

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0331

研究課題名（和文）精緻な神経回路を作る、個々のニューロン識別機構（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Single neuron discrimination for refining neural circuits(Fostering Joint International Research)

研究代表者

金子 涼輔 (Kaneko, Ryosuke)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40390695

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 8,400,000円

渡航期間： 9ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、マウス小脳をモデル解析系とし仮説「同じPcdhを発現するニューロン同士で神経回路を作る」の検証を試みた。その結果、Pcdh欠損により(i)小脳神経回路が異常になる、(ii)小脳の運動学習機能が異常になる、ことが判明した。本結果により、小脳の機能的神経回路形成にPcdhが関与することが明らかとなった。また、上記仮説を検証するために用いるPcdh発現レポーターマウスの作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、小脳の機能的神経回路形成にPcdhが関与することが明らかとなった。小脳は運動学習を制御することが知られていた。さらに、近年になって自閉症への関与も報告され、高度な精神機能への関与も明らかとなった。従って、本研究を進展させることで、運動学習や高度な精神機能を担う新たな分子メカニズムの解明が予想される。将来的には、運動機能を向上させる新規な手法や自閉症の新たな治療法の開発に結びつく可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, the mouse cerebellum was used as a model system to verify the hypothesis that two neurons expressing the same Pcdh wire each other and make neural circuits. We found that Pcdh deficiency caused (i) abnormal cerebellar neural circuits in cerebellum and (ii) motor learning deficits. These results indicate that Pcdh is involved in the formation of functional neuronal circuits in the cerebellum. Furthermore, we have generated a Pcdh-expression reporter mouse, which will contribute to directly verify the hypothesis in the near future.

研究分野：神経生物学

キーワード：プロトカドヘリン 小脳 運動学習

## 様式 F-19-2

### 1. 研究開始当初の背景

ニューロンは適切なパートナーを識別して神経ネットワークを作る。しかし、個々のニューロンを識別する分子メカニズムには不明な点が多い。私たちは、個々のニューロンごとに異なるプロトカドヘリン (Pcdh、細胞接着分子) が発現する事を見出した (Nat Genet, 2005, JBC, 2006, Front Mol Neurosci, 2012) (図1)。Pcdh は脳神経系で発現する接着分子群である。哺乳類では約 50 種類の互いに異なった Pcdh 遺伝子 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) が存在する。同じ Pcdh タンパク質同士が結合することも考え合わせ、仮説「同じ Pcdh を発現するニューロン同士で神経回路を作る」を立てた。

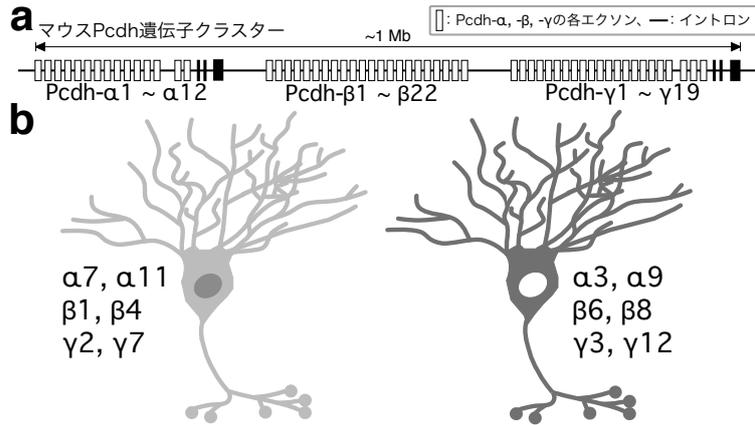


図1 約50種のcPcdh遺伝子(a)とその発現(b)

cPcdhは個々のニューロンでランダムな組み合わせで発現する。

私たちは上記仮説の検証を目的として研究を進めてきた。本研究開始当初には、以下(あ)(い)の進展が得られていた。

#### (あ) 単一Pcdh分子種発現可視化レポーターマウス樹立

生きた脳の中でPcdh発現パターンを知る手段が囑望されていたが、他グループも含めて失敗続きであった。しかし、本国際共同研究の開始直前に、Pcdh- $\beta$ 3遺伝子座に赤色蛍光タンパク質 (RFP) をノックインしたマウス (Pcdh- $\beta$  RFPマウス) が完成した。本マウス使用により、遂に単一Pcdh分子種の発現を可視化できた。

#### (い) Pcdh欠損マウスにおける小脳機能異常の発見

2014年度よりオランダ・エラスムス医療センター Chris De Zeeuw 教授との共同研究を始めた。Pcdh 欠損マウス (小脳 Pcdhg KO マウス) をオランダにて繁殖し、運動機能を計測したところ、その異常が認められた。本結果は、小脳機能異常の可能性を示しており、小脳の神経回路形成における Pcdhg の関与が示唆された。

### 2. 研究の目的

私たちは上記の仮説「同じ Pcdh を発現するニューロン同士で神経回路を作る」の検証を目的としている。しかしながら、マウス個体レベルでの生理学的解析技術の経験・機材・ノウハウ不足のために Pcdh 依存的に神経回路が形成される場所や時期の同定が困難であった。そのために、オランダ・エラスムス医療センター Chris De Zeeuw 教授の研究室に滞在することで上記困難を克服し、上述の進展(あ)(い)を発展させることで上記仮説を直接的に検証することが、本国際共同研究の目的である。

### 3. 研究の方法

マウス小脳の神経回路をモデル解析系とし、以下3課題を行なう。

- Pcdh 欠損マウスにおける神経回路の形態学的・電気生理学的解析
- Pcdh 欠損マウス小脳機能の *in vivo* 解析 (De Zeeuw 教授と共同研究にて実施)
- 個々の神経回路における Pcdh の発現解析 (De Zeeuw 教授と共同研究にて実施)

これら実行には(ア)遺伝子改変マウス、(イ)Pcdh 発現解析、(ウ)マウス個体での小脳機能解析法を用いる。申請者は(ア)(イ)には経験と実績がある (Nat Protocols, 2006 など)。一方、課題 b) および c) は De Zeeuw 教授との共同研究にて行なう。

特に課題 c が本研究計画の最も重要な点である。すなわち、Pcdh 発現を可視化できるレポーターマウス (Pcdh- $\beta$  RFP マウス[完成]および Pcdh- $\gamma$  PA tag マウス[作製中])を用いる。De Zeeuw 研究室にて本マウスに運動学習させる。学習により形成された神経回路は同一の Pcdh 発現と予想する。そのため、これらマウス小脳において学習により形成された神経回路を標識し、その神経回路における Pcdh 発現をレポーターマウスを用いて解析する。

#### 4. 研究成果

本国際共同研究では、課題 a), b), c)について下記の成果が得られた。

##### 課題 a) Pcdh 欠損マウスにおける神経回路の形態学的・電気生理学的解析

小脳のほぼ全てのニューロンにおいて Pcdh を欠損させたマウス (PV-cre: Pcdhg cKO マウス。課題 b でも解析)の小脳神経回路を形態学的に解析した。その結果、様々なニューロンタイプにおける細胞数の減少を見出した (顆粒細胞、分子層インターニューロン、プルキンエ細胞)。さらに、プルキンエ細胞の配置の乱れを見つけた。興味深いことに、配置が乱れているプルキンエ細胞では樹状突起の形態異常も認めた。これらは Pcdh 欠損により神経回路が異常になることを示す。電気生理学的解析については、現在、共同研究を進めている。

##### 課題 b) Pcdh 欠損マウス小脳機能の in vivo 解析

問) Pcdh 欠損により脳機能が異常になるか?に答えるべく研究を進め、以下の成果を得た。これまでに小脳のほぼ全てのニューロンにおいて Pcdhg を欠損させたマウス (PV-cre: Pcdhg cKO マウス。課題 a でも解析)では運動機能 (歩行機能など) の異常を見つけていた。しかしながら、この異常には小脳以外の関与も考えられる。そこで、小脳依存性がより限局した学習課題である、瞬目条件付け反射学習能を調べた。その結果、本学習能には異常がないことがわかった。本結果は本マウスにおいては基本的な小脳学習能が保持されていることを示唆する。次いで、より高度な学習課題である、位相逆転眼球運動学習における学習能を調べた。その結果、本欠損マウスでは位相逆転眼球運動学習の成績が低下していた。本結果は、位相逆転眼球運動学習の際に作られる神経回路の少なくとも一部は Pcdhg に依存することを示唆している。本結果は、Pcdh 欠損により脳機能が異常になることを明確に示している (図 2)。

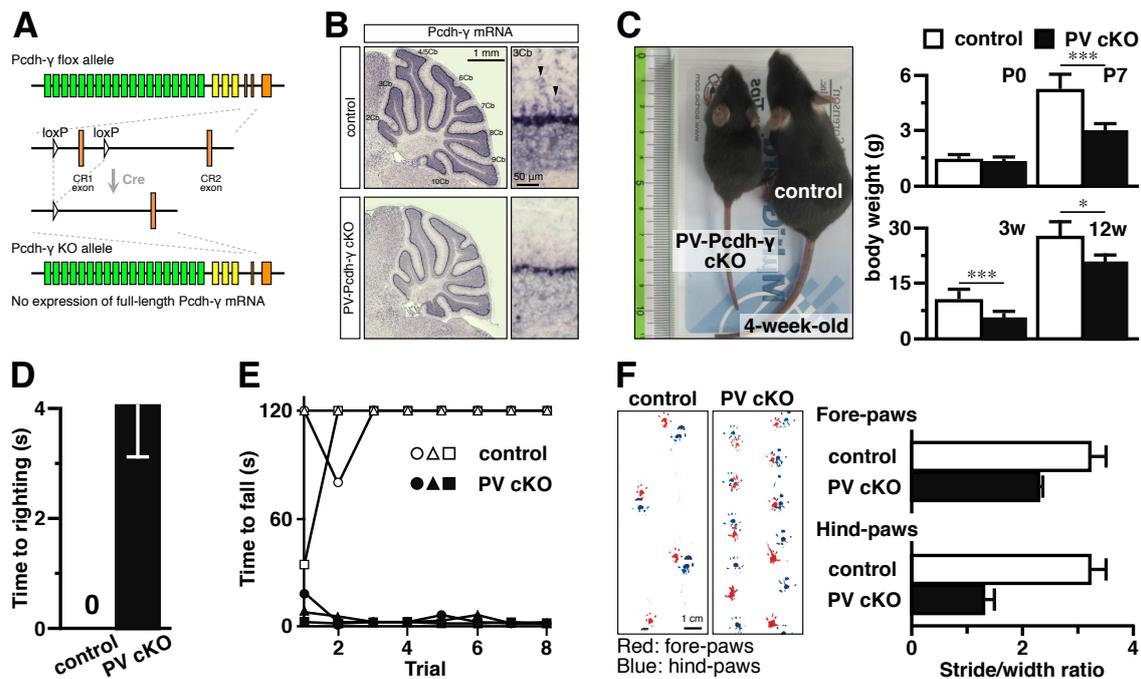


図2 小脳ニューロンにおけるPcdh欠損マウスの行動学的異常

次いで、運動学習において Pcdhg が必要なニューロンタイプの同定を試みた。そのため、3 系統の細胞種特異的 Pcdh 欠損マウス (L7-cre: Pcdhg cKO マウス、A6-cre: Pcdhg cKO マウス、Ptf1a-cre: Pcdhg cKO マウス) を作製し、これらの小脳機能を調べた。発生後期以降のプルキンエ細胞特異的 Pcdhg 欠損マウス (L7-cre: Pcdhg cKO マウス) の運動学習能を調べたところ、ほぼ正常であった。顆粒細胞特異的 Pcdhg 欠損マウス (A6-cre: Pcdhg cKO マウス) では位相逆転眼球運動学習において、わずかに運動学習能の低下が見られた。発生初期以降にて小脳抑制性ニューロン特異的 Pcdhg 欠損マウス (Ptf1a-cre: Pcdhg cKO マウス) では位相逆転眼球運動学習において運動学習能の低下が見られた。これらの結果より、発生初期の小脳抑制性ニューロンにおいて Pcdhg が機能的な神経回路形成に関与することが示唆された。

### 課題 c) 個々の神経回路における Pcdh の発現解析

問) 神経回路を構成するニューロン群における Pcdh 発現は同一か? に答える際に必要となる Pcdh 発現細胞可視化マウス (蛍光タンパク質ノックインマウス) を作製・解析し、以下の成果を得た。まず、Pcdhb3-tdTomato マウスを用いて、小脳における tdTomato 発現パターン (すなわち、Pcdhb3 発現パターン) を解析した。

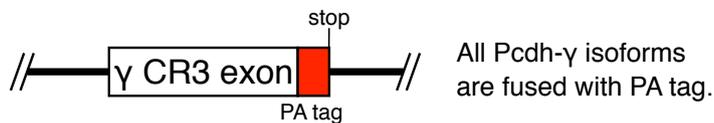
脳透明化法を用いて 3 次元的に tdTomato 発現パターンを解析したところ、tdTomato 発現パターンは個体ごとに異なることが判明した。また、プルキンエ細胞だけでなく、抑制性インターニューロン、顆粒細胞においても tdTomato 発現が認められた。これらの結果は、これらのニューロン群が作る神経回路の構築において Pcdhb3 が関与することを示唆する。

Pcdhg への PA tag ノックインマウスも

得られた。本マウスを用いることで、Pcdhg タンパク質の局在を組織学的に解析することが可能となる。本マウス脳を組織学的に解析した結果、発生初期の小脳においてはプルキンエ細胞の細胞体や樹状突起、そして、平行繊維 (顆粒細胞の軸索) に Pcdhg タンパク質が存在することが判明した。一方、成熟したプルキンエ細胞-平行繊維シナプスには Pcdhg タンパク質は存在していなかった。本結果は、Pcdhg タンパク質がプルキンエ細胞-平行繊維シナプスの形成初期において機能することを示唆する。

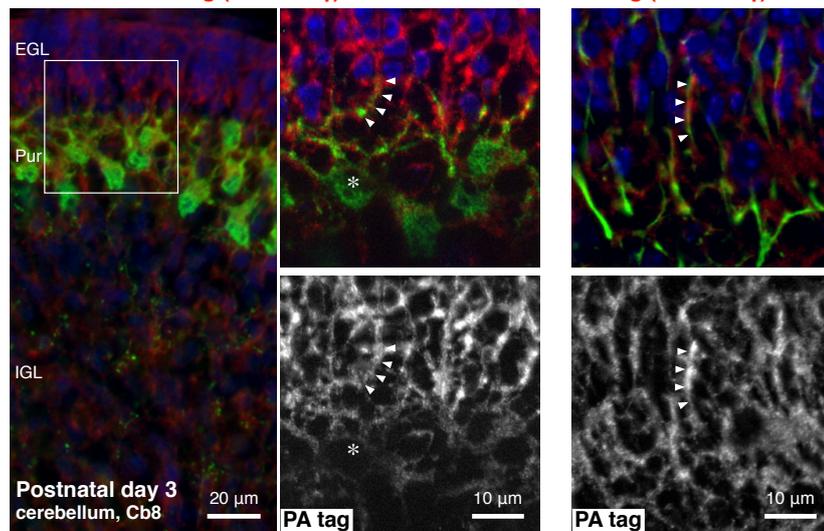
今後は、上記 (iii) にて得られた Pcdh 発現細胞可視化レポーターマウスを用いて、神経回路を構成するニューロン群における Pcdh 発現は同一か? を直接的に検証する。

### Pcdh-γ PA tag knock-in allele



Calbindin (Purkinje cell)  
PA tag (all Pcdh-γ) DAPI

BLBP (radial glia cell)  
PA tag (all Pcdh-γ) DAPI



Pcdh-γ PA tag knock-in mouse, Postnatal day 3  
Cerebellum, Sagittal section, 20 μm thickness  
Immunostaining: anti-PA tag antibody (Wako, 1/500), mouse anti-calbindin antibody (swant, 1/1000), or rabbit anti-BLBP antibody (Frontier Institute, 1/200)

### 図3 発生初期におけるPcdhgタンパク質の局在解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ikeda K, Kaneko R, Yanagawa Y, Ogawa M, Kobayashi K, Arata S, Kawakami K, Onimaru H.	4. 巻 144
2. 論文標題 Analysis of the neuronal network of the medullary respiratory center in transgenic rats expressing archaerhodopsin-3 in Phox2b-expressing cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Res Bull.	6. 最初と最後の頁 39-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainresbull.2018.11.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko R, Kakinuma T, Sato S, Jinno-Oue A.	4. 巻 64
2. 論文標題 Freezing sperm in short straws reduces storage space and allows transport in dry ice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 541-545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-100.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Igarashi H, Ikeda K, Onimaru H, Kaneko R, Koizumi K, Beppu K, Nishizawa K, Takahashi Y, Kato F, Matsui K, Kobayashi K, Yanagawa Y, Muramatsu SI, Ishizuka T, Yawo H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Targeted expression of step-function opsins in transgenic rats for optogenetic studies.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 5435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23810-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Igarashi Hiroyuki, Ikeda Keiko, Onimaru Hiroshi, Kaneko Ryosuke, Koizumi Kyo, Beppu Kaoru, Nishizawa Kayo, Takahashi Yukari, Kato Fusao, Matsui Ko, Kobayashi Kazuto, Yanagawa Yuchio, Muramatsu Shin-Ichi, Ishizuka Toru, Yawo Hiromu	4. 巻 8
2. 論文標題 Targeted expression of step-function opsins in transgenic rats for optogenetic studies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23810-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sairenji Taku James, Ikezawa Jun, Kaneko Ryosuke, Masuda Shinnosuke, Uchida Kaoru, Takanashi Yurie, Masuda Hiroko, Sairenji Tomoko, Amano Izuki, Takatsuru Yusuke, Sayama Kazutoshi, Haglund Kaisa, Dikic Ivan, Koibuchi Noriyuki, Shimokawa Noriaki	4. 巻 114
2. 論文標題 Maternal prolactin during late pregnancy is important in generating nurturing behavior in the offspring	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 13042 ~ 13047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1621196114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kaneko Ryosuke, Takatsuru Yusuke, Morita Ayako, Amano Izuki, Haijima Asahi, Imayoshi Itaru, Tamamaki Nobuaki, Koibuchi Noriyuki, Watanabe Masahiko, Yanagawa Yuchio	4. 巻 526
2. 論文標題 Inhibitory neuron-specific Cre-dependent red fluorescent labeling using VGAT BAC-based transgenic mouse lines with identified transgene integration sites	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 373 ~ 396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa S, Kumagai M, Hagihara M, Nishimaru H, Hirano K, Kaneko R, Okayama A, Hirayama T, Sanbo M, Hirabayashi M, Watanabe M, Hirabayashi T, Yagi T	4. 巻 9
2. 論文標題 Distinct and Cooperative Functions for the Protocadherin- , - and - Clusters in Neuronal Survival and Axon Targeting.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci	6. 最初と最後の頁 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2016.00155.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tarusawa E, Sanbo M, Okayama A, Miyashita T, Kitsukawa T, Hirayama T, Hirabayashi T, Hasegawa S, Kaneko R, Toyoda S, Kobayashi T, Kato-Itoh M, Nakauchi H, Hirabayashi M, Yagi T, Yoshimura Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Establishment of high reciprocal connectivity between clonal cortical neurons is regulated by the Dnmt3b DNA methyltransferase and clustered protocadherins.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 BMC Biol.	6. 最初と最後の頁 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Egashira Y, Takase M, Watanabe S, Ishida J, Fukamizu A, Kaneko R, Yanagawa Y, Takamori S.	4. 巻 113
2. 論文標題 Unique pH dynamics in GABAergic synaptic vesicles illuminates the mechanism and kinetics of GABA loading.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 10702-10707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1604527113.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shibasaki K, Hosoi N, Kaneko R, Tominaga M, Yamada K.	4. 巻 140
2. 論文標題 Glycine release from astrocytes via functional reversal of GlyT1.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Neurochem.	6. 最初と最後の頁 395-403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.13741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Igarashi H, Koizumi K, Kaneko R, Ikeda K, Egawa R, Yanagawa Y, Muramatsu S, Onimaru H, Ishizuka T, Yawo H.	4. 巻 11
2. 論文標題 A Novel Reporter Rat Strain That Conditionally Expresses the Bright Red Fluorescent Protein tdTomato.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0155687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0155687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko R, Sato A, Hamada S, Yagi T, Ohsawa I, Ohtsuki M, Kobayashi E, Hirabayashi M, Murakami T.	4. 巻 25
2. 論文標題 Transgenic rat model of childhood-onset dermatitis by overexpressing telomerase reverse transcriptase (TERT).	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Transgenic Res	6. 最初と最後の頁 413-424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11248-016-9939-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Vargas D, Shimokawa N, Kaneko R, Rosales W, Parra A, Castellanos A, Koibuchi N, Lizcano F	4. 巻 56
2. 論文標題 Regulation of human subcutaneous adipocyte differentiation by EID1.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Mol Endocrinol	6. 最初と最後の頁 113-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JME-15-0148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ryosuke Kaneko, Manabu Abe, Yusuke Takatsuru, Yukiko U. Inoue, Masahiko Watanabe, Kenji Sakimura, Yuchio Yanagawa, Takeshi Yagi
2. 発表標題 Visualizing single-neuron identity specified by Pcdh-b cluster
3. 学会等名 第41回日本神経科大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryosuke Kaneko
2. 発表標題 How to modulate individuality: Involvement of expressional dynamism of Pcdh
3. 学会等名 「個性」創発脳 第1回国際シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子涼輔、阿部 学、高鶴裕介、渡辺雅彦、崎村建司、柳川右千夫、八木 健
2. 発表標題 ニューロンIDの可視化 ~ クラスター型プロトカドヘリンの発現解析 ~
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金子涼輔、阿部 学、高鶴裕介、渡辺雅彦、崎村建司、柳川右千夫、八木 健
2. 発表標題 ニューロンIDの可視化 ～クラスター型プロトカドヘリンの発現解析～
3. 学会等名 第40回日本神経科大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金子涼輔、阿部 学、高鶴裕介、渡辺雅彦、崎村建司、柳川右千夫、八木 健
2. 発表標題 ニューロンIDの可視化：クラスター型プロトカドヘリンの発現解析
3. 学会等名 第39回日本神経科大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学大学院医学系研究科附属生物資源センター <a href="http://doujitsu.dept.med.gunma-u.ac.jp/cms/?page_id=16">http://doujitsu.dept.med.gunma-u.ac.jp/cms/?page_id=16</a> 群馬大学大学院医学系研究科附属生物資源センター <a href="http://doujitsu.dept.med.gunma-u.ac.jp/cms/?page_id=16">http://doujitsu.dept.med.gunma-u.ac.jp/cms/?page_id=16</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	デゼウ クリス  (De Zeeuw Chris)	エラスムス医療センター・Department of Neuroscience・Proessor	