

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700344

研究課題名(和文) 運動制御を担う大脳新皮質出力回路を遺伝子マーカーで切り分ける

研究課題名(英文) Dissecting the neocortical output circuit responsible for motor control with genetic markers

研究代表者

鶴野 瞬 (Tsuruno, Shun)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：80548991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の大脳新皮質では、第5B層の皮質下投射神経細胞(SCPN)が主要な出力を担い、脊髄や脳幹の橋などへ情報を伝える。我々は特定の遺伝子マーカーを発現したSCPNがどの細胞から入力を受けるか、光遺伝学を用いてマッピングすることに成功した。また、これらのSCPNが大きな入力を同じ細胞から受けるのは、それらが縦に並んだ場合が多いことも明らかにした。これらの結果は大脳皮質の出力を理解する上で重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：From mammalian neocortex, subcerebral projection neurons (SCPNs) provide the major output. These neurons project to areas such as the spinal cord and the pons. We succeeded in mapping the source of inputs to SCPNs expressing a specific genetic marker using photostimulation techniques. In addition, we found that radially aligned SCPNs preferentially receive strong common inputs. These results will provide important basis for understanding the output of neocortex.

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 神経回路 遺伝子マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の大脳新皮質は、知覚、認識、運動などの高次機能の中核であり、6層構造を持つ。第5B層の皮質下投射神経細胞(SCPN)が皮質の主要な出力を担い、脊髄や脳幹の橋などへ投射する。この細胞はヒトの高次機能にとっても重要で、その異常が遺伝性痙攣性対麻痺や筋萎縮性側索硬化症に伴う中枢神経系の失調の原因となる。また、SCPNは第5B層の上部から下部まで分布するが、運動野第5B層上部(上から約1/3)のSCPNは第2/3層から強い興奮性入力を受けるのに対し、中・下部のSCPNは第5B層自身から回帰的な強い興奮性入力を受ける(Weiler et al., Nat Neurosci, 2008)。しかし、異なる入力を受けるSCPNが運動や知覚の制御の異なる側面を担うかは明らかでない。

### 2. 研究の目的

SCPN特有の遺伝子マーカーはいくつか知られている。それらの中で、一部は第5B層の中・下部に主に発現する。つまり、この遺伝子マーカーを用いて、特定の入力を受けるSCPNのサブセットを標識することができるかと期待される。我々はこの遺伝子マーカー(Xとする)を発現したSCPNが蛍光タンパク質で標識されたトランスジェニックマウスを用いた。

我々は第5B層中・下部のSCPNが皮質内回路において果たす役割を明らかにすることを目的とした。そのためには、これらのSCPNに入力を与える細胞を高精度で同定することと、これらのSCPNが形成する微小回路を解明することが有用である。特に微小回路は、皮質の機能を理解する上で大変重要である。たとえば、大脳皮質では縦に並んだ細胞は応答特性が類似しやすいことが知られているが、微小回路を調べることで、そのメカニズムを明らかにできるかもしれない。

そこで、遺伝子マーカーXを発現したSCPNにおいて下記の2点を明らかにする。

- (1) 入力細胞
- (2) 微小回路

### 3. 研究の方法

(1) 入力マッピング: チャンネルロドプシン(ChR2)を入力層の候補(ここでは第2/3層)に発現させる。方法としては子宮内電気穿孔法を用いた。脳スライス標本中で、SCPNから電流記録を行いながら、ChR2発現細胞に光を照射する。すると、SCPNに入力を与える細胞の位置、ならびに入力の強さをマッピングすることができる(図1)。

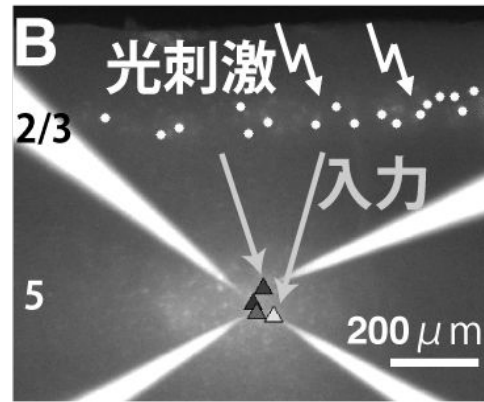


図1 光刺激を用いて第5層のSCPNへの入力をマッピング

第2/3層の細胞にまばらにChR2を発現させ、レーザー光を照射。このとき、レーザーパワーを最小限にすることで、刺激される細胞が減り、結果として高精度のマッピングが可能となった。

入力をマッピングしたSCPNが発現する遺伝子マーカーの同定: 上記マッピング後に、各SCPNの細胞内液を吸い取る。逆転写反応とPCRを組み合わせることによって、内液に含まれる遺伝子マーカーmRNAを検出した。

(2) 複数のSCPNから同時にシナプス応答を記録し、それらのSCPN間の結合と、共通の細胞から入力を受ける程度を定量した(図2)。

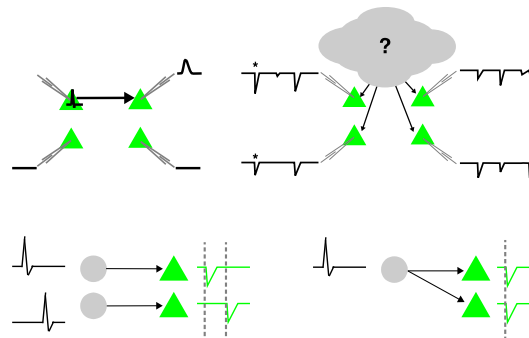


図2 SCPN間の結合と共通入力の定量  
(左上)1つのSCPNを電流注入により発火させ、残りのSCPNでシナプス応答を記録すると、細胞間の結合の有無と強さを測れる。

(右上)自発性シナプス入力を複数のSCPNで同時に記録。異なる細胞から受けた入力は同期しないが(左下)、共通の細胞から受けた入力は同期する(右下)。この性質を用いて、SCPNが共通入力を受けるか判別。

#### 4. 研究成果

(1) 【内容】 遺伝子マーカー X を発現する SCPN が受ける入力を高精度にマッピングすることに成功した。その精度は最高で 1 細胞程度に達した。

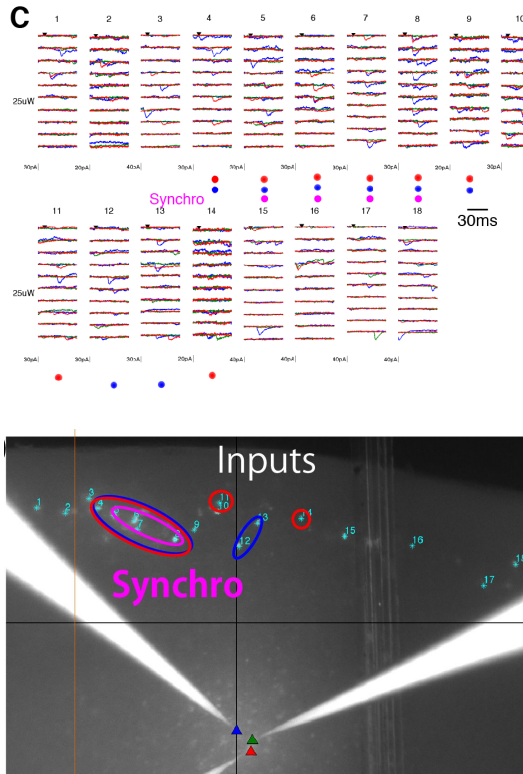


図 3 高精度入力マッピング

(上) ChR2 を発現した第 2/3 層細胞を刺激した時に、2 つの SCPN で記録された電流。刺激は 18 箇所に行い、そのうち数箇所から SCPN が入力を受けていた。

(下) 電流記録の結果をマッピング。一つの刺激箇所には ChR2 陽性細胞が数個しか無いので、マッピングの精度は 1-数細胞と言える。

マッピング後に各 SCPN に発現する遺伝子マーカーを同定する手法を導入した。(Single-cell RT PCR)

【意義、重要性】 SCPN は第 5 B 層の上部と中・下部の間で異なる皮質内回路から入力を受けることが知られている。今回用いた遺伝子マーカーは発現部位が第 5 B 層の中・下部に偏っているので、今回のマッピングにより SCPN の中でも一部の種類に限定して入力を高精度で同定することが可能になった。また、マッピング後に複数のマーカーの発現量を調べることにより、遺伝子発現プロファイルと回路の関係を詳細に調べられるようになる。

(2) 【内容】 上記(1)と同じマーカーを発現した SCPN の結合と入力を調べた。その結果、SCPN 間の結合は 80 $\mu$ m 以内ではほぼ一様であることが明らかになった(図 4)。また、縦に並んだ SCPN は同じ細胞から強い入力を受けやすいことも明らかになった(図 5)。

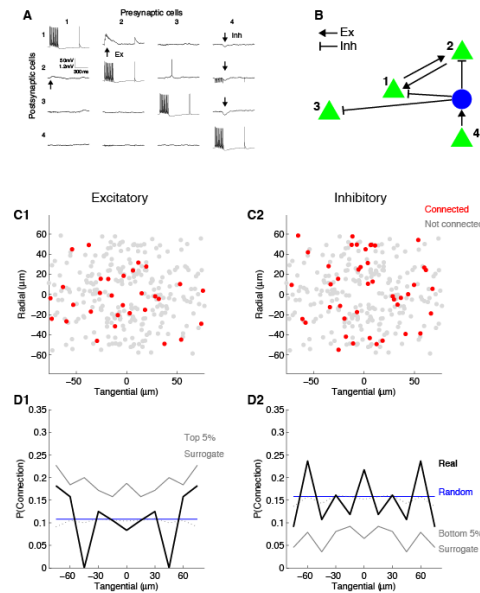


図 4 SCPN 間の結合

- (A) 4 つの SCPN のうち、1 つを刺激した時、他の細胞で記録された電位応答
- (B) 結合の模式図
- (C) 結合した細胞の分布
- (D) 結合確率は一様

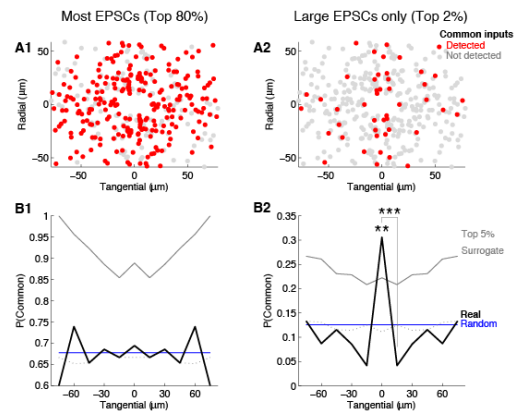


図 5 SCPN の共通入力

- (A) 共通入力を受ける細胞の分布
- (B) その存在確率。弱い入力も含めると共通入力を受ける確率は一様だが、強いものに限って共通入力を受ける確率は SCPN が縦に並んだ時に高い。

【意義、重要性】 縦に並んだ皮質細胞は刺激に対する反応が類似しやすいが(大脳皮質の

カラム構造)、そのメカニズムは不明だった。今回の結果は、少なくとも SCPN において、そのメカニズムを強い共通入力が担うことを示唆する。今後は、他の種類の細胞でも同様の傾向が見られるか調べ、このメカニズムがカラム構造全般に適用できるか明らかにすることが重要である。

研究者番号：

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

鶴野 瞬(TSURUNO, Shun)

(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：80548991

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )