

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650074

研究課題名(和文)光遺伝学による神経回路標識と、その遺伝子発現解析への応用

研究課題名(英文)Optogenetic labeling of neural circuits for gene expression analysis in vivo

## 研究代表者

千原 崇裕 (Chihara, Takahiro)

東京大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00431891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳神経回路の発生・機能を正確に理解するためには、脳を構成するそれぞれの細胞群の遺伝子発現情報を取得、整理することが必須となる。本研究では、ショウジョウバエの脳をモデルとして、脳内で任意に標識した神経細胞の遺伝子発現プロファイルを取得可能にする技術基盤開発と研究例提示を目標とした。その結果、脳内の特定の神経細胞における遺伝子発現情報を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the development and function of neural circuits, it is crucial to know which gene is expressed in each neuron of the brain. In this study, we aimed to develop the efficient method to analyze the gene expression profile of neurons of interest in the Drosophila brain. As a result, we succeeded to establish the method to perform microarray analysis using total RNA isolated from genetically labeled neurons in the developing Drosophila brain.

研究分野：神経発生遺伝学

キーワード：遺伝子発現 神経細胞 マイクロアレイ ショウジョウバエ

### 1. 研究開始当初の背景

現在、神経科学分野、特にショウジョウバエ脳を題材にした脳科学分野では、「分子神経回路」「神経回路 記憶・行動」を結ぶ研究が盛んに行われており、それぞれの神経回路の役割が明らかになりつつある(*Science* 322, 904-909, 2008)。この研究の流れを加速している一因として、米国ハーワードヒューズ医学研究所が行う「ショウジョウバエ脳の網羅的神経回路解析(コネクトーム解析)」が挙げられる(<http://flweb.janelia.org/cgi-bin/flew.cgi>)。このプロジェクトにより数年後には「完全なショウジョウバエ脳神経地図」が発表され、個体行動・記憶との関係に関する理解が更に深まると予想される。このように、ショウジョウバエ脳の構造・回路の理解は飛躍的に進んできたが、「どのようにして神経回路が形成されるか?」という最もシンプル且つ重要な疑問に対しては、発生神経科学者が地道にそれぞれの神経回路・遺伝子を研究しているのが現状である。

### 2. 研究の目的

脳のように圧倒的に複雑な神経回路であっても、その大まかな設計図は遺伝子によって規定されている。よって、脳神経回路の発生様式・機能特性を正確に理解するためには、まず、脳を構成するそれぞれの細胞群の遺伝子発現情報を取得、整理することが必須となる。本研究では、分子・神経回路・行動・記憶を関連づけた研究が進む「ショウジョウバエの脳」をモデルとして、「脳内で任意に標識した神経細胞の遺伝子発現プロファイル」を取得可能にする技術基盤開発と研究例提示を目標とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、ショウジョウバエの高度な遺伝学を駆使することにより、脳内の任意の神経細胞を1細胞レベルの解像度で標識し、更にそれら神経細胞の遺伝子発現プロファイルを行った。更に、私達の研究グループが確立した微量total RNAからの増幅技術を用いてマイクロアレイ解析を行った。具体的には、ショウジョウバエ嗅覚系の二次神経細胞である「投射神経(Projection Neuron: PN)」の遺伝子発現プロファイリングを行うことにより、本研究構想が実現可能であることを示すことで、他の脳回路研究への波及効果を狙うものである。

本研究におけるモデル脳神経回路として、ショウジョウバエ嗅覚回路2次神経である「投射神経(Projection Neuron: PN)」を採用した。これまで私は「PN 樹状突起の発生、特に樹状突起ターゲティング」に関する研究を行ってきており、本モデル神経回路には精通している(*J Neurosci* 26, 3367-3376, 2006; *Nat Neurosci* 10, 828-837, 2007; *J Neurosci* 30, 9939-9946, 2010)。以下にPNが構成する神経回路・触角葉に関して説明する。触角葉は、

約50個のシナプス構造・糸球体から構成されており、哺乳類では嗅球に相当する脳構造である。PN(mitral/tufted 細胞に相当)は嗅覚神経回路の2次神経として、その樹状突起を約50個の糸球体の中から特定の糸球体を選び出してターゲティングする。この特徴的な樹状突起ターゲティング様式により、触角葉における匂い情報は混線することなく高次嗅覚中枢へ伝えられていく。本研究では、各糸球体へ投射するPNの遺伝子発現プロファイリングをモデルに研究を進めた。

まず、発生過程の特定のPNのみを標識する目的で、様々な遺伝学的手法を用いてPN標識を行った。まずショウジョウバエの遺伝学的モザイク法 MARCM 法(*Neuron* 22, 451-461, 1999)を用いて発生過程の特定PNを標識した。その結果、標識自体は可能ではあるが、標識効率が低いため、本研究の目的には不適切であることが明らかになった。ショウジョウバエには、上記 Gal4/UAS システム、MARCM 法に加えて、LexA/LexOP システム、QF/QUAS システム、FLP/FRT 組み換えシステムなどを活用することで、個体内の細胞を標識する事が可能になる。次に私は Gal4/UAS システムと FLP/FRT 組み換えシステムを組み合わせることでPNを効率的に標識できるかを検証した。様々な Gal4、FLP の組み合わせることによって、最終的に、発生過程のPNを約90%の効率で、標識できる条件を見出すことに成功した。

上記方法で標識された神経細胞を酵素処理により、分離し、手動により回収した。回収した細胞からtotal RNAを抽出し、増幅・ラベルすることによりマイクロアレイ解析を行った。このショウジョウバエ脳神経細胞の分散・単離にはスイス・ベルン大学の名越教授から様々なアドバイスを受け、微量RNAからの線形性を保った増幅には哺乳類1細胞マイクロアレイ法のプロトコル改変を行った。これら方法を用い、特定のPNから回収されたtotal RNAにおける遺伝子発現状態をマイクロアレイ法により解析した。

### 4. 研究成果

上記のように、条件検討で殆どの時間を費やしたが、最終的にはマイクロアレイデータを取得することができた。その結果、PN 樹状突起ターゲティングに関わる候補遺伝子群の同定に成功した。例えば、候補遺伝子の中には *Toll6* 遺伝子などの全く想定外の遺伝子も含まれていたが、本研究過程で「*Toll6* がPN 樹状突起ターゲティングにおいて重要な働きをしている」という報告が成された(*Neuron* 85, 1013-1028, 2015)。この報告は、研究成果を先に報告されたという意味で残念であると同時に、本研究で得られた候補遺伝子群を解析することで更にPN 樹状突起ターゲティングに関する知見を深めることができる可能性を示している。今後は、更にマイクロアレイデータを蓄積し、得られた候補

遺伝子群の解析を進める。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

Okumura, M., Sakuma, C., Miura, M. and **Chihara, T.\*** "Linking cell surface receptors to microtubules: Tubulin folding cofactor D mediates Dscam functions during neuronal morphogenesis"

*J Neurosci* 35:1979-1990 (2015)

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0973-14.2015

査読有り

Sakuma, C., Kawauchi, T., Haraguchi, S., Shikanai, M., Yamaguchi, Y., Gelfand, V.I., Luo, L. and Miura, M. and **Chihara, T.\*** "Drosophila Strip serves as a platform for early endosome organization during axon elongation"

*Nat Commun* 5:5180 (2014)

DOI:10.1038/ncomms6180

査読有り

Sakuma, C., Anzo, M., Miura, M. and **Chihara, T.\*** "Development of olfactory projection neuron dendrites that contribute to wiring specificity of the *Drosophila* olfactory circuit"

*Genes and Genetic Systems*, 89: 17-26 (2014)

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs/89/1/89\\_17/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs/89/1/89_17/article)

査読有り

**Chihara, T.\***, Kitabayashi, A., Morimoto, M., Takeuchi, K., Masuyama, K., Tonoki, A., Davis, L.D., Wang, J.W. and Miura, M.\* "Caspase inhibition in select olfactory neurons restores innate attraction behavior in aged *Drosophila*"

*PLOS Genetics* 10:e1004437 (2014)

DOI:10.1371/journal.pgen.1004437

査読有り

千原崇裕「膜タンパク質を一網打尽：小胞体分子 Meigo による樹状突起ターゲティング制御機構」生化学 86, 259-264 (2014)

[http://www.jbsoc.or.jp/ebook/ebook\\_JBS8602/#258](http://www.jbsoc.or.jp/ebook/ebook_JBS8602/#258)

査読なし

Sekine, S.U., Haraguchi, S., Chao, K., Kato, T., Luo, L., Miura, M. and **Chihara, T.\*** "Meigo governs dendrite targeting specificity by modulating Ephrin level and N-glycosylation"

*Nat Neurosci* 16:683-91 (2013)

DOI:10.1038/nn.3389

査読有り

関根清薫・千原崇裕「小胞体タンパク質

Meigo は Ephrin の蛋白質量および N-結合型糖鎖修飾を介し樹状突起のターゲティングにおける特異性を制御する」

ライフサイエンス新着論文レビュー(2013)

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/7116>

査読なし

〔学会発表〕(計7件)

**Chihara, T.**: Molecular and cellular mechanism underlying neural map formation in *Drosophila*. 2015. 1.28, Global COE Liaison Laboratory Seminar, Kumamoto

千原崇裕, 関根清薫, 森谷浩幸, 三浦正幸: 神経発生において特異的な機能を持つ小胞体分子 Meigo. 第 87 回 生化学会大会. 2014.10.15-18、京都

**Chihara, T.**: ephrin/Eph signal governs wiring specificity in the *Drosophila* olfactory circuit. 2014. 1.30, Workshop on Sensory Systems, Yokohama

千原崇裕: 微小脳から学ぶ神経科学と疾患、熊本大学大学院生命科学研究部 大学院特別講義、2013.10.11、熊本

千原崇裕: 神経回路の一生を支える分子基盤 ショウジョウバエ遺伝学を用いたアプローチ、熊本大学発生医学研究所第220回発生研セミナー、2013.10.10、熊本

千原崇裕: 新規因子 Dogi は、初期エンドソーム成熟と癌抑制遺伝子 Hippo 経路を介して神経発生を制御する、第86回日本生化学会大会シンポジウム、2013.9.13、横浜

千原崇裕: 新規因子 Dogi は、発生過程の神経において初期エンドソーム成熟と癌抑制遺伝子 Hippo 経路を制御する、第 65 回日本細胞生物学会シンポジウム、2013.6.19、名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~genetics/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

千原 崇裕 (CHIHARA TAKAHIRO)  
東京大学 大学院薬学系研究科・准教授  
研究者番号：00431891

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし