

「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

H23 年度 実績報告

伊藤啓

東京大学分子細胞生物学研究所・准教授

感覚情報を統合する高次神経の回路構造と機能のシステム解析

§1. 研究実施体制

(1) 伊藤グループ

① 研究代表者: 伊藤啓 (東京大学分子細胞生物学研究所、准教授)

② 研究項目

- ・視覚・嗅覚・聴覚・味覚の低次感覚中枢からの投射神経経路と機能の解析
- ・体性感覚中枢の同定と投射マップの構造機能解析
- ・脳全体の神経回路のプロジェクトーム解析
- ・行動制御神経の同定とその入力領域に投射する感覚情報の解析
- ・新規の遺伝子発現誘導システムの構築

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

【視覚・嗅覚・聴覚・味覚の中枢とそこに投射する神経の解析】

我々は従来からショウジョウバエの視覚系・嗅覚系・味覚系・聴覚前庭覚等の感覚中枢の構造と、各中枢内部の機能分担様式を解析してきた。今年度はこれまでの研究を発展させ、まとめる形で、いくつかの成果を発表できた。まず嗅覚系に関しては、助教の遠藤が続けてきた研究を完成させ、一次嗅覚中枢に投射する嗅覚感覚神経が感覚器のタイプごとに特異的に投射するメカニズムの一端を解明した。これは、ひとつの母細胞から最大4つの異なる嗅覚細胞が形成される過程で、3回の細胞分裂のたびに同じ Notch タンパクによる非対称制御を繰り返して受けていること、また同じ分化シグナルを受けるにもかかわらず異なる細胞腫への分化が惹き起こされる理由として、ヒストンの配置変化によるエピジェネティックな制御が行われていることを示したものである²⁾。

また、アイルランドおよびインドのグループと共同で、我々が同定した嗅覚1次中枢のGABA介在神経が匂い刺激への馴化反応に中心的役割を果たすことを³⁾、フランスおよびドイツのグループと共同で、我々が同定した嗅覚2次中枢(キノコ体)と周辺脳領域を結ぶ神経が匂い記憶の取り出し過程に必須であることを⁴⁾、それぞれ見いだして発表した。さらにアメリカのグループと共同で、視覚2次中枢に見られる特徴的な構造が嗅覚1次中枢の糸球体と構造的にも機能的にもよく類似していることを発見して発表した⁵⁾。

【高精度な神経連続断層像を効率よく作成する態勢の確立】

我々はこれまで遺伝子発現パターンに応じて神経を特徴的にラベルする4,000以上の発現誘導システムのスクリーニングを利用して、感覚中枢の構造と、そこに存在する様々な神経の投射構造や機能を解析してきた。これまでは、全システムについて未固定の脳標本を撮影した低解像度の画像データベースを作成し、調べたい神経をラベルしている可能性があるシステムをスクリーニングして、改めて抗体染色による高感度高解像の共焦点顕微鏡撮影と三次元画像解析を行ってきた。しかし高解像撮影の結果、ラベルされていたのが実は目的の神経でなかったり、低解像画像では見えなかった多数の神経が染まっていたり解析に使いにくかったりすることも多く、研究者の作業の多くが無駄になっていた。

4,000以上のシステムのうち、ある程度特異的なラベルが見られる1,500~2,000システムについて、予め高解像画像を取得してデータをプールし、研究者がシステムを解剖・染色することなくデータを眺めるだけである程度の解析ができるようにした方が、膨大な手間はかかるが長期的には効率的である。そこで解剖・染色・撮影・三次元画像構築の各ステップについて専門の技術員を養成し、今年度はLexA発現誘導システム300システムについて画像撮影を終えた。

また、蛍光ラベルした神経標本は暗いシグナルと明るいシグナルの差(ダイナミックレンジ)が非常に大きく、従来の共焦点レーザー顕微鏡では暗いシグナルを残さず記録しようとすると明るい部分が白く飛んでしまい、逆に明るい部分のシグナルが飛ばないように撮影すると暗い部分の信号が欠落してしまうという問題があった。露出を変えて撮影した明暗の画像を合成するHDR(ハイダイナミックレンジ)法を使えば、この問題は原理的には解決できる。しかし、150枚を越える連続切片画像で撮影中の蛍光の減衰を補正しながら、全切片について適切な一定の露出比率で複数

画像を撮影できるような共焦点顕微鏡は存在しなかった。そこでオリンパス社の技術者と協力して画像取得プログラムを改良し、全切片に渡って十分な画質の連続切片 HDR 画像を得られるようにした。(この機能はすでにソフトウェアアップデートによって全ユーザーに提供されている。)

【体性感覚中枢の構造の解析】

我々はこれまで視覚系・嗅覚系・味覚系・聴覚前庭覚の感覚中枢を解析してきたが、五感の残る 1 つである体性感覚については、我々を含め誰も昆虫脳では詳しく解析していなかった。一次体性感覚中枢の明確な場所すら、ほとんど分かっていない。体性感覚は他の多くの感覚種と統合される重要な感覚である。そこで脳と胸部神経節をつなぐ神経をラベルする系統を集中的にスクリーニングし、胸部からの神経が脳内のどこに投射するかを調べている。今年度は、上述のチームで撮影した LexA 系統群の脳標本写真の解析をほぼ終了し、胸部からの神経が 3 つのルートで投射し、脳の下部にあるいくつかの領域群に特異的に標的していることを見いだした。これらの領域が昆虫脳の 1 次体性感覚中枢と推定される。また、これらの領域のうちのひとつからは、脳の上部に向かって放射状の投射が伸びており、哺乳類脳の脊髄→視床→大脳皮質と同じような体性感覚伝導路の 2 段階の中継構造が、昆虫脳でも見られる可能性が高まってきた。次年度は、スクリーニングで得られた系統について胸部神経節の標本を作製して脳に投射する各神経の由来を調べるとともに、GAL4 系統群を利用してさらなる神経種の同定と、これらの神経のより特異的な神経ラベルの探索を進める。

【昆虫脳の構造と用語の統一的フレームワークの確立、アトラスの作成】

他の動物の脳と同様、昆虫脳でも、相同な神経や脳構造が研究者や動物種によって異なる名前で呼ばれていたり、定義が微妙に異なっていたりすることがある。また、ヒト脳よりも研究者人口がはるかに少ない昆虫脳では、従来から詳しく解析されてきた一部の領域以外では、脳構造の名前や境界の定義が確立していないことも多い。これらの問題を解決するため、2007 年から指導的な昆虫脳研究者を組織して、脳の構造と用語の統一的フレームワークを議論してきた。最終的に脳を 44 の領域に分割し、用語に混乱や矛盾が見られた 35 以上の課題について解決案を提示した。各用語について選定理由を説明し、脳の全領域にわたって今回統一的に命名された部位の構造を解説する図版をまとめた文書を作成し、投稿にまでこぎ着けた。

また、ショウジョウバエではこれまで 300 種類以上の神経種が同定・報告されているが、それらは様々な研究者の個々の論文に断片的に記述されており、すべての情報を網羅して閲覧する方法がなかった。この問題を解決するために開発を進めてきたデータベース Flybrain Neuron Database を完成させ、発表した¹⁾。

これらの作業をさらに発展させ、脳アトラスの作成作業を進めた。ショウジョウバエ脳は分子神経科学の分野で世界的に広く使われているにもかかわらず、これまで脳のアトラスが出版されていなかった。欧州の出版社との交渉がまとまって刊行の目処が付き、150 以上の図版をほぼ完成させた。引き続き解説文書の執筆を進めており、次年度には刊行予定である。

【細胞系譜にもとづいた神経ネットワークの解析】

脳細胞は限られた数の神経幹細胞によって形成される。ショウジョウバエ脳には片半球あたり約 100 個の神経幹細胞しかなく、それぞれの子孫は脳の特異的な領域に投射する。従って原理的には、それぞれの幹細胞に由来する 100 種類の神経細胞群が形成する神経投射のユニットを網羅

的に同定すれば、脳全体の神経投射の全貌(プロジェクトーム)を明らかにできる。従来投射構造が知られていたのはこのうち十数ユニットだけであった。多数の標本を比較した結果、最終的に102種類のユニットを同定した。

標本ごとに微妙に異なる脳のサイズや向きをコンピューターで三次元的に正規化して、個々の幹細胞に由来する神経ユニットの投射領域の重なりを調べた結果、これまで昆虫脳で活発に研究されてきたキノコ体や触角葉、中心複合体などの脳領域は実は少数のクローンからなる単純な構造を持っているのに対し、これまでほとんど研究されていない脳の上部や中部の領域は、はるかに多数のユニットから構成され、多数の脳領域との連絡が見られるという、一部の脳領域のみに着目した従来の研究手法では分からなかった新しい脳回路のネットワーク像が浮かび上がってきた。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Shinomiya K, Matsuda K, Oishi T, Otsuna H, Ito K. Flybrain neuron database: a comprehensive database system of the *Drosophila* brain neurons. *J Comp Neurol.* 519:807-833, 2011. (DOI 10.1002/cne.22540)
2. Endo K, Karim MR, Taniguchi H, Krejci A, Kinameri E, Siebert M, Ito K, Bray SJ, Moore AW. Chromatin modification of Notch targets in olfactory receptor neuron diversification. *Nat Neurosci.* 15:224-233, 2012. (DOI 10.1038/nn.2998)
3. Das S, Sadanandappa MK, Dervan A, Larkin A, Lee JA, Sudhakaran IP, Priya R, Heidari R, Holohan EE, Pimentel A, Gandhi A, Ito K, Sanyal S, Wang JW, Rodrigues V, Ramaswami M. Plasticity of local GABAergic interneurons drives olfactory habituation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:E646-654, 2011. (DOI 10.1073/pnas.1106411108)
4. Sejourne J, Placais PY, Aso Y, Siwanowicz I, Trannoy S, Thoma V, Tedjakumala SR, Rubin GM, Tchenio P, Ito K, Isabel G, Tanimoto H, Preat T. Mushroom body efferent neurons responsible for aversive olfactory memory retrieval in *Drosophila*. *Nat Neurosci.* 14:903-910, 2011. (DOI 10.1038/nn.2846)
5. Mu L, Ito K, Bacon JP, Strausfeld NJ. Optic glomeruli and their inputs in *Drosophila* share an organizational ground pattern with the antennal lobes. *J. Neurosci.* in press.

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)