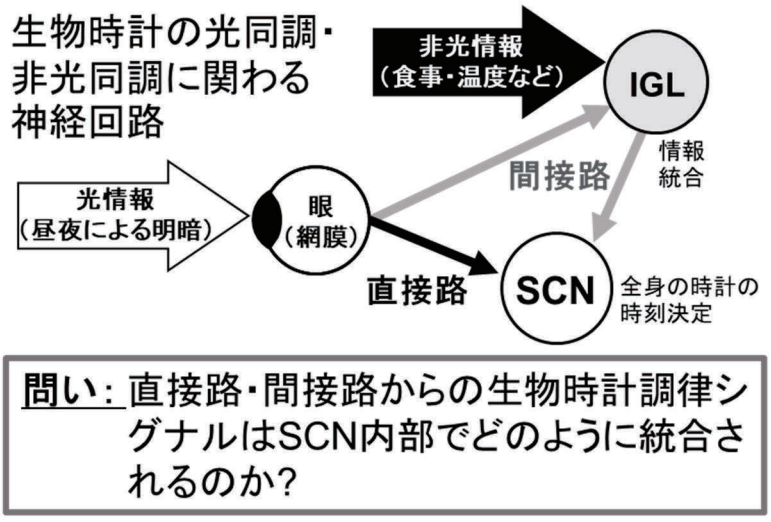
150　神経回路選別技術の新規開発に基づく「目覚め」の解明	三宅　崇仁

【目的】生物時計は地球の自転に伴う昼夜の規則正しい環境変動に体内の代謝応答などを同調させる、生命にとって最も根源的な「時間」の仕組みである。生物時計の中枢は視交叉上核（suprachiasmatic nucleus : SCN）にあり、外部環境変化（光明暗情報）が眼（網膜）を介して SCN を刺激することにより、SCN やその支配下にある全身の時計を調律する。生物時計を調律する神経回路には、網膜から直接 SCN へ投射するものと（直接路）、網膜から膝状体間葉（intergeniculate leaflet : IGL）を経由して SCN へ投射するものがある（間接路）（下図）。これまで、直接路は光情報を基とした SCN 時計の調律（光同調）に重要であり、間接路は IGL で光情報と光以外の情報（食事・温度等）を統合し SCN 時計を調律する（非光同調）と示されてきた。しかし、全身の生物時計の時刻を決定する SCN 時計の調律に関わるこの 2 種類の神経回路が、SCN 内部で最終的にどのように統合されるのかは今でもわかっていない。本研究では、この SCN における複雑な時刻調律機構の一端を明らかにすることを目的に、新規遺伝学的ツールの開発を行った。

【方法】本研究課題では、脳に対する光の影響を調べることから、従来用いられてきた光遺伝学的な手法を用いることはできないため、本研究では、①化学遺伝学的に神経活動を操作する新技術の開発、および②シナプス局所へのタンパク質輸送最適化を、細胞評価系（Tango assay・GloSensor assay・Fura-2 イメージング）と動物個体を用いて行った。

【結果】本研究において開発した約 350 アミノ酸の小型 DREADD（G_i-または G_q-coupling）は、人工リガンド依存的なβ-アレスチン集積・cAMP または Ca^{2+}シグナリングを示した。この新 DREADD をマウス脳内に AAV を用いて導入し、マウス行動・体温を、人工リガンドを用いて人為的に操作することに成功した。次に、複雑な回路を検証するため、膜タンパク質をシナプス局所に移行させる配列の探索を行った。その結果、シナプス局在タンパク質の細胞内ドメインを別の膜タンパク質に付与することで、膜タンパク質をシナプス前・後膜それぞれに輸送できることがわかった。

本研究課題の背景 および 解決したい問い



150. 神経回路選別技術の新規開発に基づく「目覚め」の解明

三宅　崇仁

京都大学 大学院薬学研究科 創発医薬科学専攻 システムバイオロジー分野

Key words：DREADD，シナプス，膜タンパク質，体温

緒　言

生物時計は地球の自転に伴う昼夜の規則正しい環境変動に体内の代謝応答などを同調させる、生命にとって最も根源的な「時間」の仕組みである。生物時計の中枢は視交叉上核（suprachiasmatic nucleus：SCN）にあり、外部環境変化（光明暗情報）が眼（網膜）を介してSCNを刺激することにより、SCNやその支配下にある全身の時計を調律する。生物時計を調律する神経回路には、網膜から直接SCNへ投射するものと（直接路）、網膜から膝状体間葉（intergeniculate leaflet：IGL）を経由してSCNへ投射するものがある（間接路）。これまで、直接路は光情報を基とした中枢時計の調律（光同調）に重要であり、間接路はIGLで光情報と光以外の情報（食事・温度等）を統合し中枢時計を調律する（非光同調）と示されてきた［1，2］。しかし、全身の生物時計の標準時刻を示すSCN時計の調律を担うこの2種類の神経回路が、SCN内部で最終的にどのように統合されるのかは今でもわかっていない。本研究では、SCNにおけるこの複雑な時刻調律機構の一端を明らかにすることを目的に、新規遺伝学的ツールの開発に取り組んだ。具体的には、①化学遺伝学的に神経活動を操作する新規小型化DREADDの開発、および②シナプス局所へのタンパク質輸送最適化を、細胞評価系（Tango assay・GloSensor assay・Fura-2イメージング）とマウス個体を用いて行った。

方　法

1. Tango assay

Tangoアッセイは DREADD-Tango、pCDNA3.1（＋）-CMV-bArrestin2-TEV-TRE-Luc2CP の 2 種類のプラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入して行った。Tango システム発現細胞由来の生物発光を、Kronos - Dio（ATTO）を用いて35℃で測定した。発光は30分間隔で2分間測定した。相対的なレポーター発現量は、$(L_e - L_0) / (L_{max} - L_0)$ で算出した。なお、L_e は各濃度のアゴニストを処理した際の Tango レポーター発光量、L_0 はコントロール細胞のレポーター発光量、L_{max} は各系の最大量のアゴニストを処理した後の飽和したレポーター発光量を表す。

2. GloSensor assay

GloSensor アッセイは以前の報告と同等の方法で実施した［3］。具体的には、Flp-In TREx293-DREADD/GloSensor 細胞を、10%熱非動化ウシ胎児血清、0.035% $NaHCO_3$、10 mM HEPES（pH 7.2）、3.5 g/L D-グルコース、1%抗生物質-抗真菌剤混合溶液（Nacalai）を添加した DMEM 培地（D2902、Sigma）を用いてコラーゲンⅠマルチウェルプレート 96 ウェル（Corning）に播種し、1 mM D-ルシフェリン（Promega）を加えて 6 時間 37℃で 1 晩培養した。発光検出前に 27℃で 1 時間細胞を順応させ、必要に応じて 10 μM フォルスコリンを加えた。発光は FDSS/μCELL plate reader（浜松ホトニクス）を用いて 27℃で記録した。

3. Fura-2 蛍光イメージング

細胞内 Ca^{2+}濃度測定は、Ca^{2+}蛍光指示薬である Fura-2 を用いて可視化することにより行った。カバーガラス（直径 10 mm）上に播種した DREADD 発現細胞を 5 μM Fura-2 AM と 0.005%クレモフォア EL を加えた Krebs-Ringer 緩衝液で 40 分室温にてインキュベートした。その後カバースライドを測定チャンバーへ移し、倒立蛍光顕微鏡（IX71、Olympus）へ設置後、蛍光イメージングシステム（AQUACOSMOS/ORCA-R2、浜松ホトニクス）を用いて測定した。Fura-2 の蛍光は波長 340 nm および 380 nm の励起光による波長 510 nm の蛍光として室温で観測し、5 秒毎にそれぞれの蛍光強度を取得した。340 nm の励起光によって取得した蛍光強度（F340）を 380 nm の励起光によって取得した蛍光強度（F380）により除した値（Ratio（F340/F380））を細胞内 Ca^{2+}濃度の指標として用いた。実験開始時に Ratio（F340/F380）が 1.5 を超えている細胞は除外して解析を行った。

4. 実験動物、アデノ随伴ウイルス（AAV）作製・投与、体温・行動量観察、免疫組織化学

動物実験には清水実験材料より購入した雄性 C57BL6J マウスを用いた。マウスは明期 12 時間、暗期 12 時間の明暗条件下、自由摂食および自由飲水条件にて飼育した。AAV は、LentiX293T 細胞および PEI MAX（Polysciences）を用いてトリプルトランスフェクション法により作製した。トランスフェクション 24～48 時間後、細胞を回収し凍結再融解を繰り返すことで細胞を破壊し、ベンゾネース（Melk Millipore）を用いて処理し遠心分離したのち、上清を回収した。回収した上清を 15、25、40、58%イオジキサノール密度勾配液にのせ、SW 41Ti ローター（Beckman-Coulter）中で 40,000 rpm、18°C の条件下で 3 時間遠心分離し、40%と 58%のグラジエント層の境界よりウイルス懸濁液を回収した。回収した溶液はビバスピン 6（Sartorius）を用いて限外ろ過した後、マイクロシリンジ（HAMILTON）を用いて DMD（ブレグマより、AP：−1.25 mm、ML：+0.3 mm、DV：−5.0 mm）CA3（AP：−2.06 mm、ML：+2.5 mm、DV：−2.05 mm）または CA1（AP：−2.0 mm、ML：+1.6 mm、DV：−1.1 mm）へ投与した。動物行動量は、赤外線センサー（FA-05F5B、Omron）を用いて 1 分間隔で測定し、CLOCKLAB（Actimetrics）を用いて解析した。動物体温測定は、ボタン型データロガー（Thermochron iButtons、DS1921H、Maxim）を麻酔下で腹腔内に留置することで行った。免疫組織化学は rat anti-mCherry IgG（M11217、Invitrogen）および Alexa594 標識 anti-rat IgG（A-21209、Invitrogen）を用いて行った。全ての動物実験は、京都大学動物実験委員会の承認を得た上で、京都大学における動物実験の実施に関する規定に則り行った。

結果および考察

1. 新規小型 DREADD の開発

これまでの神経科学研究領域における化学遺伝学的神経活動操作にて広く用いられている DREADD には、G_q 共役型の $hM3D_q$（590 アミノ酸）や G_i 共役型の $hM4D_i$（479 アミノ酸）、KORD（381 アミノ酸）などがあげられる［4］。これら遺伝学的ツールをマウス脳内へ導入する場合は、当該遺伝子を搭載した AAV ベクターを脳内へ局所注射することが一般的である。しかし、AAV ベクターに搭載できる遺伝子サイズには制限があるため（約 4.7 kbp まで）、1 種類の AAV ベクターにさまざまな遺伝学的ツールを同時に組み込むことは難しい。そのような背景の下、本研究課題では、これまでに報告されている化学遺伝学的ツールとしては最も小型な DREADD $miniD_q$・$miniD_i$ を開発し（それぞれ約 350 アミノ酸）、これら新規 DREADD の活性化に伴うβアレスチン集積・cAMP シグナリング・Ca^{2+}シグナリングについて、培養細胞レベルでの評価を行った。まず、GPCR-TEV プロテアーゼ切断配列－転写因子（tTA）融合タンパク質とβアレスチン－TEV プロテアーゼ融合タンパク質を細胞内で共発現することで、GPCR へのβアレスチン集積を TRE プロモーター支配下のレポーター遺伝子発現量で評価できる Tango assay［5］を行い、DREADD アゴニスト濃度依存的な $miniD_q$・$miniD_i$ へのβアレスチン集積を確認した（図 1A）。次に、cAMP バイオセンサーである GloSensor ［6］を用いて、アゴニスト刺激依

存的な細胞内 cAMP 濃度変化を調べたところ、miniD$_q$ 発現細胞では、アゴニスト刺激前後において大きな細胞内 cAMP 濃度変化は惹起されなかった一方で、miniD$_i$ 発現細胞では、アゴニスト濃度依存的な cAMP 濃度低下が確認された（図 1B）。また、Ca^{2+}蛍光指示薬である Fura-2 を用いて、アゴニスト刺激依存的な細胞内 Ca^{2+}濃度変化を調べたところ、miniD$_i$ 発現細胞では、アゴニスト刺激前後において大きな細胞内 Ca^{2+}濃度変化は惹起されなかった一方で、miniD$_q$ 発現細胞では、アゴニスト刺激に応じた大きな Ca^{2+}濃度上昇が確認された（図 1C）。

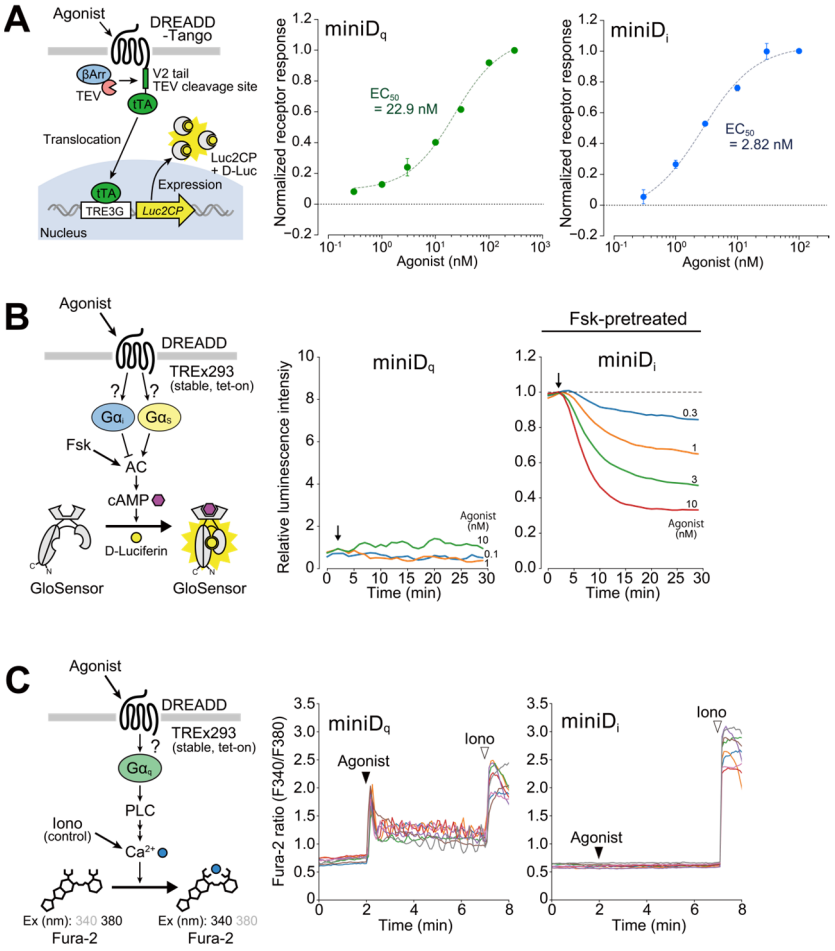


図 1. 新規小型 DREADD の機能評価

A） Tango assayの模式図および各DREADD-Tangoのレポーター発現量に関する容量作用曲線。縦軸は、各実験における最大濃度のアゴニストを処置した際のレポーター発現量を1とした際の相対的なレポーター発現量を示す。

B） GloSensor assayの模式図および各DREADDにおける代表トレース。縦軸はアゴニスト処置直前のレポーター発光強度を1とした際の相対的なレポーター発光強度を示す。Gi/o依存的なcAMP濃度低下を調べる際には、細胞に対してアデニル酸シクラーゼ活性化薬であるフォルスコリン（Fsk）を実験直前に処置した。

C） Fura-2蛍光イメージングの模式図および各DREADDにおける代表トレース。縦軸はFura-2蛍光強度比を示す（方法参照）。細胞のviabilityを調べるために、細胞に対してCa^{2+}イオノフォアであるイオノマイシン（Iono）を測定終了前に処置した。

今回新たに作出した DREADD の *in vivo* での機能を確かめるため、miniD$_q$・miniD$_i$ それぞれを AAV ベクターにパッケージングした（図 2）。神経科学研究ツールとしての有用性を確認するため、動物の体温・行動量を制御する神経核である背側背内側核（dorsal part of the dorsomedial hypothalamus：DMD）［7］にこの AAV を導入した後、miniD$_q$・miniD$_i$ の DREADD のアゴニストをマウスに投与した際の体温・行動量の変化を調べた（図 2）。最も体温・活動量の低い時刻である ZT7 に miniD$_q$ のアゴニストを投与すると、マウスの体温・活動量はともに大きく上昇した（図 2）。同時刻における vehicle 投与では、体温・活動量ともに大きく変化しなかったことから、miniD$_q$ アゴニスト投与によって見られた体温・活動量の変化は、DMD における miniD$_q$ 活性化を介した神経活動の増加によって生じたと考えられる。また、miniD$_q$ の代わりに miniD$_i$ を DMD に感染させたマウスに対して、体温・活動量が高くなる ZT12 に、miniD$_i$ のアゴニストを投与したところ、全てのマウスにおいて、投与直後から体温・行動量はともに大きく低下した（図 2）。これらの結果は、本研究で開発した小型 DREADD と既存の他の遺伝学的ツールを組み合わせることで、これまで難しかった複雑な神経回路学的検討が可能になることを示しており、本研究で開発した新規小型 DREADD は今後、神経科学分野の発展に大きく貢献することが期待される。

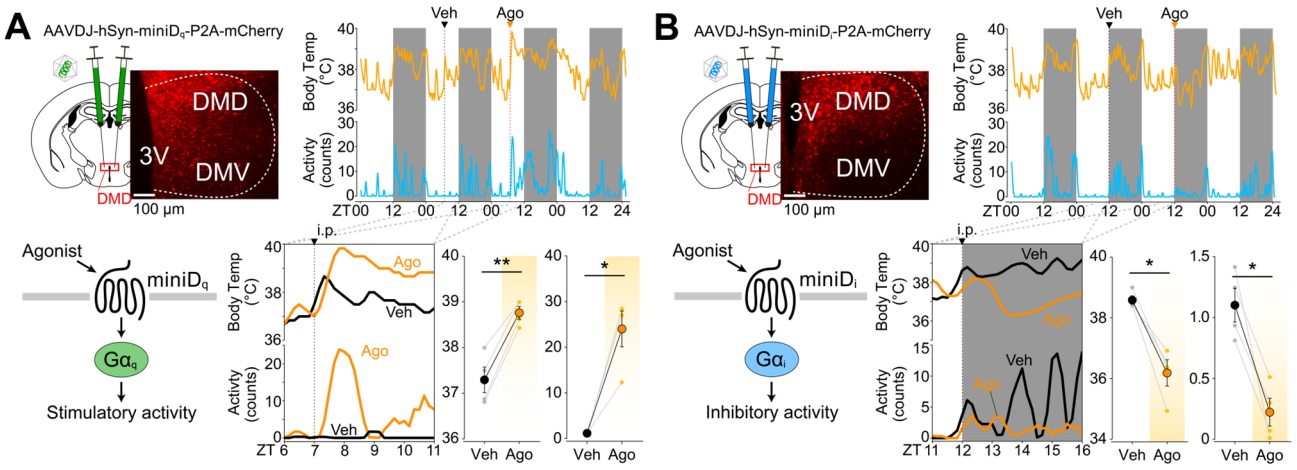


図 2. 新規小型 DREADD を用いた *in vivo* 神経活動操作

miniD$_q$（A）または miniD$_i$（B）搭載 AAV ベクターを DMD に導入し DREADD アゴニストを投与したマウスの代表的な体温・行動量経時変化プロットおよび免疫組織化学代表例。経時変化プロット背景の白黒は、飼育環境における光の明暗を示す。

n=4、**P<0.01、*P<0.05、paired t test。

2. シナプス局所へのタンパク質輸送最適化

上述のような遺伝学的ツールを用いてシナプス局所の機能を制御するためには、タンパク質をシナプス局所へ輸送する技術が必要である。本研究では、シナプス前終末局在タンパク質 neurexin、シナプス後終末局在タンパク質 PSD95 に着目し、それぞれの推定局在化配列を付加した人工膜タンパク質を設計し、海馬 CA1・CA3 に発現させ、各配列を有するタンパク質の局在を検討した。Neurexin 由来の配列を付加したタンパク質は、予想通りシナプス前終末へ移行したが、PSD95 由来の配列を付加した人工タンパク質は、一部シナプス後終末へ移行したものの、シナプス後終末以外にも多く分布する様子が確認された（図 3）。今後は、さらなる局在化配列の最適化を目指す予定である。

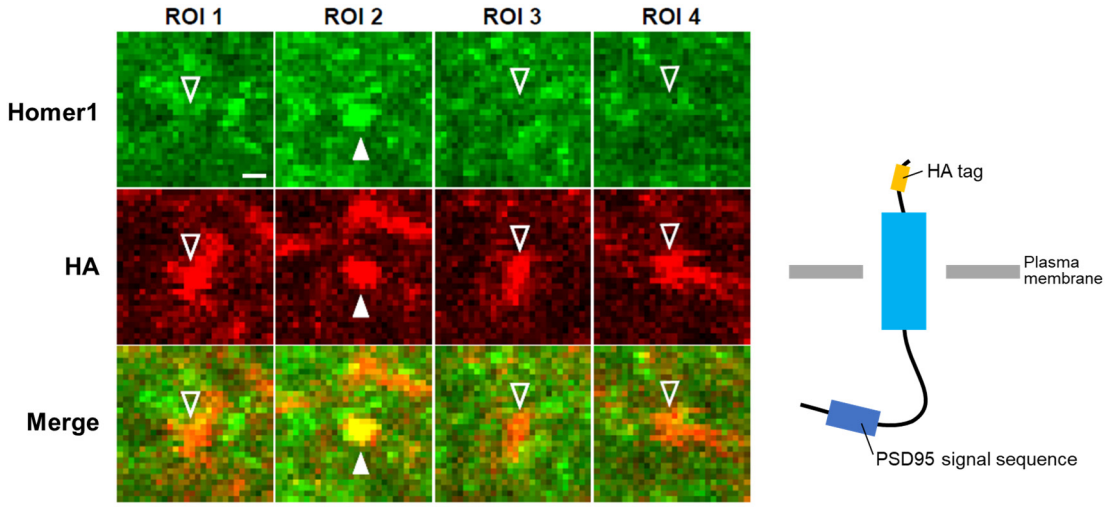


図 3. PSD95 配列を付加した膜タンパク質の神経細胞内局所移行性評価

設計した人工タンパク質を発現する AAV ベクターを用意し、マウス海馬 CA1 領域に感染させた。シナプス後終末の識別には、Homer1 を使用した。矢頭（closed：ROI 2）は人工タンパク質のシナプス後終末局在、矢頭（open：ROI 1、3、4）はシナプス後終末以外への局在を示す。

Scale bar：1 μ m。

謝　辞

本研究の遂行において、京都大学大学院薬学研究科システムバイオロジー分野の土居雅夫教授、井上汐月学士、瀬田孟仁修士、中川俊平修士、秋定晋輔修士、西村怜緒君にご協力をいただきましたこと、また、本研究をご支援下さいました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Xu P, Berto S, Kulkarni A, Jeong B, Joseph C, Cox KH, Greenberg ME, Kim TK, Konopka G, Takahashi JS. NPAS4 regulates the transcriptional response of the suprachiasmatic nucleus to light and circadian behavior. Neuron. 2021 Oct 20;109(20):3268-3282.e6. Epub 2021 Aug 19. PMID: 34416169 DOI: 10.1016/j.neuron. 2021.07.026.

2) Fernandez DC, Komal R, Langel J, Ma J, Duy PQ, Penzo MA, Zhao H, Hattar S. Retinal innervation tunes circuits that drive nonphotic entrainment to food. Nature. 2020 May;581(7807):194-198. Epub 2020 Apr 22. PMID: 32404998 DOI: 10.1038/s41586-020-2204-1

3) Wang T, Nakagawa S, Miyake T, Setsu G, Kunisue S, Goto K, Hirasawa A, Okamura H, Yamaguchi Y, Doi M. Identification and functional characterisation of N-linked glycosylation of the orphan G protein-coupled receptor Gpr176. Sci Rep. 2020 Mar 10;10(1):4429. PMID: 32157140 DOI: 10.1038/s41598-020-61370-y

4) Roth BL. DREADDs for Neuroscientists. Neuron. 2016 Feb 17;89(4):683-94. PMID: 26889809 DOI: 10.1016/j.neuron.2016.01.040

5) Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, Axel R, Lee KJ. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jan 8;105(1):64-9. Epub 2007 Dec 28. PMID: 18165312 DOI: 10.1073/pnas.0710487105

6) Fan F, Binkowski BF, Butler BL, Stecha PF, Lewis MK, Wood KV. Novel genetically encoded biosensors using firefly luciferase. ACS Chem Biol. 2008 Jun 20;3(6):346-51. PMID: 18570354 DOI: 10.1021/cb8000414
7) Zhao ZD, Yang WZ, Gao C, Fu X, Zhang W, Zhou Q, Chen W, Ni X, Lin JK, Yang J, Xu XH, Shen WL. A hypothalamic circuit that controls body temperature. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Feb 21;114(8):2042-2047. Epub 2017 Jan 4. PMID: 28053227 DOI: 10.1073/pnas.1616255114.