

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19300117

研究課題名（和文）RNA 干渉の応用による視覚野可塑性への神経栄養因子関与機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms underlying involvement of neurotrophic factors in visual cortical plasticity using RNA interference

研究代表者

津本 忠治（TSUMOTO TADAHARU）

独立行政法人理化学研究所・津本研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号：50028619

研究成果の概要：大脳皮質視覚野で片目遮蔽後にみられる両眼反応性変化やシナプス長期増強 (LTP) は発達脳可塑性の代表的な例として古くより研究されてきたが、従来の方法では種々の限界があった。本研究は、新しく開発された RNA 干渉法をマウス脳に適用し、視覚野可塑性のメカニズム解明をめざした。

まず、脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現を抑える small interfering RNA (siRNA) を使い、BDNF の発現を抑えた視覚野標本の作製を試みた。その結果、使用した電気穿孔法では siRNA が十分に視覚野ニューロンに入らず BDNF の発現を完全に抑えることができなかった。しかし、薬理学的方法で代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR5) が LTP 誘発に関与していることを発見し、さらに、mGluR5 の活性化によって生じた内因性カンナビノイドが視覚野の可塑性に関与しているという予想外の知見を得た。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2008 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：脳、シナプス、可塑性、大脳皮質、視覚野

## 1. 研究開始当初の背景

大脳皮質視覚野は感受性期と呼ばれる生後発達の特定の時期に片眼を遮蔽すると、その後両眼視機能の消失や眼優位コラムの縮小といった変化を生ずる (Wiesel &

Hubel, J. Neurophysiol. 26, 1003, 1963)。この両眼視可塑性は発達脳可塑性の代表的な例として古くより研究されてきた。

そのメカニズムに関しては、1980年代に N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体の関与が申請者ら (Tsumoto et

al., Nature 327, 513, 1987) を含めていくつかの研究から報告されたが、NMDA受容体の活性化がどのように機能や構造の変化を起こすかについては未だに十分に明らかになっていない。最近になってHenschらはGABA 抑制の発達が感受性の発現や終止に重要であることを報告した(Hensch et al., Science 282, 1504, 1998)が、GABA 抑制がどのようなメカニズムで可塑性に関与するかは不明のままである。

その後、申請者らはスライスや培養細胞標本を使って神経栄養因子、特にNeurotrophin が視覚野の可塑性に関与している可能性を示唆した(Akaneya et al., J. Neurosci. 17, 6707, 1997; Kohara et al., Science 291, 2419, 2001) が、*in vivo* 標本での直接的証明は未だなされていない(両眼視可塑性は視覚反応でアッセイするため *in vivo* でしか検証できない)。 *in vivo* で種々のNeurotrophinの機能を選択的に阻害することは機能阻止抗体が高分子であり、組織へ浸透しがたいことや阻害薬に選択性がないため困難であった。そのような内因性蛋白質の機能を調べる方法として遺伝子ノックアウト法が考えられるが、周知のようにこの方法は発生初期から全身で目的の蛋白質が欠損しているという欠点を有している。部位或いは時期限定のノックアウト法も最近開発されつつあるが、視覚野に限定する方法は、申請者の知る限りでは未だ開発されていない。

一方、数年前にMello とFire ら(Fire et al., Nature 391, 806, 1998)が線虫で発見したRNA干渉は、その後哺乳類でも生じることが明らかとなった。ただ、哺乳類の脳にRNA干渉を適用しようとする場合、最大の問題点はsmall interfering RNA (siRNA) を如何に標的の細胞に注入するかであった。申請者らは電気穿孔法を改良した方法を使って特定の脳部位の細胞にsiRNAを注入する方法を開発した。また、最近、この方法が実際にシナプス長期増強のメカニズム解明に有効であることも報告した(Akaneya & Tsumoto, J. Neurosci., 26, 10209, 2006)。

本研究ではこの方法を応用し、両眼視可塑性にNeurotrophinと関連受容体のどれが関与しているのか、及びその関与メカニズムの解明をめざした。

## 2. 研究の目的

(1) 主要なNeurotrophinであるBrain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)の発現をノックダウンさせる siRNAをラット視覚野に投与し、実際にBDNF蛋白質の発現が減弱しているかどうかを western blot analysis 及び immunocytochemistryによって確認する。

(2) siRNAを注入後6日目の時点で片眼を遮蔽し、さらに4日後に視覚野両眼視部分から皮質神経細胞光反応の眼優位性を記録、片眼遮蔽に応じて眼優位性を変える両眼視可塑性が残存しているかどうかを検証する。

(3) BDNFの高親和性受容体TrkBの発現をノックダウンさせるsiRNAをラット視覚野に投与、上記1と2と同様の実験を行い、BDNFが両眼視可塑性に関与しているかを明らかにする。

(4) ノックダウンした視覚野からスライス標本を作製し、シナプス長期増強(LTP) 或いは長期抑圧(LTD) が誘発されるかどうかを調べる。スライス標本におけるLTP, LTDが *in vivo* における両眼視可塑性と対応しているかどうかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) マウスBDNFのsiRNAを米国National Center for Biotechnology Information (NCBI) library の情報をもとに作製する。作製したRNA塩基配列の特異性はNCBIのNucleotide Basic Local Alignment Search Tool Programで確認する。

(2) 生後14日目(P14)のマウスを麻醉し、一側の大脳皮質視覚野両眼視領域にそれぞれのsiRNAを申請者らの開発したRNAi-induced gene silencing by local electroporation (RISLE) 法によって注入する。視覚野両眼視領域の同定は申請者らの研究室で稼動している左右の各眼への光刺激に対する内因性シグナルの記録によって行う。他側の大脳皮質対応部位にはコントロールとして溶媒溶液のみを同じ手続きによって注入する。目的領域の神経細胞にsiRNAが注入されたかどうかは、一部のマウスでCy3-conjugated siRNAを同時に注入しCy3に対する免疫組織化学的染色によって確認する。siRNA注入後麻醉から回復させ飼育ケージにもどす。

(3) RNA干渉によって標的の蛋白質のノックダウンが生じる注入後6日目(P20-21)にマウスを再び一時的に麻醉し、片目遮蔽を行う。遮蔽術後は再度ケージにもどす。

(4) 片眼遮蔽4日後(P24-25)に siRNA注入領域の視覚野から単一ニューロン活動を細胞外記録し、片眼遮蔽による眼優位性のシフトが起きているかどうかを調べる。対側の視覚野からコントロールの記録を行う。

(5) 両眼視可塑性を阻害したと判定された siRNA を別のグループのラットマウスの視覚野に注入し、その後 6 日目に注入部位を含むスライス標本作製する。スライス標本の II/III 層にシナプス反応の記録電極、IV 層に刺激電極を置き、IV 層の高頻度刺激によって LTP が生じるかどうかを調べる。

(6) LTP が生じた場合、種々の拮抗薬を使いどのようなシナプス受容体が関与しているかを調べる。

#### 4 . 研究成果

まず試験的な実験として、脳由来神経栄養因子(BDNF)の siRNA を入手し、それをマウス大脳皮質視覚野に注入し BDNF の発現を抑えた標本の作製を試みた。しかし、使用した電気穿孔法では siRNA が十分に視覚野ニューロン内に入らず BDNF タンパク質の発現を完全に抑えることができなかった。

一方、マウス視覚野スライス標本において代謝型グルタミン酸受容体の 5 型( mGluR5 ) の特異的阻害薬が LTP 誘発を阻止することを見出したので視覚野可塑性のメカニズムとして mGluR5 の役割がより重要と思われた。したがって、mGluR5 の関与に焦点を当てて研究を遂行したところ、mGluR5 の作動薬が LTP 様シナプス増強を起こすこと、この変化後 LTP を起こすはずの高頻度刺激が LTP を起こせなくなるという閉塞(occlusion)現象が生ずることを見出し、mGluR5 は LTP 誘発に関与していることを証明した。

さらに、mGluR5 の活性化によって endocannabinoid (eCB)が生じ、これが高頻度刺激を受けないシナプスに異シナプス性長期抑圧 (heterosynaptic LTD) を起こす一方で刺激を受けたシナプスでは放出された BDNF が eCB の抑圧作用を押さえ同シナプス性長期増強 (homosynaptic LTP) を維持していることを発見した。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Huang, Y., Yasuda, H., Sarihi, A. and Tsumoto, T. Roles of endocannabinoids in heterosynaptic long-term depression of excitatory synaptic transmission in visual cortex of young mice. *J. Neurosci.*, 28, 7074 – 7083 (2008). 査読有

Yasuda, H., Huang, Y. and Tsumoto, T. Regulation of excitability and plasticity by

endocannabinoids and PKA in developing hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 3106-3111 (2008). 査読有

Sarihi, A., Jiang, B., Komaki, A-R., Sohya, K., Yanagawa, Y. and Tsumoto, T. Metabotropic glutamate receptor type 5-dependent long-term potentiation of excitatory synapses on fast-spiking GABAergic neurons in mouse visual cortex. *J. Neurosci.*, 28, 1224-1235 (2008). 査読有

Kohara, K., Yasuda, H., Huang, Y., Adachi, N., Sohya, K. and Tsumoto, T. A local reduction in cortical GABAergic synapses following a loss of endogenous BDNF, as revealed by single-cell gene knockout method. *J. Neurosci.*, 27, 7234-7244 (2007). 査読有

Sohya, K., Kameyama, K., Yanagawa, Y., Obata, K. and Tsumoto, T. GABAergic neurons are less selective to stimulus orientation than excitatory neurons in layer II/III of visual cortex, as revealed by in vivo functional Ca<sup>2+</sup> imaging in transgenic mice. *J. Neurosci.* 27, 2145-2149 (2007). 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

Tsumoto, T. Activity-dependent trafficking of BDNF in axons of cortical neurons and an antagonizing action on endocannabinoid-mediated suppression of transmitter release at presynaptic sites. 6<sup>th</sup> FENS Forum of European Neuroscience. 13 July 2008, Geneva, Switzerland

Tsumoto, T. LTP of excitatory synapses on GABAergic neurons in mouse visual cortex: Its mechanism different from that of excitatory synapses on pyramidal neurons. 8<sup>th</sup> Biennial Meeting of Asia-Pacific Society for Neurochemistry. 23 June 2008, Shanghai, China

Tsumoto, T. Imaging in two worlds: Trafficking molecules in vitro and activities of different neurons in vivo. International Symposium “Topical Problems of Biophotonics-2007”, 4 August 2007, Nizhny Novgorod, Russia

Tsumoto, T., Adachi, N. Trafficking of BDNF in axons and dendrites of cortical neurons, analyzed by live-cell imaging. 7<sup>th</sup> IBRO World Congress of Neuroscience, 14 July 2007, Melbourne, Australia

〔その他〕

ホームページ等

<http://tsumoto.brain.riken.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

津本 忠治 (TSUMOTO TADAHARU)

独立行政法人理化学研究所・津本研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号：50028619

### (2)研究分担者

惣谷 和広 (SOHYA KAZUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・津本研究ユニット・研究員

研究者番号：80415207

蒋 斌 (JIANG BIN)

独立行政法人理化学研究所・津本研究ユニット・訪問研究員

研究者番号：30446520

茜谷 行雄 (AKANEYA YUKIO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40222517

亀山 克朗 (KAMEYAMA KATSURO)

独立行政法人理化学研究所・津本研究ユニット・訪問研究員

研究者番号：80446517