

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19440

研究課題名(和文)脳内免疫メカニズム解明のためのcAMPシグナリング光操作技術の開発

研究課題名(英文)The use of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) in vitro and in vivo.

研究代表者

小山 隆太(Koyama, Ryuta)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：90431890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：アストロサイトは脳内にもっとも豊富に存在するグリア細胞である。アストロサイトは細胞外環境の維持や脳機能の調節を行うとされてきたが、この機能を発揮するための細胞内シグナリングは不明な点が多かった。そこで、本研究ではin vivoでアストロサイト特異的にcAMPを上昇できる遺伝子改変マウス(mIc1-PAC)を作製し、アストロサイトcAMPの上昇の記憶に対する影響を検証した。その結果、アストロサイトのcAMP上昇が海馬依存的な記憶の固定と障害の両者を調節することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、記憶・学習を調節する新しい細胞生物学的メカニズムを明らかにした。すなわち、脳内細胞の大部分を占めるグリア細胞のアストロサイトが、細胞内cAMPシグナルの活性化を介して、記憶を双方向性(固定化と障害)に調節することが明らかになった。また、本研究では光遺伝学的手法を、一般的な神経細胞の活動調整ではなく、ではなくグリア細胞のセカンドメッセンジャーのシグナル調節にin vivoで用いるという学術的にも重要な挑戦を成功させた。

研究成果の概要(英文)：To understand the role of astrocytic cyclic AMP (cAMP) in memory, we developed a transgenic mouse line in which astrocytes express photoactivated adenylyl cyclase (PAC), a protein which can be activated by blue light and rapidly changes its conformation to synthesize cAMP from ATP. In these mice, we optogenetically modulated the intracellular levels of cAMP in the hippocampal astrocytes and investigated the effect of a prolonged cAMP elevation in spatial memory. We found that the long-term cAMP elevation in astrocytes after training session facilitated the memory fading, while the short-term cAMP elevation enhanced memory formation. We also found that astrocytic cAMP facilitates synaptic plasticity through activating NMDA receptors, which may underlie both memory fading and enhanced memory formation. Thus, our results suggest that astrocytic cAMP signaling can modulate hippocampus-dependent learning and memory.

研究分野：神経科学

キーワード：アストロサイト サイクリックAMP アデニル酸シクラーゼ 記憶学習 光遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の主眼となる光活性化アデニル酸シクラーゼ「PAC (Photoactivated Adenylyl Cyclase)」の研究は2008年頃より、PAC発見者である伊関峰生博士(東邦大)や故渡辺正勝博士の協力を得て始めた。当時、研究代表者は、2006年頃から始めた研究により、てんかん脳の神経回路変性がcAMP依存的に生じるという結果を得ていた(Muramatsu et al., Brain 133:60-75, 2010)。しかし、この結果は主に、培養神経細胞にcAMPアナログを細胞外から添加する実験系から得られたものであり、実際に生体内で生じる細胞内cAMPの変動を十分に反映しているとは言えなかった。そこで、*in vivo*系において細胞内cAMPを時空間的に制御する方法を模索し、PACを利用することにした。

当時、PACのプロパティを哺乳類の神経細胞で検証した研究はほとんど無かった。そこで、研究代表者はまず、PACを培養海馬神経細胞に発現させ、PACのプロパティ解析をした。その結果、PACは青色光刺激に応じて培養神経細胞内のcAMP量を上昇させ、軸索の分枝および伸長を促進させることが分かった(Zhou et al., Scientific Reports, 5:19679, 2016)。さらに、青色光の照射時間によって細胞内cAMP量を時間的制御することや、青色光の局所照射によって、局所的な軸索成長を誘導することにも成功した。また、最近では、朴三用博士(横市大)らのグループとともに、ラン藻由来のOaPACの構造決定に成功し(Ohki et al., PNAS, 113:6659-6664, 2016)、OaPACも軸索成長を促進させることを確認した。以上の知見を元に、*in vivo*でPACを発現させる系の確立を模索した。特に、多様な組織や細胞でPACを発現することを望んだため、tTA-tetOシステムを利用したマウスを開発した。なお、PACはミドリムシ由来のeuPACではなく、暗所での活性がより低く、青色光刺激に対する反応性がより高いベギアトア菌由来のbPACを用いた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳内免疫細胞であるグリアの細胞内cAMP量を*in vivo*で光操作する新規技術を開発・利用し、脳内免疫メカニズムの一端を解明することである。この目的を達成するために、研究代表者はグリア特異的にPACを発現させるための新規遺伝子改変マウスを作成した。PACはミドリムシの鞭毛膨潤部から分離・精製され、380nm-470nmの紫/青色光によって特異的に活性化してcAMPを生成する。本研究では、この新規PACマウスを挑戦的に利用し、光操作応用研究を展開した。

まず、細胞内cAMPシグナリングを世界で初めてマウス*in vivo*系で光操作することを目的とした。イオンチャネルの光操作と比較して、細胞内シグナリング因子を光操作する技術の確立や、その応用研究は圧倒的に遅れている。本研究では、多様な細胞応答を制御するcAMPシグナリングを*in vivo*で光操作する技術を開発・利用した。このために、研究代表者はテトラサイクリン遺伝子誘導発システムの制御下、多様な細胞に特異的にPACを発現することが可能なtetO-PACマウスを作成した。

次に、グリアの活性化を光操作し、グリア機能の新知見を得ることを目的とした。脳機能の発揮には神経細胞だけでなく、グリアが大きい役割を担うことはもはや疑いようがない。この数十年でグリア動態の観察技術は著しく発展した。しかしながら、グリア研究における現在の問題は、グリアの細胞内シグナリングを制御し、その活性化状態を操作する方法が殆ど存在しないことである。本研究では、グリア特異的PACマウスを用いて主にアストロサイトの活性化を光操作し、グリアが脳機能に与え得る

影響を検証し、グリア研究に新たな知見をもたらす。

### 3. 研究の方法

本研究では、PAC の中でも、特にベギアトア菌から発見された bPAC を採用した。また、アストロサイト特異的に bPAC を発現させるために、tTA-tetO システムを利用した。まず、Tet オペレーターの下流に bPAC とレポーター蛍光タンパク質である GFP を発現する tetO-GFP-2A-bPAC マウスを作製した。これを、アストロサイト特異的なプロモーターである Mlc1 の下流に tTA を発現する Mlc1-tTA マウスと掛け合わせた。これにより、アストロサイト特異的に bPAC を発現する Mlc1-tTA::tetO-GFP-2A-bPAC マウス（以下 Mlc1-bPAC マウスと略す）を作製した。Mlc1-bPAC マウスにおける GFP の発現を免疫染色法を用いて調べたところ、GFP は脳全体に発現しており、アストロサイトのマーカーである S100 $\beta$  と共局在していることが確認できた。本研究では、主にこのマウスを利用し、アストロサイトの cAMP シグナリングが脳機能に及ぼす影響を行動学、電気生理学、組織学の観点から検証した。

### 4. 研究成果

まず、Mlc1-bPAC マウスの皮質からアストロサイトの単離培養を作製し、光照射後の cAMP 量を ELISA により測定した。10 分または 30 分の光照射（1s/5s）によってアストロサイト細胞内の cAMP 量が上昇した。なお、この上昇度はアデニル酸シクラーゼの作動薬である forskolin（10  $\mu$ M）、またはアドレナリン  $\beta$  受容体作動薬 isoproterenol（10  $\mu$ M）の処置による cAMP 量の上昇と同程度であった。また、doxycycline（DOX）によって tetO 下流の転写を阻害した場合、光照射による cAMP 量の上昇は阻害された。さらに、cAMP センサータンパク質を用いて培養アストロサイト内の cAMP のイメージングを行った。その結果、bPAC 発現アストロサイトにおいて、単回または複数回の光照射に対し、cAMP 量が急峻に上昇することを明らかにした。以上より、アストロサイトの cAMP 量を光操作によって上昇させる系が確立したことが確かめられた。

次に、Mlc1-bPAC マウス海馬へ光照射することによって、記憶の調節を試みた。アストロサイトによる神経細胞へのエネルギー供給や神経伝達物質の回収・放出は、神経活動の維持だけではなく、神経可塑性および記憶にも重要であると考えられる。また、アストロサイトのエネルギー産生や神経伝達物質の放出が cAMP によって制御されるという *in vitro* 系先行研究がある。そこで、研究代表者は記憶を担う脳領域の海馬に着目し、光操作による海馬アストロサイトの cAMP シグナル活性化が、海馬依存的空間記憶に影響を与える可能性を検証した。空間学習課題としては、物体位置認識試験を用いた。すなわち、トレーニング時にマウスに同様な物体 2 つを探索させ、テスト時にはそのうち 1 つの物体を移動し、再びマウスにこれらの物体を探索させる。テスト時において、トレーニング時の物体の位置を覚えているマウスは移動された方の物体をより探索するため、両物体を探索する時間差（弁別比）を用いて記憶の程度を評価した。マウスを試験用チャンバーで馴化させた後、トレーニングを行った。その翌日に両側海馬へ光照射（1 時間；1s/5s）し、次の日にテストを行った（テスト 1）。さらに、その後別の物体でもう一回トレーニングを行い、その後テスト 2 を行った。

テスト1において、光照射を受けた Mlc1-bPAC マウスの弁別比は低下した。すなわち、アストロサイト cAMP 量の上昇によって記憶の程度が減弱した。この結果から、トレーニング後にアストロサイトの cAMP 量を上昇させた場合には、形成された記憶の維持が阻害されることが示された。また、テスト2において光照射群の弁別比は低下しなかったことから、光照射による記憶の障害は可逆的であることが示された。次に、記憶形成時、つまりトレーニング前、トレーニング中またはトレーニング後に光照射（10分；1s/5s）を行い、その4日後にテストを行い、記憶を評価した。光なし群のマウスは2つの物体を弁別できなかったが、トレーニング中またはトレーニング後の光照射を受けたマウスは物体を弁別できた。この結果から、記憶の形成と固定化の時期にアストロサイトの cAMP 量を上昇させた場合、より強固な記憶が形成されることが示唆された。

最後に、Mlc1-bPAC マウス海馬への光照射によるけいれん発作が抑制される可能性を検証した。海馬の神経活動は健常時において記憶や空間認知に重要であるが、その神経活動が過剰に亢進すると、けいれん発作を誘起することがある。また、アストロサイトもけいれん発作と深く関わっている。例えば、アストロサイトによるグルタミン酸や  $K^+$  イオンの回収は神経活動の異常興奮を抑制する一方、アストロサイトによる神経細胞へのエネルギー供給はけいれん発作における神経細胞の過剰興奮の要因であることが知られている。そのため、Mlc1-bPAC マウスを用いて海馬アストロサイトの cAMP 量上昇が薬物誘導性けいれん発作に与える影響を検証した。マウスを試験用チャンバーに置き、20分後にけいれん発作誘導作用のある pentylenetetrazol (PTZ) を投与し、けいれん発作を誘起した。その結果、PTZ 投与前から観察終了まで光照射を受けた群または PTZ 投与後に光照射を受けた群において、発作ステージ（重篤度）が低下した。さらに、光照射を受けた群では、重篤度の高い強直間代発作が完全に阻害された。このことから、アストロサイトの cAMP シグナル活性化が急性な抗けいれん作用を有することが示唆された。

本研究では、*in vivo* でアストロサイトの cAMP 量を時間・空間分解能よく上昇させることができる遺伝子改変マウスの作製に成功した。また、海馬依存的記憶形成過程に関して、海馬アストロサイトの cAMP 量が増加するタイミングによって記憶の忘却または形成が促進されることを発見した。さらに、海馬アストロサイトの cAMP 量上昇が急性けいれん発作を阻害することを発見した。以上のことから、アストロサイトの cAMP シグナル活性化が海馬神経細胞の可塑性および活動レベルに影響を与え、個体の行動に反映されることが示された現在、これらの成果を纏め、学術論文として発表準備中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Zhou Z, Ikegaya Y, and Koyama R (corresponding author).

The astrocytic cAMP pathway in health and disease.

Int J Mol Sci., 20:3, 2019.

〔学会発表〕(計6件)

Koyama R.

Modulating glial function in health and disease using PAC (Photoactivated Adenylyl Cyclase).  
Young Glia (Speyer), 5 Oct 2018.

Zhiwen Z, Onodera J, Hiragi T, Andoh M, Tanaka KF, Koyama R, Ikegaya Y.

Optogenetic regulation of cAMP in brain cells in vivo.

Neuroscience 2017 (Washington, D.C.), 13 November 2017, 384.05

Andoh M, Koyama R, Ikegaya Y.

cAMP modulates microglial phagocytosis.

Neuroscience 2017 (Washington, D.C.), 13 November 2017, 295.02

周至文、小野寺純也、平木俊光、安藤めぐみ、田中謙二、小山隆太、池谷裕二

アストロサイトの cAMP による記憶の双方向制御

第 41 回日本神経科学大会 (神戸)、2018 年 7 月 28 日、3P-023

周至文、小野寺純也、平木俊光、安藤めぐみ、田中謙二、小山隆太、池谷裕二

Optogenetic regulation of cAMP in brain cells in vivo.

第 9 回光操作研究会(仙台)、2017 年 10 月 22 日

周至文、小野寺純也、平木俊光、安藤めぐみ、田中謙二、小山隆太、池谷裕二

脳細胞における光遺伝学的 cAMP の in vivo 制御

第 40 回日本神経科学大会 (千葉)、2017 年 7 月 21 日、2P-100

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。