

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19374

研究課題名（和文）ホメオ蛋白質の移動原理と新たな効能の探究

研究課題名（英文）Exploring a novel mechanism of homeoprotein transfer

研究代表者

杉山 清佳（SUGIYAMA, Sayaka）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：10360570

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：こどもの脳の発達は急速かつ柔軟であるが、経験とともに脳が発達する仕組みには未だ不明な点が多い。本研究では、経験により脳内を移動するホメオ蛋白質に注目し、情動の発達の仕組みを探究した。大人は恐怖の記憶を忘れられないが、幼い子は恐怖の記憶を忘れやすい（幼児健忘）。成体マウスに恐怖を連想させる音と模様を記憶させると、ホメオ蛋白質の欠損マウスは模様に対する恐怖を感じにくかった。一方、音に対する恐怖は感じられるが、記憶を忘れやすかった。この際、ホメオ蛋白質は恐怖の記憶を担う回路を移動し、回路の機能発達を促した。今後、本研究で開発した回路の可視化技術を用い、恐怖体験とホメオ蛋白質の移動の関連を解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ホメオ蛋白質が恐怖の情動を担う回路を移動し、回路の発達を促すことを初めて明らかにした。ホメオ蛋白質の脳内移動の報告は未だ少なく、移動の新たな効能を示す成果となった。今後、恐怖の体験によりホメオ蛋白質の移動が促進されるのかを明らかにすることが重要である。ヒトのホメオ蛋白質の変異からは、発達・睡眠障害が報告されている。幼児期の睡眠障害は自閉症にも関与し、彼らを悩ませる危険感受性の弱さやフラッシュバックとの関連が疑われる。本成果は、睡眠障害に関与するホメオ蛋白質が、恐怖情動の発達を促すことを示唆しており、睡眠障害と恐怖情動のバランスを同時に整える新たな治療法につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Brain networks are intensively shaped by experience in early life. However, much about the mechanism of experience-dependent plasticity remains unclear. In this study, we focused on effect of homeoprotein transfer on development of fear processing. Conditioned fear is erased by extinction learning in young children but not in adulthood. In fear conditioning analysis, fear responses to visual cue were significantly decreased in homeoprotein depletion although fear responses to tone cue were similarly detected compared to control mice. Corresponding to a role of homeoprotein transfer in maturation of amygdala circuits, recall of tone-cued fear memory was declined in these mice. Thus, homeoprotein transfer may promote the network function in fear development and memory. It would be important to elucidate the direct role of experience-dependent transfer of homeoprotein in emotional development by using newly established single-cell electroporation technique.

研究分野：神経科学

キーワード：回路形成 ホメオ蛋白質 遺伝子導入法 ドーパミン作動性細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ただ泣いていた赤ちゃんが、3歳頃には言葉で気持ちを伝えられるようになる。子どもの脳の発達は非常に急速かつ柔軟だが、経験に伴って発達する仕組みには、未だ解明されていない点が多い。申請者らは、胎児の脳を作る Otx2 ホメオ蛋白質が、生後の脳の柔軟な発達に必要であることを明らかにした (Cell 2008)。マウスにおいて Otx2 の量を外部から操作すると、大脳の発達を人為的に操作することができる (成体マウスの脳に柔軟な発達期を誘導することも可能である)。面白いことに、このホメオ蛋白質は転写因子でありながら、見る経験によって目から大脳視覚野の抑制性ニューロン (PV 細胞) へと移動し、視覚の発達を促すという非常にユニークな性質を持つ。これまでに、Otx2 の細胞特異的な取り込みには、Otx2 と PV 細胞周囲を取り巻くコンドロイチン硫酸との結合が必要であることを明らかにした (Beurdeley/Sugiyama et al., 2012, Hou/Sugiyama, 2017)。さらに、Otx2 は転写と翻訳の双方を介して、標的遺伝子の発現を制御し PV 細胞の形態と機能を促進する (Sakai/Sugiyama, 2017)。一方で、ホメオ蛋白質が脳内を移動する仕組みは分かっておらず、最も解明しなくてはならない課題である。特に、PV 細胞の機能不全が精神疾患の一因であると示唆されており、Otx2 の細胞特異性には薬としての潜在力がある。

Otx2 は視覚だけでなく、情動の発達に関与すると推測される。幼い子どもは、恐怖記憶を完全に忘れてしまうが (幼児健忘)、成長すると完全には忘れられず、強い恐怖はトラウマのように蘇ってしまう。ヒトの Otx2 変異では、発達障害や言語障害に加え、睡眠障害や摂食障害も報告されている。幼児期の睡眠障害は自閉症にも関与し、彼らを悩ませる危険感受性の弱さやフラッシュバック (恐怖記憶の蘇り) との関連が疑われる。そこで、経験のメッセンジャーである Otx2 が、恐怖情動の発達に関与する可能性を明らかにする。

2. 研究の目的

我々は、発生期に脳の細胞運命を決定するホメオ蛋白質が、生後においても脳の細胞発達に関与することを見出した。さらに、転写因子として知られるホメオ蛋白質が、脳内において神経活動依存的に細胞間を移動することを世界で初めて明らかにした。これらの発見は、未だに驚きとともに受け取られ、特にホメオ蛋白質の移動の仕組みについては続報を期待されている。共同研究者らの培養実験から、ホメオ蛋白質は受容体を介さず、ホメオドメイン内の配列により細胞外に分泌され、膜融合によって細胞内に取り込まれることが示唆されている (Prochiantz and Joliot, 2003)。一方で、Otx2 がシナプス結合を介して移動するのかが検出することは非常に難しい。免疫組織学染色により PV 細胞膜周囲での局在が観察されるが (Hou/Sugiyama, 2017)、この抗体は電子顕微鏡解析には不向きであった。すなわち、Otx2 の移動を観察するためには、新規 Otx2 抗体を用いた電子顕微鏡解析、あるいは現在開発中の遺伝子導入法 (single-cell electroporation) を用いた解析など、アプローチに工夫が必要と考えられる。

Otx2 の報告以降 (Cell 2008)、他のホメオ蛋白質が脳内を移動するという報告は少なく、生後のホメオ蛋白質の移動の普遍性を確かめることが重要である。Otx2 は大脳視覚野だけでなく、扁桃体にも移動すると推測されるが、その役割は不明である。これまでに、Otx2 欠損マウスを用いた行動解析から、このホメオ蛋白質が情動記憶の発達に関与することが示唆された (飯島/杉山, 2018)。ヒトの Otx2 変異では発達障害や言語障害が報告されているが、情動の発達におけるホメオ蛋白質の役割は分かっておらず、本研究において明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ホメオ蛋白質の移動を観察するアプローチ法の開発

本研究では、ホメオ蛋白質の移動を観察する手法として生後の脳を用いた遺伝子導入法 (single-cell electroporation) の開発を行った。エレクトロポレーション法は、これまでに胚発生期に遺伝子を導入する方法として確立されているが、生後の脳を用いた際には遺伝子導入率に難があることが報告されている。さらに、ホメオ蛋白質のシナプス間移動を観察するためには、単一神経細胞に遺伝子導入を行い、その細胞に起因する神経回路を可視化することが必要である。そこで本課題では、神経回路を形成する単一神経細胞に、安定的に遺伝子導入を行うことを目標にする。胚発生期のエレクトロポレーション法、および生後の脳における報告を参考に、従来の実体顕微鏡下で効率よく遺伝子を導入する方法を探索する。

(2) ホメオ蛋白質の新たな機能の発見

これまでの恐怖条件付け行動解析から、Otx2 欠損マウスでは、成体においても幼児健忘のように、音に対して条件付けられた恐怖記憶を忘れてしまうことが分かった。恐怖を連想させる知覚刺激には、聴覚や視覚を介する刺激など様々なバリエーションが考えられるが、異なった知覚刺激が共通の回路を介して恐怖の情動を導くのかは分かっていない。そこで、Otx2 を発現するドーパミン作動性細胞において、特異的に Otx2 遺伝子を欠損するマウス (Otx2-flox/DAT-cre) を作製する。コントロールマウスと欠損マウスを用いて、音 (聴覚) および縞模様 (視覚) に対する恐怖条件付けを行い、恐怖の形成と記憶に対する行動解析を行う。

Otx2 蛋白質は情動、特に恐怖記憶の中核とされる扁桃体基底外側核に強く検出される。一方、大脳 PV 細胞と同様に、扁桃体においても Otx2 mRNA の発現は検出されない。申請者らは、ドーパミン作動性細胞に発現した Otx2 蛋白質が扁桃体へと移動し、恐怖記憶の発達に関与すると推測している。そこで、ドーパミン作動性細胞特異的 Otx2 欠損マウスを用いて、扁桃体基底外側核の発達を免疫組織化学染色により観察する。

4. 研究成果

(1) 生後の脳における単一神経細胞遺伝子導入法の確立

エレクトロポレーション法を用いて遺伝子発現ベクターを導入すると、分裂中の神経上皮細胞においては非常に効率良く遺伝子が導入されるのに対し、分裂後の神経細胞においては5割ほどの導入率に留まることが報告されている。そこで、神経細胞への遺伝子導入率を上げるために、遺伝子発現ベクターの注入方法、電極および電気パルス設計方法において、最適な条件設定の探索を行った。その結果、直径20 μ m以上のガラス電極を用いて、遺伝子発現ベクターをなるべく多く神経細胞の周囲に注入することが、遺伝子導入率を上げるための必要条件であることを見出した。この条件に従い、ベクター注入と電気パルス刺激を3回以上繰り返すことで、遺伝子導入率を9割に近づけることに成功した (Sugiyama et al., 投稿中)。

上記の方法により GFP (green fluorescent protein) を導入すると、GFPを発現した視床の単一神経細胞が大脳皮質へと軸索を伸ばし、特定の皮質層に密に分岐することが観察された (図1)。視床の神経細胞は、投射様式に従って3つの細胞種に分類される。この遺伝子導入法を用いることで、投射様式による細胞種の違いを同定することが可能になった。さらに、異なった遺伝子発現ベクターを共導入することで、視床の単一神経細胞に、同時に複数の遺伝子を発現させることに成功した (図2)。細胞内に均一に分散する GFP の分布と比較することにより、例えば、軸索終末においてシナプス小胞輸送に関わる VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2) 蛋白質は、強制導入ののちに、内在性の輸送システムによって軸索終末に運ばれて分布することが観察された。すなわち、本研究によって開発された遺伝子導入法を用いることで、神経回路を形成する単一神経細胞に、安定的に遺伝子導入を行い、遺伝子機能の解析を行うことができる。この成果は、今後ホメオ蛋白質を始めとして、シナプスを移動する分子 (WGA レクチンなど) の観察にも役立つと考えられる。シナプス移動分子の観察は、単一神経細胞に起因する神経回路の可視化につながると期待される (Sugiyama et al., 投稿中)。

図1: 遺伝子導入法による視床 皮質投射の可視化

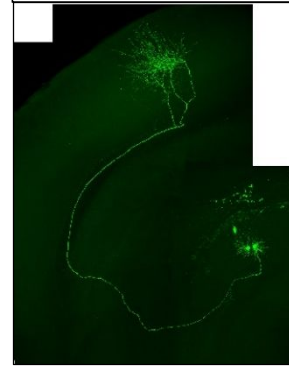
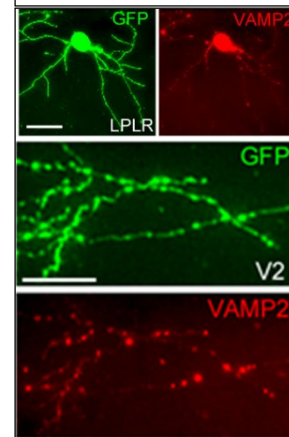


図2: 外来 VAMP2 蛋白質のシナプス前終末の局在

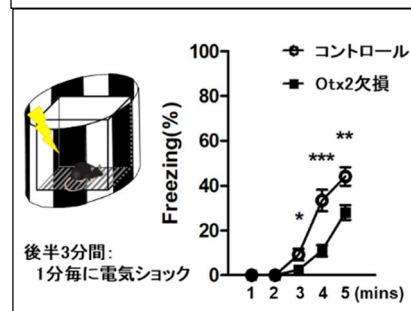


(2) ホメオ蛋白質による恐怖情動の発達

成体マウスは、音とともに電気ショックが来ることを記憶すると、音が鳴るだけで恐怖を想起し、すくみ行動 (Freezing) を示す。音を縞模様の視覚刺激に替えても、同様のすくみ行動が見られる。一方、ドーパミン作動性細胞特異的な Otx2 欠損マウスは、コントロールマウスと同じように音に対する恐怖を感じて記憶するが、1日経つと記憶が薄らぎ、音が鳴った時のすくみ行動がコントロールマウスに比べ有意に減少する (飯島/杉山, 2018)。さらに、縞模様の箱内で電気ショックを与えると、Otx2 欠損マウスは恐怖自体を感じにくく、はじめからすくみ行動がコントロールマウスに比べ有意に少ない (図3)。すなわち、恐怖を連想させる知覚刺激 (音 vs 縞模様) の違いにより、恐怖の感じやすさに違いが生じることが示唆された。ごく最近、恐怖を連想させる視覚の情報、中脳上丘からドーパミン作動性細胞に直接入力し、この細胞の神経活動を制御して防御行動を促すことが報告されている (Zhou et al., 2019)。視覚の情報に対し、聴覚の情報は、視床や大脳聴覚野から恐怖記憶の中核である扁桃体に入力すると考えられる (Tsukano/Sugiyama et al., 2019)。これらの結果から、Otx2 はドーパミン作動性細胞の発達あるいは神経活動に関与する可能性があること、ドーパミン作動性細胞は直接的に視覚の情報伝達を受け、扁桃体において恐怖記憶が形成される前に、恐怖の感受性に影響を与えることが示唆された。

Otx2 蛋白質は扁桃体基底外側核に運ばれ、多くが抑制性ニューロンに取り込まれる。ドーパミン作動性細胞特異的な Otx2 欠損マウスにおいて扁桃体基底外側核の免疫組織化学染色を行うと、Otx2 蛋白質の局在が有意に減少し、視床からの興奮性入力 (VGLUT2 陽性) および抑制性ニューロンの機能分子 (GAD67, PV) の発現が有意に低下するのが観察された。すなわち、ドーパミン作動性細胞に発現する Otx2 は、扁桃体基底外側核の回路の成熟に寄与すると考えられた。この結果は、Otx2 欠損マウスにおいて、音に対して条件付けられた恐怖記憶が低下することと一致する。一連の結果から、恐怖情動の発達において、Otx2 はドーパミン作動性細胞から扁桃体へと運ばれ、恐怖記憶に関わる回路の発達を促すことが示唆された。本研究により、ホメオ蛋白質が視覚経路だけでなく、情動を担う回路においても移動して機能することが、世界で初めて示された。本研究の成果は、今後さらに詳細な解析を加え、論文としてまとめる予定である。

図3: 縞模様に対する恐怖条件付け解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsukano Hiroaki, Hou Xubin, Horie Masao, Kitaura Hiroki, Nishio Nana, Hishida Ryuichi, Takahashi Kuniyuki, Kakita Akiyoshi, Takebayashi Hirohide, Sugiyama Sayaka, Shibuki Katsuei	4. 巻 9
2. 論文標題 Reciprocal connectivity between secondary auditory cortical field and amygdala in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56092-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Igarashi Michihiro, Takeuchi Kosei, Sugiyama Sayaka	4. 巻 119
2. 論文標題 Roles of CSGaINAct1, a key enzyme in regulation of CS synthesis, in neuronal regeneration and plasticity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 77 ~ 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2017.10.001	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 -
1. 著者名 Sakai Akiko, Sugiyama Sayaka	4. 巻 60
2. 論文標題 Experience-dependent transcriptional regulation in juvenile brain development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 473 ~ 482
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12571	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 -
1. 著者名 杉山 清佳、侯 旭濱	4. 巻 61
2. 論文標題 弱視の臨界期に関する最近の知見	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 眼科	6. 最初と最後の頁 63 ~ 69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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10件(うち招待講演 2件/うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Sakai A. Nakato R. Peters H. Shirahige K. Sugiyama S.
2. 発表標題 Regulation of chromatin structure by cohesin during juvenile cortical development
3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hou X. Morishima M. Matohara N. Sugi J. Sakimura K. Kawaguchi Y. Sugiyama S.
2. 発表標題 Coactosin functions as a morphological determinant in developing cortical interneurons
3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koyama C. Iijima T. Hou X. Sugiyama S.
2. 発表標題 Effect of Otx2-expressing dopaminergic cells on development of fear memory
3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hou X. Morishima M. Matohara N. Sugi J. Sakimura K. Kawaguchi Y. Sugiyama S.
2. 発表標題 Cytoskeletal mechanisms underlying a morphological determinant in developing cortical interneurons
3. 学会等名 The 13th Biennial Conference of Chinese Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hou X. Kunimi J. Sakimura K. Sugiyama S
2. 発表標題 Cytoskeletal mechanisms regulating morphology of cortical interneuron for critical period plasticity
3. 学会等名 Toward Understanding Individuality (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sugiyama S.
2. 発表標題 Dendritic organization of cortical interneurons in anticipation of postnatal plasticity
3. 学会等名 The 41th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hou X. Kunimi J. Sakimura K. Sugiyama S
2. 発表標題 Cytoskeletal mechanisms regulating morphology of cortical interneuron for critical period plasticity
3. 学会等名 The 41th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsukano H. Hou X. Horie M. Takebayashi H. Sugiyama S. Shibki K.
2. 発表標題 Cortico-subcortical monosynaptic excitatory loops that originate and terminate in the auditory cortex
3. 学会等名 The 2018 Annual Meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒井 晶子, 中戸 隆一郎, 凌 一葦, 侯 旭濱, 原 範和, 柳川 右千夫, 桑野 良三, 奥田 修二郎, 白髭 克彦, 杉山 清佳
2. 発表標題 経験による脳の発達に必要な抑制性介在ニューロンにおける転写制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉山 清佳
2. 発表標題 弱視の臨界期の分子メカニズム
3. 学会等名 第122回日本眼科学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究内容/神経発達学/新潟大学医学部医学科 http://www.med.niigata-u.ac.jp/contents/research/shinryou/shinkei.html
--

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