

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04984

研究課題名（和文）新規順行性神経標識法の確立と、それを用いた記憶神経ネットワークの解明

研究課題名（英文）Development of the anterograde neural tracing system for understanding the neural circuit for memory

研究代表者

平野 恭敬 (Hirano, Yukinori)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：40580121

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、記憶に関わる特定の神経がシナプス接続する神経を、順行性に標識する手法を確立することを目標とした。方法論として、細胞表面の受容体であるNotchを用いた人工タンパクを取り入れた。この人工タンパクをin vitroで最適化し、ショウジョウバエを用いて順行性のシナプス標識を実現させた。以上のように本研究で、順行性神経標識法という新規手法を確立した。今後、本手法を用いて特定のシナプス接続に焦点を絞った解析を進めていくことで、脳神経回路の更なる理解に発展させる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの様々な技術の発展から、遺伝学的、および生化学的に複雑な脳神経回路が解き明かされてきた。一方で、記憶に代表されるような、限られた記憶神経が司る神経ネットワークを理解するためには、シナプス間結合のある神経のみを標識し、それらを操作する方法論の樹立が必要不可欠であるが、そのような試みはされてこなかった。本研究で確立した順行性標識法が簡易な手法として活用できれば、ウィルスを用いずに遺伝子改変動物で可能となり、脳回路研究の強力な推進力となるだろう。この手法は遺伝子改変が可能なあらゆる動物に応用可能であり、ショウジョウバエ研究にとどまらない、汎用性の高い手法であると考えている。

研究成果の概要（英文）：We aimed to establish a novel technique by which the synaptic connection in the brain is visualized anterogradely. We adopted the artificial protein using Notch transmembrane protein. This artificial protein was optimized in vitro, and tested in Drosophila, which neural circuit can be labeled genetically. We successfully obtained the candidate protein which can be used for our specific aim, and will employ this to understand the complicated neural circuit for memory.

研究分野：神経科学

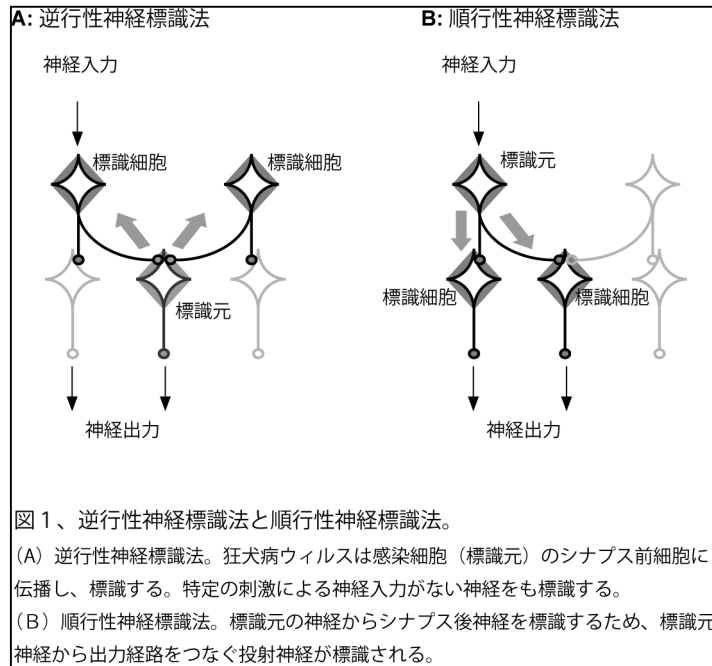
キーワード：順行性神経標識 神経回路 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

脳の機能解明、また神経回路の解明に向け、これまでに様々な手法が取り入れられてきた。哺乳動物においては種々のウイルス、あるいは特定神経でのみ発現するマーカー遺伝子の活用、ショウジョウバエにおいてはエンハンサートラップ法を用いた神経標識法が、脳機能研究の強力な推進力となった。また、シナプス接続のある神経を標識する手法(トランスシナプティック標識法)として狂犬病ウイルスが用いられ、さらに脳回路の一端を解明することができるようになった(図1)。

狂犬病ウイルスによる逆行性標識法(シナプス後神経からシナプス前神経の標識)は、任意の神経がどのような神経群に制御されるかを理解するために有用である。それとは異なり、神経の投射先を調べる手法、つまり順行性の神経標識法(シナプス前神経からシナプス後神経の標識)が確立されれば、任意の神経が司る神経回路を知ることができ、脳回路研究のさらなる進歩が期待できる。

私はこれまでにショウジョウバエの匂い条件付け課題を用い、記憶学習に寄与する分子メカニズムや神経回路を明らかにするための研究を行ってきた。ハエの記憶中枢は、約4500の神経からなるキノコ体と呼ばれる構造体である。またキノコ体のシナプス後神経が同定され、記憶中枢から行動出力までの回路網の一端が明らかにされた。神経構造体単位での理解は進んだといえるが、実際に記憶行動を引き起こすキノコ体神経は4500神経の中のどれなのか、またそのようなキノコ体神経がどのシナプス後神経に投射して行動を誘発するか、記憶神経回路を理解するうえで重要な知見が欠如している。これは記憶に使われる神経を同定し、順行性神経標識法を導入することで解決されると考えられた。



2. 研究の目的

本研究では以下のように、順行性の神経標識法を開発し、開発した方法を用いてショウジョウバエの記憶神経が関与する神経ネットワークを解明することを目指した。

1. 新規順行性神経標識法の構築と最適化

シナプス接続がある神経間で、シナプス後神経を標識する新規手法として、順行性神経標識法を構築する。ショウジョウバエ脳神経の初代培養を用いることで、最適化を図る。

2. 順行性神経標識法を使った記憶回路の解明

順行性神経標識を可能にするトランスジェニック系統を確立する。また、記憶形成に伴い発現誘導される遺伝子 Arc2 のプロモーターを用いて、記憶神経を標識する。これらを併用することで記憶神経のシナプス後神経を明らかにし、未知の記憶神経回路を解明する。

3. 研究の方法

1. 新規順行性神経標識法の構築と最適化

2016年に、細胞間相互作用に関わる Notch を改変し、細胞が接着したときに蛍光タンパクの発現が誘導される手法が発表された。細胞表面の受容体である Notch は、隣接する細胞の Delta 等の Notch リガンドと結合する。Delta との結合により、Notch は セクレターゼによる切断を受け、Notch の細胞内ドメインが遊離する (図 2 A)。Morsu. L.らは Notch の細胞外ドメイン (受容部) をラクダ由来の重鎖のみの特殊な抗体である Nanobody (コードする遺伝子は約 800bp 長) と置換し、さ

さらに細胞内ドメインを転写因子 Gal4 と置換した。GFP と結合する抗 GFP Nanobody-Notch-Gal4 を発現する細胞に、GFP を細胞表面に提示する細胞を隣接させると、GFP と抗 GFP Nanobody が結合することで Notch が切断され、Gal4 依存的な蛍光タンパクの発現が誘導されることが示された (図 2 B)。この報告では全細胞表面に GFP を提示させていたため、シナプス接続を検討していない。

本研究では、上記の手法を改変し、シナプス接続を検出するよう、最適化を行った (図 2 C)。シナプス前部に局在する Neurexin(Nrx)と GFP を融合させることで、シナプス前部で GFP が提示されるよう設計した。また Morsu. L.らと同様、膜タンパク Pvr の膜貫通ドメインを用いて細胞表面に GFP を提示するポジティブコントロールを構築した。恒常的に活性を持つ Gal4 を用いると発生段階のシナプス結合も検出する可能性があるため、薬剤により誘導可能な Gal4SW (RU486 という薬剤の存在下でのみ活性を持つ改変型 Gal4) を用いた。これらをコードする遺伝子をバキュロウィルスに組み込み、ハエ蛹由来の脳神経初代培養に感染させることで順行性神経標識法の最適化を図った。私はレンチウィルス由来の糖タンパク (VSV-G) をバキュロウィルスに組み込むとハエ神経に選択的に感染することを発見した (未発表) ので、これを活用した。検討する項目として、発現量、局在シグナル、シグナル増幅等を考慮した DNA 構築を行った。

2. 順行性神経標識法を使った記憶回路の解明

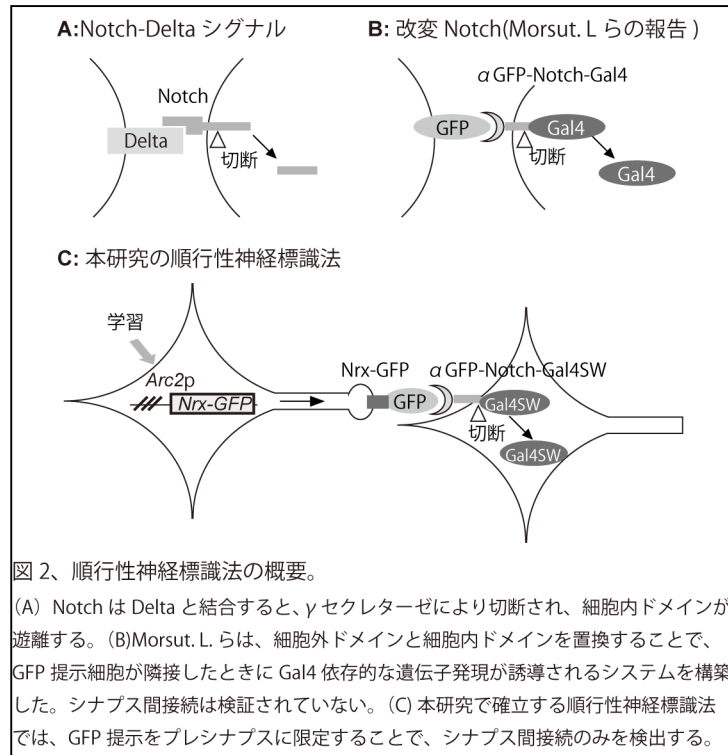


図 2. 順行性神経標識法の概要。

(A) Notch は Delta と結合すると、 γ セクレターゼにより切断され、細胞内ドメインが遊離する。(B)Morsu. L.らは、細胞外ドメインと細胞内ドメインを置換することで、GFP 提示細胞が隣接したときに Gal4 依存的な遺伝子発現が誘導されるシステムを構築した。シナプス間接続は検証されていない。(C) 本研究で確立する順行性神経標識法では、GFP 提示をプレシナプスに限定することで、シナプス間接続のみを検出する。

上記で検討した遺伝子をトランスポゾンを用いてハエに導入し、トランスジェニック系統を確立した。それとともに、記憶形成に伴い発現誘導される遺伝子 Arc2 のプロモーターを用いた記憶神経標識のためのトランスジェニック系統を確立した。これらの系統を用い、Arc2 プロモーターで Nr_x-GFP を発現させ、全神経で抗 GFP-Nanobody-Notch-Gal4SW / UAS-mcherry を持たせる。学習後、Arc2 発現神経で Nr_x-GFP が発現し、そのシナプス後神経で Notch の切断が起き、mcherry が発現すると考えられる。以上のように記憶に関与するキノコ体シナプス後神経を明らかにし、記憶神経ネットワークの理解につなげることを目指した。

4. 研究成果

1. 新規順行性神経標識法の構築と最適化

(1-1) nanobody の最適化

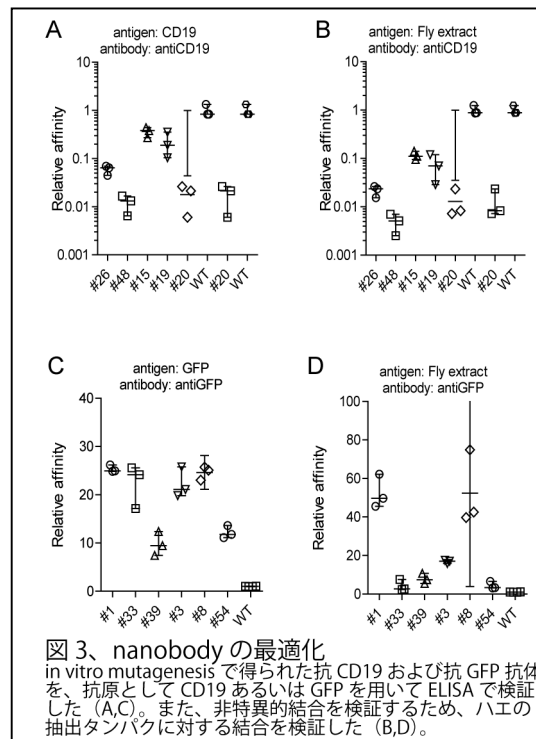
用いる nanobody とその抗原の組み合わせとして、抗 GFP 抗体と GFP、および抗 CD19 抗体と CD19 を選択し、最適化を行った。用いる nanobody として望ましいものは、抗体価が高く、かつ非特異的結合が少ないものであるため、in vitro mutagenesis を行い、nanobody のスクリーニングを行った。非特異的結合としてハエの脳抽出液中のタンパクとの結合を、ELISA で評価した。各抗体について、100 の独立した変異を持つ候補から 5 つの最適なものを選択し、それら 5 つからさらに 100 の独立した変異をもつ候補を作成し、最適なものを選定した。その結果、抗 GFP 抗体として 2 つ、抗 CD19 抗体として 5 つ、同等に抗体価が高く、かつ非特異的結合が少ない候補を同定した（図 3、抗 GFP 抗体 #33, #3、抗 CD19 抗体 #26, #48, #15, #19, #20）。シーケンス解析の結果、それらすべては別の変異を持つクローンであることがわかった。

(1-2) 初代培養神経を用いた検討

上記 nanobody を組み込んだ Notch-Gal4SW を構築し、バキュロウイルスを作成した。同じバキュロウイルス上に UAS-mcherry をさらに組み込み、Notch 切断により Gal4SW が各移行したときのレポーターとして用いた。nanobody に対するリガンド（GFP または CD19）を融合させた Nr_x を別のバキュロウイルスに組み込んだ（図 2C）。これらバキュロウイルスをシヨウジョウバエ脳の初代培養神経に感染させた。感染効率は 10% 程度に抑えることで共感染を防いだが、共感染が認められた場合は解析から除外した。ほとんどの組み合わせで Notch 切断によるレポーター発現は見ることはできなかったが、抗 CD19 抗体の中でも #48 と名付けたものにおいて、顕著なレポーター発現が観察された。これを用い、in vivo の検証を行った。

2. 順行性神経標識法を使った記憶回路の解明

上記で得られた抗 CD19 抗体 b を含む複数の候補 nanobody について、トランスジェニック



ク系統を作成した。これまでに神経回路がよくわかって神経からそのシナプス後神経を標識できるか検討した。匂い受容体神経に Nrx-CD19 を提示させ、全神経で抗 CD19-Notch-Gal4SW を発現させ、また全神経で UAS-mcherry をもつトランスジェニック系統を作成した。上記の初代培養神経の場合と同じく、抗 CD19 抗体の中でも b を使用したときのみ、シナプス後神経が標識されることがわかった (図 4)。Nrx-CD19 を記憶神経のみで提示させれば、記憶神経が投射するシナプス後神経を標識することができると思われる。

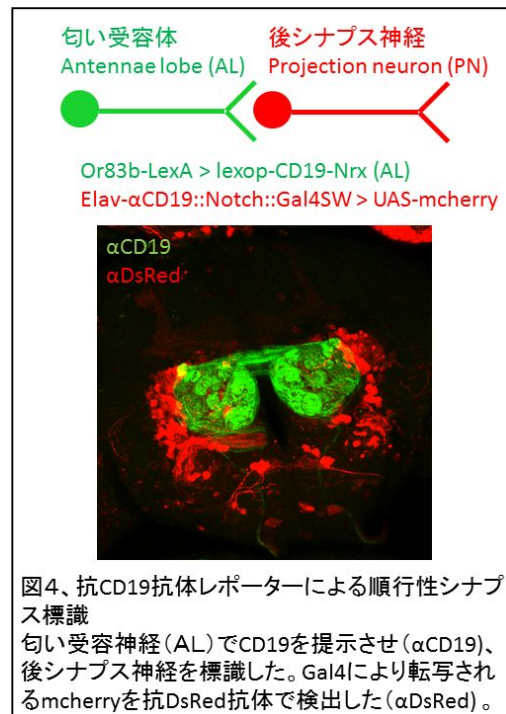


図4、抗CD19抗体レポーターによる順行性シナプス標識
匂い受容神経(AL)でCD19を提示させ(αCD19)、後シナプス神経を標識した。Gal4により転写されるmcherryを抗DsRed抗体で検出した(αDsRed)。

これまでに私は、記憶形成に伴い発現誘導される特異的な遺伝子として、哺乳類 ARC オーソログの Arc2 を報告した (2019, PNAS)。Arc2 遺伝子のプロモーターを用いて Nrx-CD19 を発現させるため、Arc2 遺伝子のプロモーターをクローニングし、LexA::SW 転写活性化因子を発現させるトランスジェニック系統を構築した (図 5)。これを用いれば、LexA 結合配列である lexop 下流の遺伝子を発現誘導することができる。lexop-GFP を Arc2p-LexA::SW と併用することにより、キノコ体神経でも数個の神経を発現させることに成功した (図 5)。今後、この Arc2-LexA::VP16 を用いて Nrx-CD19 を発現させ、記憶神経のシナプス後神経を網羅的に同定していく。

以上のように本研究で、順行性神経標識法という新規手法を確立した。今後、本手法を用いて特定のシナプス接続、例えば記憶神経とその後シナプス神経に焦点を絞った解析を進めていくことで、脳神経回路の更なる理解に発展させる。

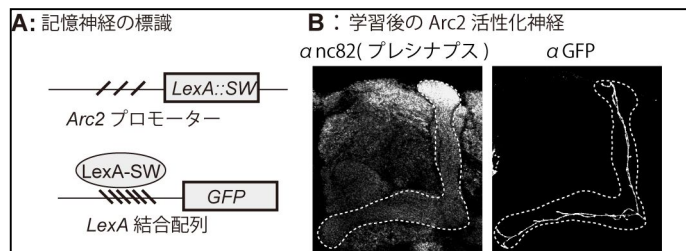


図 5、Arc2 プロモーターを使った記憶神経の標識。
(A) 記憶細胞の標識。Arc2 遺伝子のプロモーターで LexA-SW タンパクを発現させる。LexA-SW はハエに RU という薬剤を摂取させたときのみ、LexA 結合配列下流の遺伝子発現を誘導する。Arc2 は哺乳類の神経活動依存的に発現誘導される ARC と相同配列を含む遺伝子である。(B) 匂い条件付け課題後に誘導される Arc2 活性化神経。長期記憶を形成させるため、繰り返し学習を行い、6 時間経過後に免疫染色で GFP を検出した。プレシナプスタンパク brp を認識する nc82 抗体でプレシナプスを染色し、キノコ体神経を同定した (左: 白点線)。Arc2 活性化神経は中でも、1 神経のみであった (右)。学習前の個体では、GFP 発現はないことを確認している。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroko Awata, Mai Takakura, Yoko Kimura, Ikuko Iwata, Tomoko Masuda, Yukinori Hirano	4. 巻 116
2. 論文標題 The neural circuit linking mushroom body parallel circuits induces memory consolidation in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 16080, 16085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1901292116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yukinori Hirano
2. 発表標題 The Trisynaptic Disinhibitory Network linking Mushroom Body Parallel Circuits Induces Memory Consolidation in <i>Drosophila</i> .
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukinori Hirano
2. 発表標題 Decoding spaced training is mediated by a GABAergic and a trigger neuron in <i>Drosophila</i> .
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukinori Hirano
2. 発表標題 The Trisynaptic Disinhibitory Network linking Mushroom Body Parallel Circuits Induces Memory Consolidation in <i>Drosophila</i> .
3. 学会等名 Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野恭敬
2. 発表標題 シヨウジョウバエ記憶中枢並列回路をつなぐ脱抑制回路が、遺伝子発現誘導を介した記憶 固定化を誘導する
3. 学会等名 日本神経化学会大会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----