

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26250001

研究課題名(和文)新規細胞ラベリング法による神経伝達物質コードの解明

研究課題名(英文) Direct visualization of endogenous gene expression through targeted genetic labeling

研究代表者

谷本 拓 (Tanimoto, Hiromu)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70714955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞は神経伝達物質の連絡により情報を伝える。神経回路の機能を理解するためには、神経細胞の接続部位における伝達物質と受容体を同定することが重要である。

本研究では、細胞特異的な遺伝子、細胞機能の操作が簡便に行えるショウジョウバエをモデルに、脳構造の高度の構築原理を明らかにするため、神経伝達物質およびその受容体の脳内分布に注目した。CRISPR/Cas9法を用いて標的遺伝子の発現レポーターシステムを作成し、各種神経伝達物質の放出及び受容細胞を標識する遺伝学的リソースを構築した。これらのシステムを用いて、各種神経細胞種の形態を高解像度で視覚化し、神経伝達物質マップの作成に向けた基礎を築いた。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive connectivity maps of nervous systems and connectomics are providing detailed designs of neuronal circuits. Although these connectivity maps are powerful in predicting hypothetical circuit functions and guiding new experiments thereon, the information of neurotransmitters and receptors is critical in interpreting how a given circuit functions. This project research aims at comprehensive mapping of neurotransmitters in the *Drosophila* brain. Using the CRISPR/Cas9 system, we generated a transgenic library of GAL4 knock-in that recapitulate the expression of genes for neurotransmitter biosynthesis and their receptors. By visualizing their expression patterns in the brain, we quantitatively compare the distribution of neurotransmitter-releasing and receiving cells. This study provided the basis of neurotransmitter map in the fly brain.

研究分野：神経行動学

キーワード：脳機能モデル動物 遺伝学

1. 研究開始当初の背景

記憶や思考などを司る脳は、無数の細胞が適切な回路を形成し機能する。この回路を構成する素子は神経細胞であり、その機能は神経伝達物質による細胞間の連絡により発現される。ショウジョウバエは多彩で精緻な行動を発揮するが、脳の細胞数は約 10 万個とヒトの脳に比べ数の上で 100 万分の 1 というシンプルな構成である。さらに、遺伝学的手法を用いて細胞特異的な遺伝子、細胞機能の操作が容易であることから、神経回路研究の優れたモデルである。

近年では、脳構造間の神経接続や (Ito et al., Curr. Biol. 2013 など)、電子顕微鏡の連続切片の再構築によるコネクトーム解析 (Takemura et al., Nature 2013 など) も精力的に行われてきた。これらの解剖学的マップから神経回路の機能を理解するためには、接続部位における神経伝達物質と受容体を同定することが重要である。従来の神経伝達物質の研究では、微視的な細胞単位での機能解析が盛んである反面、脳全体を視野に入れたより巨視的なアプローチは非常に少ない。これは既存の解析の大部分が、伝達物質を合成する酵素等に対する抗体染色を用いたもので、抗体の力価に依存するため知識が断片的で、抗原の多くは細胞内局在があり細胞の全体像が得にくい、などの問題点があった。このため、脳領野間の伝達物質および受容体の構成を網羅的に比較分析することはできなかった。

2. 研究の目的

本研究では、全ての神経伝達物質に関連する遺伝子についてマーカー遺伝子のノックイン・ショウジョウバエシステムを作成し、網羅的に各伝達物質を放出・受容する細胞の形態学的解析を試みた。これにより脳全体に渡る高解像度の「神経伝達物質マップ」を構築するための基礎を築くことを目指した。

(1) 全ての神経伝達物質の放出及び受容細胞を標識するトランスジェニックライブラリーの樹立

CRISPR/Cas9 を用いた相同組換えにより、多数の特定遺伝子座に GAL4 などの遺伝子をノックインし、内在性遺伝子と同じパターンでトランスジーンを発現する系統ライブラリーを作成する。

(2) ショウジョウバエ脳の神経伝達物質マップ用画像データの撮像

作成した GAL4 系統で GFP などのマーカー遺伝子を発現させ、各遺伝子を発現する細胞を特異的に標識する。これら各神経伝達物質網羅的の画像データを網羅的に取得する。

3. 研究の方法

(1) Cas9 はタンパク質サブユニットと RNA サブユニット (gRNA) からなる配列特異的ヌ

クレアーゼで、gRNA の配列を変更することにより、任意の DNA 配列を切断するようにプログラムすることができる。近年、我々は Cas9 を用いたゲノム改変技術をショウジョウバエに適用し、高効率で部位特異的変異体を得るシステムを開発した (Kondo and Ueda, Genetics 2013)。この技術を更に発展させ、gRNA とノックイン・ベクターの同時注入により、切断部位にベクターを挿入するシステムの開発を進めた。さらに本研究では、ノックイン後に任意の遺伝子との入れ替えが可能な「交換可能カセット」の構築を試みた。

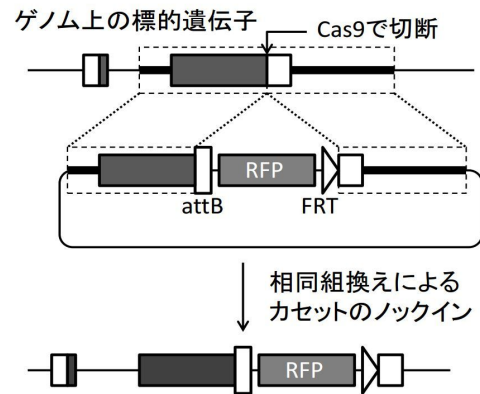


図 Cas9 を用いた外来遺伝子のノックインシステムの原理。Cas9 切断部位に隣接する DNA 領域に相同な配列を持った外来遺伝子ベクターを gRNA と同時注入する。灰色：コード領域；白：非翻訳領域。

(2) ここで新たに作成した GAL4 系統で細胞内局在するマーカー遺伝子を発現させ、脳内における各神経伝達物質を分泌・受容する細胞の分布と投射、入・出力部位を組織的に特定するため、共焦点レーザー顕微鏡により脳画像データを取得する。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 ヌクレアーゼを応用することで、ゲノム上の標的配列に高効率でトランスジーンを挿入するシステムを確立した。さらに今回開発したノックイン・カセットはゲノム挿入後にトランスジーン交換できるようにデザインしているため、標的の内在性タンパクにエピトプタグや GFP などのマーカータンパク質を付加するなどのゲノム上での改変が可能である。そのため、本研究を超えた用途にも応用可能な汎用性の高い GAL4 挿入システムリソースである。

また、ショウジョウバエでは 2000 年にゲノムが解読されており、神経伝達物質の合成に関わる酵素、トランスポーター、受容体などの遺伝子構造が明らかになっている。本研究では、これらの関連遺伝子座にマーカー遺伝子をノックインし、網羅的な遺伝学的リソースを作成した。ここで作出した系統は、近日ナショナルバイオリソースプロジェクト・ショウジョウバエストックセンターに寄

託し、研究者コミュニティに対して広く提供する。

(2) 挿入された GAL4 が内在性遺伝子の発現パターンを再現すること、その再現性が従来の(ノックインではない)GAL4 系統と比較して向上したことを、複数の遺伝子産物に対する抗体染色で確認した。さらに、この GAL4 挿入ライブラリーを用い、細胞膜や核など特定の細胞内区画に局在するタンパクを発現させることで、各種神経伝達物質を放出・受容する細胞の形態を視覚化した。ショウジョウバエの脳における高解像度の神経伝達物質地図の作成に向けて、各種神経細胞種の画像データを網羅的に収集した。

今後はここで得られた画像をもとに、神経伝達物質マップの構築を完遂し、形態学的解析を行う。さらに、同一伝達物質に対し複数存在する受容体サブタイプの間での発現の類似性・相違を解析することで、神経回路の構成原理を明らかにする。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)すべて査読有り

Yamagata N, Hiroi M, Kondo S, Abe A, Tanimoto H. (2016) Suppression of dopamine neurons mediates reward. *PLoS Biol* 14(12):e1002586.

DOI: 10.1371/journal.pbio.1002586

Ichinose T, Tanimoto H. (2016) Dynamics of memory-guided choice behavior in *Drosophila*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 92 (8) 346-357.

DOI: 10.2183/pjab.92.346

Vogt K, Aso Y, Hige T, Knapek S, Ichinose T, Friedrich AB, Turner GC, Rubin GM, Tanimoto H. (2016) Direct neural pathways convey distinct visual information to *Drosophila* mushroom bodies. *eLife* 5:e14009.

DOI: 10.7554/eLife.14009

Rohwedder A, Wenz NL, Stehle B, Huser A, Yamagata N, Zlatic M, Truman JW, Tanimoto H, Saumweber T, *Gerber B, Thum AS. (2016) Four individually identified paired dopamine neurons signal reward in larval *Drosophila*. *Curr Biol*. 26(5):661-9.

DOI: 10.1016/j.cub.2016.01.012

Thoma V, Knapek S, Arai S, Hartl M, Kohsaka H, Sirigrivatanawong P, Abe A, Hashimoto K, Tanimoto H. (2016) Functional dissociation in sweet taste receptor neurons between and within taste organs of *Drosophila*. *Nat Commun* 7:10678.

DOI: 10.1038/ncomms10678

Ichinose T, Aso Y, Yamagata N, Abe A, Rubin GM, Tanimoto H. (2015) Reward

signal in a recurrent circuit drives appetitive long-term memory formation. *eLife* 4:e10719.

DOI: 10.7554/eLife.10719

Vogt K, Yarali A, Tanimoto H. (2015) Reversing stimulus timing in visual conditioning leads to memories with opposite valence in *Drosophila*. *PLoS One* 10(10):e0139797.

DOI: 10.1371/journal.pone.0139797

Nehrkorn J, Tanimoto H, Herz AV, Yarali A. (2015) A model for non-monotonic intensity coding. *R Soc Open Sci*. 2(5):150120.

DOI: 10.1098/rsos.150120

Appel M, Scholz CJ, Müller T, Dittrich M, König C, Bockstaller M, Oguz T, Khalili A, Antwi-Adjei E, Shauer T, Margulies C, Tanimoto H, Yarali A. (2015) Genome-wide association analyses point to candidate genes for electric shock avoidance in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 10(5):e0126986.

DOI: 10.1371/journal.pone.0126986

Yamagata N, Ichinose T, Aso Y, Plaçaïs PY, Friedrich AB, Sima RJ, Preat T, Rubin GM, Tanimoto H. (2015) Distinct dopamine neurons mediate reward signals for short- and long-term memories. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(2): 578-83.

DOI: 10.1073/pnas.1421930112

Aso Y, Sitaraman D, Ichinose T, Kaun KR, Vogt K, Belliart-Guérin G, Plaçaïs PY, Robie AA, Yamagata N, Schnaitmann C, Rowell WJ, Johnston RM, Ngo TT, Chen N, Korff W, Nitabach M, Heberlein U, Preat T, Branson K, Tanimoto H, Rubin GM. (2014) Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*. *eLife* 3:e04580.

DOI: 10.7554/eLife.04580

Aso Y, Hattori D, Yu Y, Johnston RM, Iyer NA, Ngo TT, Dionne H, Abbott LF, Axel R, Tanimoto H, Rubin GM. (2014) The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *eLife* 3:e04577.

DOI: 10.7554/eLife.04577

Vogt K, Schnaitmann C, Dylla KV, Knapek S, Aso Y, Rubin GM, Tanimoto H. (2014) Shared mushroom body circuits underlie visual and olfactory memories in *Drosophila*. *eLife* 3:e02395.

DOI: 10.7554/eLife.02395

[学会発表](計 14 件)

Tanimoto H. Visualization and neuronal control of memory-guided choice behaviour. Janelia Spring Conference “Structure and Function of the Insect Mushroom Body”, Virginia, USA (2017/3/5~8)
Imanishi Y, Yamagata N, Abe A, Kondo S, Tanimoto H. Mapping dopamine receptor expression in the fly brain. The 11th Japanese Drosophila Research Conference, Tokyo, Japan(2016/9/9 ~ 11)
Tanimoto H. Neural pathways for the formation, consolidation, and retrieval of memory in the fly brain. The 6th International Symposium on "Biology of Decision Making", Paris, France (2016/5/25 ~ 27)
Tanimoto H. Dopamine circuits and memory formation. 14th European Symposium for Insect Taste and Olfaction, Cagliari, Italy (2015/9/20 ~ 25)
Tanimoto H. Mapping neural circuits for memory formation. The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan (2015/7/30)
Tanimoto H. Mapping circuits for memory formation. Tohoku Forum for Creativity Thematic Program “Frontiers of Brain Science: Symposium on Tools and Technologies”, Sendai, Japan (2015/7/25 ~ 27)
Tanimoto H. Mushroom body reward circuits. The EMBO-Kavli meeting “Neural circuits and behaviour of Drosophila”, Crete, Greece (2015/7/5 ~ 9)
Tanimoto H. Dopamine circuits for memory formation. 3rd Asia-Pacific Drosophila Research Conference, Beijing, China (2015/5/11 ~ 14)
Tanimoto H. Mushroom body circuits and memory formation. The Genetics Society Autumn Meeting, London, UK (2014/11/27 ~ 28)
Tanimoto H. Mushroom body circuits and memory formation. Neurofly, Crete, Greece (2014/10/5 ~ 9)
Tanimoto H. Distinct dopamine neurons mediate reward signals for short- and long-term memories. Janelia Farm Fall Conference “Learning and Memory: A Synthesis of Bees and Flies”, Virginia, USA (2014/9/21 ~ 24)
Tanimoto H. Neuronal circuits for memory formation. The 85th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, Sendai Japan (2014/9/11 ~ 13)

Tanimoto H. Neural circuits for colour discrimination and learning. International Conference of Neuroethology, Sapporo, Japan (2014/7/29 ~ 8/1)

Tanimoto H. Functional diversity of the Drosophila mushroom body. Janelia Farm Spring Conference “Structure and Function of the Insect Mushroom Body”, Virginia, USA (2014/4/27 ~ 5/1)

〔その他〕

ホームページ等 (プレスリリース)

ドーパミン神経の抑制による報酬シグナルの発見-報酬伝達におけるドーパミンの機能多様性-

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2017/01/press20170104-03.html>

https://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press20170104_03web.pdf

食べ物を「足」で味わう機構の解明-肢(あし)と中枢神経を結ぶ複数の甜味受容体神経の機能と構造

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2016/02/press20160217-01.html>

http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press20160217_01web.pdf

脳内の報酬のフィードバックが記憶を長期化する

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2015/11/press20151117-03.html>

http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press_20151117_03web.pdf

短期・長期記憶はそれぞれ独立したドーパミン神経細胞群によって誘導される

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2015/01/press20150129-02.html>

http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press_20150129_02web.pdf

色と匂いの記憶は脳の同じ部分で処理される

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2014/08/press20140822-03.html>

http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press_20140822_03.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 拓 (TANIMOTO, Hiromu)
東北大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号：70714955

(2) 研究分担者

近藤 周 (KONDO, Shu)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教
研究者番号：90408401

(4)研究協力者

山方 恒宏 (YAMAGATA, Nobuhiro)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：50716248