

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03325

研究課題名(和文) 神経活動依存的な回路形成を担う遺伝子発現調節のダイナミクス

研究課題名(英文) Dynamics of neuronal activity-dependent gene expression

研究代表者

山本 亘彦 (Yamamoto, Nobuhiko)

大阪大学・大学院生命機能研究科・招へい教授

研究者番号：00191429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳の神経回路はニューロンの電気的活動によって可塑的に変化する。本研究では、遺伝子のプロモーター活性のライブイメージングや転写調節因子の1分子イメージング法を駆使することによって、この可塑的な再編過程を担う神経活動-分子シグナル変換の仕組みの解明に取り組んだ。その結果、特定の環境刺激が遺伝子発現を効率的に増大させること、また転写調節因子とDNAや共因子との秒単位の繰り返し結合が下流の神経活動依存的な遺伝子発現に重要であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の特徴は転写調節因子、共因子、DNAの結合を時空間的に明らかにしたことである。分子生物学と神経生理学とを融合させた新たな研究戦略を提供するもので、分野横断的な研究も促進する。神経活動パターンが生み出す遺伝子発現調節、これこそが、後天的神経回路形成の本質であり、本研究の目指す点であり、これは次の一手にも繋がる結果である。さらに、子供の正常な脳発達や可塑性のメカニズムにも通ずるものとしても価値がある。

研究成果の概要(英文)：Neural circuits in the brain are plastically altered by electrical activity of neurons. In the present study, we investigated the neuronal activity-molecular signal transduction mechanisms which underlie the remodeling process by utilizing live imaging of gene promoter activity and single-molecule imaging of transcriptional factors. As a result, we found that specific environmental stimuli increase gene expression efficiently and that second-by-second repetitive binding of transcription factors to DNA and co-factors plays an important role in expression of the down-stream activity-dependent genes.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 神経活動 遺伝子発現 CREB CBP BDNF 1分子イメージング プロモーター活性

## 1. 研究開始当初の背景

神経回路の基本構造は発生プログラムに基づいて自律的に構築されるが、その細部は発達期の神経細胞の電気的活動によって再編される。実際、神経活動によって軸索や樹状突起の分岐やシナプス形成は変化し、環境に適応した機能を獲得する。長年にわたる神経科学の研究により、これら現象的な様相は明らかになってきたが、神経活動が形態学的、生理学的な変化を誘導するメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。この問題を解明するための鍵は神経活動依存的な遺伝子発現にある。

従来の研究によって、神経活動依存的な遺伝子発現に関する基本的なメカニズムは明らかになっている。すなわち、神経細胞における発火活動が  $Ca^{2+}$  依存性シグナルを介して複数の転写調節因子が活性化され、ゲノム上の特定の塩基配列を認識し、RNA ポリメラーゼによる転写がコントロールされる。しかし、これらの知見を示す結果のほとんどは生化学的、分子生物学的な実験から導き出されたものであり、生理学的なパターン刺激によって生ずる遺伝子発現調節機構はほとんど知られていない。また、従来の生化学的手法では多数の細胞の反応性が平均化されているため、個々の細胞による違いは不明であり、時間分解能も低い。転写調節域の DNA 脱メチル化やヒストン修飾によるクロマチンのリモデリングなどのエピジェネティックな要因も神経活動依存的な遺伝子発現調節に重要な役割を果たすが、生理学的な神経活動パターンがどのようにしてこの過程に働きかけて、遺伝子発現調節に寄与するかも不明である。

申請者らは、これまで大脳皮質における回路形成を担う分子機構を探求し、神経活動依存的に発現する軸索分岐制御因子を複数同定し、それによる制御機構を明らかにしてきた (Uesaka et al, 2007; Ohnami et al, 2008; Yamada et al, 2010; Granseth et al, 2012; Hayano et al, 2014)。次なる興味深い問題は、これら神経活動依存的な遺伝子発現調節機構である。

## 2. 研究の目的

上述の背景を踏まえて、本研究では大脳皮質感覚野において分子ライブイメージングの手法と光遺伝学的手法や生理学的な刺激手法を組み合わせることにより、回路形成を担う遺伝子発現が神経活動によって調節される機構を解明することを目指した。

- 1) 神経活動依存的な回路形成に関わる分子の一つである brain-derived neurotrophic factor (BDNF) のプロモーター活性を細胞レベルで測定し、神経活動パターンから転写活性への変換機構を解明することを目指した。具体的には、BDNF のプロモーター活性を培養大脳皮質切片の個々の細胞においてライブイメージングし、その間に様々パターンの刺激を与えるという実験を計画した。
- 2) ヒトES細胞由来大脳皮質ニューロンにおいて、転写調節因子 cAMP response element binding protein (CREB) の動態に対する神経活動の役割を1分子イメージングにより明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

### BDNF のプロモーター活性測定

BDNF エクソン 4 のプロモーター領域をルシフェラーゼ発現プラスミドに組み入れたコンストラクトを作製した。マウスあるいはラット大脳皮質感覚野から切片培養を作製し、このプラスミドを皮質 2/3 層細胞に散在的に遺伝子導入した。培養 1 - 2 週で刺激電極を装着した培養皿に

移し、顕微鏡下のステージ上で EMCCD カメラによって、ルシフェリン存在下で個々の皮質細胞の発光を捉えた。

#### CREB の 1 分子イメージング

共同研究者 Pierre Vanderhaeghen の研究室で作製したヒト ES 細胞由来の神経幹細胞から大脳皮質ニューロンに分化させ、2 次元の単層培養系を作製した。一方、Halotag 標識 CREB のプラスミドを作製し、ヒト大脳皮質ニューロン培養細胞に電気穿孔法を用いて遺伝子導入した。Halotag に特異的に結合する蛍光リガンドを添加し、CREB 1 分子を HILO (highly inclined laminated sheet optics) 照明下で経時的に観察した。神経活動を増大させるためには外液の KCl 濃度を上げるかもしくはチャンネルロドプシン 2 のプラスミドを予め導入し光刺激を加えた。

#### 4 . 研究成果

##### 1) 生理学的発火活動パターンが BDNF の発現調節に与える役割

BDNF プロモーターが挿入されたルシフェラーゼプラスミドを導入された細胞の半数以上は刺激前においても弱い発光を示したので、その発光強度がベースラインとなる。この条件下で、装着された電極を通して 0.1 ~ 60 Hz の定頻度刺激、バースト、バーストなど様々な周波数を有する生理学的パターン刺激を与えて、個々の細胞における発光強度の時間的変化を測定した。その結果、Bdnf プロモーター活性の増加レベルやタイムコースは刺激パターンによって異なり、増加率は細胞ごとに大きく異なったが、20Hz や  $\theta$  バースト刺激がプロモーター活性の上昇に有効に働くことがわかった。この結果から、個々の皮質ニューロンにおける Bdnf 発現量や時間的特性が神経活動パターンによって調節されることが示された。

##### 2) 転写調節因子 CREB の核内における動態

1 分子イメージング法を用いて、神経活動依存的な転写調節因子 CREB の DNA 結合・解離の活動依存性をヒト ES 細胞由来の大脳皮質ニューロン培養系で調べた。HILO 照明下 2 分間で数千の CREB スポット (1 分子) が観察され、大多数の CREB スポットは 1 秒以内で消失するが、5% 程度の CREB スポットは核内の一所に数秒間滞在することがわかった。それに対して、DNA 結合サイトに結合できない変異型 CREB で同じ実験を行うと、長期間滞在するスポットの数は著しく減少した。次に神経活動を KCl 刺激あるいはチャンネルロドプシン 2 による光遺伝学的手法によって上昇させて、CREB 動態を観察したが、長時間滞在する CREB スポットの数ほとんど変化しなかった。しかしながら、核内での空間分布を解析すると、神経活動の上昇後に長期間滞在の CREB スポットが繰り返し出現する部位が見出されたのである。刺激前ではそのようなスポットはせいぜい核に 1 か所であったのに対して、刺激後には複数個所で CREB スポットが頻回出現するようになった。これらの結果は、神経細胞の活動がゲノムの特定の部位で CREB が結合する頻度を増加させることによって、CREB 依存的な転写を促進することを示唆された。

#### 引用文献

1. Granseth B, Fukushima Y, Sugo N, Lagnado L, Yamamoto N (2013) Regulation of thalamocortical axon branching by BDNF and synaptic vesicle cycling. *Front Neural Circuit* 7:202.
2. Hayano Y, Sasaki K, Ohmura N, Takemoto M, Maeda Y, Yamashita T, Hata Y, Kitada K, Yamamoto N. (2014) Netrin-4 regulates thalamocortical axon branching in an activity-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:15226-15331.
3. Ohnami S, Endo M, Hirai S, Uesaka N, Hatanaka Y, Yamashita T, Yamamoto N (2008) Role of RhoA in activity-dependent cortical axon branching. *J Neurosci* 28:9117-9121.
4. Uesaka N, Hayano Y, Yamada A, Yamamoto N (2007) Interplay between laminar specificity and activity-dependent mechanisms of thalamocortical axon branching. *J Neurosci* 27:5215-23.

5. Yamada A, Uesaka N, Hayano Y, Tabata, T, Kano M, Yamamoto N (2010) Role of pre- and postsynaptic activity in thalamocortical axon branching. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 7562-7567.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyasaka Y & *Yamamoto N	4. 巻 15
2. 論文標題 Neuronal activity patterns regulate BDNF expression in cortical cells via neuronal circuits.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Neurosci	6. 最初と最後の頁 699583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2021.699583	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 Chang L, Masada M, Kojima M, Yamamoto N	4. 巻 42
2. 論文標題 Involvement of denervated midbrain-derived factors in the formation of ectopic cortico-mesencephalic projection after hemispherectomy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 the Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 749-761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioab011	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 Sato H, Hatakeyama J, Iwasato T, Araki K, Yamamoto N, Shimamura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Thalamocortical axons control the cytoarchitecture of neocortical layers by area-specific supply of secretory proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 67549
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.1371-21.2021	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 Uyeda A, Onishi K, Hirayama T, Hattori S, Miyakawa T, Yagi T, Yamamoto N, Sugo N	4. 巻 40
2. 論文標題 Suppression of DNA double-strand break formation by DNA polymerase in active DNA demethylation is required for development of hippocampal pyramidal neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 the Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 9012-9027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0319-20.2020	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 Sasaki K, Arimoto K, Kankawa K, Terada C, Yamamori T, Watakabe K, Yamamoto, N., epub bhz256.	4. 巻 30
2. 論文標題 Rho guanine nucleotide exchange factors regulate horizontal axon branching of cortical upper layer neurons.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cereb Cortex	6. 最初と最後の頁 2506-2518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhz256.	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18件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Miyasaka Y, Yamamoto N
2. 発表標題 Spatiotemporal patterns of neuronal activity-dependent BDNF expression in upper layer cortical neurons
3. 学会等名 FENS 2020 Virtual Forum (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsumi Y, Sugo N, Iwata R, Vanderhaeghen P, Yamamoto N
2. 発表標題 Activity-dependent dynamics of the transcription factor CREB in human cortical-like neurons: A study using single-molecule imaging
3. 学会等名 FENS 2020 Virtual Forum (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chang L, Yamamoto N
2. 発表標題 Denervated midbrain-derived factors induce the remodeling of the cortico-midbrain projection after unilateral cortical ablation
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamamoto N, Miyasaka Y
2. 発表標題 Spatiotemporal patterns of BDNF expression in the neocortex induced by physiological neuronal activity
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsumi Y, Sugo N, Iwata, R, Vanderhaeghen P, Yamamoto N
2. 発表標題 Single-molecule imaging of the activity-dependent transcription factor CREB in human cortical-like neurons
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chang L, Yamamoto N
2. 発表標題 The involvement of glial cell-derived factors in remodeling of the cortico-mesencephalic projection after unilateral cortical ablation
3. 学会等名 CSHL Molecular Mechanisms of Neuronal Connectivity (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyasaka Y, Yamamoto N
2. 発表標題 Patterned stimulation regulates Bdnf promoter activity spatiotemporally in upper layer cortical neurons
3. 学会等名 CSHL Molecular Mechanisms of Neuronal Connectivity
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsumi Y, Sugo N, Iwata R, Vanderhaeghen P, Yamamoto N
2. 発表標題 ctivity-dependent dynamics of CREB via cofactor CBP in human cortical neurons
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chang L, Masada M, Kojima M, Yamamoto N
2. 発表標題 Glial cell-derived axon-growth promoting factors are involved in remodeling of the cortico-mesencephalic projection after hemispherectomy
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sasaki, K., Arimoto, K., Kankawa, K., Terada, C., Yamamori, T., Watakabe, A., Yamamoto, N.
2. 発表標題 Regulation of axonal branching in cortical neurons by multiple RhoA-GEFs
3. 学会等名 The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyasaka, Y., Yamamoto, N.
2. 発表標題 Regulation of BDNF promoter activity by patterned neuronal firing in developing cortical neurons
3. 学会等名 The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2019年



1 . 発表者名 Miyasaka, Y., Yamamoto, N.
2 . 発表標題 Particular patterns of stimulation induce BDNF promoter activity preferentially in developing cortical neurons
3 . 学会等名 The 10th IBRO World Congress of Neuroscience ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Chang, L., Yamamoto, N.
2 . 発表標題 Analysis of the mechanisms underlying injury-induced corticofugal projections by CRISPR/ Cas9-mediated gene knock-out
3 . 学会等名 The 10th IBRO World Congress of Neuroscience ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Atsumi, Y., Sugo, N., Iwata, R., Vanderhaeghen, P., Yamamoto, N.
2 . 発表標題 Single-molecule imaging of CREB transcription factor in human cortical-like neurons
3 . 学会等名 The 10th IBRO World Congress of Neuroscience ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Miyasaka, Y., Yamamoto, N.
2 . 発表標題 Physiological stimuli-dependent BDNF promoter activity in cortical cells revealed by live imaging with luciferase assay
3 . 学会等名 Society for Neuroscience ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Chang, L., Sugo, N., Yamamoto, N.
2. 発表標題 The involvement of reactive glial cells in the formation of ectopic corticofugal projections after cortical ablation
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto, N.
2. 発表標題 Activity-dependent transcription regulation in developing neocortical neurons
3. 学会等名 TMIMS International Symposium on Principles of Neocortical Development and Evolution (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyasaka, Y., Yamamoto, N.
2. 発表標題 Spatiotemporal patterns of BDNF expression in the cortex induced by physiological neuronal activity
3. 学会等名 New Frontier in Neuroscience 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究 分 担 者	菅生 紀之	大阪大学・生命機能研究科・特任准教授(常勤)	
	(Sugo Noriyuki)		
	(20372625)	(14401)	

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1件

国際研究集会 Development and Plasticity of the Brain	開催年 2022年～2022年
---	--------------------

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			
ベルギー	VIB Center for Brain & Disease Research			