

令和元年9月10日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19438

研究課題名（和文）大規模機能的コネクトミクス法の創出

研究課題名（英文）Generation of transgenic mice lines for wide-view mapping of functional connectomics

研究代表者

林 朗子（高木朗子）（Hayashi-Takagi, Akiko）

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：60415271

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）：増強したスパインとともに、シナプス前・後部神経細胞を神経活動依存的に同時標識する方法を確立し、学習時に活動した特定のニューロン集団（セル・アンサンブル）と、学習に伴い増強するシナプス群（シナプス・アンサンブル）を大規模に標識する手法の創出を目指した。そのために神経活動依存性プロモーターや蛍光タンパク質の種類、蛋白質分解誘導ペプチドの付加などの条件検討を行い、シナプス前部プローブ、シナプス後部側の神経細胞形態マーカー、AS-PaRac1-mCloverを発現するトリプル・トランスジェニック（TG）マウスを作成し、大規模かつ定量的な「機能的」コネクトミクスのための技術基盤の準備をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来型の「形態的」コネクトミクスを用いて、神経回路地図の構築が目指されていますが、如何に詳細な地図を作ると、どの神経回路が実際に使用され、強化もしくは減弱されたかを示すことは出来ません。そこでシナプスの可塑性の情報を含めた「機能的」コネクトミクスを描出する技術が必要です。本研究課題で私たちが確立した「機能的」コネクトミクスは、シナプス増強プローブ（赤色）と共に、そのシナプス前部（青色）とシナプス後部神経細胞（緑色）を神経活動依存的に3色に標識するものであり、高次機能を担う神経回路の全容を、新たな角度より解明できると考えます。

研究成果の概要（英文）：Visualization and manipulation of possible synaptic pathology could provide mechanistic insight of psychiatric disorders. For this purpose, we aimed at establishment of a novel imaging technique named “functional connectomics”, in which we could visualize simultaneous presynaptic and postsynaptic activations. The probes for presynapse, postsynapse (AS-PaRac1), and postsynaptic neurons are expressed in an activity-dependent manner. We established the transgenic mice strains bearing the above-mentioned constructs. The uniqueness of this method with use of these transgenic mice is that it allows us to detect not only synaptic plasticity (micro imaging) but also the plastic reorganization of neuronal circuits in different brain areas (macro imaging). This multi-scale imaging could help elucidate the dynamic nature of synaptic potentiation in a specific neuronal circuit in the vast network of neuronal circuits in the brain.

研究分野：神経科学

キーワード：AS-PaRac1 大規模機能的コネクトミクス セル・アンサンブル シナプス・アンサンブル

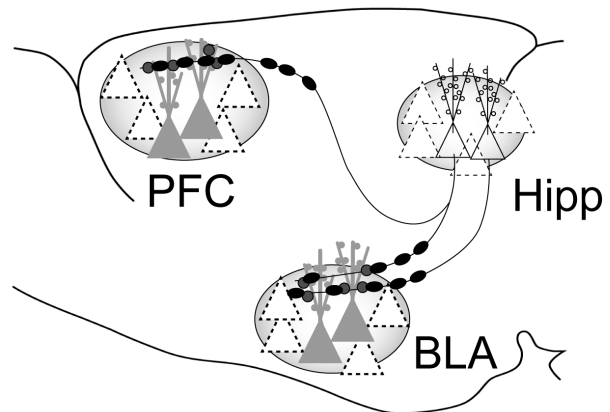
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質の興奮性シナプスは、神経細胞の樹状突起スパイン上に形成される。スパインは学習に応じて新生・増大し、スパインサイズとそのスパインに形成されるシナプスの電気伝達効率は非常に強い相関があることより、スパインの可塑性は記憶・学習の記憶素子と想定されている。また、精神遅滞や統合失調症などの様々な疾患においてスパイン異常が報告されており (Penzes *et al.*, 2011, *Nat Neurosci*) スパインの可塑性は記憶・学習にとどまらず様々な脳機能と関連すると考えられてきた。しかしながら、特定のスパインを消去する技術がなかったため、スパインと学習や精神疾患との直接的な因果関係を検討する不可能だった。そこで研究代表者は、新生・増大(増強)スパインを特異的に標識し、さらに青色光により標識したスパインだけを縮小させる AS-PaRac1 を開発した。学習後に増強スパインを消去すると記憶想起が有意に障害されたため、学習に伴うスパイン増強が学習の細胞基盤を担うことが世界に先駆けて報告できた (Hayashi-Takagi *et al.*, 2015, *Nature*)。このようなシナプス光遺伝学の技術は、スパイン異常を伴う様々な神経現象や病態を解明する強力なツールになることが期待できる一方で、様々な課題が残されていた。

2. 研究の目的

第一の問題点として、これまでの研究ではアデノ随伴ウイルスや子宮内電気穿孔法を用いた一過性の遺伝子導入法を用いており、遺伝子導入効率や導入範囲は個体間でのばらつきが必然的に生じ、スパイン可塑性を個体間で定量的に比較するには明らかに不適切と思われる。第二の問題点として、スパインは学習に伴って新生・増大する性質を持つ一方で、神経活動によらず自発的に増減するスパインも存在する (Yasumatsu *et al.*, 2008, *J Neurosci*)。また、大脳皮質の興奮性神経回路における主要な可塑性がシナプスの前部と後部の同調した活動 (Fire together, wire together) が必要であることを考えれば、シナプスの前後を同時かつ2重に標識することでより精度の高い「機能的」コネクトミクスが達成出来るはずである。このような問題点を解決し、大規模かつ定量的なスパイン研究を促進するために、本申請では神経活動依存的に使用されたシナプスの前部と後部を同時に3色で標識し、さらに光遺伝学による介入が可能なトリプル・トランスジェニック (TG) マウスを作成し、適切な系統を選別し、大規模かつ定量的な「機能的」コネクトミクスのための技術基盤の創出に挑戦した。



3. 研究の方法

(1) Tg マウスの作製に用いるコンストラクトの最適化

本研究は神経活動依存的に神経回路を標識することを目的とする。理想的な遺伝子発現は、神経活動に伴い迅速かつ比較的強い遺伝子発現とともに速やかに分解される性質を持つべきである。そこで

【図 1】プレシナプスマーカーである mTq-VAMP2 は組織特異的 Cre を発現するマウスと交配させることで、目的組織特異的に発現させることが出来る。すべての遺伝子は活動依存性プロモーターで誘導されるため、シナプス増強を誘発されたシナプスの前部・後部の回路ともに可視化できることが期待される。ここでは海馬 (Hipp) より扁桃体基底外側部 (BLA) 及び前頭前野 (PFC) に投射する回路網を示す。

神経活動依存性プロモーターや蛍光タンパク質の種類、蛋白質分解誘導ペプチドの付加などの条件検討を行い、コンストラクトの最適化を行う。このように複数の条件を子宮内電気穿孔法によりマウス胎児に遺伝子導入し、*in vivo* 2光子励起イメージングを行うことにより、記憶学習刺激に対して迅速に応答し、かつ1日以内に分解される適正な発現レベルを満たすコンストラクトを選出する。

(2) Tg マウス受精卵へのマイクロインジェクション

最適化された発現コンストラクトを受精卵にマイクロインジェクションし、TG マウスのファウンダーを作成する。

(3) 最適なマウス系統の選出

ファウンダーより F1 世代を繁殖させ、各系統 TG マウスに発現する神経細胞種、標識細胞密度、発現量の観点から、適正にシナプス前部および後部が標識される適切な系統を選出する。シナプス前部マーカーである DIO-mTq-VAMP2 は約 100% に迫る遺伝子導入効率を示し、シナプス後部を標識する AS-PaRac1 と Filler は比較的まばらに標識する系統を選び出す。灌流固定による切片標本で刺激の前後での蛍光値のダイナミックレンジが高い系統をスクリーニングする。

4. 研究成果

神経活動依存性プロモーターや蛍光タンパク質の種類、蛋白質分解誘導ペプチドの付加などの条件検討を行い、コンストラクトの最適化を行った。シナプス前部プローブ (mTq-VAMP2)、シナプス後部側の神経細胞形態マーカー (tdTomato、フィラー) を作成は、プロモーター (ESARE、SARE) と蛋白質分解シグナルとして機能する PEST 配列を付加することにより、適切な分解効率を有するシナプス前部および後部側神経細胞フィラーを選出した。具体的には、下記の 10 種類のコンストラクトを比較検証した。

シナプス前部マーカー	シナプス後部細胞 Filler
(1) <u>ESARE</u> ::mTq-VAMP2	(6) <u>ESARE</u> ::tdTomato
(2) <u>ESARE</u> ::mTq-VAMP2-PEST	(7) <u>ESARE</u> :: tdTomato-PEST
(3) <u>ESARE</u> ::PEST-mTq-VAMP2-PEST	(8) <u>ESARE</u> ::PEST- tdTomato-PEST
(4) SARE::mTq-VAMP2	(9) SARE:: tdTomato
(5) SARE::mTq-VAMP2-PEST	(10) SARE:: tdTomato-PEST

上記のコンストラクトを子宮内電気穿孔法により**第一次視覚野の片側だけ**に遺伝子導入し、P60 になり 2 日間遮光箱で飼育を行い、視覚野での視覚入力依存性発火を止める (図 2)。その後 2 時間の光照射をおこなったのち、マウスは再び遮光箱で飼育され、目的のタイミングで脳切片を作成され、コンストラクトの発現分布を確認した。

その結果、まず PEST 配列の付加がないコンストラクト (1)(6) は 2 日間の遮光にもかかわらず V1 における蛍光輝度が高く、刺激依存的な機能的コネクティクスには不適切であるし、SARE プロモーターを用いたコンストラクトである (4)(5)(9)(10) の発現量は、本研究課題には低すぎると判断した。ESARE プロモーターにより発現が誘導され、2 か所 PEST 配列が付加されているコンストラクト (3)(8) はバックグラウンド蛍光 (コホート での蛍光) も低く、光刺激後 1~3 日 (コホート

) には対側の V1 へ Tuft 部への強い投射も確認され (図 3) それ以降 () の蛍光強度は非常に低く保たれる。つまりコンストラクト (3) (8) は、刺激 1~3 日の間に、Long range connection を含む全脳レベルでの機能的コネクトミクスが行えると結論付けた。

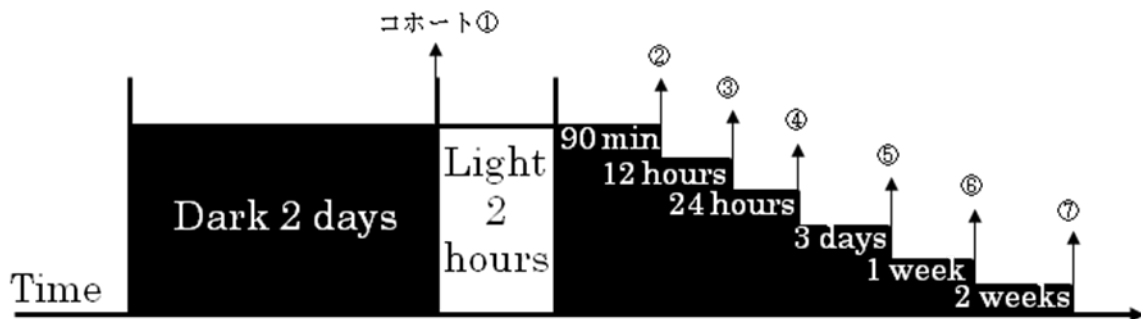


図 2 : 遮光および視覚刺激プロトコール

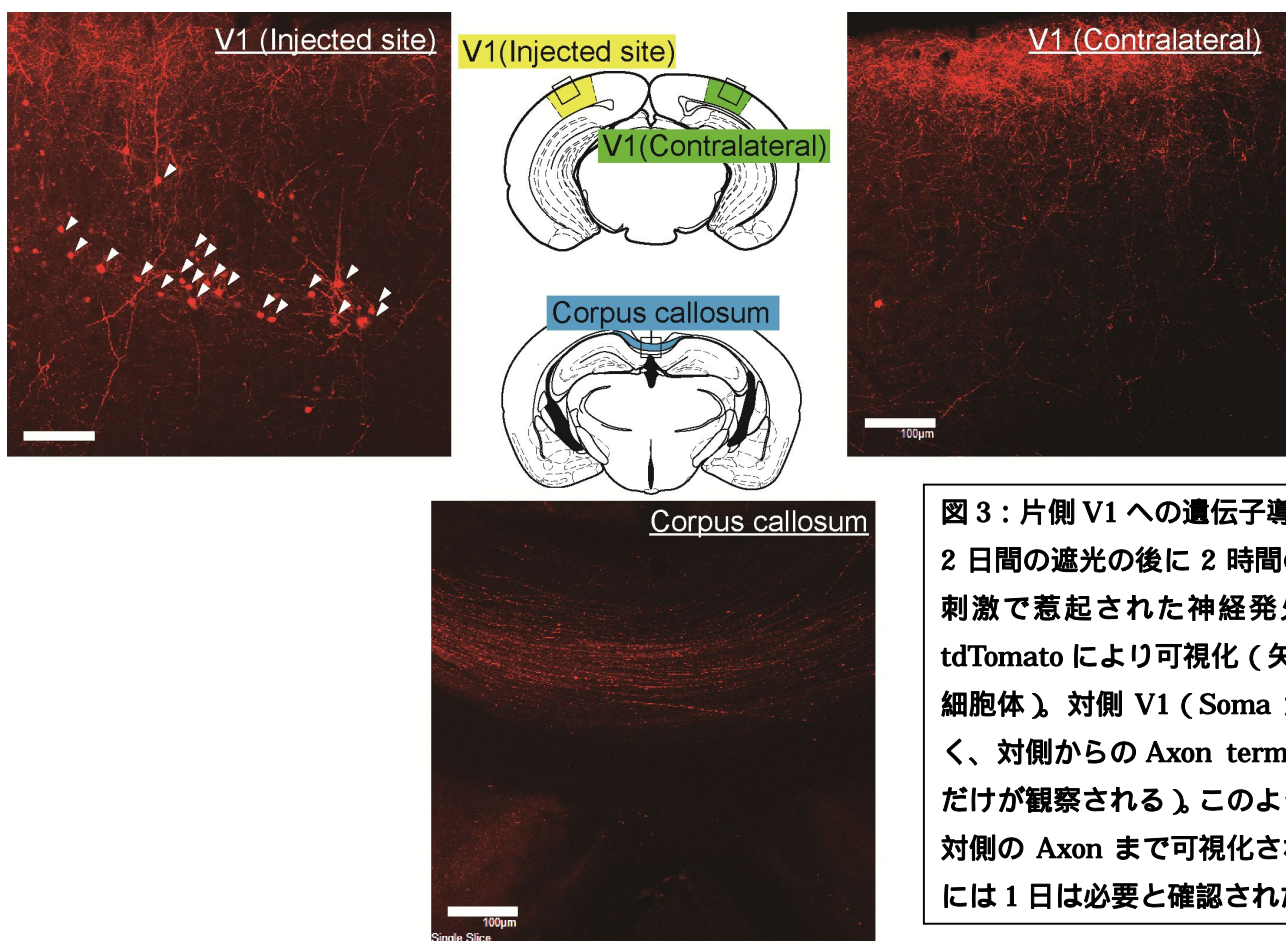


図 3 : 片側 V1 への遺伝子導入。2 日間の遮光の後に 2 時間の光刺激で惹起された神経発火が tdTomato により可視化 (矢頭、細胞体)。対側 V1 (Soma がなく、対側からの Axon terminal だけが観察される)。このように対側の Axon まで可視化されるには 1 日は必要と確認された。

これらのシナプス前部プローブ (コンストラクト 3)、シナプス後部側の神経細胞形態マーカー (コンストラクト 8、フィラー)、AS-PaRac1-mClover を発現するトリプル・トランスジェニック (TG) マウスを作成した。トランスジェニックマウスのファウンダーが 15 匹 (コンストラクト 3)、9 匹 (コンストラクト 8) 生まれており、現在、ファウンダーマウスを繁殖させ、F1 世代を用いて発現量と発現細胞の密度が適正な系統を選別している途中である。

上記のように、適切なコンストラクトの選定からはじまり、これらのコンストラクトをトランスジーンとする TG マウスの F1 世代の作成まで終了した。刺激の前後で、

蛍光値の差分が非常に大きなダイナミックレンジを示す系統も見出され、当初の目的は概ね完成できたと考えている。今後は、様々な精神疾患モデルマウスについてシナプス・アンサンブルの観点で定量的かつ大規模に可視化及び操作し、疾患モデルマウスの回路異常の全容解明を目指す。手当たり次第に解析することも効率が悪いので、注目すべき脳領域の同定も進行している。ある疾患モデルマウスの病態が形成される前後でタイムポイントを数点振り、Arc 抗体を用いた免疫染色を全脳レベルで行い、脆弱群と疾患抵抗群の差異が見られる脳領域での目ぼしを付けている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents.
Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR. (査読あり)
Cell Rep. 2018 Aug 21;24(8):2196-2210.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.056.
- 2.[Optical Erasure of the Synaptic Ensemble that Underlies Learning and Memory].
Sato M, Miyamoto N, Chiba K, Obi K, Hayashi-Takagi A. (査読なし)
Brain Nerve. 2018 Jul;70(7):713-721. doi: 10.11477/mf.1416201072. Japanese.
3. Calcineurin knockout mice show a selective loss of small spines.
Okazaki H, Hayashi-Takagi A, Nagaoka A, Negishi M, Ucar H, Yagishita S, Ishii K, Toyozumi T, Fox K, Kasai H. (査読あり)
Neurosci Lett. 2018 Apr 3;671:99-102. doi: 10.1016/j.neulet.2018.02.006. Epub 2018 Feb 7.
4. Increased EphA4-ephexin1 signaling in the medial prefrontal cortex plays a role in depression-like phenotype.
Zhang JC, Yao W, Qu Y, Nakamura M, Dong C, Yang C, Ren Q, Ma M, Han M, Shirayama Y, Hayashi-Takagi A, Hashimoto K. (査読あり)
Sci Rep. 2017 Aug 2;7(1):7133. doi: 10.1038/s41598-017-07325-2.
5. Synaptic Ensemble Underlying the Selection and Consolidation of Neuronal Circuits during Learning.
Hoshiba Y, Wada T, Hayashi-Takagi A. (査読あり)
Front Neural Circuits. 2017 Mar 2;11:12. doi: 10.3389/fncir.2017.00012. eCollection 2017.
6. Optogenetics: Applications in psychiatric research.
Shirai F, Hayashi-Takagi A. (査読あり)
Psychiatry Clin Neurosci. 2017 Jun;71(6):363-372. doi: 10.1111/pcn.12516. Epub 2017 Mar 30.
7. Synapse pathology and translational applications for schizophrenia.
Hayashi-Takagi A. (査読あり)
Neurosci Res. 2017 Jan;114:3-8. doi: 10.1016/j.neures.2016.09.001. Epub 2016 Sep 12.

〔学会発表〕(計0件)

〔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

<https://medical-neuro.imcr.gunma-u.ac.jp/>

6．研究組織

研究協力者

群馬大学・生体調節研究所・脳病態制御分野、小尾紀翔

ローマ字氏名:(OBI, Kisho)

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。