

研究課題名 逆行性神経情報伝達機構の分子生物学的研究  
所属研究機関名 独立行政法人 産業技術総合研究所  
研究者氏名 戸井 基道

## ・研究計画の概要

### 研究の趣旨・目的

神経細胞間あるいは神経・筋肉接合部位に形成されるシナプスは、動物のあらゆる生命活動に寄与する神経情報伝達、情報処理機構の素過程である。従来このシナプスにおける情報伝達は、シナプス前細胞から後細胞への一方向性のものと考えられてきた。しかしながらその逆に、シナプス後細胞から前細胞への逆行的な情報伝達系が存在する事が近年明らかにされ、新規のシナプス形成やその再生、機能維持や機能の増大あるいは抑制に大きな役割を持つ事が示唆され始めている。しかしながら、逆行性情報伝達機構に関してのこれまでの研究は、シグナル分子の候補が幾つか推定されているのみで、その詳細かつ体系だった解析はほとんど行われていない。我々はこれまでの研究から、線虫のシナプス後細胞(筋肉)から逆行性シグナルを放出する過程で機能している新規の因子、「AEX-1」の同定に成功している。この結果を考慮すれば、シナプス前細胞からの伝達物質放出過程とシナプス後細胞からのそれには、異なる因子が関与し異なる分子機構によって支配されていると推定できる。そこで本研究課題では、線虫をモデル生物として用い、特に我々の同定した逆行性情報伝達経路に注目し、その分子生物学的・細胞生理学的メカニズムを解明すること、そして個々のシナプスにおける機能から動物の行動や脳の高次機能などの生体内における逆行性情報伝達の役割までを統合的に理解する事を目指す。すなわち個々のシナプスにおける逆行性伝達の有無が、どれだけ生体での記憶や学習などの形成・発現に寄与しているのか、また生体でのシナプス形成や再生にどの様に関与しているのかを解明することを試みる。

### 研究計画の概要

逆行性伝達の分子メカニズムを理解するためには、ゲノム網羅的に逆行性伝達を制御する因子を単離し、その機能を明らかにする必要がある。そのために二通りの方法を用いて研究を進める。一つ目の方法としてゲノム解析の終了している線虫の利点を生かし、シナプス伝達に関与すると推定される遺伝子を RNAi によって網羅的に機能阻害し、その効果を調べる。二つ目の方法として、突然変異誘発剤を用いて線虫を処理し、ランダムに起こる突然変異の中から、その表現型より逆行性伝達が異常になったと推定される突然変異体や、すでに同定している逆行性伝達を制御する「aex-1、aex-5」等の因子と遺伝的に相互作用する遺伝子を網羅的にスクリーニングし、単離・同定する。どちらの方法においても、同定した遺伝子や突然変異体の原因遺伝子のクローニングを行い、各遺伝子のコードするタンパク質を明らかにするとともに、発現解析や生体内機能解析を通してその分子の生体内における役割、すなわちどの様にして逆行性伝達を制御しているのかを明らかにする。この方法は、個体の示す表現型(行動異常)をもとにして候補因子を単離してくるので、単離した遺伝子が必ず経路のどこかで機能していることが期待される利点を持つ。逆行性神経伝達の細胞生理メカニズムの解明に向けては、シナプス前・後細胞特異的にカルシウムイオン感受性の蛍光タンパク質を発現させて、シグナル放出に対応する(すなわち行動と同期した)細胞内イオン濃度変化を生体内でライブ観察することを試みる。同様にシグナル分子も蛍光タンパク質でラベルし、その局在場所や放出される際の小胞の挙動を生体内で直接観察することから、通常のシナプス前神経からの伝達物質放出過程と逆行性伝達のそれとは、細胞生理学的にどう異なっているのかを明らかにし、そのメカニズムの解明に迫る。本研究項目では、逆行性伝達の実体を直接観察することが可能になると思われる。直接観察することで、生体内における逆行性伝達の時間スケールやその空間的制御など、いわゆる培養細胞や単離したシナプスなどでの解析と異なる新たな発見に繋がることが期待できる。さらに得られた知見を基に、個体レベルにおける脳の高次機能等に対する逆行性伝達の生体内での役割を明らかにすることを試みる。これは上記のスクリーニングによって単離された突然変異体を用い、行動解析を行う。特に線虫が示す飼育した場所の匂いや温度等の環境要因に対する記憶・学習といった、中枢神経系の高次機能の発現に逆行性伝達がどのように寄与しているのかを解析する。これにより、個々のシナプスに見られる逆行性伝達が異常になることによって、個体レベルでの記憶にはどのような変化が見られるのかを観察することによって生体内における役割について深く迫れると期待される。

研究計画の詳細報告

(単位:百万円)

研究項目	所要経費					
	13年度	14年度	15年度	16年度	17年度	合計
1.ゲノム網羅的スクリーニングによる逆行性情報伝達を制御する遺伝子の同定	3	7	9			19
(1)遺伝子機能破壊及び突然変異体のスクリーニング	← 3 →	3				6
(2)新規因子のクローニング及び機能解析		← 4 →	9			13
2.逆行性情報伝達を制御する細胞内情報変化の可視化技術の開発	18	2	5			25
(1)観察システムの構築	← 17 →					17
(2)新規蛍光タンパク質の試作・改良	← 1 →	2	3			6
(3)神経活動変化の解析		← 2 →				2
(4)小胞放出過程の解析			2	← 2 →		2
3.動物の高次行動における逆行性情報伝達の役割に関する研究				↔		
(1)顕微鏡の改良				← 2 →		
(2)突然変異体行動解析					↔	
4.総括					↔	
(1)論文および研究報告書の作成						
所要経費(合計) (間接経費を含む)	21	9	14			44

## 研究成果の概要

### 研究成果の概要

1. ゲノム網羅的スクリーニングによる逆行性神経情報伝達を制御する遺伝子の同定。 ゲノム網羅的に逆行性伝達を制御する因子を単離・同定するために、ランダムに起こさせた突然変異により行動が異常になった突然変異体を単離して、その原因遺伝子を同定する正方向の遺伝的アプローチと、ある遺伝子をRNAiを用いて特異的に機能阻害する逆方向の遺伝的アプローチの2つの方法を用いて研究を行った。正方向のアプローチでは、突然変異誘発剤(EMS)を用いて線虫を処理し、逆行性伝達が異常になったと予想される表現型(排泄行動異常)を示す突然変異体をスクリーニングした。約150,000ゲノムのスクリーニングから40の突然変異候補系統を単離した。このうち強い表現型を示した10系統について優先的に、その表現型の基となっている原因遺伝子の位置決定をSNP (single nucleotide polymorphism) mapping法を用いて行い、各突然変異体の原因遺伝子をゲノム上の非常に狭い領域に決定した。さらにこの領域をカバーするゲノムDNA断片を突然変異体に導入することから、目的の遺伝子を同定している。現在までに2つの遺伝子の同定に成功し、いずれも新規の因子であった。RNAiによる機能阻害では、幾つかの候補因子の中から非常に興味深いものとして、ナトリウムポンプのベータサブユニットを同定した。この分子の機能に関するこれまでの理解は、イオンポンプであるアルファサブユニットの補助的因子というものであったが、本研究により「逆行性シグナル分子の放出」、という新たな機能も有することが明らかになっている。

2. 逆行性神経伝達を制御する細胞内情報変化の可視化技術の開発。 逆行性シグナルが放出される際に起こるシナプス後細胞およびシナプス前神経でのイオン濃度変化を可視化するために、細胞内情報伝達物質の主要な因子であるカルシウムに注目して、その細胞内濃度変化を測定することを試みた。数種のカルシウム指示タンパク質を予備的に線虫に発現させた形質転換体を作製し、線虫生体内における各融合遺伝子の発現効率や毒性などを調べた。その結果 FRET を用いて蛍光波長が変化することからカルシウム測光が可能なタンパク質、YC2.12を以後の解析に用いるマーカーとして決定した。元々この遺伝子は哺乳類での発現が最大になるように開発されており、線虫での発現レベルは比較的低く、微小な生体内での観察に必要な光量ではなかった。したがってこの遺伝子のある特定な位置に合成イントロンを導入すること、また点突然変異を導入する等の改良を行い、線虫生体の効率良くカルシウム変動がモニターできる発現ベクターを作製した。排泄行動を制御している運動神経特異的に、この YC2.12 を発現させた形質転換体を作製し、観察を行ったところ、細胞体と軸索の一部においてカルシウム変動を観察することが出来た。

### 波及効果、発展方向、改善点等

脳機能の詳細な理解やその機能回復技術はそれが直接ヒトの生命維持に関わることから非常に注目されている分野である。本研究課題はモデル生物「線虫」を用いた実験系ではあるが、線虫とヒトとの遺伝子の相同性の高さやシナプス構造タンパク質群の類似性を考慮すれば、その結果から得られる情報および技術をヒトの脳機能理解や回復技術に応用できる可能性は極めて高い。特にこれまで分子・細胞レベル、さらには生体内での役割についてもほとんど知見のなかった逆行性伝達を統合的に理解することは、今後より詳細に、かつ現実的に脳機能を理解するためには不可欠なことである。現在までに本研究によって同定されている因子も、新規の物であるか、既知の物ではあったがこれまでの機能とは異なる新規の機能を有するものであり、本研究の新規性の高さを表している。したがって本研究課題の遂行によって、全く新規な遺伝子群、あるいは遺伝子経路の発見に繋がる可能性が高く、脳を理解する上での非常に重要な研究に発展すると思われる。また神経細胞間のみならず、神経・筋接合部位においても同様に逆行性情報伝達が存在が正常な運動神経の伸長とシナプス形成を促進することが示唆されている。したがって今後の本研究課題の遂行によって得られる知見・技術は、神経筋接合部位の損傷を修復し、機能的シナプス再生に必要なシナプス後細胞側の機能・役割を明らかにし、それを基にした医療分野での応用研究を進展させるための重要な基礎データとなると考えられる。

## . 研究成果発表等の状況

### (1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合 計
国 内	0 件	1 件	2 件	3 件
国 際	1 件	0 件	1 件	2 件
合 計	1 件	1 件	3 件	5 件

### (2) 特許等出願件数

なし

### (3) 受賞等

なし

### (4) 主な原著論文による発表の内訳

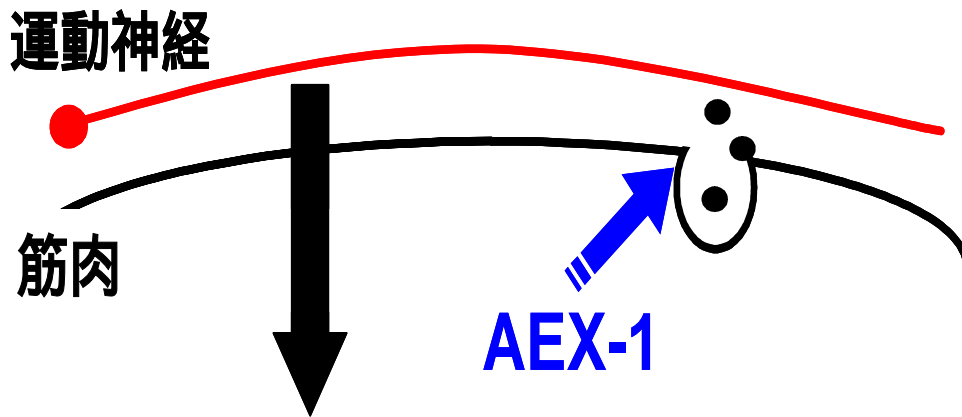
国外誌

1. Doi M & Iwasaki K: 「Regulation of retrograde signaling at neuromuscular junctions by the novel C2 domain protein AEX-1」, Neuron, 33, 249-259, (2002)

### (5) 主要雑誌への研究成果発表

Journal	Impact Factor
Neuron	15.018

# 線虫神経筋接合部位における逆行性伝達



逆行性伝達を制御するAEX-1タンパク質によって筋肉から放出された逆行性ペプチドにより運動神経が活性化



神経伝達物質アセチルコリンの放出



スムーズな行動を制御

15年度は....

AEX-1以外に同定した新規因子

- ・ナトリウムポンプベータサブユニットの1つ
- ・ある種のクモ毒受容体様分子

の解析と運動神経活性化の様子を可視化する。