

「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 27 年度終了研究課題—

研究総括 村上 富士夫

1. 研究領域の概要

本研究領域は、脳の統合的理解を目指し、新たな視点に立って脳を構成する神経回路の形成やその動作原理ならびにその制御機構の解明に挑戦する研究を対象とします。具体的には、神経回路や脳の機能単位である神経核・層構造の形成、領域や神経細胞の特異性の獲得、単一神経細胞における情報処理、神経細胞間の情報伝達やその可変性、神経細胞のネットワークとしての機能発現や可変性、さらには複雑なネットワークの集合体である領域・領野等の形成機構および動作原理、ネットワークの制御機構の研究を対象とします。また、グリア細胞など神経細胞以外の神経系の細胞の役割や、神経細胞数の維持の機構に関わる研究も含みます。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. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 5件(内、大挑戦型1件)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1) 選考は、「脳神経回路の形成・動作と制御」領域に設けた選考委員13名の協力を得て、研究総括が行う。

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、選考方針検討会を開いて検討し、さきがけ共通の選考基準(URL:

<http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html>)の他、以下の点を重視した。

提案が独創性の高いものであり、提案者自身の着想であることを特に重視し、

また分野・研究環境に関して採択課題に偏りがなく、多様性を持つよう配慮する。

さらに提案者の性別あるいは実施場所の国内外を問わない。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー14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、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ1課題を推薦した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数			
			15 件	内 訳	3年型	12 件(1 件)
対象数	210 件	33 件			5年型	3 件(0 件)

()内は大挑戦型としての採択数。

備考:

1)平成 22 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・山東信介研究者、杉山清佳研究者

最先端・次世代研究開発支援プログラムに採択され、研究を中断したため。

2)加えて、以下を今年度の事後評価対象とする。

・濱田文香研究者(平成 23 年度採択)

ライフイベントによって研究を一時中断したため。

・安部研究者

大挑戦型として採択され、期間延長審査の結果、2 年間延長し、今年度終了するため。

5. 研究実施期間

平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月(5年型)

平成 23 年 10 月～平成 27 年 10 月(3年型、ライフイベント期間延長)

6. 領域の活動状況

領域会議はこれまでに12回実施した。会議では各研究者の発表時間を越える時間を質疑討論に充てて十分な議論を行い、多様な研究者間の相互刺激とアドバイザーからの助言を期した。また研究成果報告会と合わせ特別講演として外部より7名の著明な神経研究者、および12名の領域アドバイザー・総括に、研究の進め方を含めて講演していただいた。

研究費の執行にあたっては、進捗と研究環境を把握のうえ柔軟に対応した。

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、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。

(事後評価の流れ)

平成 27 年 9 月 評価会開催

平成 28 年 2 月 研究総括による事後評価

平成 28 年 3 月 被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

(1)研究課題等の研究目的の達成状況

(2)研究実施体制及び研究費執行状況

(3)研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

(5)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。

9. 評価結果

当領域は上記の概要にもあるように広大な神経科学分野の多様な研究を採択してきたことを反映して、本報告が対象とする5件の研究課題も方法論的には生理学的、遺伝学的、分子生物学的から神経システム論的アプローチまで、問題設定も神経回路形成から回路解析、リズム機構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き、また相互の協力も発生してきた。何れの研究者も独創性が高く、国際的にも高く評価される研究成果を挙げたが、中でも小宮山研究者は二光子顕微鏡を全動物標本に適用することで、学習の基礎過程としての大脳皮質運動野微小回路の活動変化を明らかにしたことは特筆に値する。尚、すべての研究者で研究成果をすでに論文発表として公表している。今後発表が見込まれるものもありさらに大きい成果が見込まれる。なお期間中に3名の研究者が昇格を果たし、うち1名は教授に昇格している。

1. 安部 健太郎 研究者「後天的な音声コミュニケーションの神経機構とその発達メカニズムの解明」(3年型、大挑戦型、期間延長)

ヒトの言語能力に関わる音声情報処理とその獲得のメカニズムの解明を念頭に「歌」を発声・識別できる鳴禽類を利用した研究が行われてきたが、その神経生物学的基盤についてはなお不明な部分が多かった。本研究はジュウシマツを用いてまず、「歌」を構成する音素のシーケンスに着目して人工合成歌への反応を解析することにより、ジュウシマツが音の並びを高度に識別する能力があり、またその並びの規則性を自発的に学習できることを発見した。さらに神経活動依存的に発現する遺伝子を手がかりに脳を組織学的に検索し、特定の神経核(IMAN)において順序法則逸脱刺激に対する特異的な活動変化を見だし、かつこの領域の損傷が順序法則性習得を障害することも明らかにした。本研究では加えて、先進的な遺伝子改変鳴禽類作製技術を利用して転写因子 CREB の活性を操作することに成功し、その活性低下により生後の経験による音声能力の発達が抑えられること、また CREB 関連薬剤の脳内局所投与による「歌」学習の促進を見いだしている。3年目に大挑戦型増額延長を得て導入した装

着型軽量蛍光顕微鏡やマイクロレイ資材等を駆使し、構想した後天的要因の解析や非遺伝子改変手法による能力獲得促進などの重要要素ステップにおいて、目標をほぼ達成したものと認められる。また纏め得た成果は時宜を得て論文発表している。今後 CREB を中心とした分子メカニズムの解明と、学習能力発達の促進研究および他の動物種における研究展開が大いに期待できる。

2. 久場 博司 研究者「聴覚神経回路での入力依存的な神経活動制御」(5年型)

神経回路において神経情報を搬送する活動電位は神経細胞軸索の付け根にあたる軸索起始部(AIS)において発生するが、その部位の微細構造が活動電位発生の調節・制御にどのように関わるかは明らかでなかった。本研究は、ヒヨコ脳幹にあって聴覚入力の一環である大細胞核(NM)と音源定位に関わる層状核(NL)に着目し、内耳除去等の処置・スライス培養系の確立などにより、NM神経細胞のAISではKチャネルサブタイプの変化により膜電位と興奮性が巧妙に調節されていること、またNL神経細胞AISの最適化には発達途上臨界期の聴覚入力が必要であることを見出した。さらに免疫細胞組織学的解析とパッチクランプ法により、このAIS可塑性におけるKチャネルの2サブタイプの役割を解明し、かつスライス培養系の改良により、薬理的にAISの可塑性を誘導できることを見出した。これらの独創性の高い成果は神経回路の機能維持に重要な恒常的可塑性の分子基盤の理解に大きく貢献するものである。研究成果は適宜論文発表している。今後、AIS可塑性を誘導する分子機構の解明と生体脳における検証が進展し、聴覚系以外の神経回路への敷衍、さらに恒常的可塑性に関わる神経疾患病理への手がかりにつながることを期待できる。

3. 小宮山 尚樹 研究者「大脳皮質の微小回路の学習に関連した可塑性」(5年型)

大脳皮質等の局所微小回路の作動特性において学習に伴って生じる変化はこれまでは主に電気生理学的解析で単一の神経細胞について解析されてきたが、近年イメージング技術などの進歩により微小回路全体を対象とする解析が可能になってきた。本研究は、マウスの頭蓋を二光子顕微鏡下に固定し、多数の神経細胞からなるセットの活動を無麻酔で長期間にわたって経時観察できる系を立ち上げることに成功し、遺伝子改変動物、スライス培養技術、カルシウムイメージングなどを用いて、抑制性介在ニューロンのサブタイプに着目しながら、学習にともなう微小回路の変化を解析したものである。まず嗅覚系で学習におけるシナプスの変化がにおい特異的・覚醒下特異的に起こり、その調節にパルブアルブミン陽性抑制性介在ニューロンが関わることを明らかにした。またレバー押し学習系を工夫して、2週間の訓練中に起きる大脳皮質運動野微小回路の活動変化を解析し、特定の運動パターンへの収束が神経活動パターンの収束によること、その変化においてソマトスタチン及びパルブアルブミン抑制性神経細胞から錐体細胞樹状突起へのシナプスに変化することなどを見いだした。さらに視覚学習にともなう視覚野の情報処理におけるトップダウン入力とボトムアップ入力の変化を解析して、ソマトスタチン細胞の関与を見いだしている。これらは高く評価される成果であり、いずれも論文発表している。今後より詳細な解析を経て学習にともなう大脳皮質に普遍的な回路機構とそこにおける抑制性神経細胞の役割が解明されることが期待できる。

4. 名越 絵美 研究者「行動の概日リズムを制御する神経回路構築の分子基盤」(5年型)

動物は一般に周期的な外界の環境変化に対応して活動の周期的変動を示し、特にヒトにおいては脳による概日リズム制御の不調は不眠症等各種の疾患に深く関わっている。本研究は、比較的単純な構造の脳を持ちながらも行動に明確な概日リズムを呈し、かつ各種の遺伝学的手法を適用して行動を司る個々の遺伝子の機能を容易かつ迅速に解析できるショウジョウバエをもちいて、概日リズムの神経回路基盤を解明しようとするものである。脳内に数ある“時計ニューロン”の中でもLN_{vs}細胞がマスターペースメーカーと目されつつもその分子機構が不明であった。本研究は *unf* 遺伝子がそこで経時機構と他の時計ニューロンを同調させる要となっていることを明らかにし、さらにその遺伝子産物 UNF が、ホモログが哺乳類において分子時計の一部とされている E75 と協働することにより、最も良く知られた時計遺伝子 *per* の読み出しに関わることを見だし、かつその周辺の分子現象を解明した。また薬理学的手法も援用してニューロペプチド PDF の PER 発現における役割も明らかにした。これらの成果は、分散神経培養系に加えてハエ脳を器官培養下にコンフォーカル顕微鏡にて長期間ライブイメージングできる実験観察系を立ち上げた得たことによるものであり、高く評価できる。これらの成果は適宜論文で発表している。今後は細胞内機構に加えて時計ニューロン間の相互作用の分子機構が明らかになるとともに、哺乳類脳の概日リズム神経機構とその障害の理解が加速されると期待できる。

5. 濱田 文香 研究者「体温の概日リズムを制御する分子機構と神経回路ネットワークの解明」(3年型、ライフイベント期間延長)

行動遺伝学の研究材料として40年以上にわたり多様な分子遺伝学的研究が行われてきたショウジョウバエは変温動物とされ、その体温の研究はほとんど顧みられてこなかった。本研究はこのハエが環境温度選択行動を示しかつその行動に日周リズムがあることを発見し、これが概日時計による制御を受け、それは活動リズムとは別個の神経回路による制御であることを解明した。さらに、時計細胞DN2細胞に着目した遺伝変異体解析などにより、神経ペプチドのDH31受容体とPDF受容体の機能が昼の高温選択と夜の低温選択行動とを特異的に演出していることを解明し、またDN1細胞におけるPDFR受容体が昼の温度選択リズムに光刺激が介入することを可能にしていること、および外界温度の感知はAC神経細胞のTrpA1チャンネルにより、その情報がAC神経からsNLV時計細胞を介してDN2細胞に統合されることを見いだした。これらは独創性の高い研究成果であり、適宜論文発表しあるいは投稿中となっている。これら一連の研究によっても哺乳類の体温リズムとショウジョウバエの温度選択リズムには関与分子を含めて共通点が複数見いだされており、今後ハエの概日リズム機構の全貌がより精緻に解明され、哺乳類の概日リズム神経機構の理解に役立ち、ひいては睡眠障害などの治療の手がかりも得られることが期待できる。

10. 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・名誉教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成28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 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 九州大学名誉教授
 立花 政夫 東京大学名誉教授
 能瀬 聡直 東京大学大学院新領域創成科学研究科・複雑理工学専攻・教授
 平田 たつみ 情報・システム研究機構国立遺伝学研究所・教授
 藤田 一郎 大阪大学大学院生命機能研究科・教授
 虫明 元 東北大学大学院医学系研究科・教授
 柚崎 通介 慶應義塾大学医学部・生理学・教授

(参考)

件数はいずれも、平成28年3月末現在。

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	1	31	32
口 頭	34	47	81
その他	0	0	0
合 計	35	78	113

(2) 特許出願件数

国 内	国 際	計
0	0	0

(3) 受賞等

小宮山 尚樹

Alfred P. Sloan Foundation, Sloan Fellow (H23)

Pew Charitable Trusts, Pew Scholar (H23)

David & Lucile Packard Foundation, Packard Fellow (H23)

New York Stem Cell Foundation, NYSCF-Robertson Neuroscience Investigator (H24)

McKnight Foundation, McKnight Scholar, (H26)

The Scientist Magazine, 'Scientist to Watch' Highlightee (H26)

Kavli Foundation and National Academy of Sciences, Kavli Fellow (H26)

National Institute of Health, BRAIN Initiative Grant Award (H27)

濱田 文香

March of Dimes, Basil O' Connor Starter Scholar Research Award (H24)

Cincinnati Children's Hospital, Charlotte R. Schmidlapp Women Scholars (H25)

(4)招待講演

国際 41 件

国内 1 件

別紙

「脳神経回路の形成・動作と制御」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成28年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
濱田 文香 (兼任)	体温の概日リズムを制御する分子機構と神経回路ネットワークの解明 (シンシナティ小児病院)	シンシナティ小児病院 Assistant Professor (シンシナティ小児病院)	41

(5年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成28年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
安部 健太郎 (兼任)	後天的な音声コミュニケーションの神経機構とその発達メカニズムの解明 (京都大学生命科学研究科)	京都大学生命科学研究科 講師 (京都大学生命科学研究科)	60
久場 博司 (兼任)	聴覚神経回路での入力依存的な神経活動制御 (京都大学医学部・名古屋大学医学部)	名古屋大学医学系研究科 教授 (京都大学医学研究科)	103
小宮山 尚樹 (兼任)	大脳皮質の微小回路の学習に関連した可塑性 (カルフォルニア大学サンディエゴ校)	カルフォルニア大学サンディエゴ校 Assistant Professor (カルフォルニア大学サンディエゴ校)	106
名越 絵美 (兼任)	行動の概日リズムを制御する神経回路構築の分子基盤 (ベルン大学細胞生物学研究所・ジュネーブ大学遺伝進化学科)	ジュネーブ大学遺伝進化学科 Assistant Professor (ベルン大学細胞生物学研究所)	103

研究報告書

「後天的な音声コミュニケーションの神経機構とその発達メカニズムの解明」

研究タイプ: 大挑戦型(延長有)

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 安部 健太郎

1. 研究のねらい

ヒトが文法法則を基に言語を生成・理解する能力など、動物が生後に接する環境や他個体からの情報を受けて後天的に獲得される能力の情報処理メカニズムやその発達・獲得メカニズムについては不明な部分が多い。鳴禽類は音を複雑に組み合わせた構造をもつ「歌」を発声、識別し、他個体とコミュニケーションをとる。ヒトの言語習得過程と同様に生後にこのような音声コミュニケーション能力を獲得するため、ヒトの言語能力に関連する高次音声情報処理メカニズムとその発達メカニズムを明らかにするモデル動物となりうる。本研究では、鳴禽類が音の組合せを特定の情報と認識・識別する情報処理メカニズムとそれを可能にする神経メカニズム、およびその発達メカニズムを明らかにする。これらの解析を介し、ヒトの言語処理のような高度な音声情報処理を可能にする脳内メカニズムの生物学的な基盤、そしてその発達を促進する先天的遺伝要因および後天的環境要因を明らかにすることを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

ヒトは、個体間において言語を介した複雑なコミュニケーションをとることができるが、言語にかかわる情報処理能力においてはヒト固有の情報処理能力があると考えられている。また、これらの言語獲得過程において、生後に社会から受容する後天的な情報入力が必要であることが知られており、既存のモデル動物では言語情報処理に関わる音声情報処理のメカニズムやその発達メカニズムは解析することが困難であると考えられていた。

本研究では鳴禽類を用いて、「歌」識別に使用される音素シーケンス情報処理能力を解析し、ヒト独自の能力と考えられていたような音声情報処理能力を鳴禽類が有することを明らかにした。さらに、そのような情報処理に関わる神経領域を神経活動依存的な発現を示す遺伝子発現を指標に同定し、また、その領域を損傷した個体では「文脈依存文法」を逸脱する「歌」を識別できなくなることを示すことにより、「歌」識別に使用される高次音声情報処理を担う神経領域を同定した。さらに、自然な「歌」に含まれる高次音順構造をもとに「歌」を識別する能力は生得的なものではなく、その獲得には生後において他個体からの情報入力や社会相互作用が必要であることを明らかにした (Abe et al., *Nat. Neurosci* 2011)。

次に、生後に受容する音声環境や社会相互作用依存的に鳴禽類個体の音声能力が発達するメカニズムを明らかにする目的で、生後の社会環境を制御して育成した鳴禽類個体での遺伝子発現プロファイルを取得し、生後環境依存的に発現が増減する遺伝子群を明らかにし、それらのうち多数の遺伝子の発現調節には転写因子 CREB が関わることを示唆された。鳴禽類において遺伝子改変個体を作成する技術を開発し、CREB の活性を変化させた個体を作成したところ、CREB の転写活性を低下させた個体においては先天的な発声に関しては影

響がみられないものの、後天的な情報を受けた音声能力の発達が抑えられることを明らかにした (Abe et al., *PNAS* 2015)。また、脳内の CREB の活性を人為的に制御することにより鳴禽類における音声習得を一部促進させることができることを明らかにした。

本研究の成果により、高度な音声情報処理を可能にする脳内メカニズムの生物学的な基盤、そして社会相互作用がその発達を促進するメカニズムの一端が明らかになった。

(2) 詳細

① 鳴禽類の「歌」識別に使用される音素シーケンス情報処理能力の解明

鳴禽類ジュウシマツが他個体とのコミュニケーションに使用する音声シーケンス(「歌」)を構成する音の「並び」について、ジュウシマツが保有する識別能力を検討した。また、人為的に音素を特定の法則に従い配列し作成した「人工合成歌」を学習させ、新規音声を識別させることで、これまでヒトのみが可能と考えられているような高次音声情報処理が可能であるか検討した。

鳴禽類は無音で区切られた音の基本単位(音素)を並べた「歌」と呼ばれる音声シーケンスを使用し、他個体とコミュニケーションを図る。本研究では、①鳴禽類は「歌」等の音声シーケンス中の音の「並び」に関し、高度に識別する能力を有すること、②「歌」の中の音順序の法則性は、社会的に共有されたものの存在が想定されること、③ジュウシマツは受容する音声情報から、音の並びの規則性を自発的に習得すること、④「入れ子構造」や「文法構造規則」のような、これまでヒトのみが可能とされてきたような高次音声情報処理も一部において可能であることを明らかにした。また、以上の解析を通じ、鳴禽類「歌」を構成する音の順序は、「歌」の聞き手にとって行動変化を起こすだけの「意味」のある情報を有するという、興味深い結果が得られた (Abe et al., *Nat. Neurosci* 2011)。

一方、鳴禽類が実際のコミュニケーションに使用する生理的な「歌」の音順に、具体的にどのような「意味」(特定の対象・欲求に関連付けられた音素順序など)があるのかは不明である。大挑戦型の延長課題として「歌」に含まれる、社会的に共有される情報や音素順序規則の実体を明らかにすることを目指した。ジュウシマツ個体に対し画像、動画、音声など多様な情報を提示し、それに応じて自発的に発声される「歌」の音素順序情報を蓄積・解析したところ、「歌」に含まれる具体的な「意味」の解明には至っていないが、状況に応じて発声される「歌」の音素順序に違いが認められることを明らかにした。

② 歌識別に使用される音声情報処理に関わる神経回路の同定と神経情報処理メカニズムの解明

鳴禽類「歌」に含まれる音順を改変した音順改変歌を聞かせた個体、および、人工的な音素順序法則学習させた後に、その法則を逸脱する人工音素シーケンスを聞かせた個体において、特異的に神経活動が変化する鳴禽類の脳内領域を神経活動依存的な遺伝子発現 (*egr-1*, *c-fos*) を指標に探索したところ、大脳-基底核回路を構成する神経核 (IMAN 近傍領域) において、順序法則を逸脱する音声に対し特異的な神経活動変化が観察された。またこの領域を損傷した個体では、音素順序改変の識別や、新規音声シーケンスからの音素順序法則性の習得ができなくなることから、この領域が「歌」や音声シーケンスの識別に関与する

ことを明らかにした (Abe et al., *Nat. Neurosci* 2011)。

大挑戦型の延長課題としてこの領域の神経活動をイメージングによる取得することを目指した。頭部装着型の軽量蛍光顕微鏡と GRIN レンズを使用することで、無麻酔自由行動下の鳴禽類において脳深部に位置するこの領域の神経細胞が「歌」の聴覚入力による神経スパイクがおきることを観察することに成功した。

③ 鳴禽類の「歌」識別に使用される音素シーケンス情報処理能力の獲得メカニズムの解明

音声能力の発達には先天的な要因と後天的な要因の両者が関わり、それらを切り分けて解析することは困難であった。鳴禽類は生後環境を厳密に管理して育成することができるため、先天的な要因と後天的な要因を切り分けて解析することが可能である。一方で、遺伝子改変個体作成技術は未発達であり、先天的な要因(ゲノム情報)を人為的に制御することが困難であった。本研究では、独自に遺伝子改変鳴禽類の作成手法を改良することにより、世界に先駆けて、音声学習に表現型を示す遺伝子改変鳴禽類の作成に成功した (Abe et al., *PNAS* 2015)。

以上の技術および、生後に受容する環境・社会相互作用を管理して個体を育成する技術を使用し、音声情報処理能力の発達にかかわる先天的な要因と後天的な要因を切り分けて解析を行った。まず、獲得する音声能力をより定量的に解析することが可能なキンカチョウを用いて、ジュウシマツと同様に、生後に接する音声情報に依存して獲得する音声能力に違いが生じることを確認した。次に、キンカチョウを用い、生後に接する音声情報に依存して発現が変化する遺伝子群をマイクロアレイ法により解析したところ、転写因子 CREB によって発現が制御される遺伝子が多数含まれることが分かった。実際、CREB はキンカチョウにおいて生後の育成環境に依存してその活性が変化することを観察した。次に、CREB 活性を人為的に変化した遺伝子改変キンカチョウを作成したところ、CREB の転写活性を低下させた個体においては先天的な発声に関しては影響がみられないものの、後天的な情報を受けた音声能力の発達が抑えられることを明らかにした (Abe et al., *PNAS* 2015)。さらには、キンカチョウ音声学習に関わる、遺伝子改変等の先天的要因の制御と、生後隔離育成下に提示する情報である後天的要因の制御を組み合わせることにより、生成する音声能力の発達を促進または抑制させることに成功した。

大挑戦型の延長課題として遺伝子改変が困難な他の動物や、ヒトなどに本研究から得られた知見を応用するために必要となる、遺伝子改変技術を使用しない音声能力獲得の促進方法の開発を行った。遺伝子改変鳴禽類の解析で得られた知見を基に、薬剤投与法を探索することにより、遺伝子改変を使用しない方法で、遺伝子改変動物の表現型と同様な音声能力の発達の人為的变化を引き起こす方法を見出すことに成功した。

3. 今後の展開

本研究では、鳴禽類の「歌」習得過程において生後の音声環境や社会環境依存的に脳内の遺伝子発現が変化することを示し、それらの遺伝子発現の変化に関わる転写因子 CREB の転写活性を操作することにより、社会相互作用依存的に獲得する後天的な音声能力の発達を操作す

ることができた。また、CREB の転写活性を上昇させる薬剤の脳内局所投与と適切な情報提示の組み合わせにより、「歌」習得を促進することができることを明らかにした。今後は、CREB の活性化を引き起こすメカニズムの詳細を明らかにすることにより、能力の発達をより促進する手法を編み出せると考えられる。また、本研究によって明らかになった方法を他動物に応用することにより、生後の情報入力を受けて発達する後天的な能力のより普遍的な神経基盤を明らかにすることができると考えられる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究は、挑戦目標としてヒトの言語などの高次音声情報処理能力の生物学的な基盤を明らかにするとともに、後天的に獲得する能力の発達メカニズム、およびその能力発達をより促進するような育成・教育システムを確立することを挙げていた。本研究では、ヒトのみが可能と考えられていたような高次音声情報処理の一部を鳴禽類も行うことができることを明らかにし、既存のモデル動物では研究することが困難な、高次音声情報処理や社会相互作用依存的な神経系の発達・行動の獲得を研究するモデルを提供することに貢献した。また、遺伝子工学的実験手法に乏しい鳴禽類において、社会学習依存的な音声習得に表現型を表出する遺伝子改変個体を作成することに世界に先駆けて成功し、鳴禽類において後天的に獲得する音声能力の発達をより促進する教育システムを見出すことに一部成功した。また、将来的な目標としていたヒトでの能力獲得の促進法の開発には未だ多くのハードルがあるものの、鳴禽類のみならず、他の動物種においても適応可能な新規技術を創出することに成功し、ヒトにも原理的には適応可能と考えられるような薬理処理と情報提示を併用した能力獲得促進法を鳴禽類において明らかにすることができた。これらの観点から、研究当初の目標はほぼ達成されたと判断できる。

また、延長時の目標としては、「歌」に含まれる意味情報の解明、識別神経機構の解明、および他動物にも適応可能な育成システムの作成を挙げていた。鳴禽類が状況に応じて「歌」に含まれる音の並びを変化させることを明らかにすることができたものの、意味情報の解明に関してはデータ量や因果関係の証明が不足しておりデータを拡充している状況にある。識別神経機構の解明に関しては、新規技術の開発により、自由行動下の鳴禽類において「歌」識別に関わる脳深部において複数の細胞の神経活動を記録することに成功した。他動物にも適応可能な育成システムに関しては上記のとおり、開発できたと考えられる。以上の観点から大挑戦型延長時の目標は一部未完であるものの、本研究全体としての目的はおおむね達成されたと判断できる。

ヒトは綿密な社会相互作用の中で生後発達し、知識や能力を獲得する。本研究によって明らかになった成果、および本研究を続けるうえで得られる成果は、社会相互作用の中で発達する能力の発達メカニズムの生物学的な基盤を明らかにする。それらの知見をもとに、ヒトにおける既存の教育・育成システムを改変してゆくことにより、より効率的な教育・能力発達のシステムを作り上げることができ、社会・経済へも波及することが期待される。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ヒトの言語能力に関わる音声情報処理とその獲得のメカニズムの解明を念頭に「歌」を発声・識別できる鳴禽類を利用した研究が行われてきたが、その神経生物学的基盤についてはなお不明な部分が多かった。本研究はジュウシマツを用いてまず、「歌」を構成する音素のシーケンスに着目して人工合成歌への反応を解析することにより、ジュウシマツが音の並びを高度に識別する能力があり、またその並びの規則性を自発的に学習できることを発見した。さらに神経活動依存的に発現する遺伝子を手がかりに脳を組織学的に検索し、特定の神経核(IMAN)において順序法則逸脱刺激に対する特異的な活動変化を見だし、かつこの領域の損傷が順序法則性習得を障害することも明らかにした。本研究では加えて、先進的な遺伝子改変鳴禽類作製技術を利用して転写因子 CREB の活性を操作することに成功し、その活性低下により生後の経験による音声能力の発達が抑えられること、また CREB 関連薬剤の脳内局所投与による「歌」学習の促進を見いだしている。3年目に大挑戦型増額延長を得て導入した装着型軽量蛍光顕微鏡やマイクロアレイ資材等を駆使し、構想した後天的要因の解析や非遺伝子改変手法による能力獲得促進などの重要要素ステップにおいて、目標をほぼ達成したものと認められる。また纏め得た成果は時宜を得て論文発表している。今後 CREB を中心とした分子メカニズムの解明と、学習能力発達の促進研究および他の動物種における研究展開が大いに期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Abe K., Matsui S. *Watanabe D. Transgenic songbirds with suppressed or enhanced activity of CREB transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2015. 112(24):7599-604.
2. Fujimoto H., Ohgomori T., Abe K., Uchimura K., Kadomatsu K., Jinno S. Time-dependent localization of high- and low-sulfated keratan sulfates in the song nuclei of developing zebra finches. *Eur J Neurosci*, 2015, doi: 10.1111/ejn.13073.
3. Ishiyama N, Tanaka N, Abe K., Yang YJ, Abbas YM, Umitsu M, Nagar B, Bueler SA, Rubinstein JL, Takeichi M, Ikura M. An Autoinhibited Structure of α -catenin and Its Implications for Vinculin Recruitment to Adherens Junctions. *J Biol Chem.*, 288(22), 15913-15925(2013)
4. Abe K., Watanabe D., Songbirds possess the spontaneous ability to discriminate syntactic rules. *Nature Neuroscience*, 2011. 14(8): 1067-73.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(2)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)

Abe K & Watanabe D. "A spontaneous ability of songbird to discriminate syntactic rules."
Society of Neuroscience annual meeting, November 12-16, 2011, Washington D.C., U.S.A.

Abe K & Watanabe D. “A spontaneous ability of songbird to discriminate syntactic rules in auditory information”. Neurobiology of Language Conference, November 10–11, 2011, Anapolis, ML, U.S.A.

Abe K. “Postnatal acquirement of the ability to discriminate culturally shared song syntax in songbirds”. The 9th International Conference on the Evolution of Language, March 13–16, 2012, Kyoto, Japan.

Abe K & Watanabe D. “Transgenic zebrafinches reveal the role of genetic factors in the postnatal song learning”. Society of Neuroscience annual meeting, November 9–13, 2013, San Diego, U.S.A.

安部健太郎. 「鳴禽類における世代を超えた情報の口承に関わる神経機構」. 第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会大会, 2015 年 3 月 21 日, 神戸

安部健太郎. 「鳴禽類音声コミュニケーション能力の生後発達機構」. 生理学研究所 研究会, 2013 年 12 月 12 日, 岡崎

Abe K & Watanabe D. ”Song development of the transgenic songbird”.
第 36 回 日本神経科学大会, 2013 年 6 月 22 日, 京都

安部健太郎. 「後天的な音声コミュニケーションの神経機構とその発達メカニズムの解明」
包括脳ワークショップ, 2012 年 7 月 24 日, 仙台

Abe K. “What songbird can tell us”. CDB seminar, 2012 年 4 月 10 日, 神戸

Abe K & Watanabe D. ”A spontaneous ability of songbird to discriminate syntactic rules.”
第 34 回 日本神経科学大会, 2011 年 9 月 14 日, 横浜

(プレスリリース)

鳥類の音声シーケンス情報処理能力の解明

http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news_data/h/h1/news6/2011/110627_1.htm

研究報告書

「聴覚神経回路での入力依存的な神経活動制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 久場 博司

1. 研究のねらい

我々の複雑な脳機能が発現するためには、神経回路機能が最適化され、維持されることが必要である。この過程で神経活動は重要な役割を担うことが示唆されているが、その詳細はまだよく分かっていない。脳神経回路の可塑性は二つに大別される。一つは、長期増強や長期抑圧と呼ばれる学習や記憶の発現に関与する可塑性であり、もう一つはその回路の定常性を維持しようとする可塑性である。後者は恒常的可塑性といわれ、回路の神経活動を適切なレベルに調節するよう働き、回路機能の最適化や維持に関わると考えられている。従来、これらの可塑性はシナプス伝達効率の変化によって生じると考えられてきた。我々は近年、神経細胞の軸索起始部 (axon initial segment, AIS) の分布が、神経回路への入力レベルに応じて変化するという新たな恒常的可塑性を見いだした。AIS は活動電位の発生部位であることから、この可塑性は神経活動を効果的に調節することが可能であり、神経回路機能の最適化・維持に深く関わる可能性が示唆される。従って、本研究では構造と機能が明確なトリ脳幹の聴覚神経回路を対象として、AIS に生じる恒常的可塑性の特性と分子機序、さらに機能意義を調べることにより、神経細胞における活動レベルの制御機構を理解するとともに、特定の神経回路機能が入力依存的に獲得され、維持される分子・細胞基盤を明らかにすることを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

トリの大細胞核 (nucleus magnocellularis, NM) は哺乳類の蝸牛神経核に相当する神経核であり、聴神経からのシナプス入力に対して正確なタイミングで活動電位を発生することにより音の時間情報のコードに関わる。これまで我々は、孵化後のヒヨコにおいて内耳除去により聴覚入力を遮断すると、NM の神経細胞では AIS が長くなり、膜興奮性が増すことを見いだした。このことは AIS 分布の入力依存的な変化が、恒常的可塑性として神経活動の調節に関わることを示している。神経活動は神経回路機能の最適化・維持に重要なことが知られている。従って本研究では、この AIS 可塑性が内耳障害時に NM 細胞の神経活動を亢進し、聴神経活動の消失を代償することで、聴覚中枢神経回路の構造と機能の維持に関わるという仮説のもと研究を行った。

AIS 可塑性の働きを理解するためには、その特性を明らかにする必要がある。従って、まず入力遮断による AIS 可塑性時に AIS の電気的特性がどのように変化するのか、また AIS 可塑性の表現型は細胞種、脳領域、さらに発達過程に応じてどのように異なるのかという点について検討し、以下のことを明らかにした。(1) NM 細胞では AIS 分布の延長に伴って Na チャネルのサブタイプや密度は変化しないのに対して、K チャネルの密度は

サブタイプ特異的に変化し、このことにより AIS 局所の膜電位と興奮性が巧妙に調節される（研究成果 5）。(2) NM 細胞の投射先である層状核（nucleus laminaris, NL）では、成熟期の AIS は聴覚入力の影響を受けないのに対して、発達期の AIS はその分布が最適化される過程で聴覚入力が必要な役割を果たす（研究成果 4）。一方、AIS 可塑性の分子機構については、薬理阻害や遺伝子導入の容易な培養実験系の確立を目指した。その結果、NM 細胞の生存率と AIS の形成率が非常に高い切片培養標本を得ることができ、さらに NM 細胞の自発神経活動を阻害することで AIS 可塑性を再現することに成功した。現在はこの系を用いて AIS 可塑性の誘導機構として細胞内 Ca 濃度変化に着目して解析を行っている。また、AIS 可塑性の機能意義としては、NM の神経活動が上位の神経回路の維持に関わる可能性を検討してきた。これまで NM 細胞を除去することにより NL 細胞へのシナプス入力を完全に消失させた場合、NL 細胞の樹状突起がほぼ消失することを明らかにした。

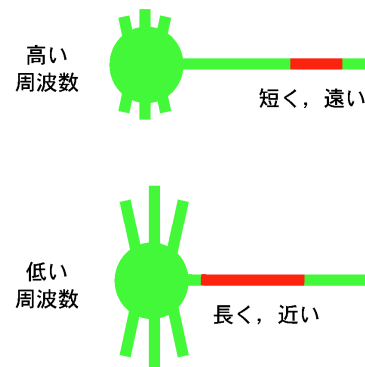
(2) 詳細

AIS 可塑性の特性 1（細胞種と時期特異性）

NL は哺乳類の内側上オリブ核に相当する神経核であり、両側の蝸牛神経核（大細胞核, NM）からの時間情報を統合することにより音源定位に関わる。これまで我々は、両側内耳を除去することによりこれら神経核へのシナプス入力を回路成熟後に遮断した場合、AIS の可塑性が NM では生じるのに対して、NL では生じないことを明らかにした。このことは AIS 可塑性の発現が神経核（細胞種）毎に異なることを示している。

一方、NL には周波数局在構造があり、高い特徴周波数をもつ細胞ほど高頻度のシナプス入力を受ける。さらに、NL では特徴周波数に応じて細胞の AIS 分布が異なる。すなわち、高い特徴周波数をもつ細胞ほど AIS は短く、細胞体から離れており、このことにより NL における正確な時間情報統合が可能となる。そこでさらに、この NL における AIS 分布の形成過程には入力依存的な AIS の制御機構が関わるののではないかと考え、NL 細胞の AIS 分布の発達過程とこの過程に対する聴覚入力の関与について検討を行った。

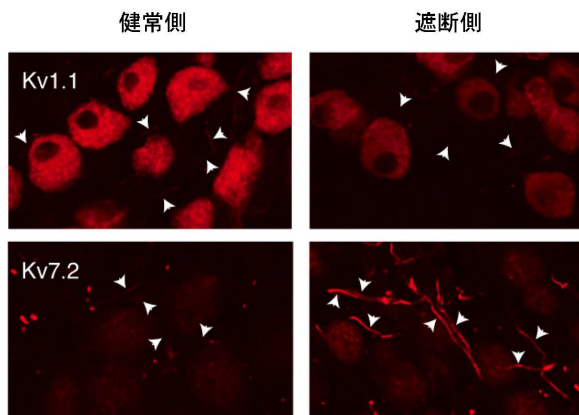
NL 細胞の AIS は、聴覚入力開始前には細胞体近くに長く分布し、その分布に特徴周波数による違いはみられなかった。一方、聴覚入力開始後からこの AIS 分布には特徴周波数に応じた変化がみられた。すなわち、AIS の長さは短縮し、かつ細胞体からの距離は延長し、これらの変化は高い特徴周波数をもつ細胞ほど大きかった。さらに、発生初期に聴覚原基を除去することで聴覚入力を遮断したところ、聴覚入力開始後にみられた AIS の短縮は抑制された。以上のことから、NL 細胞では AIS 可塑性に臨界期があり、この可塑性は特に発達期に AIS 分布を調節することで回路機能の最適化に関わることを明らかにした（研究成果 4）。



NL での特徴周波数に応じた AIS 分布の違い

可塑性の特性 2 (K チャンネルの変化)

AIS はその分布だけでなくその電気的特性も、細胞の興奮性に大きく影響する。従って、膜特性の重要な決定要因である K チャンネルに焦点を絞って、その AIS 可塑性に伴う発現変化を解析した。まず、NM 細胞の AIS では聴覚入力の遮断に伴って Kv1 が減少し、Kv7 は増加することを免疫染色により明らかにした。次に、各 K チャンネル成分の電流をパッチクランプ法により記録し、聴覚遮断



聴覚遮断によるNMでの相補的なKチャンネルの発現変化

断が Kv1 を介した電流成分を減少させるのに対して、Kv7 を介した電流成分は増加させることを明らかにした。さらに、聴覚遮断の膜興奮性に対する効果について調べ、以下のことを明らかにした、(1) 聴覚遮断後の NM 細胞では活動電位の閾値が低下し、膜興奮性が増加する。(2) 聴覚遮断後の NM 細胞でみられる自発神経活動の頻度は、Kv7 を活性化させると減少し、Kv7 を阻害すると増大する。(3) 二光子レーザー顕微鏡観察下に AIS への薬剤の局所投与を行なうと、Kv7 の阻害剤は聴覚遮断後の細胞でのみ活動電位の閾値を低下させるのに対して、Kv1 の阻害剤は聴覚遮断前の細胞でのみ閾値を低下させる。Kv1 は活性化の閾値が低く、速度も速いため、Kv7 に比べて活動電位の発生を抑える効果が強い。つまり、これらの結果は、聴覚遮断時に NM 細胞が AIS での K チャンネルを、Kv1 から Kv7 に変化させることで膜興奮性を高めていることを示している。さらに、コンピューターモデルによる解析を行った結果、これら K チャンネルの相補的な発現変化は、AIS の静止膜電位を維持しつつ、AIS の延長と協調することで効果的に興奮性を高めるしくみとして働くことを明らかにした (研究成果 5)。

AIS 可塑性の分子機構

AIS 可塑性の誘導因子や分子経路の同定を効率的に行なうために、培養実験系の確立を目指した。特に AIS は細胞接着因子 (NrCAM, NF186) を介して周囲の細胞外基質と結合しているため、細胞外環境が比較的保たれている切片培養標本の作製を行なった。様々な培養条件を検討した結果、NM 細胞の生存率と AIS の形成率が非常に高い標本を得ることができた。この切片培養標本の NM 細胞では、発火や膜電流の特性は生体内でみられるものと同様であり、さらに約 20Hz の自発神経活動がみられることを確認した。この神経活動はグルタミン酸受容体の阻害剤である DNQX で阻害されることから、興奮性のシナプス入力により生じていると考えられる。そこで、さらにこの自発神経活動を阻害することの AIS 長に対する効果を調べたところ、生体内で聴覚遮断時にみられるのと同様な AIS の延長を観察することができた。この結果は、AIS 可塑性が NM 細胞での脱分極 (シナプス電位、活動電位) の消失により生じる可能性を示している。脱分極の消失は Ca チャンネルの活性化を減弱させると考えられる。従って、現在は自発神経活動時

の細胞内 Ca イオン濃度の時空間分布についての検討を行っている。

3. 今後の展開

切片培養標本を用いた AIS 可塑性の分子機構の解析を継続する。特に Ca チャネルの阻害剤を含めた種々の薬理学的解析を行うことで、AIS 可塑性の誘導因子と下流の分子経路を検討する。薬理学的解析により明らかになった候補分子については、電気穿孔法を用いた shRNA 導入によるノックダウンを行なうことで、その関与を検証する。AIS の遠位端の位置決定には、ankyrinG と ankyrinB の発現量の相対的なバランスが重要だという報告がある。従って、可塑性の発現前後でのこれら分子の発現量と細胞内局在を調べるとともに、その活動依存性との関係についても検討する。さらに、vitro で得られた知見を vivo でも検証することで、聴覚神経回路での活動依存的な AIS 制御のしくみと役割を明らかにする。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

これまで、AIS 可塑性の特性については、いくつかの重要な知見を得ることができた。一方、AIS 可塑性の分子機構については、主に培養実験系の確立と AIS の可視化手法の改善を行ってきたが、AIS 可塑性の誘導因子や分子経路を同定するには至っていない。しかし、実験遂行のための環境は整ったため、今後も研究を継続することにより大きな進展が得られると考えている。また、音入力との関係を含めて AIS 可塑性の生体内での役割についての理解も十分に進んでいない。例えば、これまでの AIS 可塑性は内耳除去により全周波数帯域の聴覚入力を遮断することを行ってきたが、音響障害や薬剤などによる感音性難聴では特定の周波数領域のみが障害されることが知られている。また、感音性難聴時には耳鳴りを発症することも知られている。従って、今後さらに、音響障害により特定の周波数領域の内耳を選択的に障害することの効果や、耳鳴りに対する AIS 可塑性の関与を調べることで、AIS 可塑性の生理意義を明らかにしたいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

神経回路において神経情報を搬送する活動電位は神経細胞軸索の付け根にあたる軸索起始部(AIS)において発生するが、その部位の微細構造が活動電位発生の調節・制御にどのように関わるかは明らかでなかった。本研究は、ヒヨコ脳幹にあって聴覚入力の要である大細胞核(NM)と音源定位に関わる層状核(NL)に着目し、内耳除去等の処置・スライス培養系の確立などにより、NM 神経細胞の AIS では K チャネルサブタイプの変化により膜電位と興奮性が巧妙に調節されていること、また NL 神経細胞 AIS の最適化には発達途上臨界期の聴覚入力が必要であることを見出した。さらに免疫細胞組織学的解析とパッチクランプ法により、この AIS 可塑性における K チャネルの 2 サブタイプの役割を解明し、かつスライス培養系の改良により、

薬理的に AIS の可塑性を誘導できることを見出した。これらの独創性の高い成果は神経回路の機能維持に重要な恒常的可塑性の分子基盤の理解に大きく貢献するものである。研究成果は適宜論文発表している。今後、AIS 可塑性を誘導する分子機構の解明と生体脳における検証が進展し、聴覚系以外の神経回路への敷衍、さらに恒常的可塑性に関わる神経疾患病理への手がかりにつながることを期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Taruno A, Ohmori H, Kuba H Inhibition of presynaptic Na(+)/K(+)-ATPase reduces readily releasable pool size at the avian end-bulb synapse. Neurosci. Res. 2012. 72: 117-128.
2. Yamada R, Okuda H, Kuba H, Nishino E, Ishii TM, Ohmori H The cooperation of sustained and phasic inhibitions increases the contrast of ITD-tuning in low-frequency neurons of the chick nucleus laminaris. J. Neurosci. 2013. 33: 3927-3938.
3. Okuda H, Yamada R, Kuba H, Ohmori H Metabotropic glutamate receptors improves the accuracy of coincidence detection by presynaptic mechanisms in the nucleus lamirnaris of the chick. J. Physiol. (Lond.) 2013. 591: 365-378.
4. Kuba H, Adachi R, Ohmori H Activity-dependent and activity-independent development of the axon initial segment. J. Neurosci. 2014. 34, 3443-3453.
5. Kuba H, Yamada R, Ishiguro G, Adachi R Redistribution of Kv1 and Kv7 enhances neuronal excitability during structural axon initial segment plasticity. Nat. Commun. 2015. 6:8815.

(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)

英文総説

1. Grubb MS, Shu Y, Kuba H, Rasband MN, Wimmer VC, Bender KJ
Short- and long-term plasticity at the axon initial segment.
J. Neurosci. 2011. 31: 16045-16055.
2. Kuba H
Structural tuning and plasticity of axon initial segment in auditory neurons.

J. Physiol. (Lond.) 2012. 590: 5571-5579.

3. Adachi R, Yamada R, Kuba H

Plasticity of the axonal trigger zone.

Neuroscientist 2015. 21, 255-265.

4. Susuki K, Kuba H

Structural tuning and plasticity of axon initial segment in auditory neurons.

J. Physiol Sci. in press.

和文総説

1. 久場博司

軸索起始部による聴覚回路機能の制御

日本神経精神薬理学雑誌, 2014. 34, 87-92.

学会発表

1. Kuba H

Homeostatic regulation of axon initial segment in an avian auditory neuron

Neuroscience meeting 2011, 2011.11.15, Washington DC

2. 久場博司

中枢聴覚神経回路における恒常的可塑性機構

第 37 回日本神経科学大会, 2014.9.12, 横浜

3. 久場博司

聴覚神経回路における軸索興奮制御

第 120 回日本解剖学会総会・第 92 回日本生理学会大会, 2015.3.2, 神戸

研 究 報 告 書

「大脳皮質の微小回路の学習に関連した可塑性」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月

研 究 者: 小宮山 尚樹

1. 研究のねらい

我々の行動は、個々の神経細胞の調和の取れた活動の下に成り立っている。神経細胞の活動を決定する重要な単位の一つは、神経細胞同士が数百 μm の中で複雑な回路を形成する、微小回路である。しかし、微小回路が行動中、特に学習中にどのように活動し、どのように変化するのかは、ほとんどわかっていない。研究者は、マウスがタスクを学習する間に、リアルタイムで微小回路の活動を二光子顕微鏡で可視化する方法を開発し、学習に関連して微小回路の活動が変わっていく様子を可視化することに成功した。本研究では、この系を用いて、微小回路の可塑性の細胞レベルでの機構の解明、そして学習行動との関連の解明を目指している。特に、嗅覚系の嗅球の微小回路に注目し、細胞のタイプごとの結合特異性、反応特異性並びに可塑性の違いを明らかにしている。また、大脳皮質運動野での長期間の運動学習中に見られる変化を解明している。これらの研究によって、経験ならびに学習が脳神経回路をどのように調節しているのかという重要な問いに対する答えを追求している。

2. 研究成果

(1) 概要

覚醒中の、頭を固定したマウスにおける嗅球からの二光子機能的イメージングをセットアップした。トランスジェニックマウスを用い、嗅球のいくつかの主要な細胞タイプそれぞれに特異的に Ca センサーを発現させ、数週間にわたって同じ細胞群から匂い反応をイメージングすることが可能になった。この手法を用いて、嗅球の主要出力である Mitral cell のにおい反応の、経験による可塑性を明らかにした。また、この可塑性は麻酔下では見られず、麻酔下と覚醒中の嗅球の活動は大きく異なることがわかった。(論文 5) また、嗅球の抑制系回路に着目し、その中でも特定のマーカー分子を発現する細胞群のにおい情報処理に対する寄与を詳細に調べた。(論文 4)

また、運動学習中の大脳皮質運動野の活動並びにシナプス結合の変化を調べた。これにより、運動野の活動と運動パターンの関係が、学習によって変化することが分かった。(論文 3) そして、学習中に、運動野の神経細胞が、場所特異的にシナプスの変化を起こすことが分かった。このシナプスの変化が、抑制細胞のタイプによる可塑性によって制御されていることを示した。(論文 2)

これらに加えて、大脳皮質視覚野の情報処理方法が、経験及び学習によって変化することを発見した。これは、長距離のフィードバックの入力と、局所的な抑制系細胞による制御によって制御されていることが分かった。(論文 1)

(2) 詳細

研究テーマ A 「嗅球のにおい反応の可塑性」

トランスジェニックマウスを用い、嗅球の主要出力細胞である Mitral cell に Ca センサーを発現させ、数週間にわたって同じ細胞群から匂い反応をイメージングすることが可能になった。この手法を用いて、マウスに数種のにおいを一日数回、数秒ごと嗅がせていく間に Mitral cell のにおい反応をイメージングしたところ、Mitral cell のにおい反応は経験につれて徐々に弱まった。この可塑性はにおい特異的であり、同一の Mitral cell は、未経験のにおいへの反応は強く保たれていた。この可塑性は数週間にわたって維持される一方、麻酔下では見られないことも分かった。これらの結果は、覚醒中の動物における Mitral cell の活動が、過去の経験によってダイナミックに調節され、嗅球の反応の強さは刺激の新規性に大きく影響されていることを示している。(論文 5)

また、Mitral cell と、嗅球の主要な抑制系神経である Granule cell の活動を麻酔下と覚醒中で比べたところ、Mitral cell は覚醒中にはにおい反応が麻酔下に比べてかなり弱く、粗であることがわかった。Granule cell は逆に、覚醒中では活動が高いが、麻酔下では活動が非常に弱くなっていた。これらの結果は、麻酔下における嗅球のレコーディングでは Granule cell の寄与を過小評価してしまい、覚醒中には匂い情報の表現は Granule cell の活動によって粗になる、という可能性を示唆している。(論文 5)

研究テーマ B 「嗅球の抑制系神経のサブタイプ」

嗅覚情報の処理の仕組みを解明するため、嗅球における微小回路が匂い刺激の入力をどのように処理しているのか調べている。その第一歩として、External plexiform layer に局在する、Parvalbumin (PV) を発現する抑制性神経の結合性並びに機能を調べた。PV cell は、External plexiform layer にまばらに局在している。PV cre のマウスラインを用いて、特異的に PV cell を特定することができる。スライスでの実験で、PV cell は主要興奮性細胞である Mitral cell と非常に密に高い確率で結合していることがわかった。In vivo で匂い刺激に対する反応をカルシウムイメージングで見ると、個々の PV cell は様々な種類の匂い刺激に幅広く反応することが示された。この結果は、Mitral cell との高い結合率 (Convergence) と一致しており、PV cell は Mitral cell や Granule cell よりもかなり広い tuning を示す。PV cell の活動を特異的に抑制すると、Mitral cell の匂い刺激に対する反応が線形的により強くなることから、PV cell は Mitral cell の匂い反応の Gain を制御していることが示唆された。今までの嗅球の抑制性細胞の研究はおもに Granule cell と Periglomerular cell に注目しているが、今回の結果は嗅球において様々な種類の抑制性細胞が複雑に匂い情報の表現を制御していることを示唆している。(論文 4)

研究テーマ C 「運動学習中の運動野の可塑性」

運動学習が脳のどのような変化を伴うのかという問いに着目して、マウスが頭を固定された状態で運動行動を学習する実験系を開発した。マウスは、前肢でレバーを特定の

方向に動かすことで報酬（水）がもらえることを、1日1時間（100回）ほどの訓練を2週間続けることで覚えた。マウスがレバーの動かし方を覚えるまでの期間中、レバーの動きを高解像度で記録し、運動パターンを詳しく解析した。また、この2週間に及ぶ学習期間中、運動野の神経細胞群の活動を細胞単位で、運動学習の全過程を通してイメージングしたところ、1）学習の初期では、レバーを動かす方向や速度がほとんど同じ場合であっても、神経細胞の活動パターンは全く異なっていた。しかし、2）学習が進むに連れ、徐々に神経細胞の活動パターンが安定化し、最終的には、神経活動のパターンと運動のパターンが一致するようになった。3）学習後期の運動パターンは、元々学習初期にも一部観察されていたが、神経活動のパターンは学習初期に見られたものと後期のものとは異なっていた。これらの結果から、ある1つの運動パターンはさまざまな神経活動パターンから生み出され得ること、運動学習によって初めて運動野の神経細胞の活動と運動パターンとが1対1の関係ができることが示された。（論文3）

次に、上記のように神経活動パターンが柔軟に変化し得るメカニズムを調べるため、運動学習中の運動野内の神経細胞同士のシナプス結合の動性を、高解像度イメージングを用いて経時的に観察した。この結果、学習期間中にのみ、新たなシナプス結合が、古いシナプス結合と入れ替わる形で形成されることが分かった。この結果は、運動学習が運動野内の神経回路を変更することを示し、新たな神経回路の形成が、学習後に見られる安定した神経活動パターンの再現に重要な役割を担っていると考えられる。（論文3）

運動学習中のシナプス結合の動性を詳しく解析したところ、樹状突起のうち、細胞体から遠位な部分のシナプス結合は学習によって変化するものの、近位のシナプス結合は変化しないことが分かった。これらの樹状突起の部位はそれぞれ別々の抑制系神経のタイプから抑制を受けていることが知られている（遠位=SOM-IN、近位=PV-IN）。そのため、PV-IN と SOM-IN に注目し、それらのシナプスを継時的に追ったところ、学習中にPV-IN のシナプスは増え、SOM-IN のシナプスは減ることが分かった。SOM-IN を学習中にOptogenetics を用いて活性化させたところ、興奮性シナプスの可塑性並びに学習が阻害された。これらの結果は、SOM-IN のシナプスの減少による興奮性細胞の樹状突起の活性化が興奮性シナプスの可塑性および運動学習に重要であることを示唆している。（論文2）

研究テーマD「視覚野の可塑性」

次に、学習による脳の感覚情報処理形態の変化を観察するために、視覚情報による能動回避学習課題注をマウスに与え、大脳視覚野における個々の同一神経細胞群の活動を2光子顕微鏡で数日に渡り評価した。興奮性神経細胞や抑制性神経細胞を個別に観測できる遺伝子改変マウスを利用し、またトップダウン入力の起点となる高次脳領域で遺伝子を導入する手法を組み合わせ、それらの神経細胞の活動を大脳視覚野で観測することで、脳内における個々の神経細胞群種の活動を体系的に、そして長期的に観測することに成功した。その結果、脳内部モデルからの予測、期待または注意といった情報を伝えるとされるトップダウン入力を可視化できるようになり、学習を通じて大脳視覚野に対するトップダウン入力の影響が強まることが示された。また外部世界からの情報処理に関わるとされるボトムアップ入力は学習が進むにつれて次第に減少することも分かり、

トップダウン入力とボトムアップ入力は非対称な変化を示した。次に、学習におけるトップダウン入力とボトムアップ入力という2つの情報処理機構の非対称な変化の仕組みを明らかにするため、さまざまな抑制性神経細胞の活動を個別に評価したところ、トップダウン入力を制御していると考えられる特定の抑制性神経細胞群（SOM-IN）の活動が下がることも分かりました。これにより、トップダウン入力による大脳視覚野への影響がさらに高まるのではないかと考えられる。本研究から、学習によって特定の視覚情報に対する脳の情報処理形態が変化することが明らかになった。このような学習における脳の個別の神経回路素子の体系的かつ長期的な観測は世界で初めて行われ、今まで実験で立証されることがなかった理論への理解を深めることに成功した。（論文1）

3. 今後の展開

本研究の技術的な目標であった、学習中の脳回路の機能と構造を細胞単位あるいは細胞以下の解像度で長期的に可視化することは達成された。今後は、これらの手法を用い、様々な種類の学習での変化を継続的に追うことで、普遍的な学習の機構を明らかにしていきたい。また、これらの手法は学習以外の論題にも有効であり、脳の高次機能の機構を突き詰めることにも使っていきたい。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

本研究の技術的な目標であった、学習中の脳回路の機能と構造を細胞単位あるいは細胞以下の解像度で長期的に可視化することは達成され、この手法を用いて学習の機構を追求した研究結果をトップジャーナルに5報発表することができた。また、領域会議での活発な議論を通じてアイデアの交換、また、共同研究も始めることができた。さきがけの支援のおかげと大変感謝している。

本研究の結果から、遺伝学的に定義された神経細胞の種類、特に抑制系神経のサブタイプが、学習並びに柔軟な行動に特異的かつ重要な役割を持つことが示唆されている。将来的にこれらのサブタイプを制御することが神経疾患の治療法として使われる可能性が出てきた。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

大脳皮質等の局所微小回路の作動特性において学習に伴って生じる変化はこれまでは主に電気生理学的解析で単一の神経細胞について解析されてきたが、近年イメージング技術などの進歩により微小回路全体を対象とする解析が可能になってきた。本研究は、マウスの頭蓋を二光子顕微鏡下に固定し、多数の神経細胞からなるセットの活動を無麻酔で長期間にわたって経時観察できる系を立ち上げることに成功し、遺伝子改変動物、スライス培養技術、カルシウムイメージングなどを用いて、抑制性介在ニューロンのサブタイプに着目しながら、学習にともなう微小回路の変化を解析したものである。まず嗅覚系で学習におけるシナプスの変化がにおい特異的・覚醒下特異的に起こり、その調節にパルブアルブミン陽性抑制性介在ニュー

一ロンが関わることを明らかにした。またレバー押し学習系を工夫して、2週間の訓練中に起きる大脳皮質運動野微小回路の活動変化を解析し、特定の運動パターンへの収束が神経活動パタンの収束によること、その変化においてソマトスタチン及びパルブアルブミン抑制性神経細胞から錐体細胞樹状突起へのシナプスが変化することなどを見いだした。さらに視覚学習にともなう視覚野の情報処理におけるトップダウン入力とボトムアップ入力の変化を解析して、ソマトスタチン細胞の関与を見いだしている。これらは高く評価される成果であり、いずれも論文発表している。今後より詳細な解析を経て学習にともなう大脳皮質に普遍的な回路機構とそこにおける抑制性神経細胞の役割が解明されることが期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Makino, H. and Komiyama, T. (2015)
“Learning enhances the relative impact of top-down processing in the visual cortex.”
Nature Neuroscience, 18(8), 1116–22. PMID: 26167904
2. Chen, S.X., Kim, A.N., Peters, A.J. and Komiyama, T. (2015)
“Subtype-specific plasticity of inhibitory circuits during motor learning.”
Nature Neuroscience, 18(8), 1109–15. PMID: 26098758
3. Peters, A.J., Chen, S.X. and Komiyama, T. (2014)
“Emergence of reproducible spatiotemporal activity during motor learning.”
Nature, 510(7504), 263–7. PMID: 2480523
4. Kato, H.K., Gillet, S.N., Peters, A.J., Isaacson, J.S.# and Komiyama, T. # (2013)
“Parvalbumin-expressing interneurons underlie a local inhibitory circuit regulating the gain of olfactory bulb output.”
Neuron, 80, 1218–31. PMID: 24239124
5. Kato, H.K., Chu, M.W., Isaacson, J.S. # and Komiyama, T. # (2012)
“Dynamic sensory representations in the olfactory bulb: modulation by wakefulness and experience.”
Neuron, 76(5), 962–75. PMID: 23217744

(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)

受賞

2015	BRAIN Initiative Grant Awardee, National Institute of Health
2014	Kavli Fellow, Kavli Foundation and National Academy of Sciences
2014	Highlighted as a ‘Scientist to Watch’, The Scientist Magazine
2014–17	McKnight Scholar, McKnight Foundation
2012–16	NYSCF–Robertson Neuroscience Investigator, New York Stem Cell

	Foundation
2011-16	Packard Fellow, David & Lucile Packard Foundation
2011-15	Pew Scholar, Pew Charitable Trusts
2011-12	Sloan Fellow, Alfred P. Sloan Foundation

研 究 報 告 書

「行動の概日リズムを制御する神経回路構築の分子基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月

研 究 者: 名越 絵美

1. 研究のねらい

動物の行動は特異的な神経回路によって生み出され、外界からの感覚情報、体内の生理環境や経験によって調節を受ける。行動の異常は様々な精神・神経疾患において顕著にみられ、近年その理解と改善に対する期待が高まっているにも関わらず、行動を司る神経回路の構築と動作原理の殆どは謎に包まれている。本研究では、行動を司る神経回路の動作機構のロジックを解明することを長期的目標とする。地球上のほとんどすべての動物は、地球の自転と公転によって生み出される周期的な外界の環境変化に対応するために、約24時間周期にリズムに変動する活動のパターンを示す。このような行動の概日リズム(サーカディアンリズム)は人では睡眠-覚醒のリズムを司っており、そのリズム障害は不眠症、睡眠覚醒リズム障害として現れるだけでなく、肥満や高血圧、脂質異常症などの生活習慣病のリスクを増大し、うつ病や双極性障害などの精神疾患に伴って現れることが知られている。従って、概日リズム発現と調節のメカニズムの理解はリズム障害と様々な疾患との関係の理解にも貢献すると期待される。

ショウジョウバエは比較的簡単な神経系を持ちながら、脊椎動物にも共通する多様な行動を示す上に、分子遺伝学的手法によって特異的な細胞種や遺伝子の機能を *in vivo* で解析することが比較的容易に行える系である。本研究では、ショウジョウバエをモデルとして行動の概日リズムを生み出す神経回路の構築と動作原理を分子レベルで解明することを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、行動の概日リズムを司る脳内のサーカディアン回路の構築のロジックを総合的に理解することを目標としている。ショウジョウバエの行動のサーカディアンリズムは分子時計機構を有する約150の時計ニューロンからなる神経回路(サーカディアン回路)によって生み出される。時計ニューロンには少なくとも7種類のサブタイプが存在し、その中でも、ventral lateral neurons (LNvs, M-cells)が回路全体のリズムを同調させ、行動のリズムの位相と速度をコントロールするマスターペースメーカーであると考えられてきた。しかしながら、LNvs がどのような機構でマスターペースメーカーとしての機能を発揮するかの詳細は明らかにされていない。細胞内の分子時計は細胞内の大部分の生理機能をリズムに調節することが知られているので、時計ニューロンでは分子時計が神経間の情報伝達機構に関わる様々な過程をコントロールすることによって時計ニューロン間の同調を促していると考えられてきている

が、その仮説を裏付ける分子機構は未知である。我々は、サーカディアン回路が同調したリズムを刻み行動発現を調節する機構を多角的に理解するために、(A) LNvs がマスターペースメーカーとしての機能発揮するために必要な分子機構と、(B) 時計ニューロンの神経間コミュニケーションと細胞内時計の相互関係を解析してきた。研究テーマ(A)においては、LNvs に特異的に発現する遺伝子の中から、その機能に不可欠な遺伝子 *unfulfilled (unf)* を同定し(論文1)、*unf* が LNvs の分子時計機構と時計のアウトプット経路に直接関わっていることを分子的に明らかにした。さらに、UNF が第2の核レセプターE75 と協働的に、分子時計に不可欠な *period* 遺伝子の転写を更新することを明らかにした(論文3)。E75 は哺乳類の分子時計の構築因子の一つである Rev-erb alpha のホモログであるので、これらの結果から、核内レセプターを介した転写調節が時計機構に 有益であるため進化的に保存されてきたことが示唆された。研究テーマ(B)においては、時計ニューロンのリズムの発生をリアルタイムで観察する系の立ち上げに成功し、時計ニューロン間のコミュニケーションがリズム発生に不可欠であることを明らかにしてきた。

(2) 詳細

研究テーマ(A) LNvs の機能の分子解析

LNvs が 時計ニューロンのヒエラルキー内で上位の機能を担うのはなぜか。この問いに答えるため、ハエの脳内の特定の細胞を単離し、その細胞内の RNA 発現ゲノムワイドにマイクロアレイで検出するという独自の手法を用いて、我々はこれまでに LNvs に発現する全遺伝子のリスト、時計ニューロン内で LNvs にのみ特異的に発現する遺伝子を同定してきた(Nagoshi et al. Nature Neuroscience 2010. 13(1) 60-68)。LNvs に特異的に発現する遺伝子のなかでも特に高い特異的発現を示す遺伝子について、行動のリズム制御に関与するかどうかを変異体や RNAi などを利用して用いてスクリーニングをしたところ、核レセプター *unfulfilled (unf; DHR51)* 遺伝子をノックダウンするとハエのリズムは完全に消失することが明らかになった。UNF がどのように行動のリズムに関与するかを明らかにするため、時期特異的にコンディショナルな遺伝子ノックダウンを行なったところ、UNF は LNv の発生過程および、発生後の成虫のニューロンの両者で必要であることがわかった。*unf* コンディショナルノックダウンのよって LNvs の分子時計にどのような変化が起きたのかを、免疫染色によって調べたところ、発生中の *unf* ノックダウンも、成虫でのノックダウンでも、LNvs の分子時計は恒暗条件下のみで停止することが明らかになった。加えて、サーカディアン回路の他の時計ニューロンの分子時計のリズムにも変化が起きており、発生中の *unf* ノックダウンによっては他の全ての時計ニューロンの時計のリズムが消失し、成虫での *unf* ノックダウンによっては dorsal lateral neurons (LNds) の時計の周期が約2時間遅くなることが明らかになった。これらの結果から、UNF は、マスターペースメーカーである LNvs の時計機構に直接関わるだけでなく、他の時計ニューロンのリズムを同調させ、回路全体として統一されたリズムを生み出すことに必要であるという結論が導かれ、論文に発表した(論文1)。

UNF はリガンド依存的に遺伝子の転写を調節する核内レセプターである。核内レセプターはホモダイマーまたはヘテロダイマーを形成して遺伝子の転写を調節することが知られているので、UNF の機能を裏付ける分子メカニズムを明らかにするため、ハエに存在する18種類

の核内レセプターを個々に M-cell 内でノックダウンし行動実験をすることによって、UNF と類似の機能をもつ核内レセプターをスクリーニングした。その結果、ほ乳類の Rev-Erb alpha のホモログである E75 が UNF とほぼ同じ機能をもつことが明らかになった。さらに、UNF または E75 をノックダウンすると M-cell 内の分子時計のリズムが消失し、UNF と E75 をダブルノックダウンすると行動のリズムも完全に消失することから、UNF と E75 は時計の構築因子の転写を直接制御する可能性が高いことが示された。E75 は Rev-Erb alpha/beta と同様に、ROR element (RORE) に結合することが予想されるので、ハエの時計遺伝子座の近傍に RORE 配列が存在するかどうか調べたところ、*period* 遺伝子の exon1 に RORE が存在することが分かった。さらに、S2 細胞を用いて *period* 遺伝子に E75 と UNF が結合するか、また E75 と UNF の結合が *period* 遺伝子の発現レベルを制御するか、その制御機構に RORE が関与するかどうかを Chromatin IP 及びルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。その結果、E75 と UNF は *period* の proximal promoter と、RORE を含む intronic promoter の両者に結合し、結合パターンは CLK の結合ピークと類似していることが明らかになった。さらに興味深いことに、E75 と UNF はそれぞれ単独でも *period* 遺伝子に結合するが、両者が同時に存在すると、UNF の結合のターンオーバーが亢進し、それと同時に *period* 遺伝子の転写を活性化させることが明らかになった。転写活性の高いプロモーター上では、核内レセプターの結合のターンオーバーが速いことが知られているので、以上の結果から、E75 が UNF の転写活性機能をより亢進させることによって *period* 遺伝子のリズム的な発現を調節しているという新たな分子機構が明らかになった(論文3)。加えて、我々の新しい知見は核内レセプター Rev-erb α のホモログの分子時計での役割が進化的に保存されていることを裏付けるものである(図1)。

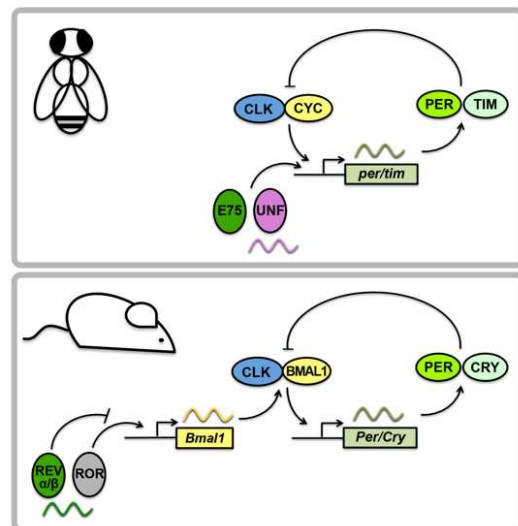


図1

研究テーマ(B)時計ニューロンの神経間コミュニケーションと細胞内時計の相互関係

時計ニューロンの分子時計のリズムの同調には、細胞間コミュニケーションが大きな役割を果たすと考えられてきたが、その機構はこれまで明らかにされていない。我々は、リアルタイムで時計ニューロン内の分子時計のリズムを観察する系を立ち上げることによって、神経間コミュニケーションとリズムの関係を明らかにすることを目指している。これまでに、*period* 遺伝子の転写リズムを VENUS 発現によって模倣するレポーターと、PER タンパクの C 末に赤色蛍光タンパクの TdTOMATO を融合し、PER タンパク質の発現と細胞内局在を模倣するレポーターの2種を構築し、それぞれを発現するハエの系統を作成した。さらに、ハエの脳と、分散培養ニューロンを リゾナントスキャナーコンフォーカル顕微鏡で長期間蛍光観察する系を立ち上げた。

両者のレポーターの挙動をライブイメージングで調べたところ、両者とも、培養脳内ではいくつかの時計細胞では概日振動に近いリズムを刻むが、分散培養系では振動は観察されない

ことがわかった。これらの結果は、ハエの時計ニューロンがリズムを発振するためには、インタクトな神経間ネットワークが必要であることを示唆している。

TdTOMATO レポーターは period タンパクと同様に、in vivo では時計ニューロン内で細胞質と核の間を行き来し、夜の後半には核内に局在する。しかし、分散培養ニューロンでは常に細胞質に存在することが明らかになった。分子時計は転写翻訳のネガティブフィードバックから構築されており、分子時計機構の中心的なリプレッサーである PER タンパクの核輸送は分子振動の鍵となるステップである。われわれのライブイメージングの結果は、分散培養ニューロンでは PER タンパクの核への輸送を調節する過程が阻害されているために、リズムが発振されないという可能性を示唆している。この可能性を検証し、時計ニューロン間のシグナル伝達がどのように PER タンパクの核輸送を調節するのかを明らかにするために、分散培養系を用いた薬理学的手法によってこの過程に関与する神経伝達物質を同定する実験を行った。その結果、VENUS 発現のベースラインは TTX または GABA の添加後に変化しないことから、period の基本的な転写には神経活動は必要ないことが分かった。しかし 興奮性伝達物質と考えられる PDF、5-HT、ACh の添加後には蛍光強度が増加した。PDF または 5-HT と同時に TTX を添加するとその変化が抑制された。これらの結果は、少なくとも period 遺伝子の転写レベルを増大させる過程には、PDF や 5-HT の入力と神経の発火活動が必要であることを示唆している(図2)。PDF は行動のサーカディアンリズムを公暗条件下で持続させるために不可欠なニューロペプチドであることが知られているが、PDF がどのように分子時計を調節するかは未知であった。これらの結果は、PDF の入力 Na チャネル依存的に period 遺伝子の転写レベルを増大させる役割があることをはじめて示したものであり、サーカディアン回路の動作機構を理解する上で極めて重要な知見である。

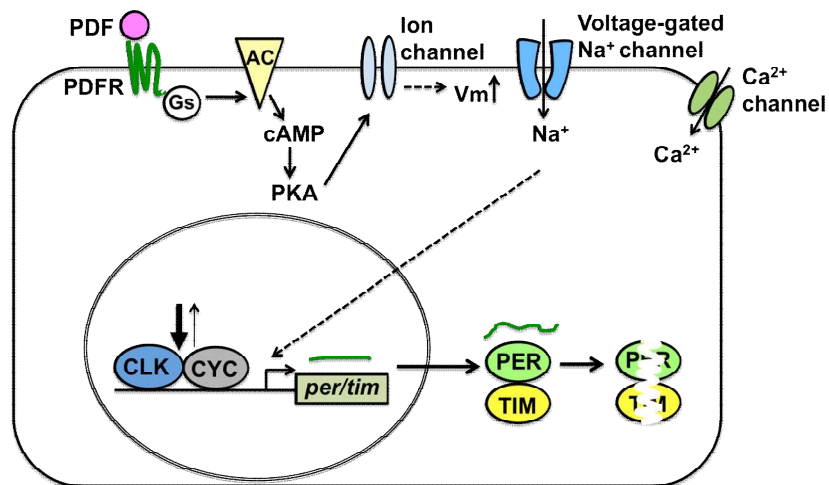


図2

3. 今後の展開

これまで、研究テーマ(A)においては、分子遺伝学の手法を駆使し、サーカディアン回路のメインペースメーカーである M-cell の機能に重要な分子 UNF、E75 を同定し、分子機構を追求してきた。研究テーマ(B)においてはライブイメージングを駆使して、個々の時計ニューロンの分子時計が、細胞間相互作用に非常に依存した特質を持つことを明らかにしてきた。今後は、分子遺伝学とイメージングの技術を組み合わせて、時計ニューロン間の相互作用が細胞内の時計機構を直接制御する機構を明らかにしていく。具体的には UNF によって転写調節を受けている幾つかの分子の機能解析をまず足がかりとする。一方、本研究で明らかにされた、細

胞間の相互作用に依存した時計機構を総合的に理解するための数理モデルの構築を目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究は行動のサーカディアンリズムを司る神経回路の動作機構を解明することを目標にし、分子時計のリズム発生機構を分子レベルで追求するというミクロの視点と、神経回路の活動が個々の神経細胞のリズム発生機構にどう関与するかというマクロの視点から研究を進めてきた。研究開始当初は Nocturnin という分子に着目して細胞内時計が光入力に同調されるための分子機構の解析を行っていたが、様々な技術的困難のために停止をやむなくされた。しかしながら、同時に行っていたスクリーニングから UNF が細胞内時計に重要な役割を果たす事が明らかになり、論文発表につながる結果を得た。さらに UNF の機能を分子レベルで追求することによって、哺乳類の時計遺伝子のホモログである E75 がハエのメインペースメーカー細胞の時計の構築因子であることを明らかにした。この結果はサーカディアンリズムの分子機構が、これまで予想されていた以上に進化的に保存されていることを示したものであり、ジュネーブ大学からプレスリリースとして発表され、フランスの雑誌 (Biofutur) にも掲載された。このように、具体的な研究内容は計画時とは異なるものの、サーカディアンリズムを司る神経回路の動作とその分子機構を明らかにするという研究目標に沿った結果が得られてきたと考えている。予想外の結果を得たときにあきらめず、また小さな結果でもおろそかにせずに追求することが必要であることを深く実感してきた。

蛍光レポーターを用いたライブイメージング系は、さきがけ研究よりの開始より数年前に構想し、パイロット実験行っていたが、いくつかの技術的困難によって完成されていなかった。しかし、さきがけ研究によってハエの系統を新たに作り直し、パイロット実験時には未だ開発されていなかった顕微鏡システムを用いることによって、技術的困難を克服し、信頼性のあるデータがとれるようになった。新たに確立したこの実験系を用いることによって、脳内の時計ニューロンの分子時計は細胞間のネットワークインタラクションに依存して機能するという新規の知見が見いだされた。この知見は、最近の哺乳類の研究結果と一部共通しており、ハエを用いた我々の研究が哺乳類にも共通するサーカディアン行動のペースメーカー回路の動作機構を理解するために非常に有益であることを示唆するものである。本研究で構築した蛍光のサーカディアンレポーターは、2光子顕微鏡を用いて生きたハエの脳内のサーカディアン振動を記録することに応用可能であり、オプトジェネティックスを組み合わせると、神経活動の操作とリズムの記録を生きたハエの脳内で同時に行うことも可能である。このような実験系は、例えば、ペースメーカー回路の光に対する応答を記録するためにも利用できる。外界の光情報は、ペースメーカー回路を介して行動の位相を左右させる最も重要な因子であり、光入力のタイミングが突然数時間もずれることが時差ぼけの原因であるが、その神経機構、分子機構は未解明である。新たに構築した蛍光のサーカディアンレポーターを用いて、光入力によって起こる個々のペースメーカー細胞のリズムの動的な変化を調べることによって、時差ぼけを起こす仕組みの神経基盤にも迫ることが可能である。このように、本研究で今後の研究にも役立つ技術を立ち上げることができ、研究領域の目標の一つを達成できたと言える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

動物は一般に周期的な外界の環境変化に対応して活動の周期的変動を示し、特にヒトにおいては脳による概日リズム制御の不調は不眠症等各種の疾患に深く関わっている。本研究は、比較的単純な構造の脳を持ちながらも行動に明確な概日リズムを呈し、かつ各種の遺伝学的手法を適用して行動を司る個々の遺伝子の機能を容易かつ迅速に解析できるショウジョウバエをもちいて、概日リズムの神経回路基盤を解明しようとするものである。脳内に数ある“時計ニューロン”の中でも LN_{vs} 細胞がマスターペースメーカーと目されつつもその分子機構が不明であった。本研究は *unf* 遺伝子がそこで経時機構と他の時計ニューロンを同調させる要となっていることを明らかにし、さらにその遺伝子産物 UNF が、ホモログが哺乳類において分子時計の一部とされている E75 と協働することにより、最も良く知られた時計遺伝子 *per* の読み出しに関わることを見だし、かつその周辺の分子現象を解明した。また薬理学的手法も援用してニューロペプチド PDF の PER 発現における役割も明らかにした。これらの成果は、分散神経培養系に加えてハエ脳を器官培養下にコンフォーカル顕微鏡にて長期間ライブイメージングできる実験観察系を立ち上げた得たことによるものであり、高く評価できる。これらの成果は適宜論文で発表している。今後は細胞内機構に加えて時計ニューロン間の相互作用の分子機構が明らかになるとともに、哺乳類脳の概日リズム神経機構とその障害の理解が加速されると期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Beuchle, D., Jaumouillé E., and Nagoshi, E. The nuclear receptor *unfulfilled* is required for free-running clocks in *Drosophila* pacemaker neurons. *Curr. Biol.* 2012. 22(13):1221–1227.
2. Bou Dib P, Gnägi B, Daly F, Sabado V, Tas D, Glauser DA, Meister P, and Nagoshi E. A conserved role for p48 homologs in protecting dopaminergic neurons from oxidative stress. *PLoS Genet.* 2014. 10(10):e1004718.
3. Jaumouillé E, Machado Almeida P, Stähli P, Koch R, and Nagoshi E. Transcriptional regulation via nuclear receptor crosstalk required for the *Drosophila* circadian clock. *Curr Biol.* 2015. 25(11):1502–8.
4. Abruzzi K, Chen X, Nagoshi E, Zadina A, Rosbash M. RNA-seq profiling of small numbers of *Drosophila* neurons. *Methods Enzymol.* 2015;551:369–86.
5. Daniel Pouly, Sébastien Chenaux, Virginie Martin, Maja Babis, Rafael Koch, Emi Nagoshi, Vladimir L. Katanaev, Frédéric Gachon and Olivier Staub. USP2–45 is a circadian clock output effector regulating calcium absorption at the posttranslational level. *PLoS One.* *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. プレスリリース (フランス)。 BIOFUTUR 367 Juillet/Août 2015, Biotech News (Medtech).
《 Chronobiologie : L' homme et de la mouche, une horloge biologique analogue 》
2. ジュネーブ大学プレスリリース。 Geneva | Thuesday 19 May 2015. Embargo: May 21, 2015, 12:00 noon US Eastern Time. “The fly' s time”
3. September 5, 2013. Swiss Chronobiology meeting, University of Fribourg, Switzerland. Oral presentaion. “Molecular mechanisms underlying the role of unfulfilled in Drosophila circadian rhythms“
4. September 4, 2013. SKMB Gene regulation workshop. University of Lausanne, Switzerland. Invited talk. “Circadian rhythms: from genes to networks“
5. September 2, 2013. Invited seminar at the Experimental Neurology Meeting, Host: Department of Clinical Research Neurology group, University of Bern. “Circadian rhythms from cells to networks“

研 究 報 告 書

「体温の概日リズムを制御する分子機構と神経回路ネットワークの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 10 月

研 究 者: 濱田 文香

1. 研究のねらい

本研究では、体温の概日リズム(体温リズム)を司る分子機構と神経回路の解明を目指している。ヒトの体温は、一日の周期で約1℃変動する。例えば、ヒトでは体温が上昇すると覚醒し、体温が下降すると眠くなる。また、病気の例として、睡眠障害である睡眠相前進症候群 (ASPS: Advanced sleep-phase syndrome)や睡眠相後退症候群 (DSPS: Delayed sleep-phase syndrome)は、不規則な体温変化をもたらす。したがって、この体温リズムは、睡眠や代謝に密接に関与し、恒常性の維持に重要な働きをもたらす。

体温リズムは視床下部(視交叉上核)にある概日時計によって制御されていることは周知である。しかし、体温リズムの研究は、これまで主にヒト、霊長類の生理現象が着目され、マウスなどの遺伝学を用いた研究は数少ない。そのため、体温リズムがどのように制御されているか、特にその分子機構と神経回路はほとんど未知である。これまでの研究において、概日リズムや睡眠などの哺乳類の概日リズムはショウジョウバエでも保存されており、その基本的な分子機構には共通性があることが見いだされてきた。また、ショウジョウバエは遺伝学を元に、行動を制御する神経回路を、体系的かつ迅速に調査可能な優れたモデル生物である。そこで本研究ではショウジョウバエをモデル生物として、体温リズムのメカニズムを、分子、細胞、神経回路レベルで探求することをねらいとしてきた。まず、私達はショウジョウバエの温度選択性行動に着目し、体温リズムを測定することに成功した。ショウジョウバエは概日時計依存的な体温リズムをもち、その周期性および分子機構はヒトの体温リズムの特徴と相似していた (Kaneko H, et al. *Current Bio* (2012))。この結果から、ショウジョウバエと哺乳類において、体温リズムを制御する基本的なメカニズムは、ハエと哺乳類で進化的に保存されていることが示唆された。本研究および、今後得られる知見はヒトまで進化的に保存している可能性が考えられる。

2. 研究成果

(1)概要

本研究は、体温リズムの分子メカニズムの解明を目指し、まず、ショウジョウバエの行動に着目した。哺乳類の体温は内在のエネルギーを使って調節されるが、変温動物であるショウジョウバエの体温は、外界の気温と限りなく近い。そのため、変温動物は自ら温度を選択することで体温調節を行っていると考えられている。そこで私達は、ショウジョウバエは温度選択行動を用いて、体温リズムを変動させているのではないかと考えた。その結果、ショウジョウバエは温度選択リズムを行い、リズムは哺乳類の体温リズムと3つの点で相似する事を明らかにした。1) 温度は昼間上昇し、夜間下降する。2) 概日時計による制御である。3) ハエの温度選択リズムは哺乳類の体温リズムと同様に、活動リズムとは異なった神経回路により制御される。哺乳類とショウジョウバエの体温調節機構は全く異なる。それにもかかわらず、体温リズム(温度選択

リズム)を制御する基本的なメカニズムは哺乳類とショウジョウバエにおいて相似している事が示唆された。このことから、体温リズムの分子メカニズムは進化的に保存されているのではないかと考えられる(Kaneko H, et al. *Current Bio* (2012))。さらに、本研究はこの行動の分子機構と神経回路のネットワークを明らかにする事を目的に実験を行い、これまでに次の3点を明らかにしてきた。1)温度選択リズムを制御する神経ペプチドの同定、2)光による温度選択行動への影響、3)温度感覚神経の温度選択リズムへの影響。今後これらの知見をもとに、概日時計と体温リズムをつなぐ分子制御機構および神経回路の解明だけでなく、睡眠障害の機構解明につながる事が期待される。

(2)詳細

研究計画1) 温度選択リズムを制御する神経ペプチドの同定

ショウジョウバエ温度選択リズムは一日の周期で変動し、昼間に温度上昇、夜に温度下降が起こる。ではなぜこのような変化が起きるのか、分子レベルでの制御機構の違いを明らかにするため、私達は神経ペプチドに着目した。神経伝達物質である神経ペプチドは、神経間の情報伝達だけでなく、多くの行動を含む生理的な課程を制御する。温度選択行動を用いたスクリーニングの結果、G 蛋白質受容体である DH31 受容体(哺乳類の CGRP 受容体ホモログ)変異体は、昼間に常に一定の高い温度を選択した。DH31 受容体の発現部位を特定するため、DH31 受容体抗体を作製し、脳での抗体染色を行ったところ、DH31 受容体は脳の時計細胞に発現していた (Goda et al., *in preparation*)

一方、DH31 受容体のリガンドである DH31 ペプチドは PDF 受容体と *in vitro* で結合する。PDF 受容体は DH31 受容体のホモログであり、かつ活動リズムに重要な働きをする事が知られている。そこで、私達は DH31 ペプチドと PDF 受容体の温度選択リズムにおける役割を調査するため、DH31 ペプチドの変異体を作製し、DH31 ペプチドの変異体および PDF 受容体変異体の温度選択リズムの表現型を観察した。その結果、どちらの変異体も昼間の温度上昇は正常にも関わらず、夜の温度下降に異常が見られた。私達は以前、脳にある 150 個の時計細胞のうち、DN2 細胞と呼ばれる細胞が、温度選択リズムを特異的に制御する事を発見した。そこで DN2 細胞特異的に PDFR 受容体、もしくは DH31 ペプチドを発現させ、PDFR 受容体変異体および DH31 ペプチド変異体の表現型をそれぞれレスキューすることに成功した。したがって、DH31 は PDFR 受容体のリガンドとして夜のみに関与する事が示唆された。このことから、温度選択リズムは、ホモログである2つの G 蛋白質受容体により、昼間と夜それぞれ特異的に制御される事が明らかになった (Goda et al., *Current Biology in revision*)。本研究により、DH31 受容体の役割および、DH31-PDF 受容体の機能的な役割が初めて明らかになった。

研究計画2) 光による温度選択行動への影響

夜間、光にあたると私達の体温は上昇する。私達は、ショウジョウバエは光照射下では高い温度を、暗黒下では低い温度を選択する(light dependent temperature preference (LDTP))事を明らかにした(Head et al., *Current Biology* (2015))。このことから、ハエの体温は外界の温度に近い、ハエも人と同様に光照射により体温が上昇すると考えられる。

この LDTP の神経回路を明らかにするため、ハエの 7 つの眼に着目した。それぞれの眼が異常になる変異体を用いて、スクリーニングを行ったところ、7個の眼のうち全てに異常が見られ

る変異体を用いても、LDTP 表現型は正常であった。ところが、*glass* 変異体を用いたところ、LDTP 表現型に異常が見られた。*glass* は転写因子であり、*glass* 変異体は7つの眼の発生が異常になるだけでなく、脳にある概日時計である DN1 神経細胞(DN1s)の発生に異常が見られる。そこで、私達は DN1s が LDTP 行動に関与しているのではないかと考え、更なる解析を行った。まず、DN1s は概日時計細胞なので、概日時計に関与する分子の変異体を用いて、スクリーニングを行った。その結果、pigment dispersing factor receptor (PDFR) と呼ばれる GPCR の変異体のみが異常を示した。さらに、DN1s 特異的に PDFR-RNAi を発現させた PDFR のノックダウン、および、DN1s 特異的に PDFR-cDNA を発現させたレスキュー実験から、PDFR の DN1s での発現が必要十分である事を示した。温度選択リズムにおいても、LD にした場合と DD にした場合で選択する温度が同様に变化するため、昼間においては、温度選択リズムは外界の光刺激と体内時計の情報が統合する事によって、成り立つ事が考えられる。

研究計画3)温度感覚神経の温度選択リズムへの影響

外界からの温度刺激は、哺乳類の体温変化を促しその結果、概日時計にも影響を与える。そこで私達は、まず、ハエの外界からの温度刺激を感知する分子メカニズムを明らかにし、そのメカニズムが、温度選択リズムに影響を与えるか否かに着目した。TRP (Transient Receptor Potential) チャンネルは哺乳類からショウジョウバエなどで保存された温度感知センサーである。しかし、TRP チャンネルを使って感知された様々な温度情報が、どのように神経回路中で統合され伝達するのかほとんどわかっていない。ショウジョウバエ TRPA1 は 25°C>で活性化する暖センサーである。私達は以前、この TRPA1 の発現する AC 神経が直接暖かさを感知し、温度選択行動に重要な働きを示す事を明らかにした(Hamada FN, et al. *Nature* (2008))。この AC 神経は脳に存在するため、内在的な温度環境を感知している事が考えられる。ところが最近、昆虫の温度センサーは触覚や足などに多く存在する事がわかってきた。そこで AC 神経の存在する場所を詳しく調査したところ、AC 神経細胞は触覚からの神経群が脳に投射する軸索上に接して存在し、触覚からの温度感知情報を統合している事が明らかになった。さらに私達は、TRP チャンネルの1つである 38°C>で活性化する pyrexia (pyx) が触覚第二節に発現し、AC 神経はこの pyx 神経からの暖温度情報を統合している事を明らかにした。本研究は末梢から中枢への温度情報統合を初めて示し、この統合が動物の行動に重要な働きを示す可能性を示唆した(Tang X, et al. *J Neurosci* (2013))。

痛みの強さ(例えば偏頭痛や歯痛)は時間によって変化する事が知られている。この現象は概日リズムとの関連性は示唆されるが、そのメカニズムはあまり明らかでない。そこで本研究において、感覚神経と時計の神経回路がどのように関連し、生理に影響を与えているのか、ハエの温度選択行動をモデルに検証した。ショウジョウバエ温度選択リズムは一日の周期で変動し、昼間に温度上昇、夜に温度下降が起こる。TRP チャンネルの1つである TrpA1 の発現する anterior cells (AC) 神経は脳で外部の温度を感知する神経細胞であり、ハエ温度選択行動を制御する。私達は AC 神経と small lateral neurons (sLNv)時計細胞が末端で接触し、夜明け前の温度選択のみに重要な働きをしていることを明らかにした。また、セロトニンが温度伝達に使用されており、特にセロトニンは哺乳類においても体温制御に関与する事が示唆されている。さらに、私達は sLNv は、温度選択リズム全体を制御する master clock である dorsal neurons

(DN2)神経に接触する事を明らかにした。この接触した数は夜間、劇的に変化し、夜明け間にピークを示した。また sLNvs は DN2s を活性化し、DN2s の活性化を阻害したハエは低い温度を選択した (Tang et al., *Current Biology* in revision)。このことから、夜明け前に sLNvs と DN2s 神経はより結合し、DN2の活性化を制御する事で適切な温度選択リズムを制御しているという事が考えられる。したがって、本研究において、sLNvs は外界の温度の情報を時計の神経回路に統合するための gate として働いている事が示唆された。ハエの温度選択リズムは哺乳類の体温リズムと同様な働きをもつ。したがって、哺乳類の体温リズムにおいても外界の温度の情報は重要な働きをしているかもしれない。特に、夜明け前は体温リズムだけでなく、私達の体内で多くの現象がおこる、例えば、心拍数の増加や目覚めなど、これらの現象も外界の温度の情報は重要な働きをしているのかもしれない。

3. 今後の展開

概日リズムの研究は、1972年にショウジョウバエを用いて *period* 変異体が発見されて以来、大きく進展した。今もなお、概日リズムを制御する分子メカニズムを明らかにするために、ショウジョウバエの活動リズムは、世界中で頻繁に使用されている。このショウジョウバエの活動リズムを用いて、分子メカニズムが明らかにされ、その多くは哺乳類にまで保存していた。そのためショウジョウバエのモデル生物としての貢献はとても大きい。私達は 2012 年にショウジョウバエの温度選択リズムを発見した。重要なことは、この体温リズムのメカニズムは、これまで頻繁に使われている活動リズムとは異なるメカニズムによって制御されている点である(哺乳類の体温リズムも同様、活動リズムとは異なるメカニズムで制御されている)。このことから、温度選択リズムを用いることで、新しい概日リズムのメカニズムが明らかになるかもしれない。また、最近の結果から、温度選択リズムと代謝および睡眠の影響を示唆する結果がでてきた。このことを含めて、将来的にはさらなる温度選択リズムのメカニズムの解明をするとともに、代謝や睡眠にどういった影響を及ぼすのか、分子レベルで明らかにしていきたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

ショウジョウバエの温度選択リズムの分子機構とその神経回路ネットワークを明らかにするにあたり、これまでに6本の論文(うち2本は revision)を発表する事ができた。当初の予定であった、温度選択リズムの基本的なメカニズムを明らかにするだけでなく、新しい因子の特定、および、光に対する反応など、温度選択行動を中心として、研究が発展でき、将来の展望も明らかになってきた。妊娠中および産休中は領域会議にスカイプでしか参加できなかったため、他の領域の研究者の発表を聞くことができなかったのはとても残念に思う。しかし、さきがけを通じて、領域の先生方だけでなく、研究者の方達と知り合う事ができ、さきがけに採用されるというチャンスを頂けたという事を本当に感謝したいと思う。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での

評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

(研究総括)

行動遺伝学の研究材料として 40 年以上にわたり多様な分子遺伝学的研究が行われてきたショウジョウバエは変温動物とされ、その体温の研究はほとんど顧みられてこなかった。本研究はこのハエが環境温度選択行動を示しかつその行動に日リズムがあることを発見し、これが概日時計による制御を受け、それは活動リズムとは別個の神経回路による制御であることを解明した。さらに、時計細胞 DN2 細胞に着目した遺伝変異体解析などにより、神経ペプチドの DH31 受容体と PDF 受容体の機能が昼の高温選択と夜の低温選択行動とを特異的に演出していることを解明し、また DN1 細胞における PDFR 受容体が昼の温度選択リズムに光刺激が介入することを可能にしていること、および外界温度の感知は AC 神経細胞の TrpA1 チャンネルにより、その情報が AC 神経から sNLv 時計細胞を介して DN2 細胞に統合されることを見いだした。これらは独創性の高い研究成果であり、適宜論文発表しあるいは投稿中となっている。これら一連の研究によっても哺乳類の体温リズムとショウジョウバエの温度選択リズムには関与分子を含めて共通点が複数見いだされており、今後ハエの概日リズム機構の全貌がより精緻に解明され、哺乳類の概日リズム神経機構の理解に役立ち、ひいては睡眠障害などの治療の手がかりも得られることが期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Head, L.M., Tang, X., Hayley, S.E., Goda, T., Umezaki, Y., Chang, E.C., Leslie J.R., Fujiwara, M., Garrity, P.A. and Hamada F.N. The influence of light on temperature preference in *Drosophila*. **Current Biology**, 2015 Apr 20;25(8):1063–8.
2. Goda, T, Leslie J., and Hamada F. N. Design and analysis of temperature preference rhythm in *Drosophila*. **J. Vis. Exp**, 2014 Jan 13; (83)
3. Tang X., Platt M.D., Lagnese C.M., Leslie J.R., & Hamada F.N. Temperature integration at the AC thermosensory neurons in *Drosophila*. **The Journal of Neuroscience**, 2013 Jan 16;33(3):894–901.
4. Kaneko H., Head L.M., Ling J., Liu Y., Hardin. P.E., Emery.P., & Hamada F.N. Circadian rhythm of temperature preference and its neural control in *Drosophila*. **Current Biology**, 2012 Oct 9;22(19):1851–7

(2) 特許出願

研究期間内累積件数: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)

口頭発表

- “Integration of clock and temperature circuits drives pre-dawn temperature preference in *Drosophila*”

Gold spring harbor meeting, Neurobiology of *Drosophila* 2015 年 9 月

- “Circadian rhythm of temperature preference and its neural control in *Drosophila*”
SRBR (The Society for Research on Biological Rhythms) 2014, Symposium, Big Sky,
Montana 2014 年 6 月
- “Circadian rhythm of temperature preference and its neural control in *Drosophila*”
日本神経科学大会 2012 年 9 月

受賞

- Charlotte R. Schmidlapp Woman Scholars 2015 年
- Basil O’ Connor Starter Scholar Research Award, March of Dimes 2012 年