

令和 2年 5月 9日

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201870019

氏名 竹尾ゆかり

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: カリフォルニア州スタンフォード (米国)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

トランスシナプス標識法による小脳顆粒細胞の機能特異的神経回路網の解明

3. 派遣期間: 平成 30 年 4 月 10 日 ~ 令和 2 年 4 月 9 日

4. 受入機関名及び部局名

Stanford University

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

## 【研究実施状況】

私は 2018 年 4 月から、スタンフォード大学 Liqun Luo 教授の研究室において、マウス小脳をモデルに、脳神経回路の構築機構、および、高次機能発揮における情報処理機構を解明することを目的として研究に取り組んだ。

➤ 小脳顆粒細胞がどのようなサブグループにクラス分けされるのか？

多くの神経細胞において、細胞の発生時期と細胞の種類には関係があることが示唆されている。また、当研究室の以前の研究成果において、小脳顆粒細胞の軸索は、顆粒細胞の発生時期に応じて、小脳皮質分子層の異なる位置に投射することが示されている。そこで本研究では、顆粒細胞が発生時期別に異なる役割を担うサブグループを形成するのではないかと考えた。そこで、発生時期の異なる顆粒細胞が、それぞれどのような入力を受け取るのか、組み換え狂犬病ウイルスベクターを用いたトランスシナプス標識法によって同定しようと考えた。

本トランスシナプス標識法を、顆粒細胞において細胞発生時期別に行うため、組み換え狂犬病ウイルスが感染するために必要なタンパク質を、特定の発生時期特異的に顆粒細胞に発現させる手法が必要であった。そのためにタモキシフェン誘導性 Cre あるいは Flex システムを用いて、タモキシフェンの投与時期をさまざまに変えることで、さまざまな発生時期別に、一部の顆粒細胞へ組み換え狂犬病ウイルスを感染させ、入力元を標識した。タモキシフェン誘導性 Cre あるいは Flex の発現プロモーターとしては、発生時期が早い顆粒細胞の標識には Etv1 プロモーターを、遅い顆粒細胞の標識には Math1 プロモーターをそれぞれ使用することで、発生時期の異なる顆粒細胞の特異的な標識を行った。あらゆる遺伝子組換えマウスおよび、タモキシフェン投与時期の組み合わせにより、早く生まれた、あるいは遅く生まれた顆粒細胞をそれぞれ効率よく標識する発現系を確立し、入力元の神経細胞を同定することができた。データはまだ解析中であるが、現在のところ、早く生まれ

た顆粒細胞と、遅く生まれたに投射する苔状線維細胞の起始核に、違いがあることが示唆されている。この結果から、一見均一に見える顆粒細胞に、発生時期に応じた種類の異なるサブタイプがあることが示唆される。

➤ 異なる顆粒細胞サブグループが、どのような異なる機能を担うのか？

小脳は従来、運動の制御に関わる脳部位と考えられてきたが、当研究室による近年の研究も含め、最新の知見により、報酬系など運動以外の高次機能にも関与することがわかってきた。

小脳顆粒細胞は、脳の中で最も個数の多い細胞である。小脳外からの情報を苔状線維から受容し小脳プルキンエ細胞に伝達するが、樹状突起を1細胞当たり4本しか持たず、1本の樹状突起は一種類の苔状線維からの入力を受け取ると考えられている。つまり、1細胞は4種類の苔状線維からしか入力を受け取らないと考えられる。このような小脳顆粒細胞が、どのように異なる情報処理を行うのかは、まったく不明であった。当研究室のこれまでの研究で、小脳顆粒細胞は、発生時期によって異なる投射先へシナプスを形成することが分かっている。そこでまず我々は、顆粒細胞の発生時期に着目し、特定の時期に発生した顆粒細胞が、それぞれ異なる機能に関わるのではないかと考えた。これを検証するため、異なる時期に生まれた顆粒細胞を、上記のように、タモキシフェン誘導性 Cre、Cre 依存的 tdTomato、およびカルシウムセンサー蛋白質 GCaMP を発現するマウスにタモキシフェンを投与することでラベルし、タモキシフェン投与時期によって発生時期別にラベルした顆粒細胞を、頭部固定下での条件付け行動実行中の in vivo ライブカルシウムイメージングにより観察した。現在、得られたデータから、報酬系あるいは運動系に関わる刺激を受容する顆粒細胞が、それぞれどの時期に生まれた細胞であるかを解析中である。

➤ プルキンエ細胞の樹状突起形成と平行線維回路形成

顆粒細胞は軸索である平行線維を介して、小脳分子層のプルキンエ細胞樹状突起にシナプスを形成する。出力先であるプルキンエ細胞への情報伝達においても、顆粒細胞はサブグループに応じて異なる様式を持つのであろうか？ 当研究室のこれまでの研究で、分子層の深層部位には、発生時期の早い顆粒細胞が、表層部位には、発生時期が遅い顆粒細胞の平行線維が投射することが分かっている。さらに、当研究室による研究成果で、チロシンキナーゼ型受容体蛋白質のひとつである TrkC を一部のプルキンエ細胞において欠損させると、それらの TrkC 欠損プルキンエ細胞は、分子層の表層部位に樹状突起を形成しないという顕著な異常が見られることがわかっていた。すなわち、TrkC が、発生時期の遅い顆粒細胞との回路形成に関与しているかもしれないと考えられる。さらに、近年、複数の研究グループからの報告で、TrkC が神経細胞ポストシナプス部位においてシナプスの形成を促す機能をもつことが示唆されていた。これらの知見から、プルキンエ細胞において、顆粒細胞（もしくは特定の顆粒細胞サブタイプ）平行線維からのシナプス形成が、樹状突起形態、ひいては平行線維—プルキンエ細胞の回路形成を制御するのではないかと考えた。

この仮説を検証するにあたり、我々は、TrkC だけでなく、顆粒細胞平行線維—プルキンエ細胞シナプス形成に必須であることが知られている、デルタ2型グルタミン酸受容体 (GluD2) にも着目した。なぜなら、GluD2 の欠損マウスでは、平行線維—プルキンエ細胞シナプスが劇的に減少することがすでに知られていたためである。すなわち、GluD2 の欠損プルキンエ細胞の樹状突起形態を研究することで、顆粒細胞平行線維シナプス形成が樹状突起形成におよぼす影響を理解しようと考えた。

GluD2 がシナプス形成や樹状突起形成を制御する分子機構解明のため、GluD2<sup>flox</sup> マウスのプルキンエ細胞に Cre リコンビナーゼおよび、蛍光蛋白質を同時に発現させ、幼若マウスから成体になり樹状突起形態を解析することにした。このため私は、この目的に適うきわめて有用な遺伝子導入法として、IUE、in utero electroporation を利用した。IUE は、発達中のプルキンエ細胞に、細胞種類特異的に、まばらに、複数の遺伝子を高効率で発現させることができる。またプラスミドベクターをそのまま導入可能なので、組換えウイルスを用いる場合に比べて多くの遺伝子を簡便に試すことが可能である。IUE によるプルキンエ細胞への遺伝子導入は、一般的には難易度が比較的高いものの、私は留学前までに行ってきた研究によって多くの試行錯誤を重ね、効率よく実現可能な詳細な方法論を確立・習得してきた。

IUE によって、GluD2<sup>flox</sup> マウスにまばらに、Cre リコンビナーゼと同時に GFP を発現させたところ、Cre を発現した GluD2<sup>flox</sup> 欠損プルキンエ細胞の樹状突起は、予想と異なり、TrkC 欠損マウスで見られたような形質とも異なる、異常な形態をとることが明らかになった (図1)。通常、プルキンエ細胞の樹状突起は、分子層 (Molecular Layer, ML) の深層部から表層部まで均一に広がるが、GluD2 欠損プルキンエ細胞では、ML 表層部にはコントロールと比べて多くの樹状突起が形成される

のに対し、深層部では樹状突起がほとんど形成されないことが分かった。

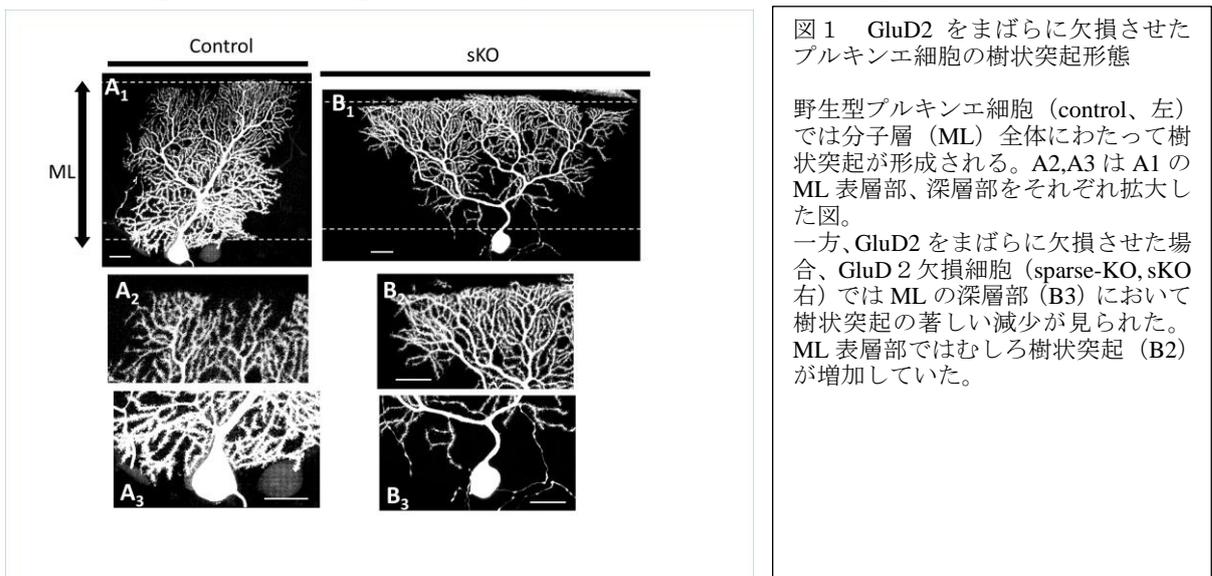


図1 GluD2 をまばらに欠損させたプルキンエ細胞の樹状突起形態

野生型プルキンエ細胞 (control、左) では分子層 (ML) 全体にわたって樹状突起が形成される。A2,A3 は A1 の ML 表層部、深層部をそれぞれ拡大した図。一方、GluD2 をまばらに欠損させた場合、GluD2 欠損細胞 (sparse-KO, sKO 右) では ML の深層部 (B3) において樹状突起の著しい減少が見られた。ML 表層部ではむしろ樹状突起 (B2) が増加していた。

この実験は、GluD2 を、IUE によって一部のプルキンエ細胞でのみノックアウトしたものである (GluD2-Sparse KO, sKO、図1)。そこで、GluD2 をすべての細胞で欠損させた、GluD2 欠損マウスのプルキンエ細胞の形態を、IUE により GFP を発現させることによって解析したところ、面白いことに、この形質は、GluD2 を全身でノックアウトした GluD2 欠損マウスでは見られないことが分かった (図2)。これらの結果から、周囲の細胞よりも少ない GluD2 を発現するプルキンエ細胞だけが、樹状突起形態に ML の総部位に応じた異常をきたすことが示唆された。

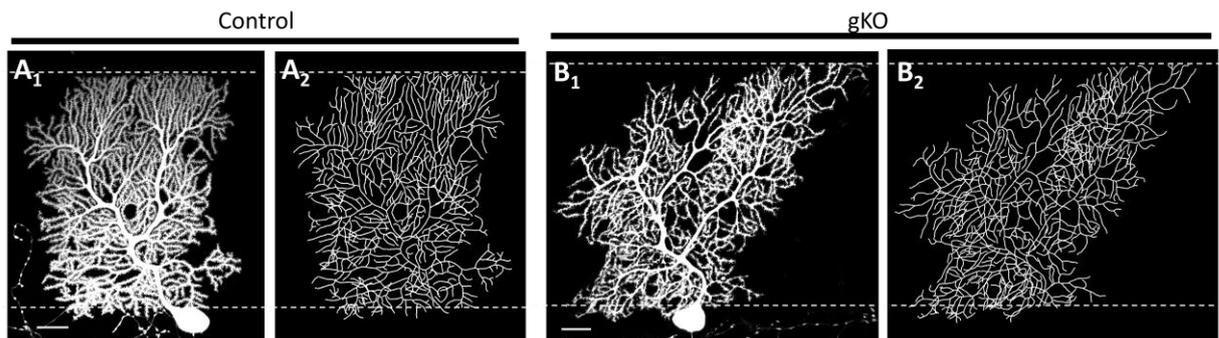


図2 GluD2 を全身で欠損させたプルキンエ細胞の樹状突起形態

野生型プルキンエ細胞 (control、左) でも、GluD2 ノックアウトマウス (GluD2-global KO, gKO、右) でも、分子層 (ML) 全体にわたって樹状突起が形成される。図1の sKO で見られたような異常は、gKO では見られなかった。

➤ 樹状突起は、顆粒細胞シナプス形成をめぐって競合的に起こる

平行線維—プルキンエ細胞シナプスの形成には、プルキンエ細胞樹状突起に局在する GluD2 とともに、平行線維から分泌される Cbln1 が、必要であることが知られている。Cbln1 は GluD2 のリガンドであり、これらの相互作用がプレシナプス・ポストシナプス双方においてシナプスの分化を促す。また、上述のように、GluD2 をまばらに欠損させた場合にのみ、GluD2 欠損プルキンエ細胞において樹状突起の形態異常が見られることから、プルキンエ細胞は周囲の細胞同士で、Cbln1 を取り合い、Cbln1-GluD2 結合によるシナプス形成ができた樹状突起が生き残るという、競合的なメカニズムで樹状突起形態形成を制御しているのではないかと考えられる。このことを、我々は数学的モデリングにより検証した。「シナプスを形成した樹状突起が、より大きな確率で新たな分枝形成を行う」という条件のもと、樹状突起形成過程をシミュレーションしたところ、樹状突起形態が、sKO 細胞 (図1B) の実験データに近い形態を取ることがわかった。このことから、樹状突起はシナプス形成および、同種の細胞間の競合的メカニズムによって制御されることが示唆された。

これらの結果は、樹状突起の発達過程におけるシナプスの役割を明らかにした点で、小脳にとどまらず脳神経回路構築機構の理解において大きな意義を持つものである。近日中に、Neuron 誌に投稿予定である。