

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06870

研究課題名（和文）神経情報伝達におけるシナプス数と位置の役割

研究課題名（英文）Elucidating a role of the number and location of synapse for information transmission

研究代表者

塚田 祐基（TSUKADA, YUKI）

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：80580000

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：シナプスと特定神経細胞に三色の蛍光タンパク質で蛍光ラベルを発現する遺伝子組換え体の作成に成功し、これを用いてレーザー手術実験を行った。これにより特定のシナプスは接続したまま、それ以外は機能不全の状態を作り出し、この線虫に対しカルシウムイメージングを行うことで神経伝達に与える影響をシナプス群ごとに評価した。また光によってシナプス機能を局所的に抑制するminiSOGをシナプス特異的に発現させることに成功し、光によって神経伝達が抑制されることを確かめた。さらに頭部神経細胞の軸索再生を発見し、それに関わる分子細胞機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞は複雑な形状をしており、お互いの接続関係も複雑な構造を形成していることが特徴である。しかし神経回路の機能である情報処理において、その形状や接続関係が果たす役割は未知である。本研究の成果は接続関係の機能的役割を調べる方法を開発したことで、コンパクトな実験系である線虫を用いてこの神経科学における重要な問題を解明する糸口を提供する。さらに末梢と異なる頭部の神経細胞における再生機構の一端を明らかにしたことで、医療応用や、神経回路形成を理解する基盤となる。またモデル生物である線虫を用いてさらに発展した研究を生み出せることを示した。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in creating a transgenic *C. elegans* that carries fluorescent labels on synapses and specific neurons with three different fluorescent proteins. We used it to perform laser surgery experiments for cutting an axon along with a specific synaptic position. The effect on neurotransmission was evaluated for each synapse group by performing calcium imaging on these nematodes. We also succeeded in inducing synapse-specific expression of miniSOG, which suppresses synaptic function locally in response to light, and confirmed that light illumination suppresses neurotransmission. Along with the laser surgery experiments, we discovered axonal regeneration in head ganglion neurons and elucidated some of the molecular and cellular mechanisms involved in this process.

研究分野：神経科学

キーワード：探索行動 シナプス 情報伝達

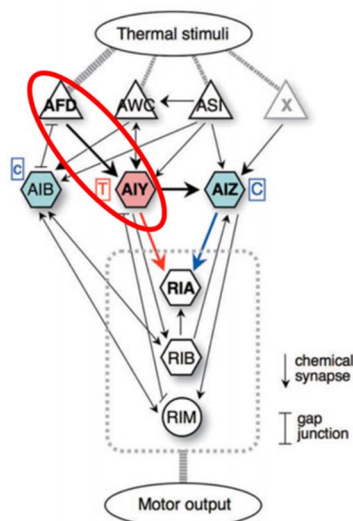
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経回路は、複雑な形態をしており種類も豊富な神経細胞群から構成されている。これらの形態とそのバリエーションは精密な神経回路の構築と、結果である回路の機能に寄与していると考えられるが、神経回路の構造と機能がどのように関係しているかについてはほとんど分かってなく、それを調べる手段もなかった。理解を妨げる主な二つの理由として、神経回路(脳)は個体全体を制御しているため細胞単位の観察と個体全体におけるその機能を関連づけることが難しいこと、分子・遺伝子的な操作と異なり細胞形態や回路構造への操作はマイクロ-ナノメートル単位で任意の操作が必要であることが考えられた。

神経回路の主な機能は情報伝達と処理であるが、神経間接続を構成するシナプスにおける情報伝達については、実験(Branco et al. 2010 など)、理論(Bhalla 2017 など)のそれぞれのアプローチで研究が進められていた。しかしそのほとんどは一つのシナプスからの入力を受け手の神経活動に与える影響についてで、1細胞対1細胞の神経接続における複数のシナプスの意義については全く知見がなかった。またこれまで、シナプス単位で神経接続を操作する技術が確立していなかったため、回路の幾何学的構造を検証するという観点の研究も見られなかった。一方で、神経回路の研究では、ショウジョウバエやマウスを対象に神経回路の接続関係を明らかにするコネクトーム研究が盛んに進められていた。しかしながら1986年にシナプスレベルのコネクトームが明らかとなった線虫でも、神経回路における情報処理の仕組みは未だ分からないことが多い状態である。302個の神経細胞に対して7000程度のシナプスがある線虫の神経回路を考えると、その接続関係に意義があることは明らかであるが、シナプスの数や位置自体がどのように寄与しているかは全く理解されていなかった。

この神経科学の問題に取り組むため、コンパクトな神経系を持つ線虫に注目すると、線虫は自己が置かれている環境の温度を感知し、行動へと反映させることが知られている。この行動を担う神経回路はほぼ完全に特定されており、その一部である感覚神経細胞 AFD と介在神経細胞 AIY は、右図左側に示すように直接接続しており、AFD は温度変化に対して応答すること、AIY は AFD の活動に応じてその活動を変化させることが報告されていた。これら AFD、AIY は温度走性行動を制御する神経回路の中でも特に重要な役割を担っており (Mori and Ohshima 1995)、AFD の神経活動にコードされている情報は温度環境を表すのに十分なことが申請者の定量計測、数理解析により明らかにされていた (Tsukada et al. J Neurosci 2016)。そして AFD-AIY 間のシナプス接続は神経環と呼ばれるリング状の神経繊維の束の部分で複数のシナプスで繋がっていることが分かっていた。



Kimata et al. 2012

技術的な背景として、本研究で用いたレーザー手術は、線虫神経系の研究で確立されている手法であったが (Fang-Yen et al. 2012)、これまでの用途としては細胞そのものを殺傷するか、運動神経細胞などの神経細胞の密度の少ない部分における軸索再生の研究に主に用いられてきた。神経細胞の密度が高い頭部神経節の中核である神経環を対象とするためには、報告されている適用例よりも精度が高くサブマイクロメートルオーダーの緻密な操作が必要となり、そのような実施例は報告されていなかった。また光遺伝学を使ったシナプスの接続操作についても、原理の証明としての報告にとどまり、科学に意義のある利用としてはあまり報告されていなかった。本研究が提案する問題設定により、既存技術を活かし、新たな技術開発と研究領域を創出することが期待された。

2. 研究の目的

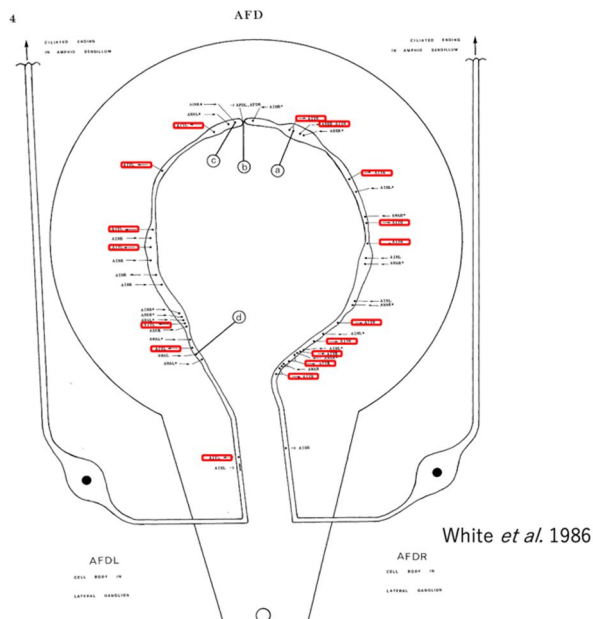
本研究は、神経回路がその構造によってどのように機能を実現、変化させているか、特にシナプ

その位置や数、種類によって構成される神経回路の構造が神経情報伝達にどのように寄与するか注目した。そのため、光を用いて単一シナプスの解像度で神経回路の配線と活動を操作・計測する手法を確立し、シナプスレベルでの摂動と個体の行動変化の関係を解析すること、さらに行動や神経活動の定量的な測定から、情報処理の仕組みを理解するため、数理解析を利用することでソフトウェアやアルゴリズムとしての、神経回路における演算の理解を進めることを目的とした。

本研究提案ではこのシナプスの数や位置、個別性の意義を調べるために、レーザー手術と光遺伝学によって摂動を与え、その変化を神経活動や個体行動の計測を数理解析することを目指す。

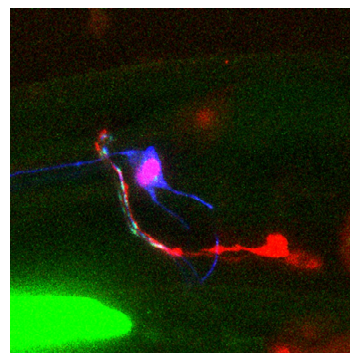
3. 研究の方法

神経回路の構造を任意に変更する方法として、線虫の AFD 神経細胞に対してフェムト秒レーザーを用いた微小手術を行った。神経環に沿った切断をシナプスの位置に応じて実施し、その後、下流の AIY 神経細胞の活動を蛍光カルシウムイメージングで計測し、上流である AFD の活動との比較を行った。上図に左右 AFD 神経細胞を示し、赤印で AFD と AIY を繋ぐシナプス位置を示す(White et al. 1986 改変)。無傷の状態では AIY のカルシウムシグナルは神経環全体の上昇として観測されるが、上流である AFD 軸索の切断部位の違いにより AIY 神経細胞のカルシウム動態は変化することが予想された。そのため特に AFD の切除部位に応じた AFD-AIY 神経活動間の変化に注目した。さらに、生体へのダメージを抑えながら単一シナプス解像度で神経接続を抑制する別の方法として、青色光依存的に活性酸素を生成する miniSOG を用いた。miniSOG は 106 アミノ酸から成る小さなタンパク質でシナプトプレビンと融合することでシナプス小胞へ局在させることができる。InSynC と呼ばれるこのシステムを用いて本研究で対象とする AFD-AIY 神経細胞間のシナプスを抑制した。さらに共焦点顕微鏡を用いてシナプスレベルの局所領域に効果を絞ることで、個別のシナプスが神経細胞間の情報伝達に与える影響を解析した。また、行動の定量計測とその数理解析を実施して行動制御への神経回路変化の影響を定量した。

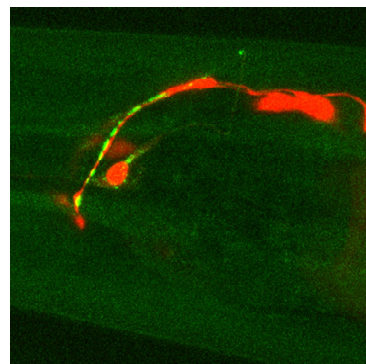


4. 研究成果

(1) レーザー手術後に AFD と AIY の神経活動を計測するため、シナプスと特定神経細胞に三色の蛍光タンパク質を発現する遺伝子組換え体を作成することができた(右図赤で AFD 核、AIY 神経細胞、青で AFD 神経細胞、緑でシナプスを示す:遺伝型は N2; $Is[gcy-8p::NLS::RCaMP2, AIYp::RCaMP2, ges-1p::tagRFP]$ Ex[$gcy-8p::iBlueberry::HO, gcy-8psnb-1::venus, lin-44p::GFP$])。これにより AFD と AIY を繋ぐシナプス位置を venus で可視化し、それを基準として AFD 軸索の任意の場所をレーザー手術で切断することが可能となった。シナプス位置を示す venus 蛍光と、標的とする神経細胞の iBlueberry 蛍光シグナルに従って神経軸索をレーザーで切断することで、特定のシナプスは接続したまま、それ以外は機能不全の状態を作り出した。さらにこの線虫に対し AIY 神経細胞に発現させた RCaMP2 を使いカルシウムイメージングを行うことで神経伝達に与える影響をシナプス群ごとに評価した。



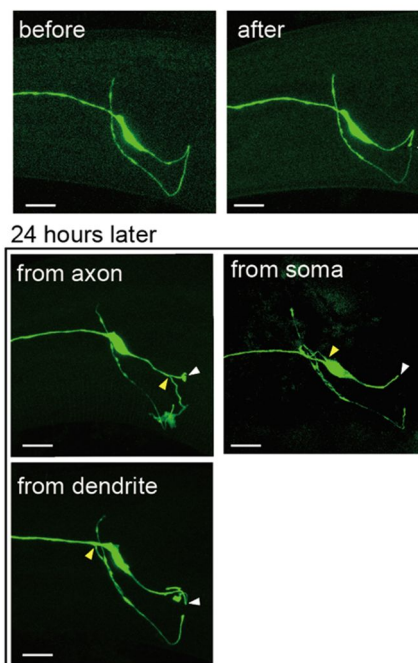
(2) AFD の核と AIY 全体に、蛍光カルシウムインディケーターである RCaMP2 を発現し、AFD と AIY を繋ぐ AFD のプレシナプス領域に、光によってシナプス機能を局所的に抑制する miniSOG と蛍光ラベルである venus を発現する遺伝子組換え体を作成した(右図、赤で AFD 核と AIY 神経細胞、緑で AFD シナプスを示す:遺伝型は N2; Ex[$gcy-8p::mSOG::snb-1::venus::ERexport, AIYp::RCaMP2, gcy-8p::NLS::RCaMP2$])。この線虫系統を用いて、光刺激によりシナプス機能を抑制させた上でカルシウムイメージングを行い、光によって神経伝達が抑制されることを確かめた。局所的な光を当てることで、どの領域のシナプスが神経伝達にどのくらい影響を与えるか評価した。



(3) 上記の実験系を用い、線虫の温度走性行動を担う感覚神経細胞 AFD と、その下流である介

在神経細胞 AIY の接続を標的として、AFD-AIY 間にある 20 程度のシナプスの神経伝達への影響を評価した。無傷の条件では温度上昇における AFD の応答反応は AIY に伝達するが、レーザー手術や miniSOG による抑制後にはこれが変化することが計測され、その様子を定量的に評価した。

(4) 本研究では計画段階では予想していなかった現象も観測された。頭部神経細胞へ微小領域のレーザー手術によって、先行研究では報告されていなかった軸索再生が見られた。右図では上段でレーザー手術前後の神経細胞を示し、白矢頭で切断箇所を示す。中段下段はレーザー手術 24 時間後を示し、白矢頭の切断に対し、黄色矢頭のさまざまな部位から軸索再生が起きていることが示されている。一般に抹消神経と中枢神経の軸索再生機構は異なり、中枢神経では軸索再生が起こりにくいことが知られているが、本結果は中枢神経系に対応する頭部神経節での軸索再生を発見した。実験として扱い易く、変異体を用いることで遺伝学的にもさまざまなことが探究できる線虫神経細胞の実験系を確立することで、臨床応用などの可能性も期待できる成果となった。さらに後述するように頭部神経軸索の再生機構を担う分子・細胞機構についてもある程度の知見が得られた。これらの結果は国際会議で発表し、海外の研究者を含む専門家と議論を行った。現在、学術論文としてまとめている途中である。



(5) 上記の頭部神経軸索の再生に関わる分子機構として、PKC が関わることを見出した。pkc-1 の変異体を用いることで頭部神経軸索の再生に pkc-1 が抑制的に関わることを示唆された。面白いことに、pkc-1 は、末梢神経に対応する体の運動神経細胞の軸索再生には促進性に働くことが報告されている。つまり、頭部と体、言い換えれば中枢と末梢で同じ分子が逆の機能を持っていることを示唆する。PKC はさまざまな分子機構を制御する因子として知られているため、今後の展開も期待でき、かつ将来的には医療応用も期待される成果である。

(6) 頭部神経軸索の再生に関わる細胞機構としては、グリア細胞 (CEPsh 細胞) の影響が観察された。CEPsh 細胞を欠失する組換え系統を用いてレーザー手術を行ったところ、CEPsh 細胞を欠失している個体は野生型に比べて軸索再生が促進されることが示唆された。通常、神経細胞を助ける役割を持っているとされているグリア細胞であるが、軸索再生においては再生を抑制する働きをもつことを示唆する。この発見も、将来的に医療応用などへ役立つ可能性を持つ成果で、今後の研究展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Huang Tzu Ting, Matsuyama Hironori J., Tsukada Yuki, Singhvi Aakanksha, Syu Ru Ting, Lu Yun, Shahan Shai, Mori Ikuo, Pan Chun Liang	4. 巻 19
2. 論文標題 Age dependent changes in response property and morphology of a thermosensory neuron and thermotaxis behavior in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ace1.13146	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 塚田 祐基
2. 発表標題 局所神経回路のシナプスレベル機能解析
3. 学会等名 日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Yuki Tsukada
2. 発表標題 Distinct regeneration manners of head ganglia neurons in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 CeNeuro2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 三浦 耕太、塚田 祐基	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカル・サイエンス・インターナショナル	5. 総ページ数 212
3. 書名 デジタル細胞生物学	

1. 著者名 塚田 祐基	4. 発行年 2023年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊細胞「線虫を使った最新の神経行動生物学」	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------