

神経回路の形成機構 -光を用いて脳の形と機能を観る-

Probing the structure and function of the neural circuitry in the developing vertebrate brain

研究機構研究企画推進室, 理工学研究科生体制御学部門(兼任) 津田 佐知子
Research and Development Bureau, Graduate School of Science and Technology
Sachiko TSUDA

Abstract

During the development of the nervous system in vertebrates, the brain is formed through several processes such as neural tissue morphogenesis and the formation of functional circuitries. Defects in these processes are known to cause various types of brain disorders.

To elucidate the mechanisms of the brain development, we focus on the cerebellum, which is an ideal brain region to analyze neuronal circuitries due to its relatively simple and widely conserved structure, as well as to the accumulated information on its anatomy and physiology. Importantly, recent advances in the optical techniques allow for various approaches to examine structural and functional development of the cerebellum.

Here I will discuss the recent progress in terms of the following two topics; cellular dynamics and functional circuitry formation during cerebellar development in the zebrafish system, which is an excellent vertebrate model and to which I am now applying optical techniques.

1. 脳構築メカニズムへの光を用いたアプローチ

動物の活動の多くを制御する脳は、多数のニューロン(神経細胞)が結合した神経回路により構成されている。神経回路では、ニューロン間の情報伝達により、外界からの様々な知覚入力の処理や、運動や感情といった多様な出力が行われる。それでは、神経回路はどのように形作られ機能を持つのであろうか。脊椎動物の発生過程において、脳の前基はまず外胚葉の肥厚として形作られ、その後生まれた神経前駆細胞がダイナミックに移動し、ニューロンに分化した上で相互に結合することにより、機能を持った神経回路を形成する。この際には、複数の神経回路が集団(モジュール, 区画)を作って協調的に機能することで、脳における精緻な情報処理が可能となっていると考えられている。脳の機能を理解するには、この神経回路が担う情報処理のしくみ、そしてその成り立ちを知ることが重要であるが、その複雑さから未だ解明に至っていない。私は神経回路の構築メカニズムを明らかにするため、進化的に構造と機能が広く保存され、知覚と運動の情報統合による行動の精緻な制御、近年では認知機能への関与も知られる小脳に注目し、研究を行っている。

また、近年の光技術の発展により、蛍光タンパク質を用いた細胞の形や遺伝子発現の詳細解析に加え、ニューロンの活動を光により制御・記録することが可能となり(光遺伝学)、神経科学領域に革新がも

たらされている。私は、これらの光技術を、電気生理学的手法などと共に小型魚類ゼブラフィッシュに応用し、小脳神経回路の形態形成と機能発達の機構を研究している。

ゼブラフィッシュは、胚体が小さく透明で発生が速く、遺伝学的手法や行動観察が容易といった利点を持ち、発生学・神経科学研究に広く用いられているモデル脊椎動物である(図 1)。脳の基本構造と形成機構は、脊椎動物の間で共通であることから、よりシンプルなゼブラフィッシュの系を用い小脳神経回路形成機構の解明を目指している。

本稿では、これらの光を用いたアプローチの一端を、脳発生初期における神経前駆細胞の移動、発生後期における機能的神経回路の形成、という2点に注目して紹介する。

2. 脳領域形成における神経前駆細胞のダイナミックな移動

初期の脳形成における重要なイベントが「脳原基の領域形成」である。この際、神経前駆細胞から成る神経管は前後軸方向に前脳・中脳・後脳に区分けされ、それぞれ異なる機能をもつ脳領域に分化する。この中で後脳の前方がその後、小脳に分化する(図 1)。この領域形成には様々な遺伝子の関与が知られ、これらがネットワークを形成することが、領域の形成と維持、そしてその後の神経分化に重要であることが明らかとなってきた¹。一方、発生過程における形作りには細胞の移動が大きな役割を持つことが知られるが、脳領域形成における細胞集団の挙動の実態は、技術的限界などのため殆ど分かっていない²。

私は小脳形成に重要なシグナリングセンターである中脳後脳境界領域(Midbrain Hindbrain Boundary, MHB)に発現し、MHB 形成に関わる *gbx2* 遺伝子に注目し、その発現細胞の挙動を解析した。実際には、*gbx2* 発現細胞を緑色蛍光タンパク質で標識した遺伝子組換えゼブラフィッシュ³を用い、共焦点レーザー顕微鏡により *gbx2* 細胞の挙動を3次元的に経時観察した上、得られた4次元データを用い、細胞の軌跡を4次元的に定量解析した(図 2)。その結果、*gbx2* を発現する神経前駆細胞が、後脳の広い領域においてダイナミックな移動を示すこと、移動様式が有意に異なる3グループに分けられることが明らかとなった(図 3)。さらに、これらの異なる移動様式を示す *gbx2* 発現細胞はニューロンに分化し、その一部が小脳を構成することが分子・形態的に示された。これは、後脳の神経回路の著しい多様性を生み出すメカニズムの一端を示すものではないかと考えられる。現在、これらの細胞集団の、MHB 領域形成や小脳神経回路形成における役割を明らかにすべく解析を進めている。

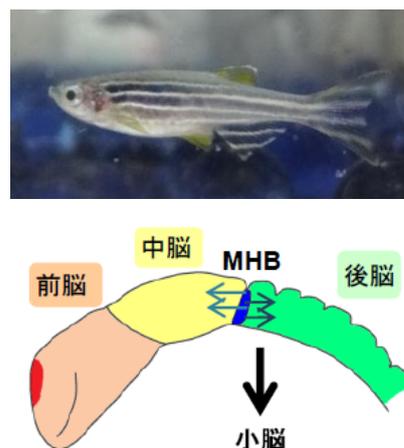


図 1. (上)ゼブラフィッシュ成魚。(下)脳領域形成の模式図。MHB: 中脳後脳境界領域。

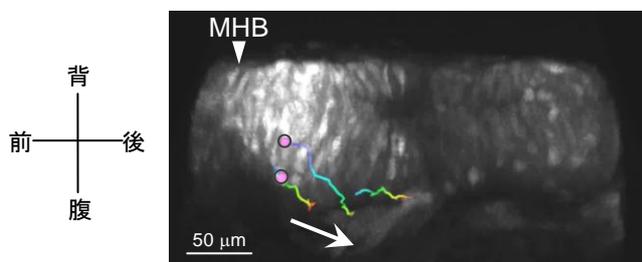


図 2. 中脳後脳境界領域(MHB)の後方域における、蛍光標識された *gbx2* 発現細胞の軌跡の例。3細胞について、細胞体の位置を円、移動方向を矢印で示した。

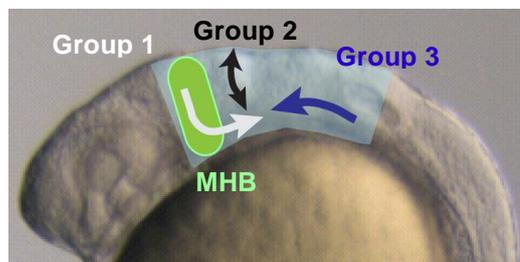


図 3. *gbx2* 発現細胞集団の移動パターンの模式図。写真はゼブラフィッシュ 20 時間胚。MHB:中脳後脳境界領域。

3. 光遺伝学を用いた小脳神経回路の形成機構

脳原基の領域形成に続き、神経回路の形成と機能の獲得が起きる。後脳に由来する小脳は、脊椎動物に広く保存された比較的単純な構造を持っており、回路解析のモデルとして、すでに解剖学・生理学的知見が蓄積している⁴。

ここで注目されるのは、小脳が示す区画構造である。例えば、小脳皮質からの出力を担うプルキンエ細胞に局在する **Zebrin** タンパク質は、皮質において帯状分布を示す(図 4)。この区画構造は進化的にも保存されており、近年これが小脳の機能単位(モジュール)として、その高速かつ精緻な情報処理に重要な役割を持つのではないかと考えられている⁵。しかし、小脳区画に関し、機能や神経回路との関係は未だ殆ど明らかとなっていない。

私達は、小脳における神経回路の形成メカニズムを、この区画構造に注目して機能的に明らかにするため、光遺伝学を用いて解析を行っている。光遺伝学は、光依存的なチャネルを特定のニューロンに発現させ光刺激を行うことにより、細胞種選択的な神経活動の制御が可能な新たな回路解析法である⁶。これまでに、光刺激と同時にニューロンの活動記録をイメージングにより行うことで、回路解析を強力に進めることが可能な解析システムを作成し(All Optical System, 図 5,6), マウス小脳における神経回路の構成を明らかにしてきた^{7,8}。このシステムを現在、光技術に適したゼブラフィッシュに用い、回路構築の解析を進めている(図 6)。

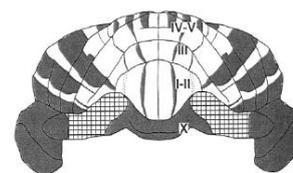


図 4. マウス小脳における区画(黒:Zebrin 帯)
(Hawkes and Herrup, 1995)

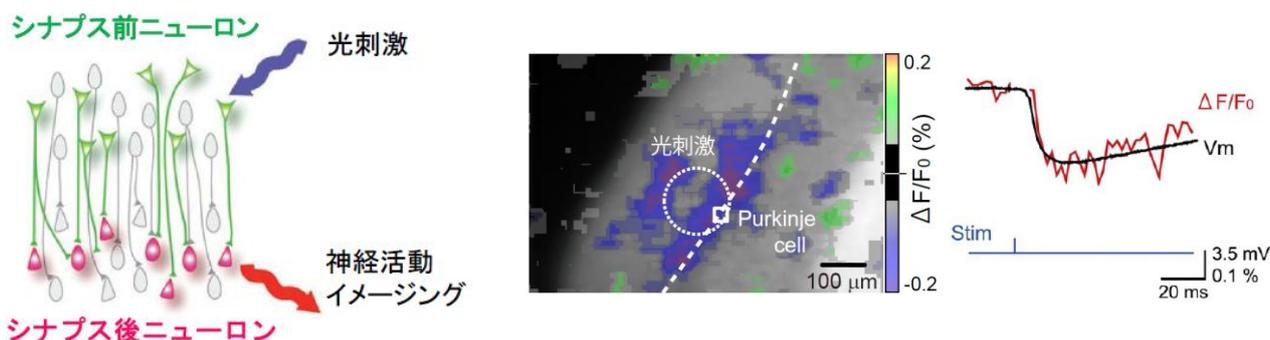


図 5. (左) All optical アプローチを用いた神経回路解析の模式図。(右) All Optical System により観察された、マウス小脳皮質の光刺激(白円)に伴う、プルキンエ細胞層(点線)での広い抑制性応答(左: 膜電位センサーイメージング, 右図中 $\Delta F/F_0$)。これは、電気生理学的に同時記録したプルキンエ細胞の膜電位変化(Vm)と一致する⁷(右)。

ゼブラフィッシュ小脳においては、比較的広い機能的領域の存在が示されているが、区画の知見は未だなく解析が待たれている⁹。このためまず、神経活動を蛍光シグナルにより記録できるカルシウムセンサー(G-CaMP)を小脳ニューロンに発現させ、発生段階における活動記録を行った。その結果、小脳内において、異なる活動パターンを示す領域が複数見出された。これはゼブラフィッシュ小脳における機能的区画の一部である可能性がある。さらに、その活動性を異なる発生段階において比較した結果、小脳形成の初期段階において一過的に活動が増大するという傾向が見出された。これは小脳神経回路の機能形成メカニズムの一端を示すことを示唆する。一方、小脳では抑制性ニューロンの役割が顕著であることから、

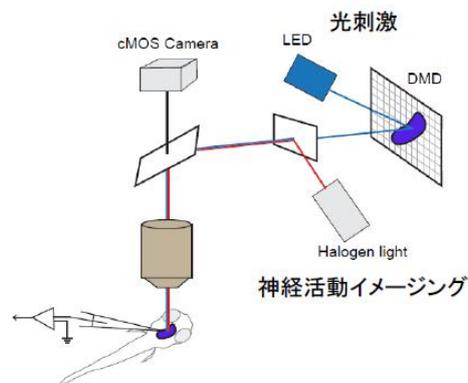


図 6. All Optical System の模式図

抑制性応答の計測も可能な膜電位センサーを発現する遺伝子組換えゼブラフィッシュ系統をすでに作成した。このように、興奮・抑制性両方のシグナルの記録と光刺激を組合せ、小脳における区画の構造と機能の連関を明らかにし、脊椎動物の知覚運動統合の神経基盤の理解を目指している。

4. まとめ

小型魚類ゼブラフィッシュの利点を生かした脳構築メカニズムの研究について、脳形成初期における細胞集団のダイナミクス、また後期における機能的な神経回路形成に焦点を当てて紹介した。本研究により、脳領域形成の細胞レベルでの理解と、脳の区画構築機構の理解に加え、その進化的考察、そして脊髄小脳変性症などの神経疾患の基盤の理解が進むと期待される。

本研究は光技術の発展の恩恵を受けたものであるが、さらに近年実用化されたLight sheet顕微鏡などを用いることで一層の進展が期待される。その一方、4次元データの定量解析には今後大きな開拓の余地があり、今後の課題といえる。

謝辞

本研究の遂行に当り以下の方々のご協力を頂いた。この場をお借りし感謝申し上げる。弥益恭博士、川村哲規博士、中井淳一博士、大倉正道博士、畠山晋博士(埼玉大学)、武田洋幸博士、島田敦子博士、岡良隆博士(東京大学)、小田洋一博士、日比正彦博士(名古屋大学)、George Augustine 博士(Duke-NUS Graduate Medical School)

参考文献

1. Kikuta, H., Kanai, M., Ito, Y. & Yamasu, K. *gbx2* Homeobox gene is required for the maintenance of the isthmus region in the zebrafish embryonic brain. *Dev Dyn* **228**, 433-450 (2003).
2. Langenberg, T. & Brand, M. Lineage restriction maintains a stable organizer cell population at the zebrafish midbrain-hindbrain boundary. *Development* **132**, 3209-3216 (2005).
3. Islam, M. E. *et al.* Three enhancer regions regulate *gbx2* gene expression in the isthmus region during zebrafish development. *Mech Dev* **123**, 907-924 (2006).
4. Ito, M. Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* **78**, 272-303 (2006).
5. Apps, R. & Hawkes, R. Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nat Rev Neurosci* **10**, 670-681 (2009).
6. Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* **8**, 1263-1268 (2005).
7. Tsuda, S. *et al.* Probing the function of neuronal populations: combining micromirror-based optogenetic photostimulation with voltage-sensitive dye imaging. *Neurosci Res* **75**, 76-81 (2013).
8. Kim, J. *et al.* Optogenetic mapping of cerebellar inhibitory circuitry reveals spatially biased coordination of interneurons via electrical synapses. *Cell Rep* **7**, 1601-1613 (2014).
9. Matsui, H., Namikawa, K., Babaryka, A. & Koster, R. W. Functional regionalization of the teleost cerebellum analyzed in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 11846-11851 (2014).