

「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」

平成 16 年度採択研究代表者

ヘンシュ 貴雄

独立行政法人 理化学研究所脳科学総合研究センター・グループディレクター

臨界期機構の脳内イメージングによる解析と総合的解明

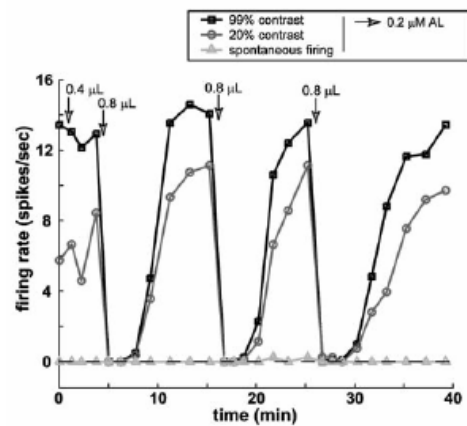
1. 研究実施の概要

哺乳類の中枢神経系は出生時には未熟で、生後発達初期の経験に応じて神経回路を改変しながら脳機能を発現していく。本研究では、特定の細胞群を直接操作できるアデノウイルス技術を開発し、可塑性に必要な抑制性介在細胞を同定し、また、それに誘導される形態的变化を可視化し、その分子機構(プロテアーゼ、テレンセファリン)の解明を目指している。これまでに、神経回路の再構築を可視化するために、本 CREST で購入した2光子レーザー顕微鏡を立ち上げるとともに、樹状突起フィロポディアの形成・維持を促進する分子としてテレンセファリンを同定し、その機能を明らかにした。今後、各種トランスジェニックマウス及びキンカチョウを用いて、生きている脳で臨界期(感受性期)の終了過程で生じる神経回路の再編成過程を可視化し、臨界期のメカニズム解明を目指す。

今後、細胞特異的操作をマウス、キンカチョウに応用する新技術の開発を以下の通りに進める：

1. 臨界期に関する抑制ニューロンの制御メカニズムを形態的に解明するアプローチとして、これまでの蛍光アデノウイルスの信号強度を強化する努力をする。本 CREST で購入した2光子レーザー顕微鏡を用いて、生きた抑制性細胞のイメージングによる臨界期メカニズムの解明を目指す。
2. 樹状突起フィロポディアの形成・維持におけるテレンセファリンの重要性を明らかにし、引き続き臨界期可塑性への影響を調べる。本 CREST で購入した2光子レーザー顕微鏡を用いて、生きた興奮性細胞のイメージングによる臨界期メカニズムの解明を目指す。

3. 臨界期に関する抑制ニューロンの制御メカニズムを機能的に解明するアプローチとして、**flox⁻** allatostatin 受容体 (AlstR) マウスモデル (Salk 研、Goulding 氏提供) 胎児への **Cre**-アデノウイルス局所注入と生後における電気生理学的解析を行う。このシステムでは、層・細胞特異的に神経活動を一過的に中断することにより、臨界期の発現に係わる個々の大脳細胞の役割を調べることが可能となる。(右図、Tan ら *Neuron* 2006より改編)



4. キンカチョウの歌学習で GABA 細胞の役割を明らかにし、マウスと異なった動物種で、臨界期に関する新しい概念を確立するため、多光子 Ca^{++} イメージングを行い、囀り学習の神経基盤を同定する。
5. 他の課題に比べ基礎研究に特化している本研究では、臨界期 (感受性期) そのもののメカニズム解明を目指し、本領域の主旨である「ヒトの学習・教育への応用」の基礎として貢献できるよう、自閉症動物モデルの臨界期可塑性を測定し、それらの異常の治療を試みる。特に、**CAPS2** 遺伝子欠損マウス (理研、古市氏提供) を電気生理学的、形態学的に調べる。また、ハーバード大学・ボストン小児病院におけるさらなる自閉症動物モデルの解析を試みる。

2. 研究実施内容

ヘンシュ研究グループ

哺乳類の視覚経路は出生時には未熟で、生後の発達初期に自己の経験を通じて急速に脳機能を発現していく。これら受容野特性の発達メカニズムは依然として不明である。発達期の脳内では、抑制性神経回路網が興奮性神経のシナプス可塑性に重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、この Parvalbumin(PV)陽性介在神経が、どのようにして脳の可塑性を制御しているかは、多くの技術的困難に阻まれ、詳細は明らかにされていない。そこで、マウス大脳視覚野の *in vivo* 単一細胞内記録手法を確立し、個々の細胞に対する入力・出力を同時に比較することで、眼優位性が大脳視覚野の神経細胞内で増幅されることを明らかにした。さらに、GABA受容体の阻害剤を細胞内注入し、眼優位性の形成にダイナミックな抑制性細胞への入力可塑性が不可欠であることが分かり、今後より正確な大脳局所神経回路の数理モデルの作製を可能とする。

Hessler 研究グループ

2光子によるイメージング法によって、トリの歌生成に関わる運動制御核HVCの神経活動を測定し始めた。聴覚刺激の提示によって、細胞内カルシウム濃度が増加し、神経活動が上昇していることを見出した。イメージング法の更なる改善を行い、個々のトリの聴覚刺激に対する神経活動が、発達に伴ってどのように変化するか、今後観察していく。

橋本研究グループ

発達期の脳内では、抑制性神経回路網が興奮性神経のシナプス可塑性に重要な役割を果たしていることが知られている。特に、PV陽性の抑制性介在神経(GABA作動性)は、多種存在する抑制性介在神経全体の50%以上を占め、眼優位性の獲得過程における臨界期出現・維持・終了に大きく関与していることが示された。しかし、このPV陽性介在神経が、どのようにして脳の可塑性を制御しているかは、多くの技術的困難に阻まれ、詳細は明らかにされていない。そこで、本研究では、アデノウイルスベクターを用いて、PV陽性細胞の可視化・PV陽性細胞への機能遺伝子の導入技術の確立を試みた。側脳室の脳室体から発生してくる大脳皮質の錐体細胞とは異なり、抑制性介在神経はganglionic eminence (GE)から発生してくることが知られている。アデノウイルスベクターを用いて抑制性介在神経へ遺伝子を導入するためには、アデノウイルスベクターをGEに感染させる必要がある。そこで、マグネット粒子を付着させたアデノウイルスベクターの作製を行った。これは、脳室内に注入したアデノウイルスベクターを脳の外から磁石で制御し、アデノウイルスベクターを局所(GE)に感染させようという試みである。この技術を用いることによって、アデノウイルスベクターを局所的に感染させることが可能となり、GEから発生してくる介在神経へ遺伝子を導入することが可能となった。また、今日の神経科学の大きな発展をもたらしたのは、遺伝子改変動物(トランスジェニックマウス、ノックアウトマウス)によるところが大きい。遺伝子改変動物は、神経機能を解析する上で必須であるが、歌学習において脳の可塑性が観察できるキンカチョウの遺伝子改変動物を作製することは不可能である。そこで、アデノウイルスベクターを用い、キンカチョウの神経核へ遺伝子の導入を試みたところ、アデノウイルスベクターによって、キンカチョウの神経細胞へ遺伝子導入が可能であることが判明した。これらの成果を、ヘンシュ研究グループならびにヘスラー研究グループへ提供することにより、抑制性介在神経による局所神経回路網が脳の可塑性をどのように制御しているかを、より詳細に解析できるものと考えられる。

吉原研究グループ

本年度は脳の柔らかさを調節する細胞接着分子テレンセファリンの細胞内領域に結合し、その樹状突起フィロポディア形成機能を担うシグナル伝達分子の探索を、酵母two-hybridスクリーニングにより行った。その結果、ERMファミリーアクチン結合蛋白質群(Ezrin/Radixin/Moesin)がテレンセファリン細胞内領域の膜近傍アミノ酸配列に結合することを発見した。テレンセファリンとERMファミリー分子の結合は、表面プラズモン共鳴法による蛋白質直接相互作用の反応速度論的解析、テレンセファリン誘導発現 N2a 細胞の免疫染色による共局在解析及び免疫沈降法による複合体

形成解析によって確認された。活性化型リン酸化 ERM 蛋白質が海馬初代培養神経細胞の樹状突起フィロポディアに局在することを見出した。さらに、海馬神経細胞に恒常的活性型 Ezrin を強制発現させると樹状突起フィロポディア数の増加が、逆に siRNA によって ERM 蛋白質発現を抑制すると樹状突起フィロポディア数の減少が観察された。以上の結果から、発達期の神経細胞における樹状突起フィロポディアの形成は、テレンセファリンと ERM 蛋白質の相互作用によって調節されていると考えられる。

3. 研究実施体制

(1) ヘンシュグループ

- ①研究者名:ヘンシュ 貴雄 (理化学研究所)
- ②研究項目:大脳皮質における臨界期可塑性の形態的イメージング

(2) Hessler グループ

- ①研究者名:Neal A Hessler (理化学研究所)
- ②研究項目:発声行動学習における GABA 細胞と形態的可塑性

(3) 橋本グループ

- ①研究者名:橋本 光広 (理化学研究所)
- ②研究項目:アデノウイルスベクターを用いた、マウス胎仔脳の局所的遺伝子導入技術の開発

(4) 吉原グループ

- ①研究者名:吉原 良浩 (理化学研究所)
- ②研究項目:樹状突起スパイン形成過程におけるテレンセファリンの役割

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Furutani, Y., Matsunok H., Kawasaki, M., Sasaki., T., Mori, K. and Yoshihara, Y.: Interaction between telencephalin and ERM family proteins mediates dendritic filopodia formation. J. Neurosci., 27 (33), 8866-8876 (2007)