

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04659

研究課題名(和文)「誕生日タグづけ」という新戦略でひも解く神経構築原理

研究課題名(英文) The structural principle of neuronal circuits revealed by the neuronal birthdate tagging approach

研究代表者

平田 たつみ (Hirata, Tatsumi)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・教授

研究者番号：80260587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規技術は、新たな視点を提供し、新たな発見をもたらす。本研究では、代表者が開発した神経細胞の「誕生日タグづけ」という新規技術を用いて、神経系の構築原理を探った。この技術のねらいは、「誕生日」という古典的な神経細胞分類法を、現代神経科学に応用することである。「誕生日」による分類を、神経活動操作や軸索終末トレースなどの発展的技術にシームレスに繋げることができる。本研究では、この新規技術が最も真価を発揮すると予想される1.二次嗅覚系、2.網膜視覚系、3.脳幹網様体系、の3つを取り上げて解析した。本報告書では、そのうち特に大きな成果をあげた二次嗅覚系に的を絞って説明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

並列処理は感覚情報処理の基本である。例えば視覚系は、眼で受け取られた視覚風景の中から「色」「線の傾き」「動き」といった異なる特徴を抽出して並列処理することで、エッジの効いた属性情報へと転換し、我々が「物をどう見るべきか」を一義的に決めている。本研究では、代表者が新規開発した「誕生日タグづけ法」を用いることで、嗅覚系にも並列回路が存在することを明らかにした。この結果は、動物が、同一セットの匂い情報の中から、何らかの特徴を抽出し強調して、異なる出力へとつなげる複数のチャンネルをもつことを意味している。今後「誕生日タグづけ法」を利用して、嗅覚がもつ複数のチャンネルの機能的意味に迫りたい。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the structural principle of neuronal circuits by making use of a new technique, "neuronal birthdate tagging", which was recently developed by our group. The aim of this technique is to adapt the traditional neuronal classification based on neuronal birthdates to modern neuroscience. With the help of this technique, we can take various advanced approaches such as manipulation of neuronal activities or axon tracing, specifically targeted to a particular neuronal subtype that is defined by the neuronal birthdate. I adapted this technique to three neuronal circuits, 1) central olfactory system, 2) visual system, 3) brain stem reticula formation, all of which are expected to benefit from the neuronal birthdate tagging technique. In this report, I focus on the results obtained in the central olfactory system.

研究分野：神経科学

キーワード：誕生日タグづけ マウス 神経発生 嗅覚系

## 1. 研究開始当初の背景

終末分化状態にある神経細胞にとって、その誕生日、すなわち最終分裂を終えたタイミングは特別な意味を持つ。その最もわかりやすい例は脳新皮質細胞だろう。誕生日に従って、細胞体の層分布が決まり、結合相手や電気化学的性質までも未来永劫的に決まってしまう。このような誕生日依存的な運命決定は、他の神経細胞でもごく一般的に観察される現象であり、DNA 前駆体アナログを用いた誕生日標識が、神経細胞の分類にしばしば用いられる所以でもある。また、運命決定とはいかないまでも、分化のタイミングが神経回路の選択性に影響する場合も考えられる (Hirata & Iwai, 2019)。例えば、誕生日の似通った神経細胞同士は、シナプス結合に最適な分化タイミングも一致するため、相互に連結しやすいと予想されている。つまり、神経細胞の誕生日は、神経細胞の機能的サブセットを規定するための有力な道具になる。

代表者は、神経細胞の誕生日依存的に遺伝子組換えを誘導する手法を開発した(図1)。神経分化に働く遺伝子の中には、神経細胞誕生直後に「一過的」に発現するものがいくつか知られている。これらの遺伝子群のエンハンサーを利用して、タモキシフェン依存型 Cre 組換え酵素 (CreER) の発現を駆動するトランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスにタモキシフェン(TM) 投与すると、その 6-12 時間前に最終分裂を終えた神経細胞特異的に、loxP 配列組換えをパルス誘導できる。異なる遺伝子エンハンサーを用いて作成した多系統の中から、強力に誕生日依存的組換えを誘導できる 4 系統を選びすぎた。各々の系統は、組換え酵素の発現領域の違いから得意とする神経領域が異なり、研究目的に応じて使い分けが可能である。

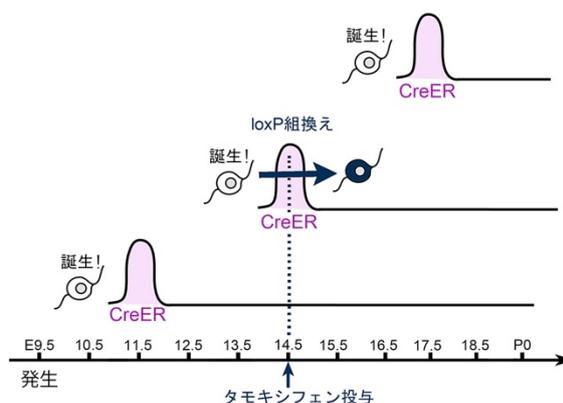


図1 誕生日タグづけシステムの原理  
神経細胞は誕生後 6-12 時間後をピークとして CreER を発現する。タモキシフェン(TM) 投与により、ちょうどその時点で CreER を発現している神経細胞でのみ loxP 配列の組換えが起きる。

## 2. 研究の目的

本研究では、この「誕生日タグづけ」システムを利用して、神経系の構築原理を探った。この手法の最大の売りは、神経細胞サブセットの分類に「新たな切り口」を提供できることである。良い分子マーカーが無いために手を拱いてきた神経集団の解析に威力を発揮できると期待される。本研究では、この新規技術が最も真価を発揮すると予想される 1.二次嗅覚系、2.網膜視覚系、3.脳幹網様体系、の3つを取り上げて解析を行った。本稿では、そのうち研究論文として発表した二次嗅覚系の解析 (Hirata et al. 2019) について報告する。

### 二次嗅覚系の誕生日タグづけ解析

鼻で受容された匂いの情報は、脳の嗅球へと伝えられ、ここで二次元的に整理された匂い地図として表現される。選別された匂い情報は、次に、嗅球の投射神経細胞によって、10 領域ほどに分類される二

次嗅覚中枢へと伝えられる (図3 参照)。ごく一部の中枢を除いて、この間の連絡にはトポグラフィックな対応関係は見つからず、基本的にランダムだと考えられている。すなわち、嗅球で展開された匂いの要素は、ほぼ全ての二次嗅覚中枢に拡散的に広がることが示されている。

二次嗅覚系における次なる疑問は、嗅球の投射神経細胞による投射先の違いである。投射神経細胞は細胞体の位置が異なるサブタイプに分類されている。大まかには、僧帽細胞 (mitral cell: MT) と房飾細胞 (tufted cell: TC) に二分され、房飾細胞はさらに internal, middle, external TCs と細分されている。各々細胞生理学的な違いが示されており、異なる機能を果たすと予想されるものの、良い分子マーカーがないためサブタイプごとの投射先や機能はよくわかっていなかった。本研究では、嗅球の投射神経サブタイプが異なる誕生日を持つことを利用して、「誕生日タグづけ法」によりサブタイプ特異的な標識をおこない、各サブタイプの軸索投射先を解析した。

### 3. 研究の方法

二次嗅覚系の解析には、「誕生日タグづけ」マウス4系統の中で  $Neurog2^{CreER}(G2A)$  が最も適していたためこれを使用した。「誕生日タグづけ法」では、嗅球以外の神経細胞でも遺伝子組換えが誘導されるため、脳の他の領域も標識されてしまい、二次嗅覚投射領域の観察の妨げになる。そこで、嗅球特異的プロモーター  $Cdhr1$  を用いて、 $loxP$  配列が組み換わると嗅球特異的にテトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tTA) が発現するトランス遺伝子を作成して使用した ( $Cdhr1^{tTA}$ )。これに、さらに、tTA 依存的に蛍光タンパク質を発現するレポーター遺伝子である  $TRE^{tdTomato-sypGFP}$  (JAX stock #12345) または  $ROSA26-TRE^{mGFP}$  (本研究で作成) を組み合わせ使用した (図2)。

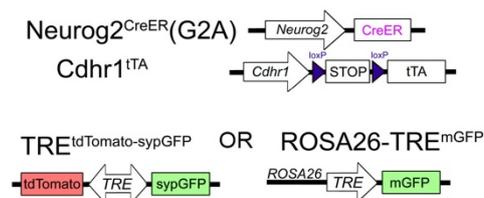


図2 二次嗅覚系の誕生日タグづけ解析のために用いた遺伝子組み合わせ

上記の3セットの遺伝子を持つマウスを交配で作出し、胎生 10.5 日目から 17.5 日目の間の任意の1時期に TM を注射して、その時期に誕生する嗅球神経細胞を特異的に標識した。標識したマウスが成長した後、標識された嗅球神経細胞のサブタイプの割合を計測し、それらの軸索の投射先を解析した。

### 4. 研究成果 (図3)

胎生 10.5 日目に TM を投与して嗅球を誕生日タグづけすると (TM10.5)、副嗅球 (accessory olfactory bulb: AOB) の投射神経細胞が主に標識された。標識された軸索は、lateral olfactory tract (LOT) の深層部を走り、bed nucleus of the accessory olfactory tract (BAOT), medial amygdala (MeA) および posteromedial cortical amygdala (PMCo) に投射していた。これら3つの領域は副嗅球投射神経の特異的標的として知られ、以下に述べる主嗅球からの軸索は侵入しないことが確認された。

胎生 12.5 日目に TM を投与して嗅球を誕生日タグづけすると (TM12.5)、主嗅球の僧帽細胞 (mitral cell: MT) が主に標識された。標識された軸索は、主嗅球の標的として知られる全ての二次嗅覚中枢に投射しており、拡散的にランダムに広がるといわれる二次嗅覚系のイメージそのものであった。しかし唯一の例外として、これらの軸索が侵入しない領域が見つかった。それは、これまでに報告がない嗅結節 (olfactory tubercle: OT) の前外側に位置する小さな領域であった (★印 図3)。

胎生 15.5 日目に TM を投与して嗅球を誕生日タグづけすると(TM15.5)、主嗅球の外側房飾細胞 (external tufted cell: eTC) が特異的に標識された。この軸索は、驚いたことに、非常に小さな2箇所の領域にのみ収束していた。ひとつは、前嗅覚(anterior olfactory nucleus: AON) の垂核の pars externa (pE) であった。もうひとつは、上記 TM12.5 で主嗅球の僧帽細胞の軸索が避けることが観察された OT の前外側領域であった(★印 図3)。

外側房飾細胞の特異的投射先であることがわかった OT の前外側領域は、これまでに特徴づけられたことがない未知の領域であったので、さらに解剖学的な解析を行った。ここには神経細胞のクラスターがあり、神経核様の構造が確認された。ここの神経細胞は、ドパミン受容体 D1R や DARPP-32 を発現するが、D2R は発現しておらず、線条体直接路細胞との類似性が示された。この細胞集団に順行性軸索トレーサーを注入して投射先を検討したところ、OT の後深層部の神経細胞と局所回路を作ることが示唆された。また、この OT の前外側領域は、嗅球の全ての領域の外側房飾細胞からの入力を受けており、小さいながらも嗅球の完全な地図情報を含むと考えられた。

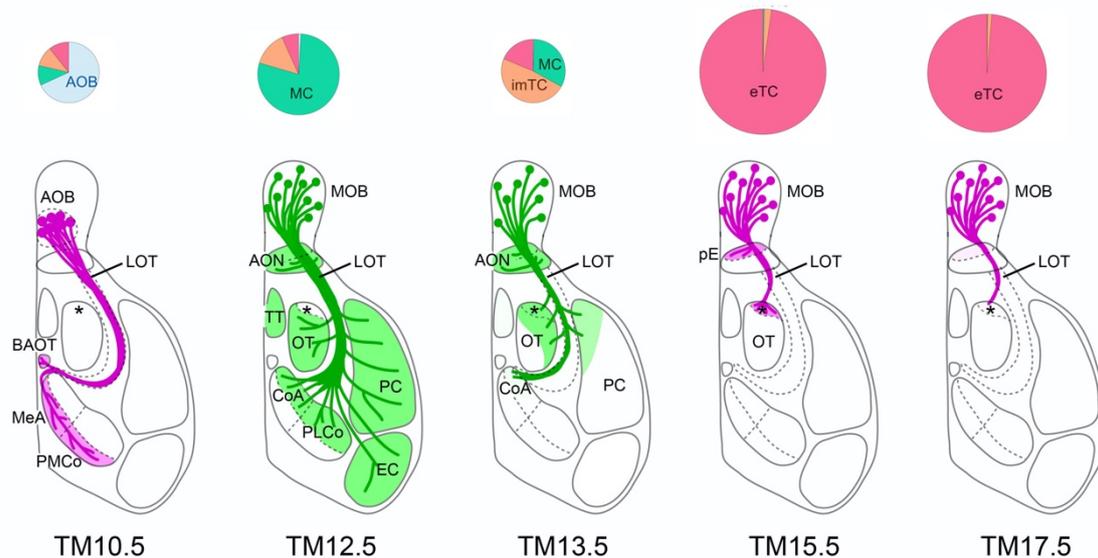


図3 二次嗅覚系の誕生日タグづけ解析のまとめ

誕生日タグづけ時期 (TM10.5~17.5) の違いにより、副嗅球 (AOB)、僧帽細胞 (MC)、房飾細胞 (TC) など、嗅球投射神経細胞の異なるサブタイプが分類でき (円グラフ)、それらが異なる標的に軸索を投射することが明らかとなった (下模式図)。

以上の結果は、嗅球の投射神経細胞のうち、少なくとも僧帽細胞と外側房飾細胞は、同じ匂い情報の入力を受けながらも、異なる標的に出力する並列回路を作ること示している。これまで僧帽細胞と房飾細胞は同一の標的細胞に情報を収束すると考えられてきたので、これまでの定説を覆すものである。また、この解析は「誕生日タグづけ法」を用いて初めて可能になったものであり、この手法の有効性も示すことができた。さらにこの手法を応用すればサブタイプごとの神経機能操作が可能であり、これまで不可能であった各サブタイプの機能的意義を探る道が開かれた。

並列処理は感覚情報処理の基本である。例えば視覚系は、眼で受け取られた視覚風景の中から「色」「線の傾き」「動き」といった異なる特徴を抽出して並列処理することで、エッジの効いた属性情報へと転換し、我々が「物をどう見るべきか」を一義的に決めてる。本研究結果は、嗅覚並列回路も同じように、同一セットの匂い情報の中から、何らかの特徴を抽出し強調して出力へとつなげていることを意味している。嗅覚の鈍い私たち人間には嗅覚の属性情報を想像することは難しいが、無意識の中に埋もれた匂い情報の属性について今後明らかにしていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Noguchi, K., Ishikawa, R., Kawaguchi, M., Miyoshi, K., Kawasaki, T., Hirata, T., Fukui, M., Kuratani, S., Tanaka, M., and Murakami, Y.	4. 巻 59
2. 論文標題 Expression patterns of Sema3A in developing amniote limbs: with reference to the diversification of peripheral nerve innervation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Dev. Growth Differ.	6. 最初と最後の頁 270-285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamauchi, K., Yamazaki, M., Abe, M., Sakimura, K., Lickert, H., Kawasaki, T., Murakami, F., and Hirata, T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Netrin-1 derived from the ventricular zone, but not the floor plate, directs hindbrain commissural axons to the ventral midline.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep	6. 最初と最後の頁 11992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-12269-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sasaki, A., Ide, S., Kawamoto, Y., Bando, T., Murata, Y., Shimura, M., Yamada, K., Hirata, A., Nokihara, K., Hirata, T., Sugiyama, H., and Maeshima, K	4. 巻 6
2. 論文標題 Telomere visualization in tissue sections using pyrrole-imidazole polyamide probes.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 29261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep29261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 de Frutos, C.A., Bouvier, G., Arai, Y., Thion, M.S., Lokmane, L., Maryama, K., Garcia-Dominguez, M., Charnay, P., Hirata, T., Riethmacher, D., Grove, E.A., Tissir, F., Casado, M., Pierani, A., and Garel, S.	4. 巻 92
2. 論文標題 Reallocation of olfactory Cajal-Retzius cells shapes neocortex architecture.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 435-448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2016.09.02	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirata Tatsumi、Iwai Lena	4. 巻 138
2. 論文標題 Timing matters: A strategy for neurons to make diverse connections	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 79 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2018.09.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Fumihito、Matsumoto Tomotaka、Hirata Tatsumi	4. 巻 21
2. 論文標題 Frequent nonrandom shifts in the temporal sequence of developmental landmark events during teleost evolutionary diversification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Evolution & Development	6. 最初と最後の頁 120 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/ede.12288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hatanaka Yumiko、Kawasaki Takahiko、Abe Takaya、Shioi Go、Kohno Takao、Hattori Mitsuharu、Sakakibara Akira、Kawaguchi Yasuo、Hirata Tatsumi	4. 巻 21
2. 論文標題 Semaphorin 6A-Plexin A2/A4 Interactions with Radial Glia Regulate Migration Termination of Superficial Layer Cortical Neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 359 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.10.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Tatsumi、Shioi Go、Abe Takaya、Kiyonari Hiroshi、Kato Shigeki、Kobayashi Kazuto、Mori Kensaku、Kawasaki Takahiko	4. 巻 6
2. 論文標題 A Novel Birthdate-Labeling Method Reveals Segregated Parallel Projections of Mitral and External Tufted Cells in the Main Olfactory System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 1 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0234-19.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 T. Hirata
2. 発表標題 Development and application of neuronal birthdate tagging
3. 学会等名 NIG Symposium: Circuit construction in the mammalian brain (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Hatanaka, T. Hirata and Y. Kawaguchi
2. 発表標題 Labeling of neurons derived from intermediate neuronal progenitors in the mouse cerebral cortex
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Hirata
2. 発表標題 Neuronal birthdate tagging: Cre-ER mouse lines for birthtime-dependent classification and manipulation of neuron subsets
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田たつみ
2. 発表標題 神経細胞の誕生日タグづけ法の開発と応用
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Hirata
2. 発表標題 Neuronal birthdate tagging, a Cre-loxP based technique for birthtime-dependent classification and manipulation of neurons
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Tran-Anh, T. Hirata, V. Nguyen-Minh and I. Sugihara
2. 発表標題 Development of Purkinje cell compartmentalization in the embryonic mouse cerebellum, analysis with birthday-specific neuronal labeling
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nomura T and Hirata T	4. 発行年 2016年
2. 出版社 Oxford: Elsevier	5. 総ページ数 10
3. 書名 The neocortical homologues in nonmammalian amniotes: bridging the hierarchical concepts of homology through comparative neurogenesis. In: Kaas, I (ed.), Evolution of Nervous Systems	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岩井 玲奈 (Iwai Lena) (80799776)	国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・特別研究員 (RPD)  (63801)	