

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19500

研究課題名（和文）脳活動状態選択的な機能的神経回路の網羅的同定と活動操作を行うマウスシステムの開発

研究課題名（英文）Comprehensive Identification of Functionally Active Circuits

研究代表者

松尾 直毅（Matsuo, Naoki）

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：10508956

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）：脳は解剖的・機能的に様々な領域に区分されており、それぞれの脳領域同士がどのようにコミュニケーションして高次脳機能を発揮するのか？を明らかにすることは、脳の働きを理解するための最も重要な課題の一つである。各脳領域は多くの場合、複数の領域からの投射入力を受けるが、あらゆる状況において全ての入力回路が同等に働く訳ではなく、その時の状況によって活動する神経回路は異なる。そこで本研究では、これらの神経回路を同定するための遺伝学的なシステムの開発をマウスを用いて行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの脳にはおよそ1000億個の神経細胞があると言われているが、ある任意の刺激に応答して活動するのは一部のごく僅かの細胞集団である。したがって、動物の高次脳機能の仕組みを理解するには、それを司る領域やそこに入出力する全ての神経回路の解析のみならず、その中で実際に働いた一部の神経細胞集団・神経回路に焦点を当てた解析を行うことが不可欠である。本研究では、それらの回路を網羅的に同定する手法の開発を行った。この手法を利用することによって、これまでは見逃されてきた新たな神経回路や、解剖学的な接続は知られていても新たな機能的価値が付加される神経回路が見出される可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The brain is anatomically and functionally divided into various regions, and it is one of the most important issues to understand how each brain region communicates with each other to achieve higher cognitive brain functions. Each brain region often receives projective inputs from multiple areas, but not all input circuits work equally in all situations, and the neural circuits that are active differ depending on the situation at the time. Therefore, in this study, we developed a genetic system to identify these neural circuits using mice.

研究分野：神経科学

キーワード：マウス 神経回路

1. 研究開始当初の背景

脳は解剖的・機能的に様々な領域に区分されており、それぞれの脳領域同士がどのようにコミュニケーションして高次脳機能を発揮するのか？を明らかにすることは脳神経科学の最重要課題のひとつである。各領域は多くの場合、複数の領域からの投射入力を受けるが、あらゆる状況において全ての入力回路が同等に働く訳ではない(図1)。しかし、この“活動状態選択的”な機能的神経回路を効率的に明らかにすることができる適切な手法は未だ開発されていない。このような手法の開発は、あらゆる行動課題、あらゆる脳領域での機能的神経回路研究に容易に適用可能な汎用性の高い極めて有用なシステムとなることが期待される。

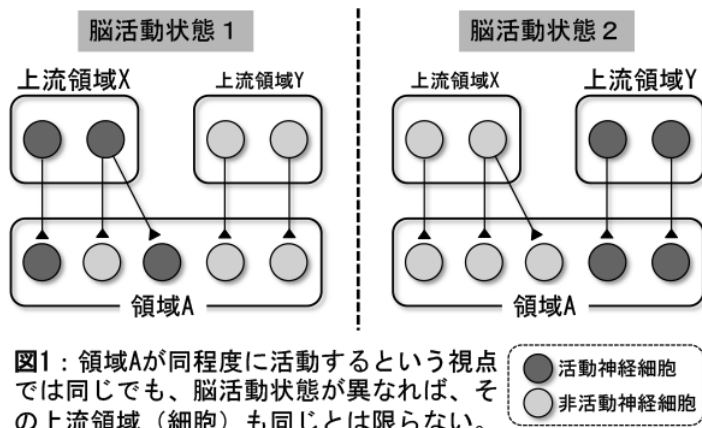


図1：領域Aが同程度に活動するという視点では同じでも、脳活動状態が異なれば、その上流領域（細胞）も同じとは限らない。

2. 研究の目的

ヒトの脳にはおよそ 1000 億個の神経細胞があると言われているが、ある任意の刺激にตอบสนองして活動するのは一部のごく僅かの細胞集団である。したがって、動物の高次脳機能の仕組みを理解するには、それを司る領域やそこに入出力する全ての神経回路の解析のみならず、その中で実際に働いた一部の神経細胞集団・神経回路に焦点を当てた解析を行うことが不可欠である。つまり、異なる刺激が同じ脳領域を活性化したとしても、その領域内の異なる神経細胞集団が働き、その領域に入出力する各回路が状況に応じて使い分けられ固有の機能を発揮していると考えられるため(図1)、それらの回路をまず同定し、それぞれを分けて解析することが可能な手法が求められる。しかし、領域内の一見ホモジニアスな細胞集団の中で活動状態に基づいて入出力する特定の機能的回路の網羅的な探索や機能解析を行った研究はその重要性にもかかわらず皆無である。また、狂犬病ウイルスを用いた解析法なども存在するが、技術的な困難さのために下流の探索に較べて上流の探索の研究は非常に少ない。

そこで本研究では、任意の行動刺激に応じて活動した特定の領域内の一部の活動細胞に投射する神経回路・細胞集団の網羅的探索および光活動操作を行うことが可能なマウスの遺伝学的システムの開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では神経活動依存的かつ一時的に発現が誘導されることが知られている最初期遺伝子群 (immediate-early genes: IEGs) の一つである *c-fos* 遺伝子のプロモーターの制御下で tetracycline-dependent transactivator (tTA) を発現するテトラサイクリン誘導発現系を組み合わせた遺伝子改変マウスシステム (*cfos-tTA*) を軸として用いる。このシステムに、Cre/loxP および Flp/frt を利用した 2 種類の DNA 組み替えシステム、経シナプスの逆行性タンパク質輸送システム、アデノ随伴ウイルス (AAV) を介した局所遺伝子発現システム、光遺伝学による神経活動操作システムを巧みに組み合わせることにより、新規のマウス遺伝学のシステム開発を

行った。

4. 研究成果

上記の「研究の方法」で記載したマウス遺伝学システムを実現するために、アデノ随伴ウイルスベクターをそれぞれ作製し、それらの混合液を C57Bl/6J マウスの脳の背側海馬 CA1 領域もしくは歯状回に局所注入を行った。これらのマウスに対して文脈依存的な恐怖条件付け学習課題を行い、その際に海馬で活性化した神経細胞集団に *c-fos* プロモーターを利用した遺伝子発現の誘導を行った。その後、脳切片を作製し、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学染色法により最終的な遺伝子産物である ArchT-EGFP の発現の解析を蛍光顕微鏡を用いることにより行った。その際に、行動課題終了後から脳を取り出すまでの時間経過を比較することにより、脳内で十分な発現が検出されるのに必要な時間の検討を行った。さらに、注入するそれぞれのアデノ随伴ウイルスベクターのタイター、量、および比率などを比較検討することにより、システムの改善を行った。

GFP 陽性細胞が存在する脳領域の網羅的探索と定量を行い、その分布の相違を解析した結果、背側海馬に投射していることが従来から知られている複数の脳領域の一部の細胞において GFP シグナルを検出することができた。例えば、海馬 CA1 領域への主要な入力部位である嗅内皮質や CA3 領域のみならず、中脳、間脳などの様々な領域においても ArchT-GFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡下で検出することができた

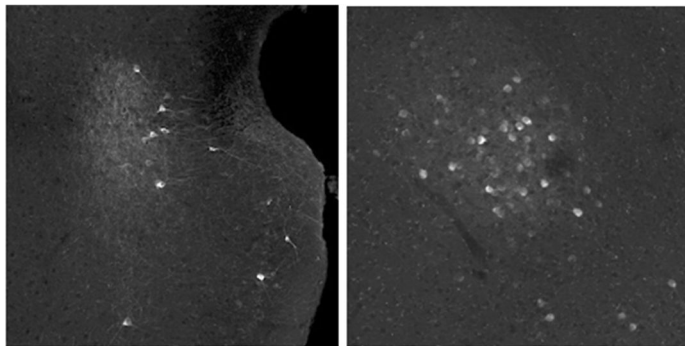


図2: ArchT-GFP陽性細胞の例

(図 2)。また、行動課題の違いに伴う発現脳領域の差異も認めることができた。これらの実験結果から、本研究によって開発したマウス遺伝学的システムが目的通りに適切に働いていることが示された。ただし、各脳領域において標識された細胞数が少ないため、さらなる条件の再検討も必要となることが課題として残されている。また、大量の脳切片の作製と免疫組織化学染色、そしてそれらの蛍光顕微鏡観察に多大な時間と労力を要するため、これらの効率化も今後の検討課題である。

本研究では、新規のマウス遺伝学システムの開発を目的としているため、研究期間中には十分な解析を行わなかったが、目的の脳領域において投射神経細胞は抑制性の光活性化タンパク質のひとつである ArchT を発現しているため、発現脳領域を標的として黄色レーザー光照射 (575 nm) を行うことにより、神経活動抑制による影響を種々の行動解析により明らかにすることが可能である。本研究により開発できたシステムを記憶の想起時に活動する神経回路の網羅的同定に適用し、研究結果を得ることができ次第、学術原著論文として公表予定である。

本システムの適用により、これまでは見逃されてきた新たな神経回路や、解剖学的な接続は知られていても新たな機能的価値が付加される神経回路が見出される可能性が十分に期待できる。さらに、本研究で開発したマウスのシステムを適切に用いれば、あらゆる行動課題、あらゆる脳領域での研究に容易に適用可能な汎用性の高い、極めて有用なシステムとなることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 松尾直毅
2. 発表標題 記憶痕跡細胞から探る記憶の神経基盤
3. 学会等名 第32回 日本動物細胞工学会2019年度大会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Matsuo
2. 発表標題 Robustness and Flexibility of Neuronal Ensembles in Memory
3. 学会等名 The 10th IBRO (International Brain Research Organization) World Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Matsuo
2. 発表標題 Robustness and Flexibility of Neuronal Ensembles in Memory
3. 学会等名 ILS 2019 (International Conference on Interdisciplinary Life Sciences) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Matsuo
2. 発表標題 Robustness and Flexibility of Neuronal Ensembles in Memory
3. 学会等名 9th FAOPS (Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies) Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾直毅
2. 発表標題 記憶の神経アンサンブルの安定性と柔軟性
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー「高次脳機能の神経回路機構」(招待講演)
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関