

研究報告書

「脳の構造的・機能的左右非対称性の解明」

研究タイプ: 大挑戦型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 玉田 篤史

1. 研究のねらい

脳は構造的にはほぼ左右対称であるとされるが、機能的には明らかに非対称であり、たとえばヒトでは左大脳半球に言語機能、右半球に空間操作機能などが優位に局在する。左半球と右半球は構造的にどのように違うのか？どのようにして機能的非対称が生じるのか？なぜ言語野は右半球でなく左半球に形成されるのか？局在する機能はどのような情報処理機構により生じるのか？という問題は未解明の謎であり、言語・思考・認識などの高次精神機能の分子的・構造的基盤および発生・発達機構、さらには、それらの機能の破綻を伴う精神・神経疾患の原因・治療方法を考える上で重要な鍵となる。本研究では、我々が最近報告した「らせん分子モーター駆動による神経細胞の回転・旋回運動」という新規の概念を切り口として、脳の構造的・機能的左右非対称性の形成・発現メカニズムを分子・細胞・神経回路・個体の各階層において理解することを目的とする。さらに、左右非対称性の理解を突破口として、脳の情報処理機構の本質に迫ることを最終的な目標とする。

2. 研究成果

(1) 概要

これまで根拠なく左右対称であるとみなされてきた脳内の神経回路が実は左右非対称であり、左巻き(反時計回り)に渦を巻いた構造をとっていることが明らかとなった。このことは、神経回路上を伝搬していく神経活動も同様な渦巻きパターンを取っていることを示唆するものである。またこれと並行して、分子モーターの遺伝子改変により神経細胞の回転運動パターンを操作する技術を開発し、本来右回転である神経細胞を逆の左回転にすることが可能となりつつある。

(2) 詳細

研究テーマA: 脳の構造的左右非対称性の形成メカニズムの解明

このテーマでは、これまで培養細胞でしか報告されていない神経突起の一方向旋回とそれに起因する左右非対称な神経回路が脳に存在する証拠を見出すことを目的として研究を行ってきた。本研究において、「神経細胞の右ねじ回転運動特性が神経回路の左渦巻き非対称構造を生み出す」との新たな仮説を提唱した。主に着目した系は脳梁投射を始めとする交連投射系である。脳梁線維は正中線を挟んで左右対称な領野間を相反的に結ぶとされるが、神経突起が層境界部での接着性の差により脳表面からみて左旋回すると想定し、回路全体が反時計回り(左巻き)方向に捻じれて左右非対称な構造を取ると予想した。

この仮説を検証するために、様々な神経トレーサー等を用いて軸索投射を標識し、軸索走行パターンを可視化し、反時計回りに捻じれた構造を取ることを見いだした。本研究で発見した神経回路の左渦巻き構造は、全く新規の概念であるが、神経細胞の回転運動から理論的に予想された構造と一致するものであった。さらに、非対称性の詳細な定量的解析を行うことを目的として、軸索標識した脳の3次元画像に対して、輝度勾配をベースにした構造テンソルを計算し、その固有ベクトルから線維の方位を検出し、神経線維の曲率を求めて、線維をトラッキングし、神経走行パターンを数値化する方法を開発した。

研究テーマB: 脳の機能的左右非対称性の発現メカニズムの解明

研究テーマ A の研究により左渦巻き構造をとることが分かった脳梁投射系を対象として、神経活動が左渦巻き方向の伝搬特性をもつかどうか解析することを目的としている。高い時間分解能で神経活動の空間的伝搬特性を解析するための手法として、膜電位感受性色素による光学的計測を選択し、大挑戦型の延長期間において、膜電位計測システムを導入した。In vivo イメージングによりマウス大脳皮質の膜電位を計測し、その時空間的伝搬パターンを解析する手法を確立しつつある。現在、この手法を用いて神経活動の伝搬特性、特に旋回パターンを数値的解析し、詳細を明らかにしようとしているところである。

研究テーマC: 神経細胞の回転・旋回運動と脳の左右非対称性との因果関係の解明

本テーマでは、まず、培養下の神経細胞の回転・旋回運動を計測するタイムラプスイメージング法および運動パターンを解析する手法を開発した。ピエゾドライブを用いた高速3次元タイムラプス顕微鏡システムを用いて、神経突起先端の成長円錐の微分干渉像の高速度断層撮影を行った。得られた微分干渉画像に対して、フーリエ変換の一種であるリース変換を適用して位相情報に輝度情報に変換し、線形的に扱える形式にした。変換画像を重ねあわせることにより3次元動画像を構築し、成長円錐の詳細な動きを可視化することに成功した。さらに、上記の構造テンソル解析法による方位検出とオプティカルフロー解析法による速度ベクトルの検出を組み合わせ、成長円錐を構成するそれぞれのフィロポディアがどの方向を向いていて、どのように動いているのか、という点について詳細に記述し、運動パターンを数値的に解析する手法の開発を行った。大挑戦型延長期間においては、これら数値解析の手法を改良し、神経成長円錐の形態・運動様式を高精度で高速に解析する方法を開発した。また、神経細胞だけでなく細胞運動全般に幅広く応用できるように改良した。本成果は、多次元の顕微鏡画像データから、恣意性を交えることなく、客観的に物体の形態・運動を解析する手法を提案するものである。

さらに、モーター分子の遺伝子改変により、培養神経細胞の回転運動を阻害・亢進・逆転する制御方法を開発した。具体的には、回転を駆動する分子であるミオシン V の分子構造を変化させて神経細胞の回転特性を操作することを目指した。9アミノ酸よりなる α ヘリックスの挿入によりネックを180度捻じると想定される改変分子を作成し、それを神経細胞に過剰発現させる実験を行った。その結果、本来なら一方向に右回転するはずのフィロポディアが右回転と

左回転を交互に繰り返すという現象が観察された。この現象は、内在性の正常分子による右回転と過剰発現させた改変分子による左回転の拮抗状態を反映しているのではないかと解釈される。この研究成果は、「モーター分子の立体構造がモーターのらせん運動性を決定し、それが神経細胞の回転運動の特性を決定する」という新しい知見をもたらすものであり、生物物理学の分野として重要な発見である。さらに、この手法を用いて、神経細胞の回転運動を自在に制御することが可能となり、回転運動と非対称性形成の因果関係を実験的に検証する道が開けた。

3. 今後の展開

本研究成果により、これまで根拠なく左右対称であるとみなされてきた脳内の神経回路が実は左右非対称であり、左巻き(反時計回り)に渦を巻いた構造をとっていることが明らかとなった(研究テーマ A の成果)。この事実は、神経回路上を伝搬していく神経活動も同様な渦巻きパターンを取っていることを示唆するものである(研究テーマ B の成果)。従ってこれらの研究成果は、「神経回路と神経活動パターンの左渦巻き構造が、左半球での言語機能や右半球での空間操作機能などの左右半球に特化した機能の発現の源泉となっている」との仮説を支持している。この仮説を基にして研究を進めることで、左右半球での機能分化のメカニズムに迫ることができる。また、分子モーターの遺伝子改変により神経細胞の回転運動パターンを操作する技術を開発し、本来右回転である神経細胞を逆の左回転にすることが可能となりつつある(研究テーマ C の成果)。分子から細胞レベルで確立した技術を個体レベルに応用し、「分子モーターの遺伝子を個体レベルで操作することで脳の左右を逆転させる」ことが可能になり、脳の左右非対称性の解明に貢献できると考えられる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

さきがけ研究期間においては、実験手技的に関して試行錯誤した面はあるが、当初設定した研究のねらいからは外れることなく研究を進めることができた。研究テーマ A の脳の構造的非対称性に関しては、軸索走行が反時計回り(左巻き)方向に捻じるという新規の現象を見いだすことができた。当初は見た目の印象でしか議論ができないような曖昧なデータであったので、走行パターンを数値化する手法の開発を行った。これにより定量的で科学的な議論を可能にすることができたと考えられる。研究テーマ B の機能的非対称性に関しては、なかなか研究を進展させることができなかったが、延長期間において神経活動の伝搬特性の解析手法をほぼ確立することができた。研究テーマ C に関しては、モーター分子改変により、神経細胞の回転運動を細胞レベルで制御する手法が確立できている。課題全体としては、定量的議論をするために実験手法の開発に立ち返る必要性が出て、さらにその開発が予想以上に困難で時間を要したことから、当初計画したスピードで研究を進めることが難しかった。しかし現在、技術的な問題はほぼ解決できているので、今後は脳の左右非対称性の解明とその制御に向けて研究を進展させていく予定である。また、本課題の研究遂行での必要性から副産物として新たな技術(微分干渉観察法で物体を3次元可視化する技術、構造テンソルにより物体の形状を解析する技術、オプティカルフロー解析により物体の運動を解析する技術)を開発するこ

とができた。これらの新技術は、多次元バイオイメーjingの分野において、有用な解析技術として利用されるものと期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

脳の形態はほぼ左右対称であるが、機能的には非対称である。たとえば、ヒトでは左大脳半球に言語機能、右半球に空間操作機能などが優位に局在する。本研究は、自ら提案した「らせん分子モーター駆動による神経細胞の回転・旋回運動」という新規の概念を切り口として、脳の構造的・機能的左右非対称性の形成・発現メカニズムを分子・細胞・神経回路・個体の各階層において理解することを目的としている。

研究目的はほぼ達成され、新しい概念に基づいて困難な目標に挑み、それに成功したことを高く評価したい。3年間の研究で基本的な道筋について立証したが、その詳細な証明にはさらに2年間の大挑戦課題としての延長期間が有効に活用された。

本研究で脳内神経回路が左右非対称であり、左巻き(反時計回り)に渦を巻いた構造をとることを明らかとした。この研究の過程で分子モーターの遺伝子改変により神経細胞の回転運動パターンを操作する技術を開発し、本来右回転である神経細胞を逆の左回転にすることを可能とした。

挑戦的な研究であるため、その過程で種々の新しい実験手技を開発した。研究テーマ A の脳の構造的非対称性に関しては、軸索走行が反時計回り(左巻き)方向に捻じるという新規の現象を見出した。定量的検討のため走行パターンを数値化する手法を開発した。研究テーマ B の機能的非対称性に関して、延長期間において神経活動の伝搬特性の解析手法をほぼ確立した。研究テーマ C に関しては、モーター分子改変により、神経細胞の回転運動を細胞レベルで制御する手法を確立した。課題全体としては、定量的議論を行うために実験手法を開発し、技術的な問題はほぼ解決できた。

本研究の成果等を踏まえ、本研究者は科研費「挑戦的萌芽研究」(形態形成の全自動数値解析法の開発と神経細胞のキラル構造とらせん運動への適用)が採択された。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Torigoe M, Yamauchi K, Tamada A, Matsuda I, Aiba A, Castellani V, Murakami F (2013)
Role of neuropilin-2 in the ipsilateral growth of midbrain dopaminergic axons.
Eur J Neurosci.37,1573-1583.
2. Takemoto M, Hattori Y, Zhao H, Sato H, Tamada A, Sasaki S, Nakajima K, Yamamoto N (2011)
Laminar and areal expression of Unc5d and its role in cortical cell survival.
Cerebral Cortex 21(8):1925-1934.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

玉田篤史

神経成長円錐の3次元イメージングとキネマティクス解析

シンポジウム「神経・血管の発生と新生:多角的アプローチで目指す未踏峰」

第121回日本解剖学会、郡山、2016

玉田篤史、五十嵐道弘

顕微鏡画像を用いた神経細胞の構造および運動の自動数値解析手法の開発

第38回日本神経科学大会、神戸、2015

玉田篤史

細胞運動の可視化・数値化技術の開発と脳の左右非対称性研究への応用

日本機械学会、第27回バイオエンジニアリング講演会、新潟、招待講演、2015

Tamada, A. and Igarashi, M.

Riesz transform-assisted differential interference contrast imaging: Application to three-dimensional kinematic analysis of the growth cone motility.

Society for Neuroscience 2014, Washington DC, USA, 2014

玉田篤史、五十嵐道弘

Riesz 変換微分干渉イメージング法の開発と成長円錐の3次元運動解析への適用

第37回日本神経科学大会、横浜、2014

Tamada, A. and Igarashi, M.

Riesz transform-assisted differential interference contrast imaging for three-dimensional visualization and quantitative analysis of asymmetric neurite extension and growth cone motility.

7th Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Forum of Neuroscience, Milan, Italy, 2014

玉田篤史、村上富士夫

成長円錐の走行制御と神経回路形成

脳神経科学イラストレイテッド(第3版)、第3章-4、羊土社、2013

玉田篤史、五十嵐道弘

成長円錐フィロポディアおよび神経突起の非対称性回転運動の起源

第35回日本神経科学大会、横浜、2012