

令和元年6月8日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03298

研究課題名（和文）生体脳内の転写因子活性の可視化と制御

研究課題名（英文）Visualization and regulation of the transcription factor activity in vivo

研究代表者

安部 健太郎（Abe, Kentaro）

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70462653

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：動物の成体の脳内において感覚入力・学習や病態の進行に伴い遺伝子の発現が変化することは知られているが、遺伝子の発現を制御する転写因子の活性に関しては不明な部分が多い。本研究では独自開発技術を用い、動物成体脳内において転写因子の活性を定量化、可視化することを試みた。本研究においては動物が社会相互作用や感覚入力、病態発症の過程において脳内神経細胞が発現する転写因子がダイナミックな活性変化を示すことを明らかにすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の神経系は個体外からの情報を受けて柔軟に変化する。生後発達、記憶学習の過程や加齢や疾患により脳内の神経細胞はその状態を可塑的に変化させ、遺伝子発現を制御する転写制御因子はその過程に重要な役割を果たす。転写因子のダイナミックな活性を観察し、人為的に操作することができれば、生命現象の理解のみならず、学習の人為的促進や高次脳機能障害に対する治療法を提供することに繋がる。

研究成果の概要（英文）：It is well known that the expression of genes changes according to the sensory information received, learning and memory, or even to the progression of the diseases. However, the activity of the transcription factors that regulate the expression of genes is not well known. This research aimed to quantify and visualize the activity of the transcription factors in the adult brain of the animal. This research succeeded to observe the dynamic activities of the transcription factors in vivo during social interaction, sensory input and the progression of diseases.

研究分野：発達神経科学

キーワード：転写因子 記憶学習 発達 可塑性

1. 研究開始当初の背景

動物は環境や他個体などから受容する情報に応じて自分の体の形態のみならず、行動パターンをも変容させる能力をもち、この適応的な能力は、動物の環境への柔軟な適応や過去の情報を生かした行動をとることを可能にしている。動物の行動をつかさどる脳神経系においては、神経活動依存的に神経細胞の遺伝子発現を柔軟に変化させる分子機構が存在し、これらが発達過程における柔軟な神経ネットワークの形成・再編、また、成体においても記憶や学習の獲得、長期的な行動の変容に重要な役割を果たすことが知られる。また、成体脳内においては神経活動依存的な遺伝子発現に加え、内分泌系、グリア性因子、免疫系由来の因子など、さまざまな細胞種からの影響により遺伝子の発現変化がおこることが知られる上、外来の感覚入力のみならず、概日性リズムや睡眠覚醒サイクルなど内在的な要因においても遺伝子の発現はダイナミックに変化することが知られている。さらに、生活習慣病、ストレス負荷状態、各種脳機能障害において脳内の遺伝子発現プロファイルの変化が観察されることから、近年、神経細胞における遺伝子発現制御機構と脳機能疾患との関連が注目されている。

脳内における経験依存的な遺伝子の発現変化は、それを制御する転写制御因子のダイナミックな活性変化によって担われている。一方で、生体内における転写因子の働きについては、発生段階の初期などにおいては神経細胞の増殖や運命決定に関することなどが知られているものの、成体脳内においてその活性がどのように変動しているのかについては知見が乏しいのが現状である。この一因として、転写因子の活性を直接観察する技術の不足、または、それらを成体脳内への適応することが困難であることが挙げられる。近年、マイクロアレイ法や次世代シーケンサー法など、遺伝子の発現プロファイルを明らかにする手法の開発は進み、生理行動、および疾患や投薬に伴う遺伝子発現の変化を効率的に解析することが可能になった。しかしながら、個々の遺伝子の発現は、その発現に関わる多数の転写調節因子の協調的な働きの総体として現れるものであり、かつ、転写因子の活性は随時ダイナミックに変化するため、遺伝子の発現プロファイルだけでは、それを制御する転写調節因子の活性を明らかにすることは困難である。複数の転写調節因子の活性を同時に比較、またその活性の変化を経時的に計測する手法は、動物の生理応答を可能にする基盤的分子メカニズムの解明のみならず、各種疾患における病態の進行の解析・病理の探求や、薬剤の薬効・副作用の探索に有用なツールとなり、創薬・創剤研究など、幅広い貢献が期待される。

2. 研究の目的

動物の成体の脳内において感覚入力・学習や病態の進行に伴い遺伝子の発現が変化することは知られているが、それを制御する転写因子の活性に関して不明な部分が多い。転写因子のダイナミックな活性を観察し、人為的に操作することができれば、生命現象の理解のみならず、学習の人為的促進や高次脳機能障害に対する治療法を提供することに繋がる。研究代表者は生体内の細胞において内在転写因子の活性を高精度に定量測定する手法、および脳内の転写因子のダイナミックな活性変化をライブイメージングする技術を確立した。本研究では、これらの技術を用いて、培養神経細胞および生体における神経活動依存的な多数の転写因子の活性を明らかにし、比較解析、活性操作することにより、それら活性変化と行動や病態への関わりを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、研究代表者によって開発された転写因子活性レポーターウイルスを用いて、培養神経細胞および、生体内において 50 種以上の転写因子の活性を測定した。まず、レンチウイルスベクターにおいて作成した、50 種類以上の転写因子のそれぞれに対する転写因子活性レポーターウイルスを作成、精製し、高力価のレポーターウイルスを得た。これらのウイルスを多種類混合し、分散培養した大脳皮質および海馬神経細胞初代培養系、およびマウス (*Mus musculus*) の生体脳内神経細胞に感染させた。レポーターウイルスにより発現するレポーター遺伝子は、サンプルからの総 RNA の抽出精製後、逆転写反応により cDNA を得た後、各レポーター遺伝子に特異的な PCR プライマーを用いて定量 PCR 法により発現量を数値化し、各転

写因子の活性の集合データである転写因子活性のプロファイルを取得した。様々な条件のサンプルから得たプロファイルを比較解析することにより、生体における神経活動依存的または社会相互作用依存的な転写因子を明らかにし、それを担う神経回路メカニズムを明らかにすることをを行った。また、行動や病態の進行に伴う転写因子活性のプロファイルを取得し、頭部装着型の蛍光顕微鏡を用いて脳内の転写因子活性の変化をライブイメージングすることにより、学習やストレス負荷などが生体内の転写因子活性に及ぼす影響を明らかにした。また、行動や病態に相関の高い転写因子の活性を人為的に制御することにより、転写因子の活性が、学習や病態進行におよぼす影響を明らかにし、これらを人為的に制御する手法を探索した。

4. 研究成果

これまで神経活動依存的な遺伝子転写機構の研究モデルとして、マウス海馬神経細胞および大脳神経細胞の初代培養系が一般的に使用されている。本研究では、これらの初代培養系を用い、レポーターウイルスを感染させた神経細胞に対し神経活動を誘発し、約 50 種の転写因子の活性を経時的に測定した。これにより、これまで特定の経路のみ調べられていた神経活動依存的な転写因子の活性化を多数の転写因子について定量比較を行った。その結果、神経活動依存的な転写因子としてこれまでに広く知られている転写因子 (CREB, SRF, EGR1 など) のほかに多くの転写因子の活性がダイナミックに変動することが明らかになった。

次に、生体脳内細胞においてこれらの転写因子活性の定量を行った。動物成体の生体内において経験・活動依存的な遺伝子発現の柔軟な変化を及ぼすメカニズムとその生理的意義に関しては、不明な部分が多い。培養神経細胞系で観察される神経活動依存的な機構に加え、神経ペプチド・モノアミン等の神経伝達物質、グリアの相互作用、内分泌系、血管との相互作用など培養系では見られない様々な因子が関与し、その詳細については明らかにできていない部分が多い。本研究では、培養神経細胞での解析で使用した転写因子レポーターウイルスをマウス脳の特定の部位 (大脳皮質、海馬、線条体など) に感染させ、生体内の転写因子活性を明らかにすることをを行った。本研究では、マウス個体およびキンカチヨウ個体を用い、レポーターウイルスを感染させた脳内神経細胞に対し神経活動を誘発し、約 50 種の転写因子の活性を測定した。これにより、これまで特定の経路のみ調べられていた神経活動依存的な転写因子の活性化を多数の転写因子について定量比較を行った。その結果、培養細胞系と同様に神経活動依存的な転写因子としてこれまでに広く知られている転写因子 (CREB, SRF, EGR1 など) のほかに多くの転写因子の活性がダイナミックに変動することが明らかになった。また、培養細胞での解析と比較を行い、多くの転写因子の活性が培養神経細胞と生体内神経細胞での違いが生じることが明らかになった。このような違いを生み出すメカニズムは現時点においては特定できていないが、培養系と生体内系における神経活動パターンの違いや、神経伝達調節物質、グリア細胞との相互作用の違いなどが影響すると考えられる。

また、本研究では、転写因子活性の変動をより細かい時間スケールでの観察を試みた。この目的のため、CREB 転写因子の活性を可視化できる転写因子活性レポーターウイルスを鳴禽類キンカチヨウ (*Taeniopygia guttata*) にウイルスベクターを用いて発現させ、頭部装着型の軽量蛍光顕微鏡によりその活性のライブイメージング観察を行った。キンカチヨウ線条体にウイルスベクターを感染させ、脳内観察用のレンズを手術により埋め込んだのち 2 - 3 週かけて顕微鏡装着に慣らせることにより、自由に行動するキンカチヨウ脳内の CREB 活性の変化を同一細胞において最長で数日にわたり経時的に観察することに成功した。本手法を用いて、刺激に応じた脳内の転写因子活性を可視化を行った。キンカチヨウ線条体は、キンカチヨウの個体間コミュニケーションの媒体である音声シーケンス「さえずり」の習得に重要な役割を果たすのみならず、シーケンスの認識にも関与することが示唆されている。本研究では、キンカチヨウに他個体の音声シーケンスを聞かせた際の線条体の神経活動、CREB 活性の変化を検討した。カルシウムインジケータ GCAMP6s を発現させ、蛍光顕微鏡により神経活動のライブイメージング記録を行ったところ、キンカチヨウ線条体細胞は、他個体の音声シーケンスを知覚する際に神経活動が生じることを確認した。キンカチヨウ線条体神経細胞の CREB 活性は、他個体が発する音声シーケンスを録音したものをスピーカーより呈示しただけでは顕著な変化を生じることにはなかったが、他個体が実際に隣接ケージに存在し、学習に必要な社会相互作用の存在下

においては、音声シーケンスの呈示は脳内の CREB 活性を大きく変化させた。また、遺伝子改変動物の作成などで CREB の活性を人為的に操作した個体を作成したところ、実際に音声シーケンスの習得を抑制および促進することを明らかにした。

本研究の成果は社会相互作用が動物の能力獲得を促進するメカニズムを明らかにすることに貢献する。成体脳内の多数の転写因子活性を定量的に測定する手法は存在せず、本研究の手法により成体脳内の転写因子活性のダイナミックな変化が観察されたことは、国内外問わず大きなインパクトがある。今後は転写因子活性の変化と脳機能の可塑性の関連をより詳細に調べ、また、ダイナミックな転写因子活性の変化が引き起こされる分子メカニズム、神経メカニズムの解析を進めていくことで、動物が外界からの情報入力に従って脳を変化させる機構を明らかにすることができ、ストレスや病気などによる脳機能障害を防ぐ術を開発することに繋がると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

安部 健太郎. 鳴禽類における世代を超えた情報の口承に関わる神経機構. 第 89 回日本動物学会. 発表年 : 2018

安部 健太郎. 生後能力発達に影響する「生まれ」と「育ち」. 第 41 回日本分子生物学会年会. 発表年 : 2018

Kentaro Abe. Mechanisms underlying the experience-dependent development of birdsongs. 第 41 回日本神経科学大会. 発表年 : 2018

安部 健太郎 脳機能の発達と可塑的变化を引き起こす脳内機構の解明の試み
大阪大学蛋白質研究所セミナー. 発表年 : 2018

安部 健太郎. 「鳴禽類における世代を超えた情報の口承に関わる神経機構」生理学研究所東北研究会. 発表年 : 2017.

Kentaro Abe. CREB activation stimulates social learning in songbirds
第 40 回日本神経科学大会. 発表年 : 2017

Kentaro Abe & Dai Watanabe. CREB-mediated interplay of genes and environment in the postnatal song learning in songbirds Society of Neuroscience annual meeting , 2016.

Kentaro Abe. Transcription factor-mediated interplay of genes and environment in the social learning of vocal skills in songbirds. Wiring and Functional Principles of Neural Circuits , 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://kntrb.org/Lab.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
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：
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。