

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22471

研究課題名（和文）新たな経シナプス物質輸送ツールの開発と大脳皮質神経回路解析への応用

研究課題名（英文）Development of a new tool for transsynaptic molecule transfer and its application for neural circuits in the cerebral cortex

研究代表者

佐藤 真（SATO, MAKOTO）

大阪大学・連合小児発達学研究所・教授

研究者番号：10222019

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：脳機能の解明には、神経活動がどのように伝播し回路網として機能するかが大切である。故に神経活動依存的に、シナプス単位で接続相手の神経細胞を標識できるトレーサー開発は重要である。本研究では、Tobacco Etch Virus proteaseを用い、新たなトレーサーを開発した。並行して、トレーサー開発の成果を応用し、大脳皮質内で、同一前駆細胞から生じる神経細胞同士による神経回路網の研究を行う予定であった。しかしながら、研究開始後まさに同じ系での成果がアメリカのチームにより発表された。それ故同研究は中止を余儀なくされた。一方、その研究のため開発していた微量Cre増幅系は論文として公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

（1）脳機能を解き明かす重要な技術基盤の開発ができた。
（2）Cre分子は、その発現細胞でのみ、目的とする遺伝子組み換えを誘導できる。そのため、細胞を単位として、遺伝子組換えを制御する際には、目的細胞のみでの発現制御が重要である。しかしながら、外部からの遺伝子導入法では、目的とする少数の細胞にその発現を誘導することは、困難であった。今回、少量のCreがあれば、組換えを起こすに十分な量をその細胞内に発現させることのできる微量Cre増幅系を開発した。本手法は、細胞単位での組換え研究に有用なツールとなる。

研究成果の概要（英文）：Mapping neural circuits in accordance with neural activity is essential for understanding brain functions. Up to now, no tracer which is suitable for activity-dependent transsynaptic tracing has been developed. Here, we develop a new tracer X. The X contains SA-1 mode transmembrane domain, which forces a preceding less-hydrophobic domain to be stabilized in the plasma membrane. Upon cleavage between the two domains by Tobacco Etch Virus (TEV) protease, used as extracellular-input in this system, the less-hydrophobic domain fused with tTA is destabilized and translocated into nucleus. In this way, the X avoids receptor fluctuation because of the accurate cleaving by TEV protease, and is thus expected to have high signal specificity. Also, the X doesn't need intracellular signal transducers. Our results demonstrate that the X is a novel efficient extracellular input detector with high signal-to-noise ratio, and is a potential activity-dependent transsynaptic tracer in vivo.

研究分野：解剖学、神経科学

キーワード：シナプス 経シナプス 神経活動 エクソソーム Arc

1. 研究開始当初の背景

以下に研究開始当初の背景を説明する。

本研究の理解のため必須であるエクソソームと大脳皮質構成細胞について説明する。

(1) エクソソームは、神経細胞を含むほぼ全ての細胞から分泌される脂質二重膜で囲まれた直径 100nm 程度の小胞で、タンパク質や RNA などを含み、細胞間情報伝達に重要な役割を担う新たな構造物として注目されている。ごく最近、ショウジョウバエの神経筋接合部において、Arc (activity-related cytoskeleton-associated protein) 及びその mRNA を含むエクソソームは軸索末端の神経終末より放出され、ポスト側に運ばれ、そして運ばれた mRNA より翻訳された Arc 蛋白はシナプス可塑性に重要な役割を果たすとの報告があった(Ashley et al., *Cell*, 2018)。我々は、Arc は神経の活動にて発現する分子であることから、この結果は、エクソソームが新たな trans synaptic な物質輸送システムとして、しかも神経活動依存的な形で応用可能であることを示すと考えた。そこで、本研究では、まずこの現象が哺乳類で、どのように成立するかを検討し、その上でエクソソームにて運ばれる分子群をデザインし、新たな trans synaptic な物質輸送系のツールとして確立することを計画した。

(2) 大脳皮質では、神経細胞群が機能ユニットごとに階層を作り、階層を一つの単位として情報をやりとりすることで高次の神経機能を実現する。大脳皮質のカラム構造は、この機能ユニットの実態の一つと考えられる。そして大脳皮質のカラム内では一つの progenitor から生まれた神経細胞同士 (sibling neurons, 姉妹神経細胞) が、(少なくとも発達期には) ギャップジャンクションで互いに結合しサブグループをなすことが知られている(Yu, Y.-C. et al., *Nature*, 2009; 同 *Nature*, 2012)。互いに結合した神経細胞は、ほぼ同時に発火することが想定され、そのため sibling neurons は集団として特徴ある入力指向をもつと指摘されている。またギャップジャンクションのため、含有する分子 (群) のやり取りがあり、何らかの共通性がある可能性が想定される。そのため、同じ神経細胞や機能的に強い連関のある神経回路網を投射先とし、一つの特性を持つ神経回路網 (神経回路網の中での新たな階層) を構成している可能性が考えられる。もし、sibling neurons を単位とする回路が一つの機能階層を構成することが示されれば、神経回路網の検討に新たな概念をもたらさう。しかしながら、研究開始当初までに sibling neurons の概念に基づく軸索投射研究、特に神経活動の同時性の検証も考慮した研究は行われていない。

2. 研究目的

当初の研究目的を記す。

「本研究は、神経系でのエクソソーム(exosome)に関する最新の知見を抛り所に、マウスにおいて神経活動依存的に trans synaptic な物質輸送を可能とする新たな機能解析ツールの開発を主目的として実施する。そして、このツールを現在我々が進めている大脳皮質内の回路構築研究に応用し、回路の階層構造の新たな概念につながる異なる層の sibling neurons から同一神経細胞に (神経活動を同じくしての) 投射があるかについて検討する。」

項目 1. 研究当初の背景で述べた研究 (1) を重点的に実施し、その成果を応用し、研究 (2) の課題に取り組む計画であった。特に (2) の詳細な計画は以下のとおりであった。

「微量増幅系の確立と低頻度標識された Sibling neurons からの神経回路研究への応用

Trans synaptic に輸送される分子は微量と考えられる。そのため、微量な分子の作用を増幅して作用・検出できる系が必要である。我々は、*in utero* electroporation 法によって神経幹細胞を低頻度標識するために微量な Cre を自律的に増幅する系を確立した。今回、同様に FLP 増幅の系を確立し、両増幅系を持つトランスジェニックマウスを作出する。さらに、Cre、FLP により 2 分割 GFP をそれぞれ発現させる。そして、Trans synaptic に Cre および FLP (の mRNA) の輸送を試みる。すでに別研究とし実施している方法にて、異なる層の barrel 野の sibling neurons にそれぞれに、ごく微量の Cre、FLP を導入する。ヒゲ刺激により該当 sibling neurons を刺激し、投射先ニューロン

に GFP が発現するか検討する。発現すれば同じ神経細胞へ投射が収束していることを示す。」

この中で、Cre を自律的に増幅する系については、成果として発表した (Oka et al, *Cereb Cortex*, in press)。一方、残念なことに、sibling neuron については、我々は 2019 年 4 月より本支援を受け、研究を実施したが、同年後半に同様の内容を取り扱った論文が他のグループより発表された (Ren SQ et al., Precise Long-Range Microcircuit-to-Microcircuit Communication Connects the Frontal and Sensory Cortices in the Mammalian Brain, *Neuron*, 2019 Oct 23;104(2):385-401.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2019.06.028.)。我々の仮説は結果として正しかったが、この論文の発表を受け sibling neuron についての研究は中止した。以降、研究 (1) に注力した。

研究 (1) の当初の目的は以下の通りである。

「エクソソームシステムがマウスにおいても機能するか、マウス横隔膜をモデルとし、同部位において神経活動刺激後の Arc mRNA の存在を検討する。Arc は特殊な配列をその 3'UTR に有し、それゆえその mRNA が capsid へ取り込まれる。この配列と特性を保持したまま、GFP などの新たな遺伝子を組み入れ、その遺伝子が trans synaptic に運ばれうるか、ポスト側で発現するか検証する。許容遺伝子サイズなど、その効率、条件も検討する。さらに培養神経細胞同士のシナプスにおいて、同じく機能するか検討をすすめる。」

研究 (1) の本来の目的は、神経活動依存的に trans synaptic な物質輸送系の樹立であった。一方、研究開始後、当初の目的である神経活動依存的に情報や物質を移動させ得る系の開発に有用と思われる新たな知見も発表された。一方、特にエクソソームにおいては、必ずしも活動している末端ピンポイントでの、かつ活動している末端ほぼ全てにおいて、量的に同じ水準で物質移動が実現できるかの疑念が生じた。そこで、まず神経活動依存的にポストシナプス側に変化をもたらし得る系の開発に注力した。

3. 研究の方法

2. で記載した理由もあり、本研究提案後、提案した手法に加え、より簡便なシステムで、神経活動依存的に経シナプス輸送 (もしくはポスト側で分子発現を誘導) を行えるツールについて検討を進めた。

(1) アデノ随伴ウイルス(AAV)は神経細胞の順行性のトレーサーとして用いられるが、プロモーター依存的に感染をさせることが難しく、特異性を担保した標識が難しい。そこでショウジョウバエでのいわゆる trans-tango のシステムに着目し (Talay et al., *Neuron* 2017)、マウスへの応用を検討した。このシステムでは、狙った領域の神経細胞に (もしくは神経系広く)、特別な受容体 X に転写因子 Y を融合させたものを発現させる。同時にこの X にリガンドが結合した場合、受容体に結合する分子に X と Y の間を切断しうる分子を融合させた分子を発現させておく。すると pre 側に X のリガンドを発現させることができれば、post 側に作用し、Y が働き、Y により狙った遺伝子を発現させることができる。特に、pre 側に発現させる X のリガンドを神経活動依存的に発現させることができれば、初期の目的は達成できるツールとなりうると考えた。

4. 研究成果

Cre の自動増幅系については、上述の通り論文として成果を発表した (Oka et al., *Cereb. Cortex*, in press)。その他の進捗内容、成果は以下のとおりである。

上述の研究の方法にならい、培養細胞でリガンドに対する感度、特異度を調べたが、ノイズが大きく、経シナプス蛍光標識に用いるには不適と判断した。判断根拠として、Arrestin と G 蛋白共役型受容体 (GPCR) の発現が各細胞でばらつくこと、シグナルが安定しないこと、外因性 GPCR 自体の熱可塑性がそれほど高くないことなどが考えられた。そこで、新規にツール分子の設計を行うこととした。まず、より正確性を求め、インプットとして TEV プロテアーゼを用いた。また、Arrestin で問題となった細胞内で外からのシグナルを変換する分子を必要としないことを設計の

念頭においた。設計した分子を培養細胞で発現させると Tango assay のノイズを下回った。今後の検証が必要であるが、新たなツール分子となりうる、実際に使用可能な候補システムの構築ができたと考えている。今後は、trans-synaptic な物質輸送の系との組み合わせの検討が重要と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yuichiro Oka, Miyuki Doi, Manabu Taniguchi, Sheena Y. X. Tiong, Hisanori Akiyama, Takuto Yamamoto, Tokuichi Iguchi, and Makoto Sato	4. 巻 in press
2. 論文標題 Interstitial axon collaterals of callosal neurons form association projections from the primary somatosensory to motor cortex in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 in press
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 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 該当する

1. 著者名 Tokuichi Iguchi, Yuichiro Oka, Misato Yasumura, Minoru Omi, Kazuki Kuroda, Hideshi Yagi, Min-Jue Xie, Manabu Taniguchi, Martin Bastmeyer, Makoto Sato	4. 巻 in press
2. 論文標題 Mutually repulsive EphA7-EfnA5 organize region-to-region corticopontine projection by inhibiting collateral extension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0367-20.2021	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 該当する

1. 著者名 Kensuke Matsumura, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Pathogenic POGZ mutation causes impaired cortical development and reversible autism-like phenotypes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14697-z	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 Yoshimi K, Oka Y, Miyasaka Y, Kotani Y, Yasumura M, Uno Y, Hattori K, Tanigawa A, Sato M, Oya M, Nakamura K, Matsushita N, Kobayashi K, Mashimo T.	4. 巻 140
2. 論文標題 Combi-CRISPR: combination of NHEJ and HDR provides efficient and precise plasmid-based knock-ins in mice and rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hum Genet	6. 最初と最後の頁 277-287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00439-020-02198-4	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 Sato M, Chou SJ.	4. 巻 14
2. 論文標題 Editorial: The Earliest-Born Cortical Neurons as Multi-Tasking Pioneers: Expanding Roles for Subplate Neurons in Cerebral Cortex Organization and Function.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front. Neuroanat	6. 最初と最後の頁 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnana.2020.00043	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Matsumura K., Baba M., Nagayasu K., Yamamoto K., Kondo M., Kitagawa K., Takemoto T., Seiriki K., Kasai A., Ago Y., Hayata-Takano A., Shintani N., Kuriu T., Iguchi T., Sato M., Takuma K., Hashimoto R., Hashimoto H., Nakazawa T.	4. 巻 519
2. 論文標題 Autism-associated protein kinase D2 regulates embryonic cortical neuron development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Bioph Res Co	6. 最初と最後の頁 626-632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.048	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 Tiong S.Y.X., Oka Y., Sasaki T., Taniguchi M., Doi M., Akiyama H., Sato M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Kcnab1 is expressed in subplate neurons with unilateral long-range inter-areal projections.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Neuroanat	6. 最初と最後の頁 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnana.2019.00039	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 該当する

〔学会発表〕 計12件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yuichiro Oka, Sheena Y. X. Tiong, Tatsuya Sasaki, Miyuki Doi, Manabu Taniguchi, Makoto Sato
2. 発表標題 Kcnab1 is an early marker for subplate of the mouse cerebral cortex and expressed in cortico-cortical projection neurons in layer 6b
3. 学会等名 第42回日本神経学会大会/第62回日本神経化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mai Q Nguyen, Tokuichi Iguchi, Misato Yasumura, Makoto Sato
2. 発表標題 LAR-RPTPs dimer formation: a potential key-step in the receptors activation control
3. 学会等名 第42回日本神経学会大会/第62回日本神経化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡 雄一郎、土井 美幸、谷口 学、猪口 徳一、佐藤 真
2. 発表標題 単一大脳皮質2/3層ニューロンによる長連合性および交連性回路の形成過程の解析
3. 学会等名 第46回日本脳科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三田村耕平、猪口徳一、安村美里、岡雄一郎、黒田一樹、謝敏カク、Ruwaida Elhanbaly、深澤有吾、佐藤真
2. 発表標題 FIB-SEMを用いたPSD陽性樹状突起スパイン形態の解析
3. 学会等名 第95回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Sato
2. 発表標題 Neocortical neurons develop neuronal circuits for cooperative tasks by multiple-targeting with collateral formation.
3. 学会等名 第2回 OIST-OU Joint Symposium (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oka Yuichiro, Tiong Sheena Y.X., Yahaya Murtala Hamza, Sasaki, Tatsuya, Doi Miyuki, Yasumura Misato, Taniguchi Manabu, Sato Makoto.
2. 発表標題 An early subplate marker Kcnab1 is expressed in cortico-cortical projection neurons in layer 6b in the mouse neocortex.
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土井美幸、岡雄一郎、佐藤真
2. 発表標題 発達段階の大脳新皮質において、Hs d11b1発現領域は一時的に拡大する
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安村美里、猪口徳一、谷口学、MaiQuynhNguyen、佐藤真
2. 発表標題 リン脂質フォスファターゼを介した軸索側枝形成の分子機構
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡雄一郎、MurtalaHamzaYahaya、張永欣Sheena、佐々木達也、土井美幸、谷口学、猪口徳一、佐藤真
2. 発表標題 Neuronal circuit development of subplate neurons
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋山久徳、岡雄一郎、猪口徳一、佐藤真
2. 発表標題 Sema3Eの脳皮質Va層異所発現による細胞移動の障害
3. 学会等名 第96回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安村美里,猪口徳一,NguyenQuynhMai,佐藤真
2. 発表標題 受容体型チロシンフォスファターゼによる軸索側枝形成の分子機構の解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会/第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤美春,猪口徳一,安村美里,岡雄一郎,佐藤真
2. 発表標題 神経活動が神経回路側枝形成に関連する受容体型PTPファミリー分子のスプライシングに与える影響について
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会/第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学 大学院医学系研究科 解剖学講座 (神経機能形態学) http://www.anat2.med.osaka-u.ac.jp/index.html</p>
--

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	岡 雄一郎 (Oka Yuichiro) (30614432)	大阪大学・連合小児発達学研究所・講師 (14401)	
研究分担者	安村 美里 (Yasumura Misato) (20533897)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	猪口 徳一 (Iguchi Tokuichi) (60509305)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	削除：2020年3月30日

	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
研究協力者	渡辺 窓太 (Watanabe Sohta)		大阪大学医学部医学科学生

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			
マレーシア	マラヤ大学			
ドイツ	カールスルーエ工科大学			