

研究課題別評価書

1. 研究課題名

視覚情報の分解と統合の生体制御システム

2. 氏名

河崎 洋志

3. 研究のねらい

視覚や触覚などの感覚情報が、脳神経回路でどのように処理され、最終的な感覚受容に至るかという問題は、基礎神経科学および医学的視点から重要な問題である。本研究では、感覚情報処理に重要となる解剖学的な神経回路基盤を分子生物学的技術を用いて明らかにすること、および神経回路を解析するための基盤技術開発を通じて、感覚情報の分解と統合のメカニズムへアプローチすることを目的とした。

網膜で受容された視覚情報は、網膜の段階ですでに、動作・空間情報や色彩・形態情報などといった異なる特性の視覚情報に分離されると考えられている(図1)。これらの異なる情報は、動作・空間情報は M 経路、色彩・形態情報は P 経路というようにそれぞれ異なる神経経路を使って大脳へと伝達される(図1)。また、視覚系と同様に体性感覚系でも情報の分離は行われており、異なる経路によって触覚情報は大脳皮質にまで伝達されている。例えば、マウスの代表的な体性感覚であるヒゲ感覚は、パレル回路とセプタ回路という異なる並列な神経回路により、大脳皮質へと伝達されている(図2)。

このようにいったん分離された異なる情報がどのように相互作用しているのかという点は、感覚受容のメカニズムを知るためには重要なポイントとなる。本研究では、分子生物学的技術を用いた神経回路の可視化技術の開発、感覚神経系に特異的な遺伝子発現の単離を通じて、異なる情報特性に対応する神経回路の相互作用の解析を行うことがねらいである。

4. 研究成果

視覚系神経回路のM細胞への遺伝子発現

視覚情報は M 経路と P 経路とに分離されて、異なる並列な神経回路により大脳皮質へと伝達される(図 1)。しかしながら、視覚能力が劣るマウスでは M/P 経路への分離は不明確であることから、マウスを用いたこれらの解析は困難である。そこで我々は以前より、高等哺乳動物フェレットを用いた解析を進めてきた。フェレットは、発達した視覚能力を持ち、M/P 経路が存在することが知られている(正式にはフェレットではそれぞれ Y/X 経路と呼ばれるが、ここでは混乱を防ぐために M/P 経路と記載する)。我々はフェレット用の cDNA マイクロアレイを作成し、フェレットの遺伝子単離を実現してきた。

本研究ではフェレット用 cDNA マイクロアレイを用いて、視床の M 細胞に発現が見られる遺

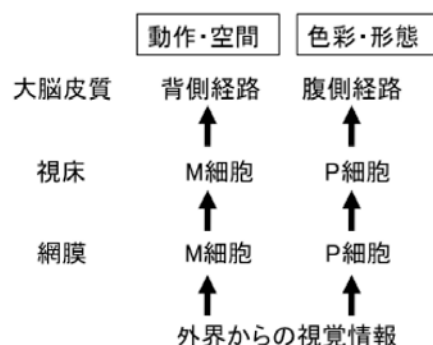


図1. 視覚系神経回路の模式図。視覚情報入力とは二つの並列な M 細胞経路と P 細胞経路によって大脳まで伝達される。

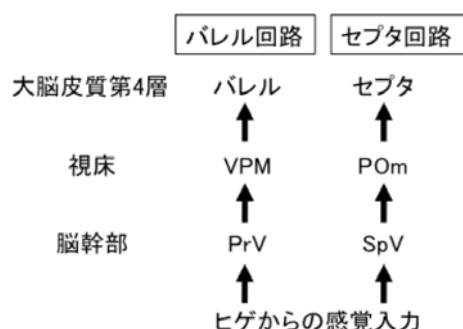


図2. マウス体性感覚系神経回路の模式図。ヒゲからの入力とは二つの並列なパレル回路とセプタ回路によって大脳まで伝達される。

伝子の単離を進めた結果、3つの遺伝子を同定することに成功した。*in situ* hybridization を行ったところ、これらの遺伝子はフェレット視床において M 細胞に発現している一方で、P 細胞には発現が見られないことがわかった。発現の経時変化を検討したところ、出生後、数日という非常に早期より遺伝子発現が見られ、従来想定されていたよりも発生過程早期に M・P 細胞への分化方向が決定されていることが示唆された。

これらの分子のサル LGN における発現を検討したところ、サル LGN においても M 細胞に発現している遺伝子があることが分かり、この発現分布は種を超えて保存されていることが示唆された。M 細胞への選択的な遺伝子発現システムを構築するためには、適切なプロモータを使用する必要がある。そこで M 細胞への発現が動物種を越えている保存されている遺伝子について、ヒト BAC クローンを入手し GFP の組み込みを行った。さらに脳内への遺伝子導入が行いやすいように、長さの短い DNA 断片を数種類作成した。これらの DNA 断片により誘導される GFP の発現分布が、M 細胞に対応するか検討を進めている。

マウス触覚神経回路における情報の分解と統合

視覚神経系と同様に体性感覚系においても、感覚情報の分解と統合が行われていると考えられている。マウスの代表的な感覚入力であるヒゲからの体性感覚(触覚)は、二つの並列な神経回路であるバレル回路とセプタ回路によって担われていることが知られている(図2)。これらの回路は脳幹部から大脳皮質第4層に至るまで並列に存在すると考えられているが、どこでこれらの二つの回路情報が統合されているかは不明な点が多い。

この体性感覚系の情報の統合を司る神経回路を検討するために、マウス大脳皮質 2/3 層の神経細胞に GFP を導入し、2/3 層神経細胞の軸索投射経路の解析を行った。その結果、体性感覚野 2/3 層の神経細胞は、その軸索を 4 層のなかでは特にセプタ領域に集中して投射していることを見出し、この構造をバレルネットと命名した(図3)。

さらに、バレルネット内にある 2/3 層神経細胞の軸索は、バレルネット部分を単に通過しているだけなのか、それともシナプスを作り何らかの機能的情報処理を行っているのかを検討した。そのために、2/3 層神経細胞に mCherry とシナプトフィジン-GFP を共発現させたところ、mCherry 陽性のバレルネット部分にはシナプトフィジン-GFP が点状に分布していることを見出した(図4)。この結果は、2/3 層神経細胞由来の軸索は、バレルネットに集積し、そこでシナプスを作っていることを示唆している。

これらの結果は、1) マウス大脳皮質体性感覚野において、2/3 層神経細胞の新たな軸索投射パターンを見出したこと、2) バレル回路とセプタ回路の情報は、2/3 層神経細胞からの軸索がバレルネットに集積することにより、バレルネット部分で情報の統合がなされている可能性があることを提起している。バレルネットは感覚情報統合の新たな構造的基盤かも知れない。

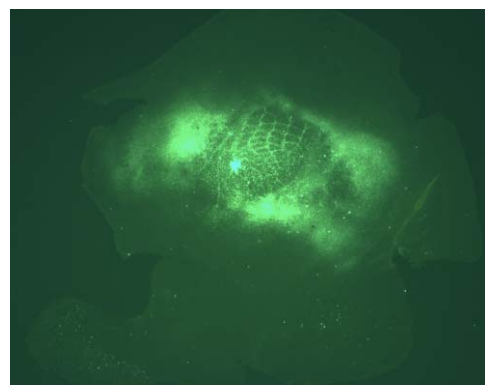


図3. マウス体性感覚野第4層にみられるバレルネット。大脳の接線方向断面。セプタ部分に GFP 陽性の 2/3 層神経細胞軸索が集積している。

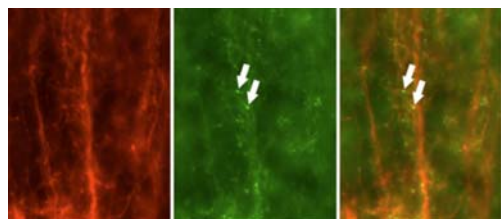


図4. バレルネットの拡大図。mCherry (左)とシナプトフィジン-GFP(中)とを共発現した。(右)mCherry とシナプトフィジン GFP を重ねた画像。バレルネットにはシナプトフィジン GFP が点状に分布している(矢印)

神経回路解析のための基盤技術開発

従来、神経回路の解析には脂溶性神経軸索トレーサーである DiI が広く用いられてきた。DiI は固定後の脳にも使用可能であるなど応用範囲が広く、簡便である半面、脂溶性物質であるために界面活性剤に触れると容易に拡散して回路解析が困難になるとの問題点があった。従って、DiI を用いた神経回路トレーシングと免疫組織染色法の組み合わせは困難であり、それゆえ、DiI 陽性軸索に発現するタンパク解析などが困難であった。

そこで我々は、DiI に対して免疫組織染色を行うことを可能とする技術の確立を行った。DiI が界面活性剤により洗い流されることが問題の原因であることから、通常の界面活性剤の代わりにジギトニンを用いることを試みた。ジギトニンは、脂質の中でもある特定の脂質にのみ反応する界面活性剤であり、多くの膜表面脂質は保存されると考えられることから、DiI のシグナルは保存されることが期待された。実際にジギトニンを用いることにより、DiI シグナルを維持するとともに抗体の組織浸透度を十分に上げることが分かった(図5, 6)。神経回路投射パターンとその免疫組織学的特徴の解析をすることを可能とする本手法は、統合回路の解析に有用である。

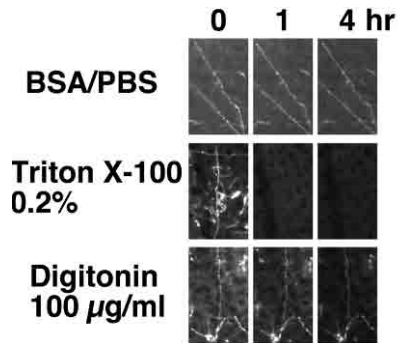


図5. DiI シグナルに対する界面活性剤の効果。TritonX-100 に比べて digitonin では DiI シグナルが拡散しにくい

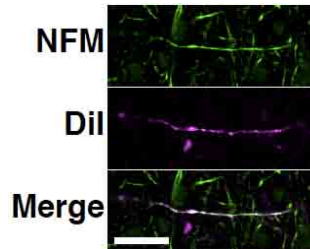


図6. digitonin を用いた DiI と抗 NFM 免疫染色の二重標識。digitonin を界面活性剤として用いることにより、DiI と免疫組織染色の二重染色が可能となった。

5. 自己評価

研究開始当初の目標は、視覚系神経回路のM細胞系とP細胞系とが相互作用をする神経回路的基盤の解析とした。そのために1) M細胞系に選択的に発現する遺伝子の単離、2) 単離した遺伝子のプロモータによる GFP 発現コンストラクトの作成、3) フェレットへの遺伝子導入、を進めてきた。これらの成果により、視覚系神経回路の解析のみならず、フェレットを用いた高等哺乳動物の中枢神経系の研究への展開が可能となった。フェレットから得られる結果は、霊長類へも応用できる可能性があると考えている。

さらに当初の目標の枠を越えて、体性感覚系の感覚情報処理回路の解析も行った結果、マウスの体性感覚神経回路において、これまで見出されていなかった新しい皮質内局所投射経路を見出すことができた。この回路が体性感覚情報の統合に重要である可能性があると考えている。この神経回路がマウス体性感覚系にのみ見られる回路か、皮質全般に一般化できる回路かという点は興味深い。また、研究期間中に様々な神経回路解析に重要となる基盤技術開発も行うことができた。

さがけ期間中に得られた研究成果、開発技術および多くの研究者と議論をできたことは非常に有意義であり、研究者として成長する上での大きな糧になった。お世話になった皆様に改めて御礼申し上げ、深謝いたします。

6. 研究総括の見解

視覚系神経回路のM細胞系とP細胞系とが相互作用をする神経回路的基盤の解明のために、M細胞系に選択的に発現する遺伝子の単離、単離した遺伝子のプロモータによる GFP 発現コンストラクトの作成などの成果を挙げ、さらにフェレットへの遺伝子導入法を確立させた。これらの成果により、視覚系神経回路の解析のみならず、フェレットを用いた高等哺乳動物の中枢神経系の研究への展開に活かされることを期待する。

さらに、マウスの体性感覚神経回路において、これまで見出されていなかった新しい皮質

内局所投射経路を見出したことを特筆しておく。

7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

1. Sehara K., Toda T., Iwai L., Wakimoto M., Tanno K., Matsubayashi Y. and Kawasaki H., Whisker-related axonal patterns and plasticity of layer 2/3 neurons in the mouse barrel cortex. *Journal of Neuroscience*, 30, 3082–3092, 2010
2. Iwai L. and Kawasaki H., Molecular development of the lateral geniculate nucleus in the absence of retinal waves during the time of retinal axon eye-specific segregation. *Neuroscience*, 159, 1326–1337, 2009
3. Matsubayashi Y., Iwai L., Toda T., Lu Q.R. and Kawasaki H., Immunostaining for oligodendrocyte-specific galactosphingolipids in fixed brain sections using the cholesterol-selective detergent digitonin. *J. Neurosci. Methods*, 178, 87–98, 2009
4. Toda T., Hayakawa I., Matsubayashi Y., Tanaka K., Ikenaka K., Lu Q.R., and Kawasaki H., Termination of lesion-induced plasticity in the mouse barrel cortex in the absence of oligodendrocytes. *Mol. Cell Neurosci.*, 39, 40–49, 2008
5. Matsubayashi Y., Iwai L., and Kawasaki H., Fluorescent double-labeling with carbocyanine neuronal tracing and immunohistochemistry using a cholesterol-specific detergent digitonin. *J. Neurosci. Methods*, 174, 71–81, 2008

②特許

研究期間累積件数: 3件

発明者: 河崎洋志

発明の名称: 組織内の脂質抗原の免疫染色方法

出願人: 独立行政法人 科学技術振興機構

出願日: 平成 20 年 10 月 21 日

発明者: 河崎洋志、松林完

発明の名称: 界面活性剤を使用した組織の染色方法

出願人: 独立行政法人 科学技術振興機構

出願日: 平成 20 年 6 月 18 日

未公開特許 1 件

③著書

1. Toda T. and Kawasaki H., Regulation of the critical period for whisker lesion-induced barrel structural plasticity in the mouse somatosensory cortex, in *Somatosensory Cortex: Roles, Interventions and Traumas*, Johnsen N. and Agerskov R. eds., Nova Science Publishers, New York, 2009, p157–171
2. 河崎洋志、視覚系と体性感覚系を用いた神経回路形成メカニズム解析、*ブレインサイエンスレビュー* 2009, 255–272、ブレインサイエンス振興財団、2009 年

④招待講演

1. 河崎洋志、大脳皮質の臨界期終了時期におけるオリゴデンドロサイトの機能解析、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月、神戸
2. 河崎洋志、フェレットを用いた視覚神経系の形成過程解析、第一回 Retina Research Meeting、2008年11月、東京
3. 河崎洋志、フェレットを用いた感覚神経系の形成過程メカニズム解析、神経組織の成長・再生・移植研究会第23回学術集会、2008年5月、幕張