

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域： 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ  
「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」研究領域
2. 研究開発課題名：可塑的神経回路を支えるシグナル伝達の分子基盤解明と制御
3. 研究開発代表者：尾藤晴彦（国立大学法人 東京大学 大学院医学系研究科 教授）
4. 研究開発の成果

神経回路には、遺伝子プログラムによって決定される回路（hardwired circuit）に加え、経験に依存して連結性が強化される可塑的回路（plastic circuit）の存在が想定されている。本研究では、新規のイメージング技術を開発し、この可塑的回路を支えるシグナル伝達の分子基盤をシナプスレベルならびにシステムレベルで明らかにする。さらに、可塑的神経回路の脱構築・再構築を制御するための新技術を開発する。

27 年度は、研究代表者の尾藤らは、Arc プロモータの下流に luciferase を駆動するトランスジェニックマウスを用い、遠隔記憶の想起に関与する大脳皮質記憶痕跡の分布を *in vivo* で同定した。また、これらの過程に関与する可能性のある CaMK シグナルを探索する過程で、発達期の脳における新たな Ca<sup>2+</sup>依存性経路を発見した (*Mol Brain*, 2016)。一方、これまでに創出した AAV ウィルスベクター技術や Ca<sup>2+</sup>イメージング法を元に、光遺伝学を活用したアルツハイマー病モデルの創出 (*Cell Reports*, 2015; 東大岩坪威研究室との協働) や多色ファイバーオプトメトリー技術の proof-of-concept 実験 (*Nature Methods*, 2016; スタンフォード大 Karl Deisseroth 研究室との協働) に成功した。

期間全体では、尾藤グループは、記憶痕跡の標識である Arc 遺伝子に着目し、Arc 遺伝子の遠隔エンハンサー SARE (Synaptic Activity Responsive Element, SARE) に基づき、改変人工プロモーター E-SARE を創出した。これを活用し、経験依存的に活性化される細胞集団のライブイメージングと、任意のタイミングでのこの記憶痕跡を標識・操作する遺伝子改変マウスやアデノ随伴ウィルスベクターシステムを完成した。この過程で、シナプス可塑性後に Arc 分子は、伝達が増強していないシナプスへターゲットされ、弱いシナプス選択的にグルタミン酸伝達を弱めるという「inverse synaptic tagging 逆シナプス刻印」という機構を見いだした。また喜田グループとの協働で、CREB へ結合するコアクチベーター CRTCI が、*in vivo* 脳での神経活動依存的な CREB 依存的転写の一端を担い、扁桃体部位特異的に恐怖記憶形成を支配していることを明らかにした。

加えて、単一シナプスでの 2 重 FRET イメージング法を実用化し、同一シナプス内での Ca<sup>2+</sup>シグナルにより、CaMKII とカルシニューリンが全く異なる応答性を発揮する機構を解明した。菊地グループとの協働で、このシステムのさらなる改良に取り組んだ。一方で、全く新規の原理に基づく赤色 Ca<sup>2+</sup>センサー R-CaMP2 を創出した。従来の Ca<sup>2+</sup>インディケーター (GECI) に用いられていた骨格筋由来の CaM 結合ペプチド配列を、神経細胞 CaMKK 由来に入れ替えた結果、格段に線形性が高まり、かつ Ca<sup>2+</sup>応答性が早くなり、*in vivo* でのシナプス活動と発火活動が記録可能な高感度赤色 GECI を世界で初めて開発することに成功した。これらの新規イメージング技術は、脳神経科学に留まらず、がん・免疫・炎症等の疾患研究におけるシグナル伝達研究全般にインパクトを与えられる可能性を秘めている。

### 主要な原著論文

- (1) Yamamoto K, Tanei Z, Hashimoto T, et al. (2015). Chronic optogenetic activation augments Abeta pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Cell Reports* 11: 859-865.
- (2) Horigane S, Ishihara NA, Kamijo S, et al. (2016). Facilitation of axon outgrowth via a Wnt5a-CaMKK-CaMKI  $\alpha$  pathway during neuronal polarization. *Mol Brain* 9: 8.
- (3) Kim CK, Yang SJ, Pichamoorthy N, et al. (2016). Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nature Methods* 13: 325-328.