

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 21 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700347

研究課題名（和文）マウス遺伝学と電気穿孔法の融合による大脳皮質バレル野形成機構の解明

研究課題名（英文）Analyses of mechanism for neuronal circuit refinement
in barrel cortex by mouse genetics and electroporation method

研究代表者

水野 秀信 (MIZUNO HIDENOBU)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教

研究者番号：00567159

研究成果の概要（和文）：

本研究では、マウス大脳皮質体性感覚野の形成過程をモデルとし、マウス遺伝学と電気穿孔法技術を組み合わせることで、大脳皮質神経回路形成の分子・細胞メカニズムの明らかにすることを旨とした。新規に開発した単一細胞標識ベクターシステムを用い、新生仔期において、大脳皮質IV層神経細胞樹状突起の精緻化に、NMDA型グルタミン酸受容体機能が必要であることを示した。また、新生仔期マウスの生体脳イメージング法を確立した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the role of NMDAR-mediated neuronal activity in the refinement of neuronal connections in the mouse barrel cortex. By developing novel sparse neuron labeling system, we found that NMDAR plays an important role for the dendrite refinement of barrel neurons during neonatal stages when barrel formation is in progress. We also developed a method for in vivo 2-photon imaging of neonatal mice brain, and observed the dendritic morphology of developing barrel cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：大脳皮質・マウス遺伝学・電気穿孔法・蛍光蛋白質・2光子イメージング
・Cre/loxPシステム・NMDA型グルタミン酸受容体・バレル

1. 研究開始当初の背景

神経回路形成過程には、転写因子や誘導因子とその受容体の発現などによる遺伝的に決定されたメカニズムと、神経活動依存的に変化するメカニズムの両者が関与していると考えられている。しかしながら、神経活動依存的な大脳皮質神経回路形成の分子・細胞メカニズムの詳細は不明な点が多い。

マウス大脳皮質体性感覚野（バレル皮質）は、幼仔期にヒゲからの体性感覚入力を遮断すると、神経回路形成が障害されることから、

神経活動依存的な回路形成メカニズムを明らかにする有効なモデルとして用いられている。バレル皮質IV層内にはバレルと呼ばれる特徴的な構造が並んでおり、それぞれのバレルは一本のヒゲからの感覚入力を処理している。個々のバレルの中心には対応したヒゲからの入力を伝える視床皮質軸索終末が集積している。また、バレルの辺縁にはバレル細胞が位置しており、バレル細胞は樹状突起をバレル内側へ非対称的に伸長し視床皮質軸索とシナプスを形成している（図1）。

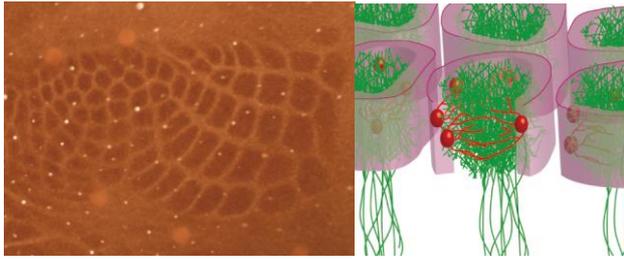


図1、バレル皮質とバレル神経回路の模式図

(左) 組織学染色で可視化された、マウス大脳皮質IV層のバレル。

(右) 個々のバレル辺縁に位置するバレル細胞(赤色)の樹状突起は、視床皮質軸索(緑色)とシナプスを形成する。

バレル細胞が非対称的な樹状突起形態を獲得することは、正確なヒゲ情報処理に重要な役割を果たすと考えられる。しかし、その経時的形成過程、および分子メカニズムの多くは不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス大脳皮質体性感覚野(バレル野)の形成過程をモデルとし、大脳皮質神経回路の経時的な精緻化過程と、その神経活動依存的な形成メカニズムを解明することであった。

まず、個々のバレル細胞を蛍光蛋白質で標識すると同時に、標識したバレル細胞のみでNMDA型グルタミン酸受容体(NMDAR)の必須サブユニットであるNR1をノックアウト(KO)できるベクターシステムを開発した。次に、ベクターシステムをバレル細胞に導入し、NR1 KOバレル細胞の形態変化の有無を調べた。さらに、二光子顕微鏡観察系を立ち上げ、野生型とNR1 KOのバレル細胞の*in vivo*観察を目指した。これらの研究により、神経活動依存的な大脳皮質神経回路形成過程の分子・細胞メカニズムを単一細胞レベルで明らかにすることが目的であった。

3. 研究の方法

本研究は、各種遺伝子組み換えマウスに対し、分子生物学的手法・子宮内電気穿孔法・細胞培養法・薬理学的手法・形態学的手法・生体二光子顕微鏡イメージング法等を組み合わせ合わせて適用することで行った。

(1) バレル細胞の蛍光標識

新規に開発した単一細胞標識ノックアウトベクターシステム(研究成果(1))を、子宮内電気穿孔法により遺伝子導入することで行った。

(2) バレル細胞樹状突起形態の解析

遺伝子導入したマウスより、大脳皮質の組織切片を作成した。次に、蛍光蛋白質で標識されたバレル細胞樹状突起の画像を、共焦点顕微鏡により取得した。樹状突起全長・分枝数等を定量的に解析した。

NR1 KO 確認実験では、大脳皮質神経細胞にGCaMP3(カルシウムインディケーター)を遺伝子導入し、初代培養を作成した。GCaMP3を発現している神経細胞でNMDARを介するカルシウム応答が消失しているか否かを調べた。

(3) 新生仔マウスの生体脳イメージング

遺伝子導入した新生仔マウスを麻酔し、脳内観察用窓をバレル皮質上部に取り付けた。2光子顕微鏡により、観察用窓より、生体内でのバレル細胞樹状突起形態を観察した。

4. 研究成果

(1) 新規な大脳皮質単一細胞標識ノックアウト法の開発

蛍光蛋白質発現ベクターを子宮内電気穿孔法により遺伝子導入すると、多数の神経細胞が標識されるため、個々の細胞の形態解析は困難である。改良 Cre-loxP 遺伝子組み換えシステムを使用することにより、大脳皮質神経細胞を、まばらかつ高輝度に標識する方法を確立した(図2)。

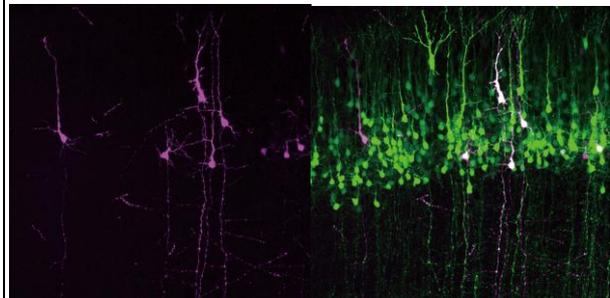


図2、新規ベクターシステムによる単一細胞標識

遺伝子導入した細胞(GFP標識細胞)の一部の細胞でRFPが発現している。

次に、システムをKO解析に使用できるよう拡張した。蛍光標識された細胞ではCreが発現しており、floxedマウスと組み合わせることでKO解析ができると考えられる。NR1 floxedマウス(Cre発現細胞でのみNR1がKOされるマウス)の大脳皮質神経細胞にベクターシステムを導入したところ、NMDA依存的なカルシウム応答が消失していた。(図3)

これらの結果は、新規システムにより大脳皮質単一神経細胞標識および標識細胞でのノックアウト解析が可能であることを示す。

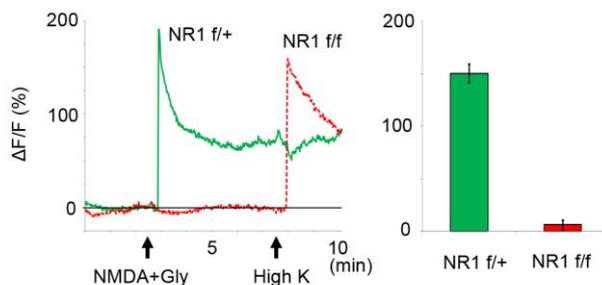


図3、新規ベクターシステムによる NR1 KO ベクターシステムを遺伝子導入された NR1 floxed マウスの神経細胞では、GCaMP3 で見られる NMDA 依存的なカルシウム応答が消失した。

(2) 固定組織での NMDAR 依存的なバレル細胞樹状突起精緻化機構の解析

上記の単一細胞標識ノックアウト法を用い、バレル細胞を単一標識および NR1 KO することで、バレル細胞樹状突起の精緻化における NMDAR の役割を調べた。

バレルの分布パターンとバレル細胞を同時可視化するため、所属研究室で新しく作成された、視床皮質軸索特異的に GFP を発現するマウス(TCA-GFP)を用いた (図4)。

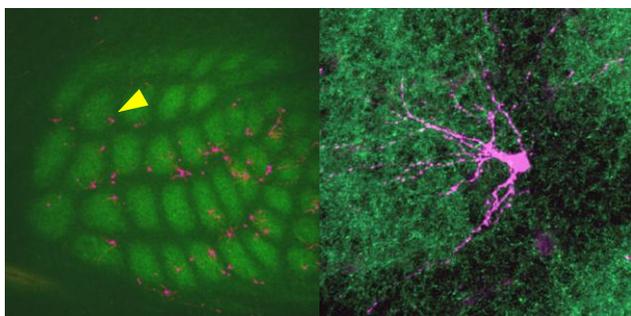


図4、バレルパターンとバレル細胞樹状突起形態の同時可視化

TCA-GFP によるバレル皮質のパターンと、RFP によるバレル細胞樹状突起を同時標識。右図は左図矢頭部の拡大図。

コントロール細胞では日齢に伴い樹状突起の内向き方向性強化 (より非対称的な樹状突起の配置) が起きた。しかし、NR1 KO 細胞では、コントロール細胞と比較して、生後5日齢以降、樹状突起の内向き方向性が有意に低かった (図5)。

これら一連の研究により、新生仔期において、バレル細胞樹状突起の精緻化に NMDAR が関与することを見出した。

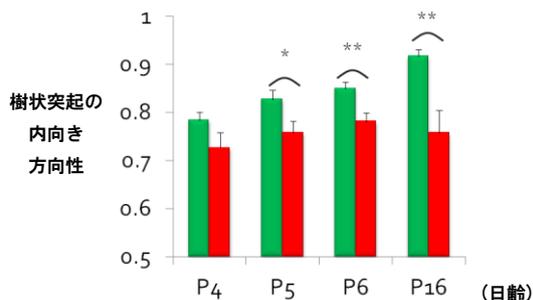


図5、NR1KO によるバレル細胞樹状突起の内向き方向性強化の消失

コントロール細胞では生後5日齢以降に樹状突起の内向き方向性強化が起きる。しかし NR1 KO バレル細胞では起きない。

(3) 新生仔マウス脳イメージング法の確立

研究成果(2)は、固定組織切片での解析であった。そのため、バレル細胞の経時的発達過程、および NMDAR が樹状突起の伸長・分枝・刈りこみなどの過程に関与するかは不明であった。これを明らかにするために、新生仔脳イメージング法を確立した (図6)。



図6、新生仔期マウスの生体脳イメージング
脳内観察用窓取付け手術後のマウス画像と、窓から観察したバレル皮質IV層の2光子顕微鏡画像

大脳皮質IV層は、感覚情報がはじめる層である。その形成過程を生体観察する事は、感覚情報の処理機構を明らかにするために、極めて重要である。しかし、技術的敷居が高いため、未だ報告されておらず、研究代表者の知る限りでは、これが初めてである。今後バレル細胞の2光子タイムラプス観察をすることで、発達期大脳皮質神経回路形成の分子・細胞メカニズムの新たな知見が得られると期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

① Mizuno H, Saito YM, Itohara S, Iwasato T. Single cell labeling method reveals the

precise developmental process of barrel neuron dendrites in somatosensory cortex of neonatal mice.

Society for Neuroscience annual meeting, Washington DC, USA, 2011年11月13日

② **Mizuno H, Saito YM Itohara S, Iwasato T.** 高輝度単一細胞標識法による幼仔期体性感覚野におけるバレル細胞樹状突起の詳細な発達過程の解析
第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月15日

[その他]

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/section/iwasato/iwasato-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野秀信 (MIZUNO HIDENOBU)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教
研究者番号：00567159

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし