

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：11401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2023

課題番号：19KK0383

研究課題名（和文）逃避行動のコマンドニューロンにおける軸索起始部の可塑性メカニズム

研究課題名（英文）Axon initial segment plasticity in the jumping escape giant fiber neuron

研究代表者

山方 恒宏（Yamagata, Nobuhiro）

秋田大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：50716248

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

渡航期間：12ヶ月

研究成果の概要（和文）：軸索起始部（AIS）は、活動電位の発生部位として神経出力の決定に関わるだけでなく、神経可塑性の起点となり、その機能異常は神経疾患や精神疾患の原因にもなる。本課題では、AISの可塑性に関わる分子基盤を明らかにするため、AIS局在性のドーパミン受容体の一種DopEcRに着目し、その働きを機能既知の巨大逃避細胞系において解析した。多核神経芽細胞培養系を用いた巨大逃避ニューロン特異的な分子局在解析では、AISにおけるDopEcRとNaVの共局在を見出し、また飛翔筋電位計測による生理解析では馴化に係るDopEcRの機能が明らかになるなど、DopEcRと特異的なイオンチャネルの機能連携が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経系の馴化における個別のチャネル遺伝子の機能理解に繋がり、AISの制御メカニズムを含む神経可塑性の基礎的メカニズムの理解に貢献する。

ドーパミン受容体のアゴニスト、アンタゴニストは、さまざまな精神疾患の処方薬として多く用いられているが、副作用も多い。より安全かつ効果の高い新薬の開発のためにも、ドーパミン受容体の「細胞内効果」の十分な理解が必要である。本課題では、DopEcRの標的チャネルからその細胞内効果を分子レベルで特定し、これに貢献することを目指す。同方法論は、さまざまな分子機能の解析にも適用でき、異なる受容体を介したドーパミン作用の機能解析も加速できるものと期待している。

研究成果の概要（英文）：In the research project, I examined the axon initial segment (AIS) and its role in neural output regulation and neural plasticity. One specific area of focus was the DopEcR, a dopamine receptor located in the AIS. Through molecular localization in a multinuclear neuroblast culture system, we found that DopEcR and NaV are co-localized in the AIS. Furthermore, experiments measuring the DLM flight muscle, which is part of the giant escape system, demonstrated the involvement of DopEcR, cAMP, and TRPV in promoting stimulus habituation. This suggests that DopEcR has an inhibitory effect on action potential generation through specific ion channels in the AIS. These findings provide valuable insights into the molecular basis of AIS plasticity and its potential implications for neurological and psychiatric disorders.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索起始部 ドーパミン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

神経細胞は外界からの入力に応じてシナプス結合や伝達効率を変化させ、可塑的に振る舞う。これは、神経回路の形成や維持、さらには学習や記憶の基礎過程だと考えられている。一方、神経活動、より正確には細胞膜に一過的に生じる活動電位は、軸索起始部(Axon Initial Segment, AIS)において発生し、神経内を伝搬し、情報伝達する。これはAISに多くのイオンチャンネルが発現し、強いイオン電流が生じることによる。AISは活動電位の発生場所であるため、最も効率的にその調節ができ、神経可塑性のホットスポットと考えられる。これまでの研究により、特定の経験や生理状態によってAISの構造が変化することが分かってきた(Grubb and Burrone, Nature, 2010)。一方AISの制御不全は、てんかんやジストニアといった神経興奮性異常に端を発する疾患だけでなく、双極性障害や統合失調症といった精神疾患の原因にもなる(Huang & Rasband, Ann N Y Acad Sci. 2018)。それゆえAISの制御は、正常かつ可塑的な神経活動に無くてはならない過程であり、そのメカニズムの理解は、神経生理学にとどまらず、基礎医学にも貢献することが期待される。現状では、そのキープレイヤーとなる細胞内分子と作用が明らかになりつつあるが、AIS可塑性のトリガーとなる神経伝達物質やその受容体、標的となるチャンネル分子など、明らかとすべき課題も多い。

ショウジョウバエは、一定強度を超える感覚刺激に反応し、ジャンプまたは飛翔して、逃避する。Giant Fiber System(図1)は、この行動を司る神経回路であり、感覚入力から筋電位出力に渡る神経接続と回路挙動が良く理解されている(Wyman et al., Neural Mechanisms of Startle Behavior, 1984)。Giant Fiber Neuron (GF)は、その中核を成すコマンドニューロンである。GFに発生する活動電位は、逃避行動に必要な筋電位活動と同期し、逃避行動と因果関係にある(Lima and Miesenboeck, Cell 2005)。GFは、中枢神経系の活動電位が直接行動に反映される稀有なモデルケースであるばかりでなく、ハエの神経系で最も巨大なニューロンのひとつでもある。そのため単一細胞におけるチャンネル機能の電気生理学的解析が可能な数少ない中枢性モデルニューロンとして、共同研究者のChun-Fang Wu氏らにより用いられてきた(Engel & Wu, J Comp Physiol A, 1992; Engel & Wu, J Neurosci, 1998)。

近年、このGFの馴化、すなわち繰り返し刺激による逃避行動の抑制のメカニズムにDopEcRが関与することをWu氏らは見出している(Ishimoto et al., PLoS Genet., 2013)。DopEcRはドーパミンとエクジソンの両方をリガンドとするユニークな代謝型受容体であるが、その欠損変異体では逃避行動の馴化が見られない。つまりDopEcRは、GFの活動を経験依存的に抑制することを意味する。一方申請者は、基課題において、脳内の標的細胞に発現する特定の内在性タンパクを可視化する方法を確立し、これによりDopEcRは脳内ニューロンのAISに局在することを見出していた。すなわちハエの逃避行動の馴化のメカニズムとして、GFのAISにおけるDopEcRの活性化と、それに伴う活動電位抑制が示唆された。

## 2. 研究の目的

**AIS**の活動電位の発生抑制に係る**DopEcR**の作用メカニズムを分子レベルで理解することを目的とし、共同研究者らが開発した細胞形態・生理学解析に優れた巨大培養ニューロン(Wu et al., J Neurosci., 1990)系を駆使した解析を行った。

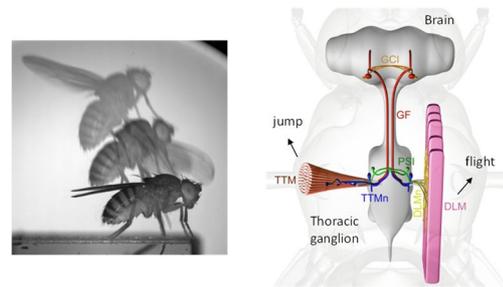


図1 ハエの逃避行動とGiant Fiber System 視覚や嗅覚刺激に反応して、ハエはジャンプまたは飛翔を通じて逃避する。この行動に関わる感覚器から歩行/飛翔筋に至る一連の神経群では、電子顕微鏡レベルの接続性が同定され、その生理も良く理解されている。

### 3. 研究の方法

#### 巨大培養ニューロンにおける形態・生理解析

原腸胚由来の神経芽細胞を摘出し、20%ウシ胎児血清、ペニシリン(50U/mL)、ストレプトマイシン(50 µg/mL)およびサイトカラシンB(2 µg/mL)を含むシュナイダー昆虫培地中で培養することでその細胞質分裂を抑制し、巨大かつ多核の神経芽細胞「巨大培養ニューロン」を得ることができる(Wu et al., J Neurosci., 1990)。細胞種特異的な巨大培養ニューロンの形態と細胞特性を解析するために、GAL4/UAS システム(Brand and Perrimon, Development, 1993)によって特異的な細胞系譜をあらかじめ蛍光標識し、識別に用いた。また細胞内におけるタンパク局在とその動態を計測するため、プロテイントラップ法(Kohl et al., PNAS, 2014; Kondo et al., Cell Rep, 2020;)によって特異的な分子をあらかじめ蛍光標識した原腸胚を用いた。細胞形態、および分子動態の解析のために、蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡(Leica SP8)を用いた。また巨大培養ニューロンからのイオン電流を解析するために、パッチクランプ記録法を用いた。

#### 飛翔筋電位における生理解析

GF ニューロンにおける DopEcR の生理学的作用を理解するために飛翔筋電位による Giant Fiber システム(図1)の生理学解析(Engel and Wu, J Neurosci., 1996)を行った。すなわち、電解研磨した鋭利なタンゲステン電極によってGFと1ないし2シナプスで接続する飛翔筋 DLM からの細胞外記録を実施しつつ、複眼より刺激電極によってGFの刺激を行った(図2)。複眼刺激の強度により、GFの直接または間接の活性化が可能であり、その違いはDLMスパイクの刺激潜時によって識別可能である。

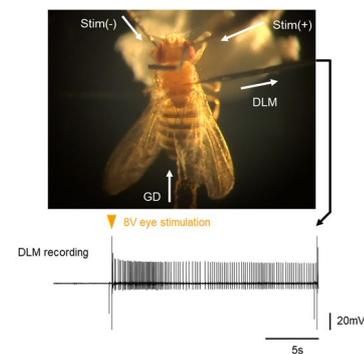


図2 飛翔筋電位計測

複眼からGF、逃避飛翔筋のように感覚入力から行動出力までが回路、シナプスレベルで刻銘に理解されており、計測も容易なため、GFの機能解析に非常に適した系。

### 4. 研究成果

#### (1) GF 特異的的巨大培養ニューロンの作製

ショウジョウバエにおいて酵母由来の GAL4/UAS システムを使うことで、特異的細胞種に任意の外来性遺伝子を発現させることが容易である。そこでGF特異的な GAL4 細胞系譜(Namiki et al., eLife, 2018)に GFP を異所発現させたハエの原腸胚を採取し、巨大培養ニューロンを作製したところ、細胞体が 10 µm 以上に達し、軸索や神経分枝、糸状仮足が大きく伸張した多核かつ巨大な培養細胞を得ることができた(図3)。さらにこれら培養細胞の軸索終末には、シナプス足場タンパクである Brp やシナプス小胞タンパクであるシナプトタグミンが集積し、神経分子が機能的に発現していることが示唆された。

#### (2) 巨大培養ニューロンにおけるドーパミン受容体発現

上述のように巨大培養ニューロンはイオンチャネルやシナプスタンパク、神経伝達物質など、神経関連分子の機能的発現が見られる(Wu et al., J Neurosci., 1990)。しかし、ドーパミン受容体のような神経伝達物質受容体が発現し、機能するかは不明であった。そこでハエゲノムに存在する4種のドーパミン受容体のそれぞれに mVenus を付与したプロテイントラップ法(Dop1R1-Venus, Dop1R2-Venus, Dop2R-Venus, DopEcR-Venus, Kondo et al., Cell Rep, 2020)を用い、巨大培養細胞上におけるその分

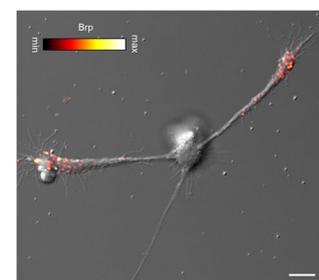
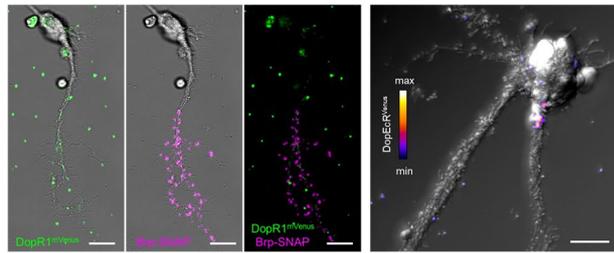


図3 巨大培養ニューロン細胞体から伸びる神経分枝とその終末に認められる Brp 液滴 (Brp-SNAP)

子発現分布を解析した。その結果、いずれの受容体種も細胞の発生の早い段階からその発現が確認されることが分かった。しかし細胞が成熟するにつれ、その細胞内の局在差が明確化する。すなわち、Dop1R1, Dop1R2, Dop2R らは、細胞体および軸索終末、さらには Brp の近傍に認められたことに対し、DopEcR は軸索の基部、すなわち AIS に対応する領域に局在した分布が認められることが分かった(図4)。さらに興味深いことに、この「軸索基部」には電位依



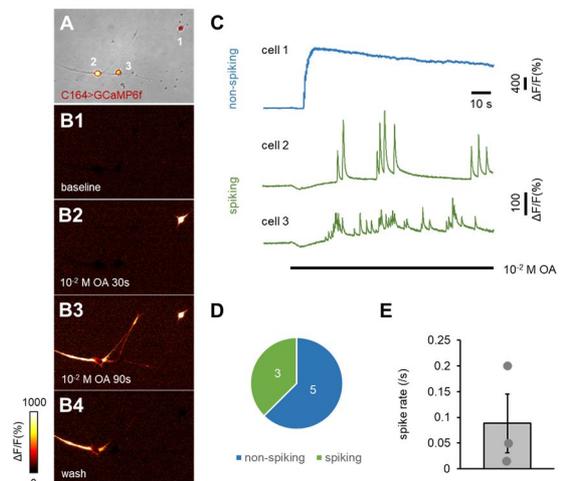
**図4 巨大培養ニューロンにおけるドーパミン受容体局在**

(左) 細胞体から伸びる神経分枝とその終末に認められる Brp 液滴および Dop1R1 分子 (右) DopEcR は細胞体から突出する軸索様の神経突起の基部に集積して観察される

存性ナトリウムチャンネル para (Ravenscroft et al., JNS 2020) が集積することも突き止めており(未発表)。まさに AIS と思しき軸索小区画が培養細胞に存在することが初めて示された。

### (3) 巨大培養ニューロンにおけるドーパミン応答

巨大培養ニューロンには種々のドーパミン受容体が発現し、異なる細胞内小区画に局在することが分かった。これらの受容体が培養細胞内で機能するかを確かめるために、巨大培養ニューロンに遺伝学的カルシウムセンサー GCaMP6 を発現させ、オクトパミンとドーパミンに対するカルシウム応答を光学計測した。培養液を生理食塩水に変え、オクトパミンを滴下すると多くの培養ニューロンが細胞内 Ca<sup>2+</sup> を一過的に増大させ、活発なスパイク活動が観察されることが分かった(図5)。対象的にドーパミンを滴下すると、Ca<sup>2+</sup> オシレーションや抑制など、様々な細胞内 Ca<sup>2+</sup> 応答が見られることが分かった(未発表)。特に、周りに細胞の存在しない巨大培養ニューロンにおいても同様な Ca<sup>2+</sup> 応答が見られたことから、これらの応答の多くは観測している巨大培養ニューロン自身に発現するドーパミン受容体の機能によることが示唆された。



**図5 巨大培養ニューロンにおけるオクトパミン応答**

培養細胞にオクトパミンを投与すると非常に活発な Ca<sup>2+</sup> 応答がみられ、その約半数ではスパイク活動が見られる。

### (4) 巨大培養ニューロンにおけるイオン電流計測

上記で示唆された巨大培養ニューロン AIS における DopEcR の抑制機能のメカニズムを理解するために、パッチクランプ法によって巨大培養ニューロンからイオン電流の計測を試みた。当初、実験は順調に進み、一部の細胞においてはギガオームシールを形成し、電位依存的なカリウム電流の計測も達成することができた。しかしナトリウム電流の計測は難しく、さらに実験機器およびシステムの不具合により、安定的に追試データを得ることが困難となった。加えて米国内コロ

ナ禍の最中、各種手続きが滞るなか、機器修理や購入を滞在期間の限られた時間内に達成することが困難であると判断し、本実験系による DopEcR の機能解析を断念せざるを得なかった。

#### (5) 飛翔筋電位計測による GF システムの生理学的解析

上記の代替案として、ハエの飛翔逃避行動に必要な巨大逃避ニューロン GF (Allen et al., J Comp Neurol, 1998; Dombrovski et al., Nature, 2023) の解析系 (図 1, 2) において DopEcR の機能解析を継続することにした。当実験系では、ハエ背部の飛翔筋電位計測を行うことで GF の活動を 1 スパイクのレベルで容易かつ正確に知ることが可能である。また、ハエ複眼への繰り返し電気刺激によって GF に馴化が生じるが (Engel and Wu, J Neurosci., 1998,) エアパフによって脱感作し、GF を直接活性化させる強い複眼刺激では馴化が見られないといった諸現象が報告されていることから、GF の入力部ないし入力統合部が馴化が生じる細胞内区画として最有力候補であることが示唆されている。加えてこの馴化には DopEcR が関わるのが先行研究 (Ishimoto et al., PLoS Genet, 2013) により示されていた。それゆえ、GF の AIS における DopEcR の活性化により活動電位が抑制されることが馴化のメカニズムと想定された。

そこでまず、GF における DopEcR 発現を解析した。GF 特異的な GAL4 系統を用い、細胞種特異的なタンパク発現解析 Split-FP 法 (Kondo et al., Cell Rep, 2020) により DopEcR を可視化したところ、予想通り、AIS に集積する DopEcR タンパクを見出すことができた (未発表)。脳内における大多数の細胞、または巨大培養ニューロン同様、生体内 GF においても DopEcR は同様な細胞内局在を持ち、機能していることが示唆された。

次いで GF システムの馴化における DopEcR のメカニズムに迫るため、飛翔筋計測系における馴化の再現実験に挑んだ結果、複眼に与える刺激周波数によって馴化のダイナミクスが大きく異なることが分かった (図 6)。特に特定の刺激周波数帯では、急激に馴化が進んだ後に、一度回復し、そこからさらに馴化が進行するといった二相性の動態が見られることが分かった。さらに DopEcR 変異体を用いて実験を実施したところ、複雑な表現系が観察された。すなわち、低周波の刺激 (2Hz, 5Hz) に対しては先行研究のように馴化が起こりづらくなるが、一方で高周波 (10Hz) の刺激に対しては野生型同様の急激な馴化が観察される。それゆえ GF における馴化は、感覚入力の強さにより異なるメカニズムで制御されていることが明らかになった。

アデニル酸シクラーゼ rut の変異体を用いた Engel らの実験 (1996) により、上記 DopEcR と同様な表現型が報告されている。それゆえ DopEcR は cAMP を介して何らかのチャンネルに作用し、馴化を誘導している可能性が示唆された。現状、その分子実体は明らかではないが、非選択性カチオンチャンネルである TRPV サブファミリーの一種 Inactive (IAV) では、馴化が起こりやすくなることを見出している。すなわち cAMP を介したイオンチャンネルへの機能制御が GF 馴化における重要なメカニズムであることは疑いようがない。今後は特に電位依存性 K<sup>+</sup>チャンネル、および Na<sup>+</sup>チャンネルの変異体、さらに GF 特異的な分子発現抑制を用いた同様の実験を実施し、AIS における DopEcR の作用メカニズムを明らかとする。

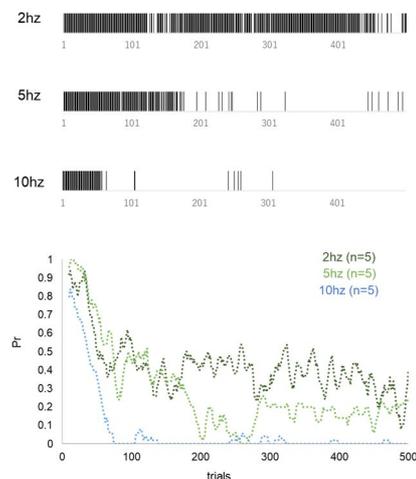


図 6 飛翔筋応答における馴化  
複眼の繰り返し刺激に対し、飛翔筋応答では慣れ、すなわち刺激に対する行動応答の低下が計測される。またそのダイナミクスは刺激プロトコルに依存する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiramatsu Shun, Saito Kokoro, Kondo Shu, Katow Hidetaka, Yamagata Nobuhiro, Wu Chun-Fang, Tanimoto Hiromu	4. 巻 1
2. 論文標題 Cell-type-specific fluorescent tagging of endogenous target proteins reveals synaptic enrichment and dynamic regulations of dopamine receptors	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.04.29.591637	査読の有無 無
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 Mizunami Makoto, Yamagata Nobuhiro	4. 巻 62
2. 論文標題 Aroma nudges in bugs: Sensory perception and memory in insects	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Current Opinion in Insect Science	6. 最初と最後の頁 101165 ~ 101165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cois.2024.101165	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 Yamagata Nobuhiro, Imanishi Yasuhito, Wu Hongyang, Kondo Shu, Sano Hiroko, Tanimoto Hiromu	4. 巻 16
2. 論文標題 Nutrient responding peptide hormone CCHamide-2 consolidates appetitive memory	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 986064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnbeh.2022.986064	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 Yamagata Nobuhiro, Ezaki Takahiro, Takahashi Takahiro, Wu Hongyang, Tanimoto Hiromu	4. 巻 10
2. 論文標題 Presynaptic inhibition of dopamine neurons controls optimistic bias	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e64907
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.64907	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 Ichinose Toshiharu, Kanno Mai, Wu Hongyang, Yamagata Nobuhiro, Sun Huan, Abe Ayako, Tanimoto Hiromu	4. 巻 31
2. 論文標題 Mushroom body output differentiates memory processes and distinct memory-guided behaviors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1294 ~ 1302.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2020.12.032	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Nobuhiro Yamagata, Rino Ichikawa, Nobuhiro Takahashi, Ayako Abe, Norihiro Katayama, Hiromu Tanimoto
2. 発表標題 Presynaptic nicotinic receptor in dopamine terminals mediates learned odor choice
3. 学会等名 Asia Pacific Drosophila Neurobiology Conference 3 (APDNC3) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Nobuhiro Yamagata, Rino Ichikawa, Nobuhiro Takahashi, Ayako Abe, Norihiro Katayama, Hiromu Tanimoto
2. 発表標題 Nicotinic acetylcholine receptor in dopamine neurons regulates learned odor choice
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第45回大阪大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山方恒宏, 市川梨乃, 阿部綾子, 片山統裕, 谷本拓
2. 発表標題 学習依存的な匂い選択行動におけるドーパミン プレシナプスのニコチン受容体機能
3. 学会等名 日本動物学会 第94回 山形大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nobuhiro Yamagata, Rino Ichikawa, Nobuhiro Takahashi, Ayako Abe, Norihiro Katayama, Hiromu Tanimoto
2. 発表標題 Presynaptic nicotinic receptor in dopamine neurons mediates learned odor choice
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nobuhiro Yamagata, Hiromu Tanimoto
2. 発表標題 Regulation of dopamine neurons for proper valuation
3. 学会等名 26th International Congress of Entomology, Helsinki, Finland (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山方 恒宏
2. 発表標題 八工の“価値観”を支える神経機構
3. 学会等名 阪大・京大・東北大 生命科学系3研究科合同セミナー(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nobuhiro Yamagata
2. 発表標題 Heterogeneity in dopamine reward system for evaluation
3. 学会等名 The University of Iowa, Department of Biology Seminar (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山方 恒宏
2. 発表標題 ショウジョウバエ脳における受容体地図の構築と機能解析
3. 学会等名 第2回トータルバイオミメティクス研究会 応用物理学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
呉 春放  (Wu Chun-Fang)	アイオワ大学・Dept Biology・Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	The University of Iowa		