

「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」
平成22年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

大木 研一

九州大学大学院医学研究院・教授

大脳皮質の機能的神経回路の構築原理の解明

§1. 研究実施体制

(1) 大木グループ

① 研究代表者:大木 研一(九州大学大学院医学研究院、教授)

② 研究項目

二光子イメージングによる大脳皮質の機能的神経回路の解析

(2) 田川グループ

①主たる共同研究者:田川 義晃(京都大学大学院理学研究科、講師)

②研究項目

光遺伝学による神経活動操作技術の確立

§2. 研究実施内容

テーマ②:機能的局所回路の発生-クローン説(大木グループ)

げっ歯類の視覚野には、高等哺乳類に見られる機能コラムが存在せず、異なった方位選択性を持つ細胞が、混ざり合って存在しているが、このような構造が形成されるメカニズムは不明であった。また、個々の神経細胞の機能がどのようにして決まるのか、遺伝的に決まるのか、それとも生後の神経活動に依存して決まるのかについて、長らく議論が重ねられて来たが、胎児期の発生様式の神経細胞の機能への影響については不明であった。

Rakicらにより、大脳皮質のミニコラムは、単一の神経幹細胞から分化した神経細胞からなるのではないかと提案されてきた。げっ歯類では、単一神経幹細胞の子孫が比較的広い範囲に疎に分布する(Cepko, Walsh 1992)。この発生様式と、異なった方位選択性を持つ細胞が混ざり合って存在していることに、関係があるのだろうか。最近、興味深い知見が報告された。単一の神経幹細胞の子孫は、成熟した大脳皮質で、お互いに特異的に結合していることが示された(Yu et al., 2009)。このことから、げっ歯類の大脳皮質では、単一神経幹細胞から分化した細胞は、同じ方位選択性を持つかもしれないと仮説を立てた。このことを検証するために、二光子イメージングに分子遺伝学的な手法を組み合わせる。ごく少数の神経幹細胞の子孫の細胞がすべて蛍光タンパクで標識されているマウスを用いて、蛍光タンパクで標識された細胞の方位選択性が類似しているかどうかを、二光子カルシウムイメージングで検証する。

TFC.09 マウス(Cre を自発的に発現するマウス) x Ai14 マウス(Cre による組換えで tdTomato を発現するマウス)、または Z/EG マウス(Cre による組換えで GFP を発現するマウス)で、組換えを少数の神経前駆細胞にだけ起こさせ、単一の神経前駆細胞の子孫を蛍光タンパク(tdTomato または GFP)で標識することに成功した。2光子カルシウムイメージングを用いて、蛍光タンパク陽性細胞と陰性細胞の視覚反応を計測し、方位選択性を比較したところ、同じ前駆細胞から分化した陽性細胞の過半数は、類似した方位選択性を示していたが、残りの細胞は異なる方位選択性を持っていた。陽性細胞同士のペアと、陽性細胞と陰性細胞のペアを比較したところ、前者のペアのほうが方位選択性が類似していた。以上より、どの前駆細胞から分化したかが、視覚野の神経細胞の方位選択性に影響を及ぼすことが示唆された。また、どの前駆細胞から分化したかによって方位選択性が完全に決定されるのではなく、その後の過程も影響を及ぼすことが示唆された。

以上をまとめて、論文を発表した¹⁾(Ohtsuki et al., 2012)。

テーマ③:機能的局所回路の発生-活動依存説(大木グループ・田川グループ)

テーマ③では、方位選択性が生後発達段階での活動に依存して決定されるかどうかを検証したい。勿論、細胞系譜によって反応選択性が概ね決まっているところに活動によって修飾を受ける可能性はあるので、テーマ②と③の仮説は排反ではない。方位選択性が生後発達段階での活動に依存して決定されるかどうかを検証するため、発達期に活動を抑制する実験を行っている。内向き整流カリウムチャンネル(Kir2.1)を、子宮内電気穿孔法にて視覚野の興奮性細胞に遺伝子導入し、

生後発達期に一部の視覚野の細胞の活動を抑制して、それらの細胞の方位選択性の成熟に変化が見られるかどうかを調べ、神経活動が方位選択性の成熟に必須であるかを検討するとともに、どの時期の活動が重要であるかを検討する。

発達期に活動を抑制したときに、方位選択性の形成に影響があるかどうかを検証する実験を進めている。活動の抑制に内向き整流カリウムチャンネル(Kir2.1)を子宮内電気穿孔法にて遺伝子導入している。活動抑制を直接確認するため、2光子カルシウムイメージングを用いて、Kirを持続発現している神経細胞の視覚応答を調べたところ、大人のマウスの視覚野においても、それらの細胞の視覚応答はほぼ完全に抑制されていた。次に、Kirを発達期のみを発現させて、大人では発現を止めるために、Tet-Offシステムを導入し、Tet-Off前には十分な発現が得られ、doxycyclineによってTet-Offしたときに発現をほぼ完全に停止させられるための条件検討を行った。

Kirの発現によって、生後初期の大脳皮質ネットワーク活動(自発的神経活動)が著しく抑制されることを、2光子カルシウムイメージングで明らかにした。さらに、Tet-Offを用いて、誕生直前から生後2カ月目まで、遺伝子導入された細胞の活動を抑制し、その後doxycyclineを1週間投与してKirの発現を停止させてから、2光子カルシウムイメージングでそれらの細胞の方位選択性を調べたところ、予想に反して方位選択性が正常に形成されていることが明らかになった。

以上まとめると、Kirの発現により、生後初期の自発的神経活動と、開眼後のKirを発現した細胞の視覚応答が、大きく抑制されたのにも関わらず、方位選択性が正常に形成されたことになり、方位選択性の形成・発達は神経活動に依存しないのではないかと考えられた。来年度中に論文投稿の予定。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Ohtsuki G, Nishiyama M, Yoshida T, Murakami T, Histed M, Lois C, Ohki K. (2012) Similarity of visual selectivity among clonally related neurons in visual cortex. *Neuron*. 75: 65-72. (DOI: 10.1016/j.neuron.2012.05.023)
2. Hayashi Y, Tagawa Y, Yawata S, Nakanishi S, & Funabiki K. (2012) Spatio-temporal control of neural activity in vivo using fluorescence microendoscopy. *Eur. J. Neurosci.*, 36, 2722-2732. (DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08181.x.)
3. Hagihara KM, Ohki K. (2013) Long-term down-regulation of GABA decreases orientation selectivity without affecting direction selectivity in mouse primary visual cortex. *Front. Neural Circuits*. 7: 28: 1-11. (DOI: 10.3389/fncir.2013.00028)
4. Bando Y, Hirano T & Tagawa Y. (2012) Dysfunction of KCNK potassium channels

impairs neuronal migration in the developing mouse cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, bhs387. (in press)