

# 研究題目 脳内における活動依存的な神経回路形成分子の網羅的探索と機能解析

## 研究組織

研究代表者：高野 哲也（慶應義塾大学医学部生理学）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

### 【1】研究の概要

#### [1-1]本研究の目的・概要

脳内には、約 150 兆個ものシナプスが存在し、多様な脳機能を担う神経回路を形成する。これらの神経回路の活動は、私たちの行動や経験に応じて日々変化している。しかし、それぞれの神経回路がどのように形成され、変わりゆく脳機能を制御しているか依然として不明なままである(図 1)。本研究課題では個々の神経回路網を構成する分子成分を網羅的に探索する為の新たなプロテオーム技術を開発する。さらに、個々の神経回路の形成機構と生理的意義の詳細な分子機序を明らかにすることによって、全く新しい観点からの脳の動作原理及び精神・神経疾患の病態の解明を進める。

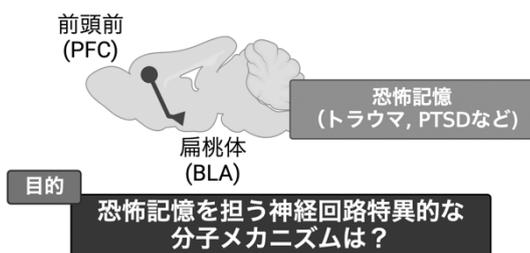


図1 本研究課題：神経回路特異的分子解析の解明を目的としたプロテーム解析

#### [1-2]研究の方法・経過

脳の前頭前野(PFC)は社会的・認知的能力、思考や意思決定を担う脳の最初中枢である。PFC領域の神経細胞は扁桃体(BLA)、大脳皮質、脳幹の神経細胞とシナプスを形成し、記憶の形成、固定、想起など非常にダイナミックに脳機能を制御している(図 1)。しかしながら、PFC-BLA という特定の神経回路が一体どのように機能しているのか、その分子機序については殆ど分か

っていない。この理由は、脳内のシナプスは非常に多様である為、これらシナプスの構成分子が十分に分かっていないことにある。

近年、生体内のシナプス近傍分子群をビオチン標識する近位依存性ビオチン標識 (BioID) 法が開発され、シナプスやグリア細胞—シナプス間の網羅的な分子解析が可能であることが示されている (上江洲ら, *Science*, 2016; 高野ら, *Nature*, 2020)。この方法はビオチン化酵素である BirA や TurboID をシナプス関連分子に融合させることで、シナプスのタンパク質成分をビオチン標識できるものである。ビオチン標識されたタンパク質はアビジンビーズで精製され、質量分析によってシナプス構成分子が網羅的に解析される。本研究課題では、神経回路特異的に局在するシグナルペプチドを TurboID に融合させた神経回路特異的 TurboID を開発する。そして、これをアデノ随伴ウイルス(AAV)によってマウスの PFC 領域に遺伝子導入し、投射先である BLA のタンパク質成分をビオチン標識することで分子解析を行なった。さらに、BLA-PFC 神経回路に同様の解析を適用することで、個々の神経回路の動作特性を制御する神経回路特異的分子メカニズムの解明を目指した。

### 【2】研究成果

#### [2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

##### (1)神経回路特異的 BioID 法の開発

前頭前野(PFC)と扁桃体(BLA)間の神経回路に特異的なタンパク質のプロファイリングを目的として、私たちはプレシナプスに特異的に局在するシグナル配列を持つ神経回路特異的 TurboID を開発した。この神経回路特異的 BioID

を AAV により PFC 領域に遺伝子導入し、ビオチン投与後に BLA 領域を観察したところ、脳内の BLA 領域において特異的にビオチン標識タンパク質が検出された (図 2)。さらに、イムノブロット解析により、神経回路特異的 BioID を導入したマウスでは、コントロールと比較してビオチン標識タンパク質が増加しており、これは PFC-BLA 神経回路における特異的なタンパク質成分の標識が成功したことを示している。この標識は、BLA-PFC 神経回路においても検出された。これらの結果から、開発した神経回路特異的 BioID が脳内の特定の神経回路からタンパク質を標識する有効なツールであることが示唆された。

## (2) 神経回路特異的 BioID 法による個々の神経回路特異的分子マッピング

次に、PFC-BLA 及び BLA-PFC 神経回路における特異的分子の解析を質量分析によって行った。その結果、500~1500 ものタンパク質が検出された。その中でも、有意に増加している神経回路の共通分子として 198 分子、PFC-BLA 神経回路の特有の分子として 16 分子、BLA-PFC 神経回路の特有の分子として 83 分子が同定された (図 2)。これらの結果より、神経回路特異的 BioID 法によって、これまで解析が非常に困難とされていた個々の神経回路に関わる分子マッピングが可能であることが示唆された。

## (3) 新規分子 PBCL1 による記憶形成の制御機構

上記(2)で同定された PFC-BLA 神経回路特異的分子として PBCL1 という新規分子に着目した。免疫組織染色法によって、PBCL1 は扁桃体特異的に存在しており、PFC-BLA 神経回路の末端部分に局在していることがわかった (図 2)。さらに、神経回路特異的 shRNA を用いて PBCL1 の発現を抑制すると、コントロール群と比較してシナプスの数が有意に減少し、また記憶形成に障害が見られた。以上の結果から、PBCL1 は PFC-BLA 神経回路の脳機能を特異的に制御する全く新しい分子であることが示唆された。

## [2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

神経回路特異的 BioID 法による分子プロファイリング技術の開発は、特定の神経回路間でのタンパク質の動態を理解する為の革新的な分子基盤技術となる。実際に、この技術を他の脳領域や異なる種類の神経回路に適用することで、脳全体の包括的な分子地図の作成が期待さ

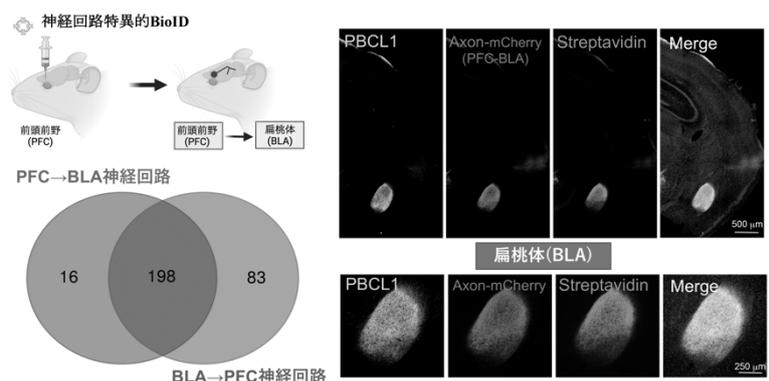


図2 神経回路特異的 BioID 法を用いた前頭前野 (PFC) - 扁桃体 (BLA) 神経回路構成分子の網羅的探索

れる。さらに、PFC-BLA 神経回路特有の分子としての PBCL1 の同定は、個々の神経回路関連疾患、例えば不安障害や PTSD などの治療標的分子となり得る。これらの分子に対する治療薬を開発することで、これまで治療が困難であった記憶障害や精神疾患に対する新しい治療戦略を提供するものである。また、個々の神経回路レベルでの分子マッピング技術の精密化は、患者ごとの神経回路の特異性に基づいた治療法の開発に貢献する可能性もある。従って、本研究の発展により、より効果的で副作用の少ない個別化医療の実現が期待される。

## 【3】 主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

・ 徳島大学共同利用・共同研究拠点成果報告会

[3-3] 成果資料等

なし

## 【4】 今後の課題等 今後の課題、その他等

本研究により、恐怖や不安などの脳機能を担う PFC-BLA 神経回路固有の分子成分が多数同定された。さらに、新規神経回路分子である PBCL1 の発現抑制によって、PFC-BLA 神経回路 (シナプス) の減弱が観察され、記憶障害が見られた。これらの結果から、PBCL1 は PFC-BLA 神経回路の動作特性を制御する全く新しい分子であると考えられる。しかしながら、PBCL1 がこれらの神経回路機能をどのように制御しているのか、その詳細な分子機能はまだ解明されていない。今後、PBCL1 のインタラクトーム解析を進め、PFC-BLA 神経回路機能を制御する PBCL1 の分子メカニズムを明らかにしていく予定である。