で誕生した神経細胞は、表層に向かって長い距離を移動する。この過程が障害されると、様々な脳疾患が引き起こされることから、神経細胞移動は脳が正しく機能するために必須な発生段階であると考えられる。しかし、大脳皮質神経細胞の移動は、複雑な形態変化や細胞−細胞間相互作用を伴う多段階の様式から成ることから、これを *in vitro* の実験系で再現することは困難であり、そのメカニズムについては未解明な点が多いのが現状である。これまでに我々は、簡便に個体への遺伝子導入を行える子宮内エレクトロポレーション法などを用いて、神経細胞移動の初期段階における複雑な形態変化を制御する分子経路を報告してきた（Kawauchi et al. Nature Cell Biol, 2006; Kawauchi et al. EMBO J, 2003 など）。本研究では、細胞内機能ドメイン（エンドソーム、リソソーム、核、ゴルジ体など）の役割に着目し、神経細胞移動の最も主要な段階である「ロコモーション様式」と樹状突起の成熟を伴う移動の最終段階「ターミナル・トランスロケーション様式」の制御機構の解析を行っている。

ロコモーション様式の移動は、放射状突起という長い突起に沿って行われることは 40 年近く前から知られていたが、移動の初期段階に起きる複雑な形態変化や神経成熟の影響を排して、ロコモーション様式およびターミナル・トランスロケーション様式の移動を解析することは困難であり、ロコモーション移動細胞がどのようにして放射状突起に接着し、その上を動いているのかについても、ほとんど分かっていなかった。本研究では、(A) 大脳皮質の興奮性

神経細胞は、細胞接着分子 N−カドヘリン依存的に放射状突起に接着していること、さらに N−カドヘリンが複数のエンドソームによって細胞内を輸送されることが、放射状突起に沿ったロコモーション移動に必要であることを示した。(B) 移動の最終段階であるターミナル・トランスロケーション様式の移動には、リソソーム系の分解経路の必要性が亢進することを明らかにした。(C) 移動の初期段階における影響を排してロコモーション移動を直接解析する実験系を確立し、ロコモーション移動における核移動には、Cdk5 や Src ファミリーなどのキナーゼが必要であることを同定した。以下に具体的な結果を示す。

（2）詳細

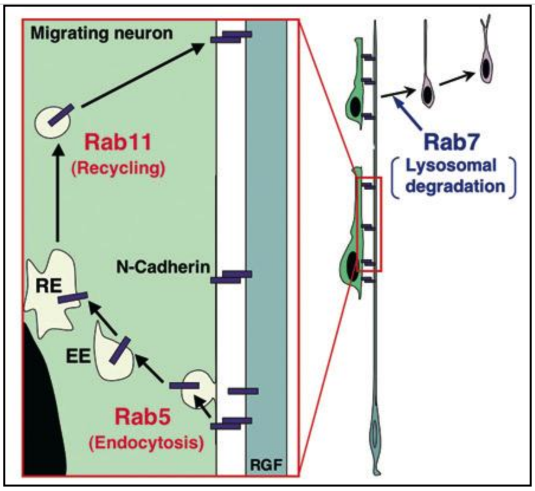
2−1. 研究テーマ(A)「大脳皮質形成におけるエンドソームの役割」



エンドソームは、初期エンドソーム、後期エンドソーム、リサイクリングエンドソームなど多くの種類に分類され、主に細胞膜からエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた膜蛋白質の細胞内動態や運命の決定に重要な役割を果たすことが知られているが、その生理的な意義はよく分かっていない。本研究では、エンドソームの重要性を *in vivo* で調べるために、まずエンドソーム形成の「入り口」となるエンドサイトーシスを個体レベルで抑制する実験を行った。子宮内エレクトロポレーション法を用いて、多くのタイプのエンドサイトーシスを阻害することが知られているドミナントネガティブ体（DN）の Rab5 と Dynamin を、胎生 14 日目のマウス大脳皮質に発現させ、遺伝子導入の 5 日後（出生 0 日目）で解析を行った。コントロールの神経細胞のほとんどは、すでに脳の表層まで移動していたのに対して、エンドサイトーシスを阻害した神経細胞は、表層まで移動することができず、中間帯にとどまっていた（論文１）。同様に、子宮内エレクトロポレーションを応用した *in vivo* ノックダウン法を用いて、Rab5 の発現抑制を行った細胞も、表層への移動が障害されていた（右上図）。Rab5 ノックダウン細胞の多くは、移動の初期段階で異常となる Cdk5 などの機能抑制とは異なり、放射状突起に沿って正常に先導突起を伸ばしていたことから、形態の異常だけで移動の障害を説明することはできなかった。そこで、初代培養神経細胞などを用いた詳細な解析を行い、Rab5 をノックダウンした神経細胞は、放射状突起のマーカーを発現する細胞との細胞間相互作用が亢進していることが分かった。さらに、Rab5 ノックダウン細胞において、細胞接着分子 N−カドヘリンの細胞表面量が増加していた。これらより、Rab5 は N−カドヘリンの輸送（エンドサイトーシス）を制御していることが示唆された。

次に、N−カドヘリンによる細胞接着の亢進が神経細胞移動に与える影響を調べるために、N−カドヘリンを *in vivo* で過剰発現したところ、表層への移動が遅れることが分かった（論文２）。N−カドヘリンを過剰発現させた神経細胞は、Rab5 ノックダウン細胞と同様に、正常に先導突起を形成して放射状突起に接着していたことから、N−カドヘリンによる接着が異常に強くなると、形態的には正常であっても、放射状突起上の移動が遅れることが示された。これに対して、N−カドヘリンをノックダウンすると、やはり神経細胞移動が障害された（論文１）。しかし、N−カドヘリンの過剰発現とは異なり、N−カドヘリンをノックダウンした神経細胞は、正常に放射状突起へと接着することができないことが分かった（論文２）。以上の結果より、N−カド

ヘリンは、神経細胞が放射状突起に接着するために必要であるが、一部の N-カドヘリンは、Rab5 依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが、表層への移動に必要であることが分かった（右図）。



それでは、Rab5 依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた N-カドヘリンは、細胞内でどのような運命をたどるのであろうか？細胞内へと取り込まれた膜蛋白質は、まず初期エンドソームへと運ばれる。初期エンドソームは「sorting endosome」とも呼ばれ、ここから細胞内の様々なコンパートメントへと輸送経路が続いている。これらの輸送経路は、それぞれ異なるRab ファミリー低分子量 G 蛋白質によって制御されていることが知られているため、次に私は、特定の Rab 蛋白質の機能抑制を介して、それぞれの輸送経路を遮断する実験を行った。その結果、N-カドヘリンは、リサイクリングエンドソームを介して細胞膜へとリサイクルされる Rab11 依存性経路によって運ばれていることが明らかとなった。さらに、Rab11 の機能抑制実験により、神経細胞移動が障害されることも分かった（前ページの図）。これらの結果より、複数のエンドソームが協調的に N-カドヘリンを輸送することが、放射状突起に沿った神経細胞移動に必要であることが示された（右上図）（論文１）。

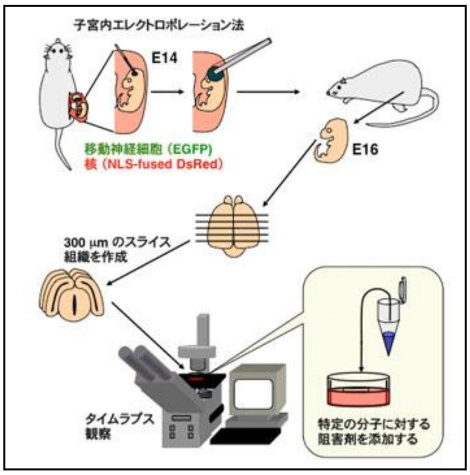
2-2. 研究テーマ(B)「神経細胞移動の最終段階におけるリソソーム経路の役割」

細胞内には、初期エンドソームを起点とした多くの輸送経路が存在する。前項で述べた通り、初期エンドソームとリサイクリングエンドソームの協調作用により、ロコモーション様式の神経細胞移動が制御されていることが明らかとなったが、その他の輸送経路の生理的な意義は分かっていない。そこで、リサイクリングエンドソームを介さずに、初期エンドソームから直接細胞膜へとリサイクルされる経路に必要とされる Rab4 の機能抑制実験を行ったところ、神経細胞移動に大きな異常はみられなかった。次に、リソソームへ向かう分解経路に関与する Rab7 の機能を抑制したところ、これらの神経細胞は表層近くまではほぼ正常に移動したが、移動の最終段階であるターミナル・トランスロケーションが異常となった（論文１）。

神経細胞がターミナル・トランスロケーション様式の移動を行う場所は、Primitive cortical zone（PCZ）と呼ばれる細胞密度が高い特殊な構造をしているが（論文３）、この PCZ 領域で、N-カドヘリンの発現量が低下していた。さらに、初代培養神経細胞を用いた実験により、Rab7 の機能抑制により N-カドヘリンの蛋白質量が増加することが分かった。これらより、Rab7 依存性のリソソーム系分解経路の標的分子のひとつは N-カドヘリンであると考えられるが、N-カドヘリンの蛋白質量の変動がターミナル・トランスロケーションに関与するかどうかについては今後の課題である。ターミナル・トランスロケーションには、細胞–細胞外基質間の接着分子であるβ1-インテグリンが必要とされることから（論文４）、Rab7 依存性のリソソーム系分解経路は、N-カドヘリン以外の膜蛋白質量の調節を介して、ターミナル・トランスロケーション様式の移動を制御している可能性も考えられる。

2-3. 研究テーマ(C)「未成熟神経細胞の核移動の制御機構の解明」

ロコモーション様式は、神経細胞の移動過程の大部分を占めることから、最も主要な移送様式であると考えられる。しかし、移動の初期段階における複雑な形態変化や神経成熟過程による影響を排して、その後に行われるロコモーション移動を直接解析することは困難であった。我々は、大脳皮質のスライス組織培養法と阻害剤実験を組み合わせることにより、ロコモーション移動を直接解析できる新たな実験系（*ex vivo* 化合物実験法）を確立した（右図）。これを用いて、ロコモーション様式で動く神経細胞における核の移動には、Cdk5 と Src ファミリーキナーゼ（特に Fyn キナーゼ）が必要であることを明らかにした（論文５）。



3.　今後の展開

これまでの研究により、エンドソームやリソソームなどいくつかの細胞内機能ドメインの大脳皮質形成における役割が明らかとなった。また、大脳皮質形成における神経細胞移動の最も主要な段階である、放射状突起に沿ったロコモーション様式の移動のメカニズムに関する重要な知見を得ることができ、新たなモデルも提唱することができた。これらの成果より、移動の各段階において、必要とされる細胞内機能ドメインや細胞接着分子が切り替わっている可能性が示唆された。そこで、本研究の後半では、神経細胞の移動様式の変化に応じて、エンドソームなどの細胞内機能ドメインが機能変換されるメカニズムなど、これまでのさきがけ研究の成果を通して浮き彫りとなった新たな疑問点について取り組む予定である。同時に、まだ機能未知である細胞内機能ドメインのうち、特に膜蛋白質の輸送や修飾において中心的な役割を果たすゴルジ体が、脳の形成（神経細胞移動、軸索・樹状突起の形成など）にどのような役割を果たしているかについても解析する予定である。

4.　自己評価

従来の神経発生研究は、組織解剖学的な形態観察もしくはヒトの脳疾患や突然変異マウスを用いた遺伝学的解析が主流であり、分子細胞生物学的な研究はほとんど行われてこなかった。これまでに我々は、移動神経細胞の形態変化を制御する分子を初めて同定するなど、大脳皮質形成に関与するいくつかの重要な分子経路を同定してきた。本さきがけ研究では、次なるステップとして、細胞生物学的な視点から脳の構築原理を理解することを目的として研究を行っている。細胞内には、分子がランダムに存在するのではなく、細胞小器官（オルガネラ）や細胞接着装置などの巨大な蛋白質複合体といった機能的な区画が存在し、これらが物質輸送などの相互作用を行いながら、細胞機能を発揮している。本研究では、このような細胞内区画を「細胞内機能ドメイン」として捉え、大脳皮質形成におけるその役割を個体レベルで明らかにすることを目指している。これまでに、細胞内における物質のやり取りに関与する「エンドソーム」が細胞接着分子を適切に輸送することが、放射状突起に沿った神経細胞の長距離移動に必要であること、膜蛋白質

などの代謝に関わる「リソソーム」は移動の最終段階に重要であることなどを報告することができ、いくつかの細胞内機能ドメインの役割を個体レベルで明らかにすることができた。同時に、これらの成果は、神経細胞移動の主要な様式であるにも関わらず、そのメカニズムがほとんど分かっていなかったロコモーション様式の移動や、神経回路網形成の基礎となる樹状突起の成熟を伴うターミナル・トランスロケーション様式の移動がどのような機構で行われているのかを示したものでもあり、神経科学や細胞生物学などの広い分野において重要な結果であると考える。また、遺伝情報をもつ DNA が含まれる「核」は最大の細胞内機能ドメインであり、その位置は「細胞が存在する場所」でもある。本研究では、移動神経細胞において、核移動を制御するキナーゼを同定することができた。以上の結果より、細胞内機能ドメインに着目した本研究は、おおむね順調に進んでいると考える。これらの研究成果によって、「エンドソーム」の機能が移動の各段階によって使い分けられている可能性が示唆され、その制御機構や機能変換のメカニズムなど、新たな課題も浮き彫りになった。また、核移動は、神経細胞移動の要とも言えるが、本研究で同定されたキナーゼがどのようにして核を動かしているのかも未解明である。本さきがけ研究の後半においては、これまでの研究で得られた知見をもとに、これらの問題点に挑んでいきたい。

5. 研究総括の見解

大脳皮質の神経回路網構築に重要な神経細胞の移動のメカニズムを、オルガネラ・小胞・細胞接着装置などの細胞内機能ドメインの機能に関わる分子に着目し、子宮内エレクトロポレーションによる遺伝子操作などの方法により、独自性の高い分子細胞生物学的解析を進めてきたことは評価できる。放射状グリアの突起を伝わって細胞が移動する際に Rab5 分子を介するエンドサイトーシスが必須の働きをしていること、又その効果は移動細胞が発現する N-カドヘリン分子のエンドサイトーシス制御によることを明らかにした。また N-カドヘリンは、リサイクリングエンドソームを介して細胞膜へとリサイクルされる Rab11 依存性経路によって運ばれていることも明らかとなった。これらは2編の論文として発表している。さらに細胞移動の終結段階においては Rab7 の関与を見出すとともに、スライス培養技術を用いて細胞のロコモーションに Cdk5 などのキナーゼの関与をつきとめ、これらの解析も進めている。このような成果に基づき、今後は細胞移動のそれぞれの段階に対応するエンドソーム機能の転換の解析、および細胞移動におけるゴルジ体の役割の解析が順調に展開し、神経回路形成の基盤が明らかになることが大いに期待できる。

6. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Kawauchi T, Sekine K, Shikanai M, Chihama K, Tomita K, Kubo K, Nakajima K, Nabeshima YI, Hoshino M. Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-Cadherin trafficking. **Neuron**. 2010, 67, 588-602.
2. Shikanai M, Nakajima K, Kawauchi T. N-Cadherin regulates radial glial fiber-dependent migration of cortical locomoting neurons. **Commun Integr Biol**. 2011, 4, 326-330.
3. Sekine K, Honda T, Kawauchi T, Kubo K, Nakajima K. The outermost region of the developing cortical plate is crucial for both the switch of the radial migration mode and the Dab1-dependent "inside-out" lamination in the neocortex. **J Neurosci**. 2011, 31, 9426-9439.
4. Sekine K, Kawauchi T, Kubo K, Honda T, Herz J, Hattori M, Kinashi T, Nakajima K. Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation

of integrin ・5・1. **Neuron**. 2012, 76, 353–369.
5. Nishimura YV, Sekine K, Chihama K, Nakajima K, Hoshino M, Nabeshima YI, Kawauchi T. Dissecting the factors involved in the locomotion mode of neuronal migration in the developing cerebral cortex. **J Biol Chem.** 2010, 285, 5878–5887.

（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）

3-1. 主要な招待講演・シンポジウム

1. Takeshi Kawauchi. ″Regulatory mechanisms for multi-step neuronal migration: Roles of cell cycle-related proteins and cell adhesion molecules″ APSN2012 (The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry & The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry), Symposium "Intracellular molecular mechanisms regulating neurogenesis and migration during cerebral cortical development", Kobe, Japan. September 14 – October 2, 2012.
2. 川内健史. ″神経細胞の分化・成熟過程における細胞周期関連分子の役割″ 特定領域研究「細胞増殖制御」終了シンポジウム、東京工業大学 蔵前会館、東京、2012年8月30-31日
3. 川内健史. ″細胞内輸送・細胞接着・細胞骨格・細胞周期関連分子の協調作用による大脳皮質形成の制御メカニズム″ 国立精神・神経医療研究センター 所内セミナー、東京、2012年5月17日
4. 川内健史. ″大脳皮質形成における多段階の神経細胞移動を制御する分子経路″ 第44回神経解剖懇話会（第117回日本解剖学会総会・全国学術集会サテライトセミナー）、甲府、2012年3月26日
5. 川内健史, 仲嶋一範. ″齧歯類終脳の外套発生過程における細胞内小胞輸送の役割″ シンポジウム「メンブレントラフィック研究の新展開」、第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、甲府、2012年3月26-28日
6. Takeshi Kawauchi. ″Rab GTPases differentially regulate the endocytic trafficking and molecular metabolism of N-cadherin, contributing to multi-step cortical neuronal migration″ Global COE Program (Center for Human Metabolomic Systems Biology) Workshop 2011, Tokyo. February 17, 2012.（最優秀論文賞受賞講演）
7. 川内健史. ″細胞生物学的視点からみた大脳皮質形成における多段階の神経細胞移動のメカニズム″ 第70回 Brain Club、慶應義塾大学医学部、東京、2012年2月3日
8. Takeshi Kawauchi. ″Endocytic regulation of N-cadherin promotes neuronal migration during cerebral cortical development″, The 21st Hot Spring Harbor Symposium jointly with 9th Global COE International Symposium "Cell Migration in Biology and Medicine", Kyushu University, Fukuoka, Japan. January 22-23, 2012.

9. 川内健史. "大脳皮質形成における神経細胞移動のメカニズム ―組織培養系を用いた阻害剤実験の確立とその応用―" 第33回 神経組織培養研究会、東京医科大学、東京、2011年10月29日
10. Takeshi Kawauchi. "Endosomal trafficking regulates neuronal cell migration and adhesion" The 84th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Symposium "New horizon in organelle research", Kyoto, Japan. September 21-24, 2011.
11. Takeshi Kawauchi, Kazunori Nakajima. "Cellular insights into the locomotion mode of cortical neuronal migration" The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Symposium "Dynamics of neuronal polarity formation and migration", Yokohama, Japan. September 14-17, 2011.
12. 川内健史. "低分子量Gタンパク質による細胞機能制御を介した大脳皮質形成のメカニズム" 徳島大学、徳島、2011年2月23日
13. 川内健史. "発生期大脳皮質における神経細胞の移動と成熟の分子機構" 神戸大学大学院医学研究科、神戸、2010年12月3日
14. Takeshi Kawauchi. "Cdk5 regulates the locomotion mode of neuronal migration during cerebral cortical development" MEXT Priority Research Project "Cell Proliferation Control" International Symposium; "Cell Cycle and Cell Differentiation -From A to Z-", Nagoya, Japan. November 4-6, 2010.
15. 川内健史. "In vivo 細胞生物学による神経細胞移動のメカニズムの解明" 第28回 脳科学グローバルCOE 若手フォーラム、東北大学 星陵キャンパス、仙台、2010年9月24日
16. Takeshi Kawauchi. "Molecular and cellular mechanisms for the radial glial fiber-dependent locomotion mode of cortical neuronal migration" Global COE Liaison Laboratory regular seminar; Kumamoto University, Kumamoto, Japan. September 15, 2010.

[注釈]
赤字: 謝金や旅費が出るなど、いわゆる狭義の招待講演
黒字: 招待された講演だが、川内が所属している研究班などが主催しているもの(旅費や謝金はなし)
青字: 学会のシンポジウムのうち、講演依頼を受けたもの
緑字: 学会のシンポジウムのうち、自らがオーガナイザーとして企画し、さらに発表したもの

3-2. 受賞

The Best Award for Excellent Paper (最優秀論文賞)
Keio University Global COE Program "Center for Human Metabolomic System Biology", 2012 年 2 月 17 日

3-3. 主要な著作物(著書・日本語総説など)

1. 川内健史 「大脳皮質形成と脳疾患:増殖停止した神経細胞における細胞周期関連分子の新たな機能」**実験医学 増刊号**「ヒトと医学のステージへと拡大する細胞周期 2013」

（中山敬一、編）(2013) Vol.31 (2) 141-146.

2. 川内健史 「細胞骨格・細胞接着・細胞内輸送の協調的作用による神経細胞移動の制御機構」 **生化学** (2011) Vol.83 (5) 409-413.
3. 川内健史 「放射状突起に沿った神経細胞の長距離移動 ―大脳皮質形成における細胞内ロジスティクスの統合的制御―」 **Intracellular Logistics (ニュースレター)** (March 2011) No.4, 19-24.
4. 川内健史（分担執筆）「細胞周期フロンティア」（佐方功幸、稲垣昌樹、岸本健雄、編）「VII章　細胞分化と増殖制御 "G0 期の神経細胞における細胞周期関連分子の役割"」(pp.236-241) (2010 年 11 月 10 日初版1刷発刊）（共立出版）（総ページ数：252 ページ）
5. 川内健史 「エンドサイトーシス経路による N-カドヘリンの細胞内輸送は放射状突起にそったニューロンの移動を制御する」 **ライフサイエンス 新着論文レビュー**（文部科学省委託研究開発事業「統合データーベースプロジェクト」）2010 年 9 月 30 日

3-4. プレスリリース

平成 22 年 8 月 20 日（報道解禁日：平成 22 年 8 月 26 日午前1時）

「大脳皮質が作られる際に神経細胞が正しい位置まで動く仕組みを解明―脳疾患の原因究明と治療法の開発に前進―」

科学技術振興機構・慶應義塾大学医学部による共同発表

（日刊工業新聞、日経産業新聞、科学新聞、JST News、高校生向け科学雑誌「Someone」（リバネス）などに、本研究の紹介記事が掲載された）

研 究 報 告 書

「精神発達障害原因解明のための Neuroligin/Neurexin モデルの確立」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月
研 究 者： 田渕 克彦

1． 研究のねらい

自閉症は、社会的相互作用の障害、コミュニケーションの障害、興味の範囲と行動の著しい限局性を特徴とする精神発達障害である。罹患率は年々増加傾向にあるが（近年の統計では 100 人に 2 人以上というものもある）、原因が不明であるため、診断のためのバイオマーカーや根本的治療法は存在せず、社会問題として認識されるようになってきた。原因として、以前より遺伝学的素因との関係が指摘されてきたが、必ずしもメンデル型遺伝をするわけではなく、同一家系の患者同士でも症状が異なることが多いことから、自閉症の多くは、複数の遺伝子異常の総合的結果によって引き起こされる（多因性遺伝性）と考えられる。このため、特定の遺伝子に焦点を絞って原因解明のための研究を行うことが困難であった。我々は以前の研究において、自閉症の患者から発見されたシナプス接着因子 Neuroligin-3 の単一アミノ酸置換変異（R451C 変異）を導入したノックインマウスを作成し、解析を行ったところ、このマウスで自閉症様行動異常が再現されることが確認された。これは、Neuroligin-3 遺伝子の変異が単独で自閉症を起こし得ることを示唆するものである。また、このマウスでは大脳皮質の抑制性シナプス機能の亢進が認められたが、シナプス以外での異常が認められないことから、シナプス異常が自閉症発症の最小構成要素ではないかとの仮説を立てた。近年、自閉症患者からの遺伝学的スクリーニングにおいて、Neuroligin のシナプスにおける結合パートナーである Neurexin の遺伝子異常も頻繁に報告されるようになってきた。これらのことから、Neuroligin と Neurexin の結合がシナプス機能獲得に果たす役割およびその破綻が引き起こす病態を研究することは、自閉症の原因解明につながるのではないかと考えた。本研究では、Neuroligin および Neurexin の、自閉症およびシナプス機能に関連した変異マウスを作成し、これらのシナプス機能を解析し、自閉症の原因解明を目指すと同時に、これらのマウスを自閉症のモデルマウスとして評価・確立することをねらいとする。

2． 研究成果

（1）概要
自閉症モデルとして、自閉症患者から見つかった Neuroligin の細胞内領域の 1 アミノ酸変異を導入した neuroligin-3 R704C KI マウス、Neuroligin の結合相手である Neurexin-3 の KO マウス、Neurexin と Neuroligin との結合特異性を規定することが知られている Neurexin-3 の第4選択的スプライス部位（ss4）の挿入を操作した neurexin-3 ss4KI/KO マウスを新規に作出した。 neuroligin-3 R704C KI マウスのシナプス機能を解析し、海馬で AMPA 受容体機能が選択的に低下していることを見出した。また、以前作成した、Neuroligin の細胞外ドメインの1アミノ

酸変異を導入したneuroligin-3 R451C KIマウスの海馬で、AMPA受容体機能に対するNMDA受容体機能の上昇、NMDA 受容体の NR2B サブユニットの機能亢進、LTP の増強を検出した。これらは幼若なシナプスの特徴であり、シナプスの成熟異常が自閉症の病態モデルの一つである可能性を見出した。

Neurexin-3 KO マウスのシナプス機能を解析し、AMPA 受容体機能が選択的に低下していることを見出した。Neurexin-3 ss4 KI ニューロン（Neuroligin との結合不全型）でも同様の結果を得たが、ss4 KO ニューロン（Neuroligin との結合可能型）では AMPA 機能は正常であった。このことから、シナプス前終末タンパク質である Neurexin が、Neuroligin と結合することにより経シナプス的にシナプス後終末に作用していることが示唆された。（未発表のため詳細省く。）

Neurexin のシナプスでの機能発現のメカニズムを解明する目的で、Neurexin の細胞内領域の構造機能解析を行った。NMR および円偏光二色性スペクトルにより、この領域は天然変性タンパク質の構造を呈し、静電学的に PI(4,5)P2 と結合し、これは PKC による Neurexin のセリンリン酸化によって解除されることを見出した。また、この領域が AP2 タンパク質と結合することを見出した。PKC シグナルが、AP2・PI(4,5)P2 複合体を介した Neurexin のエンドサイトーシスを制御している可能性を考え、現在培養神経細胞の系で解析を行っている。（未発表のため詳細省く。）

（2）詳細

研究テーマA「細胞内領域にアミノ酸変異のある Neuroligin 自閉症モデルの開発」

以前の研究において作成した Neuroligin 自閉症モデルマウスは、Neuroligin-3 の細胞外領域のドメイン内にアミノ酸変異のあるもの（R451C 変異）であった。一方、Neuroligin の細胞内領域は短く、この部位の役割はあまりよくわかっていない。自閉症患者から発見された、Neuroligin の細胞内領域のアミノ酸変異（R704C 変異）のシナプスおよび自閉症の病態に及ぼす影響を細胞外領域のもの（R451C）と比較検討する目的で、この変異を有するノックインマウスを作成し、解析を行った。このマウスは正常に発生・成長し、目立った外見的異常は認められなかったが、R451C 変異マウスとは異なり、海馬において AMPA 受容体機能の低下が認められた。NMDA 受容体機能や、GABA 受容体機能には変化が無かった（論文２）。Neuroligin ファミリータンパク質のうち、Neuroligin-1, Neuroligin-2, Neuroligin-3 がマウスの中枢神経系で強く発現しており、主要なアイソフォームだと考えられている。これらの構

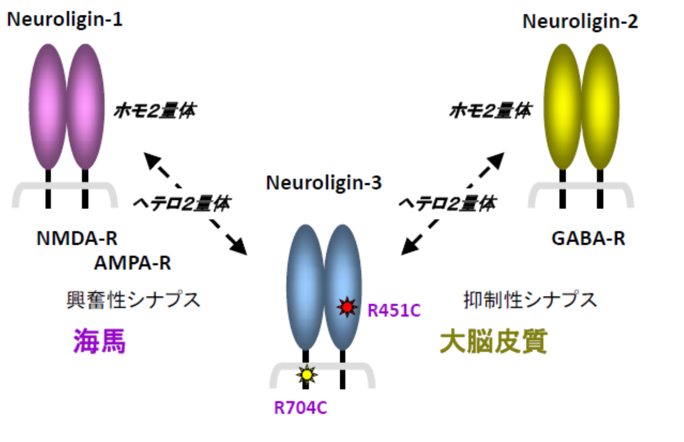


図１：Neuroligin-3の自閉症変異がシナプス異常を引き起こすモデル。

造は高い保存性を有するが、シナプスにおける局在はそれぞれ異なり、Neuroligin−1 は興奮性シナプス後終末、Neuroligin−2 は抑制性シナプス後終末にそれぞれ特異的に局在し、一方、Neuroligin−3 はこの両方に局在している。Neuroligin タンパク質は、2量体として存在し、機能発現するが、Neuroligin−3 は、興奮性及び抑制性シナプスにおいて、それぞれ Neuroligin−1 および Neuroligin−2 とヘテロ2量体を形成することが知られている。これまでの研究で、Neuroligin−3 の欠損マウスでは目立ったシナプス機能の異常は見られないことから、Neuroligin−3 が無くても、Neuroligin−1 及び Neuroligin−2 がそれぞれ興奮性、抑制性シナプス後終末でホモ2量体を形成して正常に機能するが、Neuroligin−3 のアミノ酸置換変異では、この異常な Neuroligin−3 が、Neuroligin−1 及び Neuroligin−2 と異常な2量体を形成し、シナプスに対して異常なシグナルを誘導するのではないかと考えられる。そして、Neuroligin−3 の異なるアミノ酸変異が、Neuroligin2量体のシグナルを異なる形で誘導するために、シナプスにおける効果が異なるのではないかと推測される（図1）。

研究テーマB「細胞外領域にアミン酸変異のある Neuroligin 自閉症モデルの海馬のシナプス機能の解析」

以前の研究において、Neuroligin−3 の細胞外領域のアセチルコリンエステラーゼ様ドメイン内にアミノ酸置換変異のある自閉症変異を導入したノックインマウス（neuroligin−3 R451C KI マウス）では、行動解析の結果、社会的相互作用の障害と、空間学習記憶能力の亢進が見られている。このマウスの大脳皮質では GABA 受容体機能の亢進が認められ、GABA 遮断薬の投与により社会的相互作用の障害が軽減されることから、この変異による GABA 受容体機能の亢進が社会的相互作用の障害の原因になっていると考えられる。一方、このマウスにおける空間学習能力の亢進の原因については未解明であったため、空間学習記憶能力に関係が深いとされる海馬のシナプス機能の解析を行った。電気生理学的解析により、このマウスの海馬の錐体ニューロンでは、抑制性シナプス機能は野生型と比較して変化が無かったが、興奮性シナプス機能に関して、NMDA/AMPA 応答比が上昇しており、LTP の増強もみられた。NMDA 応答の減衰時間が増強していること、NR2B 選択的遮断薬である ifenprodil に対する感受性が増強していることから、NMDA 受容体のサブユニット構成が NR2B 優位になっていることが示唆され、海馬タンパク質のウェスタンブロットでも、NR2B の発現量の増加が検出された（論文3）。海馬錐体ニューロンのシナプスの成熟過程において、幼若な時期は NMDA 受容体が AMPA 受容体に先立ってシナプス後膜に挿入され、このときの NMDA 受容体は NR2B が主体であり、成熟するに従って AMPA 受容体が挿入されると同時に NR2A サブユニット主体

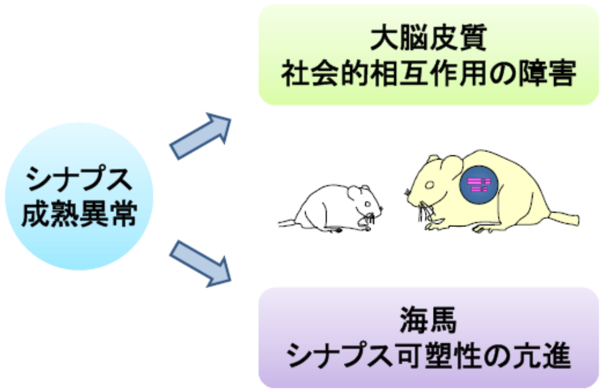


図2：シナプス成熟異常による自閉症の病態モデル。

に置き換わることが知られている。他のグループの NR2B の過剰発現マウスでは、シナプスの可塑性が亢進し、空間学習記憶能力の亢進がみられることから、本自閉症モデルマウスでは、Neuroligin-3 の R451C 変異によりシナプスの成熟が妨げられ、発達に伴って本来獲得すべき社会的相互作用に障害をきたすと同時に、単純な学習記憶能力が亢進するという自閉症の病態を引き起こしているのではないかと示唆される（図2）。

3. 今後の展開

Neurexin の細胞内領域が PI(4,5)P2 と結合し、また PKC によるリン酸化がこの結合を解除することが、シナプスオーガナイズの上でどのような意義を有するのかを研究する。まず、Neurexin のエンドサイトーシスとの関係に着目し、神経培養とレンチウィルスを用いて遺伝子導入の系を組み合わせて解析していく予定にしている。Neurexin と CASK との結合特性についても構造学的な解析を行い、Neurexin が伝達する細胞内シグナルについて解明を行いたい。本研究で作出したモデルマウスについて、可能な限り自閉症関連行動の解析も行いたいと考えている。

4. 自己評価

本研究では、シナプスの主要なオーガナイザーとして知られ、自閉症との関連性が高いことが示唆されている細胞接着因子 Neuroligin および Neurexin に着目して、これらの疾患関連変異および構造特性に基づいた遺伝子改変マウスを作成し、シナプス機能を解析することにより自閉症の原因解明を目指すと同時に、これらのマウスを自閉症モデルとして評価・確立することをねらいとして研究を開始した。これまでのところ、当初予定していた新規系統である neuroligin-3 R704C KI マウス、neurexin-3 KO マウス、neurexin-3 ss4 KI/KO マウスの作出は完了し、これら全てにおいてシナプス機能の解析を開始し、現在までのところ、自閉症の病態モデルに繋がる知見を得ており、この部分に関しては計画通りに進行していると考えている。領域会議でのアドバイザーの先生方や領域メンバーとのディスカッションを通じて、当初の計画の中で、Neuroligin/Neurexin のシナプスにおける分子機能が不明のまま、遺伝子変異の効果について研究するのは不十分であることに気付き、Neurexin の細胞内領域の構造を手掛かりとして、シナプスオーガナイズにおける分子機構の解明を、さきがけテーマとして加えることにした。この結果として、これまでまったく未知であった Neurexin のリン脂質との結合や、リン酸化による制御を発見することができ、これはさきがけ研究に加われたおかげでの、予想外の進展だと考えている。現在、この部分にエフォートを傾けてしまったため、当初予定していたモデルマウスの行動解析が十分に開始できていない。この点に関して、自閉症の原因解明のために役立つアウトプットが得られることを重視して、計画を練り直さなければいけないと考えている。

5. 研究総括の見解

シナプスの主要なオーガナイザーとして知られ、自閉症との関連性が高いことが示唆されている Neuroligin と Neurexin 分子に着目し、これらの病原性変異を導入した遺伝子改変動物を用いた解析を進めている。具体的には、neuroligin-3 R704C KI マウス、neurexin-3 KO マウス、neurexin-3 ss4 KI/KO マウスを作出し、その表現型の細胞レベルでの解析を進め、

neuroligin-3 R704C KI マウスと neuroligin-3 R451C KI マウスでグルタミン酸受容体機能の異常を見出すなどの成果を挙げている。さらに neuroligin の結合相手である neurexin の役割についても解析を進めている。現在やや広がりすぎている感があるが、研究の焦点をよりシャープなものにし、疾患とのつながりの道筋をより明確にすることで、近い将来にこの解析がまとまって責任著者論文が出版され、自閉症のシナプス分子メカニズムが解明されて、治療法の開発に繋がることが期待される。

６． 主な研究成果リスト

（１）論文（原著論文）発表

1. Blundell J, Blaiss CA, Etherton MR, Espinosa F, Tabuchi K, Walz C, Bolliger MF, Südhof TC, Powell CM. Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. J Neurosci. 2010; 30(6):2115-29.

2. Etherton MR, Tabuchi K, Sharma M, Ko J, Südhof TC. An autism-associated point mutation in the neuroligin cytoplasmic tail selectively impairs AMPA receptor-mediated synaptic transmission in hippocampus. EMBO J. 2011; 30(14):2908-19.

3. Etherton M, Földy C, Sharma M, Tabuchi K, Liu X, Shamloo M, Malenka RC, Südhof TC. Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108(33):13764-9.

4. Budreck EC, Kwon OB, Jung JH, Baudouin S, Thommen A, Kim HS, Fukazawa Y, Harada H, Tabuchi K, Shigemoto R, Scheiffele P, Kim JH. Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 110(2):725-30.

（２）特許出願

該当なし。

（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）

（著書）

1. Tabuchi, K.: Neuroligins and Neurexins in Autism. In "TEXTBOOK OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS"ed. E. Hollander, A. Kolevzon and J. T. Coyle, pp.347-352, American Psychiatric Publishing, Inc., Washington, DC, London, England, 2011

（総説）

1. 田渕克彦：シナプス, Neuroligin と自閉症. Cognition and Dementia, Vol.8, No.3, PP.203-208, メディカルビュー, 2009

2. 田渕克彦：自閉症とニューロリギン. Clinical Neuroscience, Vol.27, No.10, PP.1092-1093, 中外医学社, 2009

3. 田渕克彦：Neuroligin.分子精神医学, Vol.11, No.3, PP.207-208, 先端医学社, 2011

4. Deeba Noreen Baig, Toru Yanagawa, Katsuhiko Tabuchi：Analysis of Neuroligin-3 R451C knock-in mice as models for autistic savant.：Japanese Journal of Biological Psychiatry, Vol.23, No.4, 2012

（主要な学会発表）

1. 田渕克彦：自閉症患者から見つかった neuroligin 変異がシナプス機能に及ぼす影響：包括脳ワークショップ, さっぽろ芸文館, 札幌市, 2010

2. 田渕克彦：シナプス機能と自閉症：Neuroligin/Neurexin の役割：包括脳ワークショップ, さっぽろ文芸館, 札幌市, 2010

3. 田渕克彦：細胞接着因子 Neuroligin の 2 種類の自閉症変異がシナプス機能に及ぼす作用の比較：シナプス可塑性の分子細胞基盤研究会, 愛知県岡崎市, 2011

4. 田渕克彦：自閉症関連シナプス接着因子の変異が神経伝達に及ぼす影響：こころの発達と傷害の教育研究コンソーシアム第 2 回公開シンポジウム：東京大学鉄門記念講堂, 東京, 2011

5. 田渕克彦：Neuroligin/Neurexin のシナプスにおける役割と自閉症との関連について：自然科学研究機構プロジェクトシンポジウム「脳神経情報の階層的研究」,岡崎コンフェレンスセンター, 岡崎市, 2012

6. Katsuhiko Tabuchi：Synapse function and autism: The role of Neuroligins and Neurexins：15th Annual Neuroscience Symposium The Korean Society for Brain and Neural Science, ソウル国立大学, 韓国ソウル, 2012

7. 田渕克彦：Neuroligin 変異モデルマウスの解析による自閉症の病態の解明：第 34 回日本生物学的精神医学会, 神戸国際会議場, 神戸市, 2012

8. Katsuhiko Tabuchi：Synapse maturation and autism: The role of Neuroligins and Neurexins：The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, 神戸国際会議場, 神戸市, 2012

研 究 報 告 書

「膜電位の時空間計測における、次世代技術開発」

研究タイプ:通常型
研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月
研 究 者: 筒井 秀和

1. 研究のねらい

脳の中では膨大な数の神経細胞が互いに複雑なネットワークを構築し、情報の保持や処理等を行い、動物の知的で多様な行動の基礎となっている。その動作原理はどのようなものなのか？ある神経細胞の電気活動が、回路への入力（刺激）や出力（行動）の、ある特徴を表現しているように見える場合もあれば、個々の神経細胞は特別な個性を持たず、情報は高度に並列分散的に扱われているように感じられる場合もある。いずれにせよ、そこでの動作原理は、例えば人間が作る機械のものとは本質的に異質なように写る。神経回路研究において、回路を行き来する信号の主要な実体は細胞膜電位である。活動電位、さまざまな周期の閾値下膜電位振動など、多様でダイナミックな電気現象があらゆる細胞で起きているにもかかわらず、それらを、高精度で計測しようとすると、現在の技術では、高々、同時に数個の細胞からの計測に限られてしまう。この点において、より優れた、より強力な細胞膜電位の時空間計測法の開発は、神経回路の動作原理の解明に、決して避けて通れない第一歩であると考える。未知の動作原理に少しでも立ち入ろうとする技術はどうあるべきか？脳神経回路は完成後に突然スイッチが入るわけではなく、個体発生を通じて見れば、発生初期から細胞間の同期した発火やその伝播などの特徴的な電気現象が観察されていて、その時間軸にそった機能発現の過程には、動作原理の解明への糸口となる重要なヒントが隠されている可能性がある。系統発生についても同様で、自然淘汰の選択圧の下、種分化の際にも脳神経回路は常に機能発現を止めることなく複雑・高機能化してきた。脳神経回路の電気的現象を、系統発生を通じて比較研究することで、動作原理の共通項にたどり着ける可能性もある。このような視点に立てば、神経発生における多様な時間軸を通じて、尚且つ、多様な動物種において適用可能な時空間計測法が望まれる。本研究では、ナノスケールで起きる光物理現象や蛋白質と電場の相互作用に関する知見を駆使し、膜電位の時空間計測における次世代技術を開発し、回路研究における生理学的基盤技術の一つとして確立する事を目指す。

2. 研究成果

（1）概要
過去に開発した膜電位プローブ Mermaid を用いて、ゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態を無麻酔・非拘束で非侵襲的に「見る」ことに成功した。抗ヒスタミン系の薬物がゼブラフィッシュにいて心機能障害を誘発する事が知られているが、そのような状態での電気的興奮の伝播の様式が、正常時とは明らかに異なるモードになっている事が分かり、このような光学的手法の持つ可能性が示された。

Mermaid はこのように心臓の膜電位動態を可視化したが、神経系に適応するにはさらなる革新が望まれた。ここで蛋白質の機能について一般的に言えることであるが、膜電位プローブにおいても僅かな変異や設計の変更はしばしば予期せぬ効果を持つ。膜電位プローブの特性を向上させるには、多数の候補プローブの特性を効率よく、迅速に評価する必要がある。電気生理学的測定は正確な計測が可能であるが多数のサンプルには適していない。そこで細胞外電場に対する誘起膜電位（field-induced potential）の空間分布を利用した効率的な評価法を確立した。

この評価法を用いる事で、電位センサードメインの状態遷移に関連した新しい知見を得る事ができた。すなわち、従来まで、電位センサードメインの4つの膜貫通セグメント（S1-S4）の内、状態遷移時においては S4 が主要な構造変化を示すと考えられてきたが、S4 のみならず S1 も匹敵する構造変化を行う可能性が示された。この可能性は別の詳しい一連の光学的計測によっても支持された。

この知見を利用して、膜電位プローブの高速・高感度化を試みた。電位センサードメインの S1、S4 に蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）のドナー・アクセプターをそれぞれ配置する事で、膜電位変化により誘起される電位センサードメインの状態遷移をより高速に、大きな信号変化として検出できる事を見出した（膜電位プローブ Mermaid2 の開発）。

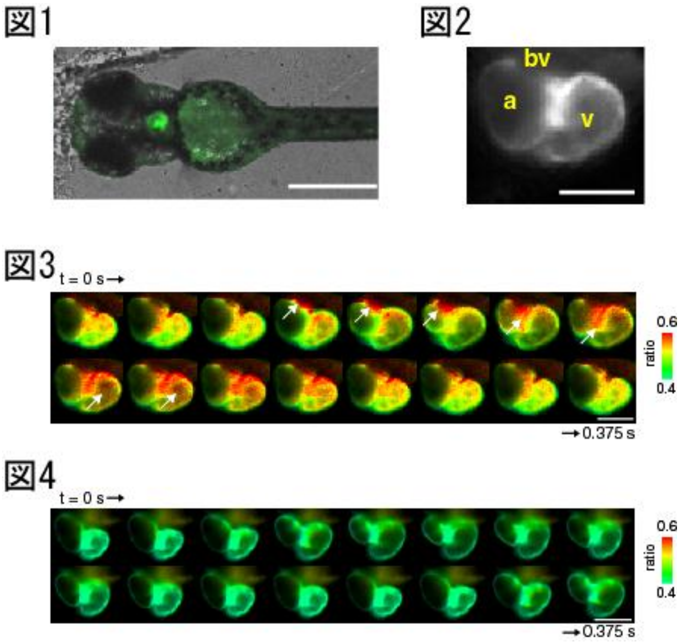
（2）詳細

A.ゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態

ゼブラフィッシュは、遺伝子操作技術が確立されている事、幼魚では細胞や組織の観察が生きたまま可能な事、発生が速く進む事、飼育コストが比較的安い事、等々のモデル脊椎動物としての利点を持ち、それらは心臓研究においても発揮されてきた。また、近年は、損傷後に再生がおきる事や、個体を用いた大規模スクリーニングへの適合性などのユニークな点にも注目されてきている。開発してきた膜電位プローブ、Mermaid を用いて、ゼブラフィッシュ心臓の電気活動を非侵襲的に「見る」ことを試みた。まず、心筋細胞で特異的に Mermaid を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ cmlc2::Mermaid を作成した（図 1,2）。標本には受精後 70-80 時間後の胚を用いた。ガラスボトムディッシュ上に寒天で小さな凹みをつくり、その中で泳がせ、腹側から観察した。この時期の胚の泳ぎは間欠的であるため、無麻酔、非拘束という極めて生理的な状態で心臓の膜電位動態を見る事が出来た。4～5Hz で起きる収縮サイクルにおいて、最初の脱分極は心房と血管の境界部付近で起こり、それが心室へと伝播していくようなレシオ画像の時系列が見えた（図 3）。モーションアーティファクトなど、偽陽性信号有無を調べるために、Mermaid D129R という電位依存性が消失している変異体（ネガティブコントロールプローブ）を発現したトランスジェニックゼブラフィッシュも同様に作成した。心収縮を観察すると、今度はほとんどレシオ変化がみられず、cmlc2::Mermaid のレシオ変化の大部分は膜電位を反映したものであるとわかった（図 4）。

アステミゾールという、第二世代のヒスタミン H1 受容体拮抗薬がある。QT 延長などの副作用を持つことが明らかとなり市場撤退した薬物で、ゼブラフィッシュに投与した場合も心臓の機能障害を引き起こす事が知られている（但し、薬理作用も同一かについてはまだ解明されていない）。アステミゾール投与が膜電位動態に与える影響を調べた。投与前は前述同様、

心房−血管の接合部から心室に膜興奮の正常な伝播が観察された。アステミゾール投与後、心室の収縮が欠如している状態においては、驚くべき事に、最初の電気的興奮が、心房、心室の境界付近で発生し、心房方向に逆伝播しているような結果が得られた。投与前の正常な収縮サイクルでは、心房−心室境界部、及び、心室での蛍光レシオのピーク時間は、心房でのピーク時間に比べて、それぞれ、57 ± 6.2 ミリ秒、及び、85 ± 6.2 ミリ秒 “遅れて”いた。これに対し、アステミゾール投与後の、心室収縮が阻害されている心臓では、52 ± 4.9 ミリ秒、及び 95 ± 4.3 ミリ秒“進んで”いた（n=5, 平均値 ± 標準誤差）。このように、mermaid を用いた膜電位イメージング技術を用いて、ゼブラフィッシュの心臓の薬剤誘発性心機能障害における異常な興奮伝播のモードが明らかとなった。前述のように、ゼブラフィッシュの心臓は、心臓機能に関わり、哺乳類のものと相同性の高い重要な分子を多く発現しながら、低コスト、高い透明性、遺伝子操作性、マイクロウェルに収まる“小ささ”、などを兼ね備えた優れた材料である。また、損傷後の再生が起きる事は特有の現象で、興味深い。拍動している心臓の電気発動を“見える”ようにすることで、心臓の生理、発生、薬理学の発展につながることが期待された（論文 1）。



（図1）作成したトランスジェニックゼブラフィッシュの FRET ドナー蛍光像。（図2）心臓の蛍光像 a; atrial v; ventricle; bv; blood vessel。（図３）心臓における蛍光レシオ画像。拍動１周期について示してある。赤い領域は脱分極している事を示す。（図４） D129R 変異体の場合における蛍光レシオ画像。Bar = 0.5mm（図１), 0.1mm（図 2−4）

B.. 光学信号の高効率アッセイ系の確立

細胞外に電場をかけることで誘起される “field-induced potential ($\Delta\Psi$)” の空間分布を利用することで、電気生理学的な計測を行うことなく、候補プローブの定量的な特性を効率的に調べる手法を確立した。N2a 細胞（マウス神経芽腫由来細胞株）にリポフェクションにより遺伝子導入を行い、その後、ガラス基盤上に接着させた。ほぼ球形の細胞を用い、電場印加に対する光学信号の電極との角度依存性を解析する。ここで、実際の電位センサードメインが「感じる」のは、・・ではなく、静止膜電位＋・・であるが、細胞ごとの静止膜電位のばらつきが問題となった。安定的に内向き整流性カリウムチャネルを発現する細胞株を作ることで、この問題

を解決することが出来た。single shot で、電位依存性や細大応答などが、約 10mV 以下の誤差範囲のもと、効率的に解析できるようになった。この方法を用いる事で、例えば、電位センサードメイン上において、膜電位プローブの電位依存性に影響を与えるアミノ酸変異などが発見された（論文投稿中）。

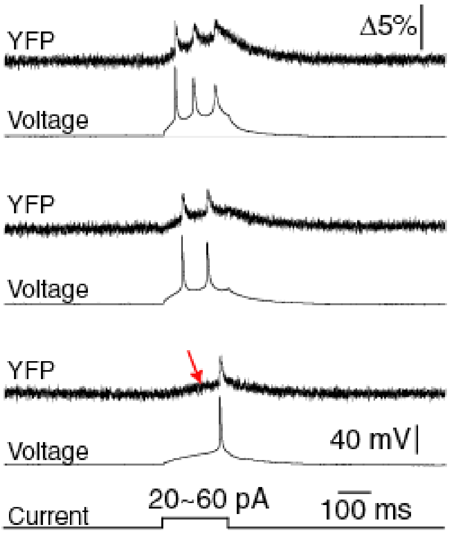
C. 電位センサードメインの状態遷移機構

従来、電位センサードメインが、その構造変化を伝える主要な部位は S4 の下流と考えられていたが、S1 の上流に FRET レポーターを付加したコンストラクトの光学信号を上記 B で開発した手法を用いて解析したところ、予想に反して、電場印加に応じて FRET 効率の変化が検出された。同様の結果はツメガエル卵母細胞の発現系でも得られた。さらに同様の現象は、FRET レポーターではなく、テトラメチルローダミン（TMR）の環境依存性に基づく計測法によっても観察され、一般的に観察される現象であることを示していた。これらの結果は、電位センサードメインの状態遷移による構造的摂動は S1 の上流にも及びうる事を初めて示すものであり、電位依存性チャネルの動作原理を考える上でも重要な知見となり得る（論文投稿中）。

D. 高速・高感度型の膜電位プローブ mermaid2 の開発

C で得られた電位センサードメインに関する新しい知見を元に、S1 の上流、S4 の下流にそれぞれ FRET ドナー・アクセプターを配置することで、高速・高感度型の膜電位プローブ mermaid2 を開発した。N2a 細胞における Mermaid2 の信号は、Mermaid に比べて、信号変化量で１．８倍、時定数で７．７倍向上していた。このようにして得られた新たなプローブ mermaid2 を用いる事で、時間平均加算することなく、150Hz までのスパイク列において個々のスパイクを分解する事、海馬神経細胞における単一スパイクや閾値下の膜電位現象を捉える事（図５）、そしてマウス大脳皮質における聴覚刺激に対する応答を可視化する事に成功した（論文投稿中）。

図5



（図 5）海馬神経細胞における電気生理学計測と Memaid2 の光学信号の同時計測の例。赤矢印は閾値下の電位応答を示す。

3.　今後の展開

これまで多くの動物種から、電位依存性フォスファターゼに由来する電位センサードメインの単離を行ってきた。確立した光学信号の高効率アッセイ系を利用して、その特性の種多様性について明らかにする。結果を元に、最適な電位センサーを用いる事により、現在の Mermaid2 を、さらに高速・高感度化できると考えている。マウス大脳皮質もしくは小脳における自発的、刺激誘発性の電気活動等を高解像度で解析することを目指す。また、電位センサードメインの状態遷移機構の詳細を解明する事は、膜電位の時空間計測技術の開発に繋がる可能性があるばかりでなく、イオンチャネルなど電位センサードメイン蛋白質の機能発現を分子レベルで理解する上でも重要である。これまでに S4 のみならず、S1 においても構造変化の可能性がある事を発見してきたが、独自に開発する分光法を用いることで、膜貫通セグメントの回転運動など、状態遷移機構のより詳細に迫る事も目指す。

4.　自己評価

Field-induced potential を利用した光学信号の高効率アッセイ系の確立が、電位センサードメインの状態遷移機構に関する新しい知見の発見のきっかけとなり、さらにその知見は時空間計測法の高速・高感度化へと繋がった。このように極めて基礎的な部分から膜電位の可視化技術の向上に取り組もうとする精神は、当初のねらいに沿っていると考える。得られた結果は今後はより迅速に発表して、他の研究者と共有し、分野の発展に貢献する必要があると反省している。これまで電位センサードメインの状態遷移の光学検出というアプローチで膜電位の可視化法の研究を行ってきた。この方向性は今後も追及してゆくが、それ以外に、まったく新しい検出原理の探求を続けることも常に視野に入れておきたい。

5.　研究総括の見解

神経回路を伝搬する信号の実体は細胞膜電位変化であり、これを高速高感度で時空間計測する技術の開発は重要である。このために開発した膜電位依存性蛍光電位プローブ蛋白質 Mermaid を用い、これを心筋細胞で発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作出し、無麻酔非拘束非侵襲的に心臓の鼓動にともなう電位の空間変化を計測することに成功したことは評価できる。また、さらに電位プローブの高速化高感度化をすすめ、反応速度、感度ともに格段に優れた機能を有するプローブ Mermaid2 の解発に成功した。これを用いて海馬神経細胞における活動電位や閾値下の膜電位、そして大脳皮質における聴覚刺激に対する応答を可視化する事にも成功している模様であり、当初の目標に近づきつつある。今後、プローブのさらなる高機能化と同時にまずは適切な脳内の神経回路に応用することにより、これが汎用性の高い技術として確立されることが期待される。

6.　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Tsutsui, H., S. Higashijima, A. Miyawaki, and Y. Okamura, Visualizing voltage dynamics in zebrafish heart..Journal of Physiology, 2010. 588: p. 2017-21.
2. Tian, Q., M. Oberhofer, S. Ruppenthal, A. Scholz, V. Buschmann, H. Tsutsui, A. Miyawaki, A.

Zeug, P. Lipp, and L. Kaestner, Optical action potential screening on adult ventricular myocytes as an alternative QT-screen. Cellular Physiology and Biochemistry, 2011. 27(3-4): p. 281-90.

(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）

生体の科学 64 （2013） 47-51 筒井秀和

膜電位の可視化

日本薬理学雑誌 138 （2011） 234-238, 筒井秀和・東島眞一・宮脇敦史・岡村康司

ゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態を可視化する

Tsutsui, H., FRET sensing of transmembrane voltage.

Gordon Research Conference on Bioelectrochemistry （招待講演）

Lucca, Italy, July 1-6, 2012

Tsutsui, H., FRET Probing of Membrane Voltage

Janellia Farm Voltage Imaging Workshop （招待講演）

Janellia Farm Research Campus, USA, Nov 1-7; 2009

Tsutsui, H., S. Karasawa, A. Miyawaki, Y. Okamura

Membrane potential measurements with engineered FRET sensor

The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences;

Kyoto, Japan; Jul 27-Aug 1, 2009

Tsutsui, H., S. Karasawa, A. Miyawaki, Y. Okamura

Membrane potential measurements with engineered FRET sensor

53rd Biophysical Meeting,

Boston USA, Feb 28-Mar 4, 2009

Voltage sensing phosphatase as molecular tools

神経科学会シンポジウム 名古屋

2012 年 9 月 18～21 日

蛍光蛋白質を用いた計測と操作

光操作研究会 岡崎

2010 年 9 月 9～10 日

FRET sensing of transmembrane voltage
九州大学イメージングワークショップ
2010 年 8 月 17～18 日

FRET-sensing of membrane voltage
生化学会イメージングワークショップ
2009 年 10 月 21 日

Sensing membrane voltage with voltage sensitive phosphates
and new coral fluorescence proteins
神経科学会 シンポジウム
2009 年 9 月 16～18 日

Establishment of transgenic mice expressing calcium sensor Yellow Cameleon 2.60 and applications to analysis of the thalamocortical pathway
Satoshi Kuroki, Takayuki Michikawa, Satoshi Manita, Hidekazu Tsutsui, Satoshi Shimozono, Masanori Murayama, Atsushi Miyawaki, Shigeyoshi Itohara
神経科学会会 名古屋 2012 年 9 月

Rapid evaluations of optical voltage reporters using filed-induced transmembrane potential responses
Hidekazu Tsutsui, Yasushi Okamura
生理学会 東京 2013 年 3 月

Physiological Genomics of Amphibian VSP：A Potential Molecular Mechanism of Electrical Block of Fertilization in Vertebrates
Joshua Mutunga Mutua、Yuka Jinno、Shuichi Ueno、Souhei Sakata、Yoshifumi Okochi、Hidekazu Tsutsui、Yasuhiro Iwao、Laurinda Jaffe、Yasushi Okamura
生理学会 東京 2013 年 3 月

研 究 報 告 書

「脳内分子変化と電気生理学的・行動学的変化の統合解析」

研究タイプ：大挑戦型

研究期間： 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月

研 究 者： 山口 瞬

1． 研究のねらい

さまざまな脳機能は、それぞれに対応した特定の神経回路の働きによって動作している。記憶・学習や一部の感覚情報処理では、それらを担う神経回路内で、神経細胞間の伝達効率が可塑的に変化することが重要だと考えられている。長期的な伝達効率の変化は、活性化された神経細胞内で一群の遺伝子が誘導され、それらの産物がシナプス部の構造（分子レベルの構造を含む）を変化させることによってもたらされると考えられている。

記憶・学習など可塑的変化を伴う脳機能のメカニズムを解明するには、そのような分子レベルの変化や電気生理学的変化が脳のどこでいつ生じるのかを明らかにする必要がある。しかし、これまで個々の記憶・学習課題などに対応した分子・電気生理学的変化が、どこでどのようなタイミングで生じるのかについて、ほとんど明らかにされていなかった。その大きな原因として、個々の記憶・学習課題などに対応した分子・電気生理学的変化が微小であり、別個体を比較するこれまでの実験手法では捉えにくかったことが挙げられる。

本研究では、研究者らが開発した *Arc-dVenus* マウス（記憶・学習や感覚情報処理に際して誘導される *Arc* 遺伝子の発現に伴い蛍光蛋白質 dVenus が発現するトランスジェニックマウス）を用いて、遺伝子発現の変化を in vivo で経時的にモニタリングし、個々の記憶・学習課題や感覚情報処理によって生じた微小な分子変化を捉えることを目指した。さらに電気生理学的変化や行動学的変化も同時に記録し解析することで、分子（遺伝子）変化・電気生理学的変化・行動学的変化の間に存在する法則性を明らかにし、脳機能の動作原理に迫ることを目指した。

また記憶・学習等に障害がある種々のミュータントマウスでも解析し、それらの機能障害の原因となる脳の責任部位の同定や病態のメカニズムについても明らかにすることを目指した。

大挑戦型としては特に、完全な自由行動下で遺伝子発現と電気生理学的変化と行動学的変化を同時に記録・解析できる系の確立を目指している。

2． 研究成果

（1）概要
無麻酔・自由行動下で *Arc* 遺伝子発現をモニタリングする系の開発を目指した。二つの異なるアプローチ、すなわち(i)小型 CCD カメラを用いた新規 in vivo イメージング装置の開発、(ii)既存の二光子励起顕微鏡を利用した in vivo イメージング法の開発、で系の完成を目指した。前者のアプローチでは、小型 CCD カメラを使った試作機を作製し、現在 *Arc-dVenus* マウスの頭に装着する手法を検討している段階である。後者のアプローチでは、大脳皮質視覚野において、視覚刺激によって蛍光が誘導された多数の神経細胞を観察することができた。イメージングの際にマウス頭部を顕微鏡下に固定しているため、完全な自由行動下での連続イ

メージングではないが、それに近い条件でのデーター採取に成功したと考えられ、*Arc-dVenus* マウスに対して二光子励起顕微鏡を用いた in vivo イメージングを行う方法が極めて有用であることを示した。

電気生理学的変化のモニタリングを行うため、脳波のテレメトリー記録装置を導入した。

行動学的変化のモニタリングを行うため、ビデオモニタリングシステムを導入した。

以上のように、自由行動下でのモニタリングに関して、遺伝子発現は二光子励起顕微鏡を用いてかなりの程度可能になっている。脳波レベルの電気生理学的変化と行動学的変化は、それぞれテレメトリーシステムとビデオシステムを用いて完全に可能となっている。

Arc-dVenus マウスの脳で二光子励起顕微鏡を用いた in vivo イメージングを行い、視覚刺激を与えた場合の大脳皮質視覚野神経細胞の反応パターンを明らかにした。さらに、同様の実験をアルツハイマー病モデルマウスにおいても行い、アルツハイマー病に特徴的な機能異常のパターンを明らかにした。今後、in vivo イメージングで個々の神経細胞の反応パターンを解析する方法は、種々の脳疾患において、病態や治療効果を解析する重要なパラダイムとなる可能性がある。本成果はその端緒を開くものとして位置づけられる。

Arc-dVenus マウスと種々の脳機能障害のあるミュータントマウス（*alpha-CaMKII* ヘテロノックアウトマウスや *Schnurri-2* ノックアウトマウス）を交配し、蛍光シグナルを解析した。それぞれのマウスの脳で著明に蛍光が低下し機能低下を示す領域があることを明らかにした。

（2）詳細

研究テーマ A「脳内遺伝子発現（転写）の in vivo モニタリング法の開発」

無麻酔・自由行動下のマウスにおける *Arc* 遺伝子発現のモニタリングシステムの開発を目指した。

(i) 小型 CCD カメラを用いた新規 in vivo イメージング装置の開発：

完全な自由行動下での *Arc* 遺伝子発現のモニタリングを実現するため、*Arc-dVenus* マウスに装着して用いる新たなイメージング装置の開発を目指した。種々のタイプのイメージング装置を考案し、作製の難易度や必要なコスト、使いやすさ等を検討した結果、*Arc-dVenus* マウスの頭に直接 CCD カメラを装着する方式の装置を製作することにした。

光学的な設計後、小型 CCD カメラを用いた試作機を作製した。この試作機では励起光が光ファイバーの先端から円錐状に広がって対象面（脳表面）に照射されるため、対象面では中心部が明るく辺縁部で暗くなる問題点があった。そこでそれを補正するためのプログラムを開発した。

現在、この試作機をマウスの頭に装着するための方法を模索、検討している段階である。イメージング装置の重量がマウスではかなりの負担になるため、*Arc-dVenus* マウスの代わりに同様のコンストラクトで作製したトランスジェニックラット（下記の *Arc-dVenus-3'* ラット）の使用も検討している。

(ii) 二光子励起顕微鏡を利用した in vivo イメージング法の開発：

上記の小型 CCD カメラを用いた in vivo イメージング装置の開発と並行して、二光子励起顕微鏡を用いた in vivo イメージングも行い、その有用性について検討した。

まず二光子励起顕微鏡を用いて、視覚刺激に対する大脳皮質視覚野の反応を観察した。大脳皮質視覚野では、眼から入った視覚刺激に対応して *Arc* 遺伝子が誘導されることが知られている。*Arc-dVenus* マウスを 60 時間真っ暗な部屋に置いたのち縦縞模様のあるシリンダー内に 1 時間入れ視覚刺激を与えた。二光子励起顕微鏡を使って in vivo イメージングを行うと、特に内側二次視覚野の第 II/III 層で、刺激によって蛍光が誘導された多数の神経細胞を観察することができた（論文 3）。

この実験ではイメージングの際にマウス頭部を顕微鏡下に固定している。したがって完全な自由行動下での連続イメージングではないが、それに近い条件でのデーター採取に成功したと考えられ、*Arc-dVenus* マウスに対して二光子励起顕微鏡を用いてイメージングする方法が極めて有用であることを示した（論文 3）。

この実験系を用いて、正常な脳における反応パターンのみならず、アルツハイマー病モデルマウスの脳における反応パターンも解析し、アルツハイマー病で見られる機能異常のパターンを明らかにした（論文 3, 研究テーマ E, F 参照）。

(iii) イメージングのための新たなトランスジェニック動物の作製：

Arc-dVenus マウスではレポーターの消退に時間がかかり、時間分解能があまり良くないという欠点があった。それを改善するため、mRNA の分解促進配列を含む *Arc* 遺伝子の 3'－非翻訳領域をレポーター遺伝子に付加しトランスジェニックマウス・ラットを作製した（*Arc-dVenus-3'* マウス・ラット）。

また脳の深い部位でのイメージングを可能にするため、赤色蛍光蛋白質や MRI で検出可能な蛋白質をレポーターに使ったトランスジェニックマウスを作製した。現在これらの有用性を解析中である。

研究テーマ B「電気生理学的変化・行動学的変化のモニタリング法の開発」

(i) 電気生理学的変化のモニタリング法の開発：

脳波をモニタリングするため、マウス頭部に付けた送信機からデーターをテレメトリーで記録装置に送るシステムを導入した。

また、in vivo でのモニタリングではないが、電気生理学的変化と *Arc* 遺伝子発現や行動学的変化との関係性を調べる有効な方法として、脳スライスを用いた実験法を開発した。この方法が有用であることを示した一例として、恐怖条件付け課題の実験が挙げられる（主要な学会発表 1）。この実験では、*Arc-dVenus* マウスに恐怖条件付け課題を行わせ、後日、恐怖を誘導するような条件に曝した後、脳を取り出し、扁桃体を含むスライスを作製した。そして蛍光シグナル(+)の扁桃体ニューロン（恐怖条件付けによって *Arc* が誘導されるようになったニューロン）と蛍光シグナル(−)の扁桃体ニューロンのそれぞれを電気生理学的に計測し、その特性に差があることを見出した（主要な学会発表 1）。

(ii) 行動学的変化のモニタリング法の確立：

行動学的変化を記録するため、ビデオモニタリングシステムを導入した。また記憶・学習課題として用いることができるよう恐怖条件付けや八方向放射状迷路、十字迷路の装置を導入した。

研究テーマ C「脳内遺伝子発現・電気生理学的変化・行動学的変化の同時モニタリング法の開発」

上述の通り、自由行動下でのモニタリングに関して、遺伝子発現は二光子励起顕微鏡を用いてかなりの程度可能になっている。脳波レベルの電気生理学的変化と行動学的変化は、それぞれテレメトリーシステムとビデオシステムを用いて完全に可能となっており、これらを併用することで同時モニタリングは可能である。現在、脳波レベルではなく、個々のニューロンの電気生理学的変化を解析するため、カルシウムイメージングやテトロード(カルシウムイメージングとの併用)を用いた記録法の導入を検討している。

研究テーマ D「転写以外の遺伝子発現変化のモニタリング法の開発」

Arc mRNA には活性化シナプス近傍へ運ばれる特性がある。*Arc* 遺伝子の 3'−非翻訳領域を用いてトランスジェニックマウス・ラットを作製し、レポーターmRNA が活性化シナプス近傍に運ばれるようにすることに成功した(未発表データー)。今後、活性化シナプスの可視化に利用できないか検討する。

研究テーマ E「正常な記憶・学習、感覚情報処理のメカニズムの解析」

(i) 視覚刺激を反復して与えた場合の反応:

縦縞模様による視覚刺激を反復して与えた場合の大脳皮質視覚野神経細胞の反応を、二光子励起顕微鏡による in vivo イメージングで調べた。1 回目と 2 回目の刺激、両方で蛍光が誘導された神経細胞は、それぞれの回に蛍光が誘導された神経細胞のうち約半数であった。蛍光強度と再活性化の割合を調べてみると、1 回目に蛍光が強く誘導された神経細胞ほど 2 回目の刺激でも蛍光が誘導される割合が高いことがわかった。このことは、Arc が誘導された神経細胞はその後の刺激によっても活性化されやすくなることを示唆している(論文 3)。すなわち Arc は神経細胞が再活性化されやすくするような可塑的変化をもたらすのではないかと考えられた。

(ii) 海馬歯状回顆粒細胞への視覚情報の伝達:

Arc-dVenus マウスに対して交連線維切断手術を行い、左右の脳半球間の情報の伝達について調べた。その結果、正常であれば本来、一側の眼からの視覚情報は交連線維を介して両側の海馬歯状回へと伝わり、一部の顆粒細胞を活性化して *Arc* を誘導していることを明らかにした(論文 2)。

研究テーマ F「脳機能障害のメカニズムの解析」

(i) アルツハイマー病モデルマウスにおける機能障害:

Arc-dVenus マウスとアルツハイマー病モデルマウス(*APP/PS1* マウス)を交配し、得られたマウスを二光子励起顕微鏡で in vivo イメージングした(図 1, 論文 3)。縦縞模様で視覚刺激し、内側二次視覚野における活性化パターンを正常と比較した。その結果、アミロイドプラーク(老人斑)の近傍では活性化される神経細胞の数が著明に減少していることを見出した。その一方で、アミロイドプラーク近傍には過剰に反応する少数の細胞群が存在す

ることも見出した（図 2）。また同じ視覚刺激を反復して与えた場合、正常では 1 回目に蛍光が強く誘導された神経細胞ほど 2 回目の刺激でも蛍光が誘導される割合が高かったが、アルツハイマー病モデルではその対応関係が崩れていることも見出した。以上のような特徴的な神経細胞の機能障害のパターンが存在することを明らかにした（論文 3）。

今後、in vivo イメージングで個々の神経細胞の反応パターンを解析する方法は、アルツハイマー病を始めとした種々の脳疾患において、病態や新たな治療法（新薬など）の効果を解析する重要なパラダイムとなる可能性がある。本実験による成果はその端緒を開くものである。

図 1

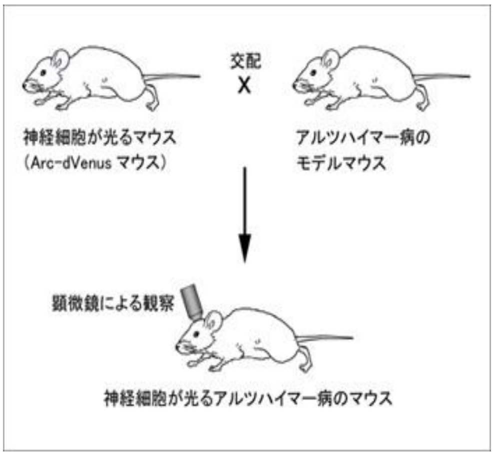
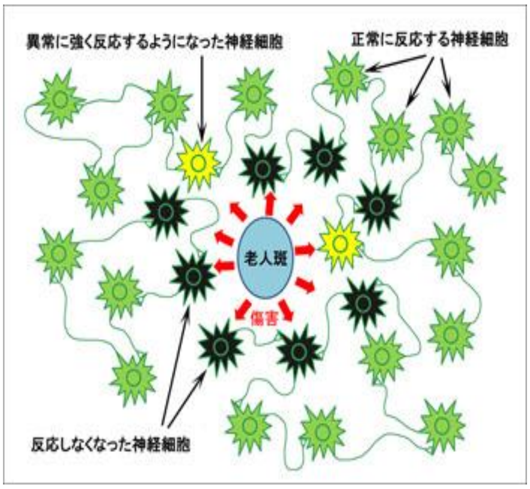


図 2



(ii) 種々のミュータントマウスにおける機能障害：

alpha-CaMKII 遺伝子のヘテロノックアウトマウスでは空間作業記憶に障害がみられる。このマウスと *Arc-dVenus* マウスを交配し、得られたマウスの脳を切片にして蛍光シグナルを解析した。その結果、海馬歯状回で著明な蛍光の低下を認め、この領域に明らかな機能障害があることを明らかにした（論文 1）。

Schnurri-2 遺伝子のノックアウトマウスでは、空間作業記憶の障害や活動の亢進、社会性行動の低下、痛覚の低下がみられる。このマウスでも同様に解析した結果、海馬歯状回や扁桃体、大脳皮質の複数の領域で蛍光が著明に低下していることを見出した（論文 4）。

このように *Arc-dVenus* マウスと種々のミュータントマウスを交配し、脳切片で蛍光シグナルを解析する方法は、それらミュータントマウスの機能障害部位を同定する強力な手段になりつつある。

3.　今後の展開

無麻酔・自由行動下での *Arc* 遺伝子発現モニタリングについては、新規開発した in vivo イメージング装置の系の確立を図るとともに、二光子励起顕微鏡を利用した in vivo イメージング法での系の発展を目指す。具体的には二光子励起顕微鏡による in vivo イメージングとバーチャル迷路システムを併用した、より自由行動に近い状態でのモニタリングを目指す。

電気生理学的変化のモニタリングに関しては、脳波だけでなく、個々のニューロンの電気活

動を解析するため、カルシウムイメージングを用いた記録法を導入することを検討している。また in vivo のモニタリングではないが、上述の、行動実験後に脳スライスを作製し電気生理学的に調べる方法は、現在順調にデーターが出ており、今後さらに積極的に進めていく予定である。

また解析対象として、視覚以外の感覚や、より複雑な脳機能（種々の記憶・学習課題など）を取り上げ、それらにおける神経細胞の反応パターンを明らかにしていく。またアルツハイマー病以外の種々の脳疾患について、その病態を個々の神経細胞の反応性を指標とした解析で明らかにしていく。

4.　自己評価

現在までに、自由行動下での遺伝子発現モニタリングは、二光子励起顕微鏡を用いてかなりの程度達成された。しかし当初の目標である完全な自由行動下での連続モニタリングにはさらなる系の発展が必要であり、今後の目標としたい。

Arc 遺伝子発現の変化と電気生理学的変化の対応関係については、まだ明らかにできていない。in vivo で個々の神経細胞の *Arc* 遺伝子発現と電気活動を同時にモニタリングするにはカルシウムイメージングなどを併用する必要があるが、技術的に難しくまだ達成できていない。しかし、行動実験後に脳スライスを作製し、*Arc* 発現と共に電気生理学的特性を調べる方法では、現在順調にデーターが出ており、*Arc* 発現と電気生理学的変化の対応関係について、かなり明らかにできると思われる。今後積極的に進める一つの方向性としたい。

5.　研究総括の見解

脳神経回路の特性はその活動にともなう遺伝子発現の変化によって変化してゆく。そのような遺伝子発現と活動特性の変化を in vivo で観測記録しようとする大胆な発想で、脳内の神経細胞の遺伝子発現を光学的にモニターするための小型 CCD カメラの開発を進め、照射強度補正法などの関連技術を開発し、マウス頭部への装着方法等を検討してきたことは評価される。また CCD カメラを用いる方法を補完する二光子顕微鏡観察を用いる方法も開発した。一方、*Arc-dVenus* マウスを用いた共同研究を積極的に展開し、アルツハイマーモデルマウスとの交配による老人斑近傍の神経細胞活性化パターンの病的変化の解明、空間作業記憶の低下の見られる *alpha-CaMKII* 遺伝子のヘテロノックアウトマウスの海馬歯状回の機能の異常の検出にも成功している。今後は、計画しているカルシウムイメージング・脳波テレメトリをも組み合わせた観測システムの構築、およびより高度なレポーターを組み込んだ遺伝子改変マウス／ラットの作出が成功するとともに、多岐に亘っている現在の研究の焦点がもっと明確なものになることで個人研究としての独創性が発揮され、責任著者論文が出版されることが期待される。

6.　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Matsuo N., Yamasaki N., Ohira K., Takao K., Toyama K., Eguchi M., Yamaguchi S., Miyakawa T. Neural activity changes underlying the working memory deficit in alpha-CaMKII heterozygous knockout mice. Front Behav Neurosci. 2009, 3(20), 1-10

2. Shinohara Y., Hosoya A., Ahmed H., Yamasaki N., Hattori S., Eguchi M., Yamaguchi S., Miyakawa T., Hirase H., Shigemoto R. Right-hemispheric dominance of spatial memory in split-brain mice. Hippocampus. 2012, 22(2), 117-121
3. Rudinskiy N., Hawkes J.M., Betensky R.A., Eguchi M., Yamaguchi S., Spires-Jones T.L., Hyman B.T. Orchestrated experience-driven Arc responses are disrupted in a mouse model of Alzheimer's disease. Nat Neurosci. 2012, 15(10), 1422-1429
4. Takao K., Kobayashi K., Hagihara H., Ohira K., Toyama K., Shoji H., Nakamura H.K., Hattori S., Koshimizu H., Umemori J., Esaki K., Yamaguchi S., Furuya S., Takagi T., Walton N., Hayashi N., Suzuki H., Matsumoto M., Ishii S., Miyakawa T. Deficiency of Schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. Neuropsychopharmacology. 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）

1. Nomura H., Toyoda T., Miura Y., Imamura N., Shimagami H., Hashikawa K., Eguchi M., Yamaguchi S., Ikegaya Y., Matsuki N. Fear conditioning increases transmitter release to specific subsets of basolateral amygdala neurons. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 17 September 2012, Yokohama
2. Yamaguchi S., Megumi E. A transgenic mouse line that allows fluorescence imaging of brain function. Biotech 2012, 27 April 2012, Tokyo
3. 「マウス脳細胞　動き"見える化"」 アルツハイマー解明に一歩
中日新聞　2012 年 9 月 12 日朝刊
4. 「『アルツハイマー』脳神経細胞」 異常な活動　視覚化
読売新聞 2012 年 9 月 26 日朝刊
5. 「アルツハイマー病の脳神経細胞異常活動状態を視覚化」
TBS テレビ　みのもんたの朝ズバッ！　2012 年 9 月 28 日