

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15196

研究課題名（和文）発達期における視覚機能成熟に対する細胞内輸送系の寄与解明

研究課題名（英文）Elucidation of the contribution of the intracellular transport system to the maturation of visual function

研究代表者

岩田 卓（Iwata, Suguru）

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：80855883

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：視覚臨界期における神経突起内の分子メカニズムの詳細についてはいまだ不明な部分が多い。そこで本研究では、視覚臨界期における分子モーターKIF5Aの機能を解明するため、ウイルスを用いて視覚野特異的な遺伝子操作を施したマウスにおいて、ニューロンの応答性及び方位選択性についてのCaイメージング解析を行った。するとKIF5Aのノックアウトと強制発現はそれぞれ視覚刺激に対する応答性を減弱及び回復させたが、ノックアウト及び強制発現された細胞はどちらも同一視覚野内のWT細胞に比べてその方位選択性を減弱させた。したがって視覚臨界期における方位選択性の維持に突起内分子機構が重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトやマウスの視覚野には発達期において臨界期と呼ばれる神経可塑性が一過的に高まる時期が存在し、この時期に正常な神経活動を得られなかった視覚野はうまく機能せず、臨界期を過ぎてしまうと元に戻すことができない。この時期において、神経細胞の生存・機能維持・可塑性に重要な役割をしている分子モーターによる分子機構がどのように関わっているかを調べたことで、本研究はこれまで未知であった神経回路網内の神経突起内メカニズムの解明に寄与する成果を得た。これにより、視覚機能の正常な発達の基盤となる分子機構を理解できると同時に、成熟した脳における視覚機能発達障害の治療法創出に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The details of the molecular mechanisms within dendrite during the visual critical period remain elusive. In this study, to elucidate the function of the molecular motor KIF5A during the period, I conducted Ca-imaging analysis of neuronal responsiveness and orientation selectivity in mouse with specific genetic manipulation of the visual cortex using AAV. I observed that knockout and overexpression of KIF5A attenuated and restored responsiveness to visual stimuli, respectively, but both knockout and overexpressed cells exhibited reduced orientation selectivity compared to WT cells located in the same visual cortex. These results suggest that molecular mechanisms in which the KIF5A transport within dendrite participates play an important role in maintaining orientation selectivity during the visual critical period.

研究分野：神経科学

キーワード：視覚臨界期 分子モーター 応答性 方位選択性 グルタミン酸受容体 Caイメージング 樹状突起

### 1. 研究開始当初の背景

視覚野には発達期において臨界期と呼ばれる神経可塑性が一過的に高まる時期が存在し、マウスにおいては生後 21 日から 35 日の期間がそれにあたるが、これは脳機能の可塑的変化の優れたモデル系として現在様々な研究が盛んに行われている。この分野において最も重要なことは、臨界期中の視覚野は両眼視による正常な視覚情報を求めており、それによって臨界期前では不完全な状態の神経回路網を正規化しているということであり、この時期に正常なニューロンの神経活動を得られなかった視覚野はうまく機能せず、臨界期を過ぎてしまうと元に戻すことができない [Hensch, Nat. Rev. Neurosci. 2005; Hooks and Chen, Neuron 2007; Espinosa and Stryker, Neuron 2012]。

一方で、申請者はこれまでに神経突起内で ATPase の機能により微小管をレールとして順行性に細胞内小器官や機能分子を輸送するキネシン分子モーター [Hirokawa et al., Neuron 2010] に着目した研究に取り組んできた。申請者による研究も含めた近年の報告では、神経可塑性や脳高次機能の発達に重要な役割を担っている分子モーターが、臨界期視覚野と同様に正常な輸送を行う上でニューロンの神経活動を必要としていることが判明している [Kondo et al., Neuron 2012; Yin et al.; Iwata et al., Sci. Adv. 2020; Hangen et al., Cell Rep. 2018]。このことから申請者は神経突起内の物質輸送システムは、視覚臨界期中の神経回路網の発達に多大なる影響を与えているのではないかと考えた。そこで、視覚臨界期中のマウスに暗黒飼育を施し、その後最長で 24 時間の明環境暴露による光刺激を与えて視覚臨界期における分子モーターの発現量に焦点をあてた実験を実施した。すると、解析した種々の分子モーターの中で、KIF5A が特異的にその発現量を暗黒飼育によって減少させ、その後の光刺激によって元の発現量に回復していた。加えて KIF5A が輸送するとされる AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) についても同様の変化が検出された。

### 2. 研究の目的

本研究では、視覚野内ニューロンの視覚刺激に対する応答性と方位選択性の発達に対して、キネシン分子モーターがどのように寄与するのかを二光子顕微鏡による  $Ca^{2+}$  イメージングを用いて解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) Kif5A-flox マウスラインと Thy1-GCaMP6s 導入マウスを掛け合わせることでダブルノックインマウスコロニーを形成し、このマウス視覚野に Cre 発現アデノ随伴ウイルス (AAV-Cre) をマイクロインジェクションすることで、視覚野特異的に KIF5A のノックアウトを施した。このマウスを通常飼育した上で、AMPA 発現量解析と二光子顕微鏡を用いた  $Ca^{2+}$  イメージングを行った。

(2) KIF5A 過剰発現 AAV ベクターを作製し、Thy1-GCaMP6s 導入マウスの視覚野にマイクロインジェクションを施すことで、暗黒飼育中の KIF5A 発現量を強制的に維持させた。このマウスについて、AMPA 発現量解析と  $Ca^{2+}$  イメージングを行った。

### 4. 研究成果

(1) 視覚野特異的 KIF5A ノックアウトを施したマウスを通常飼育した上でイムノブロッティングによるタンパク質発現量解析を行った。Cre 発現アデノ随伴ウイルスを注入した Kif5a-flox マウスの視覚野では Cre-loxP システムにより Kif5a 遺伝子がノックアウトされる。そのため KIF5A のタンパク質発現量は著しく減少し、それに伴って GluR1 のタンパク質発現量も減少することが分かった (図 1)。

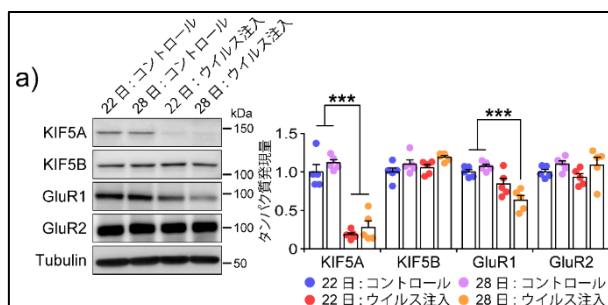


図 1. Cre 発現アデノ随伴ウイルスを注入した Kif5a-flox 視覚野におけるタンパク質発現量 a) Kif5a-flox マウスの視覚野におけるタンパク質発現量。平均値±標準誤差、 $P^{***} < 0.001$  one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc comparison.

(2) KIF5A-2lox 及び Thy1-GCaMP6s のダブルノックインマウスに AAV-Cre をマイクロインジェクションすることで、視覚野特異的に KIF5A のノックアウトを施した。その上で、二光子顕微鏡を用いた  $Ca^{2+}$  イメージングを行ったところ、同一視覚野内において KIF5A-細胞の方が KIF5A+細胞に比べて有意に方位選択性細胞の割合を減少させていることが判明した (図 2)。

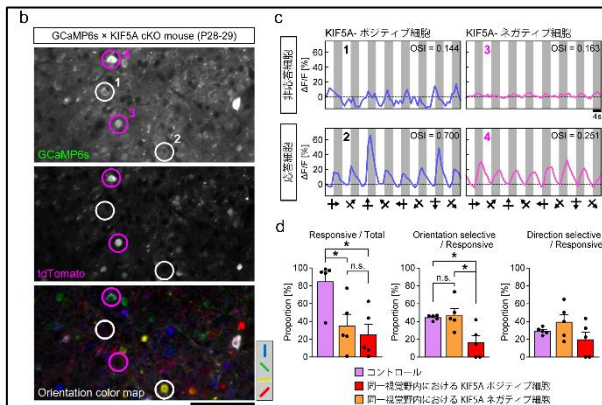


図 2. KIF5A cKO マウスの視覚野における  $Ca^{2+}$  イメージング b) Kif5a-flox マウスの視覚野における  $Ca^{2+}$  イメージング。c) 任意の細胞における応答のタイムコース。d) 応答性、方位選択性、方向選択性の定量結果。平均値 ± 標準誤差、 $P^* < 0.05$  one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc comparison.

(3) KIF5A 過剰発現 AAV ベクターを作製し、Thy1-GCaMP6s 導入マウスの視覚野にマイクロインジェクションを施すことで、暗黒飼育中の KIF5A 発現量を強制的に維持させた。このマウスについて、AMPA 発現量解析と  $Ca^{2+}$  イメージングを行ったところ、暗黒飼育をしているにもかかわらず GluR1 発現量は通常飼育を行ったマウスと同水準であり、 $Ca^{2+}$  イメージングによる応答性の結果も同様であった。しかし、同一視覚野内での KIF5A 強制発現細胞と KIF5A 通常発現細胞の方位選択性・方向選択性を比較したところ、KIF5A 強制発現細胞の方が、KIF5A 通常発現細胞に比べて方位選択性・方向選択性のどちらも減弱させていることが分かった(図 3)。これらのことから、KIF5A による樹状突起内での GluR1 輸送は視覚発達期における方位選択性及び方向選択性の維持に重要な役割のあることが示唆された。

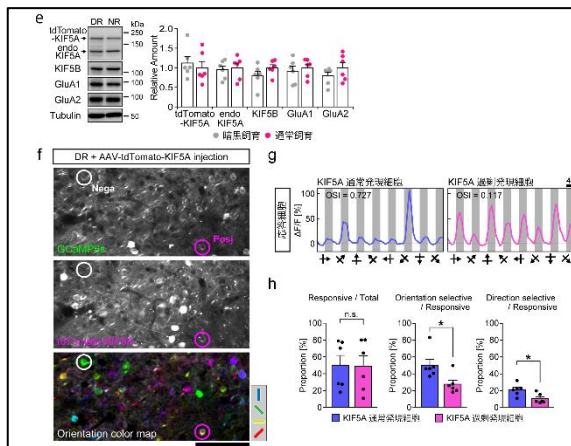


図 3. KIF5A 過剰発現マウスの視覚野における発現量解析と  $Ca^{2+}$  イメージング e) KIF5A 過剰発現 AAV をマイクロインジェクションしたマウスの視覚野におけるタンパク質発現量。平均値 ± 標準誤差、t 検定。f) KIF5A 過剰発現マウスの視覚野における  $Ca^{2+}$  イメージング。g) 任意の細胞における応答のタイムコース。h) 応答性、方位選択性、方向選択性の定量結果。平均値 ± 標準誤差、 $P^* < 0.05$  one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc comparison.

<引用文献>

- ①Hensch T.K. Critical period plasticity in local cortical circuits. Nat Rev Neurosci. 2005 Nov 6(11):877-88. PMID: 16261181 DOI: 10.1038/nrn1787
- ②Hooks B.M, Chen C. Critical periods in the visual system: changing views for a model of experience-dependent plasticity. Neuron. 2007 Oct 25;56(2):312-26. PMID: 17964248 DOI: 10.1016/j.neuron.2007.10.003
- ③Espinosa J.S, Stryker M.P. Development and plasticity of the primary visual cortex. Neuron. 2012 Jul 26;75(2):230-49. PMID: 22841309 DOI: 10.1016/j.neuron.2012.06.009
- ④Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. Neuron. 2010 Nov 18;68(4):610-38. PMID: 21092854 DOI: 10.1016/j.neuron.2010.09.039
- ⑤Kondo M, Takei Y, Hirokawa N. Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. Neuron. 2012 Feb 23;73(4):743-57. PMID: 22365548 DOI: 10.1016/j.neuron.2011.12.020
- ⑥Iwata S, Morikawa M, Takei Y, Hirokawa N. An activity-dependent local transport regulation via degradation and synthesis of KIF17 underlying cognitive flexibility. Sci. Adv. 2020 Dec 16;6(51):eabc8355. Print 2020 Dec. PMID: 33328231 DOI: 10.1126/sciadv.abc8355
- ⑦Hangen E, Cordelieres F.P, Petersen J.D, Choquet D, Coussen F. Neuronal activity and intracellular calcium levels regulate intracellular transport of newly synthesized AMPAR. Cell Rep. 2018 Jul 24;24(4):1001-1012.e3. PMID: 30044968 DOI: 10.1016/j.celrep.2018.06.095

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 岩田卓、星野鉄哉、根東覚、佐々木哲也、武井陽介、伊藤雅英
2. 発表標題 光波散乱計測を用いた分散培養ニューロンの3次元形態解析システム
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森川桃、岩田卓、森川真夏、田中庸介、武井陽介、廣川信隆
2. 発表標題 神経難病におけるキネシン分子モーターの神経細胞内での動態解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩田卓、星野鉄哉、佐々木哲也、武井陽介、伊藤雅英
2. 発表標題 神経突起内輸送動態を検知する光波散乱を用いた高速3次元解析システムの開発
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岩田卓、森川桃、佐々木哲也、武井陽介
2. 発表標題 An activity-dependent local transport regulation via local synthesis of kinesin superfamily proteins (KIFs) underlying cognitive flexibility
3. 学会等名 Neuroscience 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩田卓、根東覚、森川桃、森川真夏、武井陽介、大木研一、廣川信隆
2. 発表標題 Study of the function of molecular motor KIF5A in visual information processing during visual critical period
3. 学会等名 The 49th Naito Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩田卓、森川桃、佐々木哲也、武井陽介
2. 発表標題 AN ACTIVITY-DEPENDENT LOCAL TRANSPORT REGULATION VIA LOCAL SYNTHESIS OF KINESIN SUPERFAMILY PROTEINS (KIFS) UNDERLYING COGNITIVE FLEXIBILITY
3. 学会等名 FENS Forum 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024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

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