

神経回路を可視化する

脳のはたらきは、神経細胞が正しい相手と結合を作り、神経回路を形成することによって生じている。そこで、どの神経細胞がいかなる神経細胞と繋がっていて、感覚や運動や学習という機能が形成されているかを見出そうと、大勢の研究者が神経解剖学に携わってきた。

「元々は神経細胞を互いに結合させるタンパク質の研究を行っていましたが、このようなミクロなレベルの研究成果を使って、神経回路というマクロなレベルの研究ができないかと、4年前に考え始めたのです」と語るのは脳科学総合研究センター(BSI)ニューロン機能研究グループ・シナプス分子機構研究チームの吉原良浩チームリーダー。吉原チームリーダーが目をつけたのは、WGAという小麦胚芽のレクチンだ。

WGAにはシナプス結合を越えて、神経細胞から神経細胞へと運ばれるという珍しい性質がある。吉原チームリーダーたちは

このWGAをトレーサーとして神経回路網可視化の画期的なシステムを作り上げた。

● WGAを使った従来法の問題点

● 1970年代後半に偶然、WGAがシナプスを越えて神経細胞間を運ばれることがわかった。WGAは小麦をウイルスなどの有害物から守るはたらきをしているタンパク質で、特定の糖鎖構造を認識して結合する。ほとんどの神経細胞は、この糖鎖構造を表面にもっている。

WGAが神経細胞の糖鎖に結合すると、細胞内顆粒に取り込まれて軸索の中を運ばれ、軸索末端からシナプス間隙へと分泌される。そして今度は次の神経細胞の糖鎖に付き、また取り込まれて運ばれる。このWGAをトレーサーとして神経回路を可視化する従来の方法では、高濃度のWGAを注射器で実験動物の対象とする部位に打ち込んでいた。しかし、この方法に



吉原チームリーダー

は問題点が3つある。1つは、高濃度の異物を打ち込むので、その部位で重い炎症反応が起きることだ。

「例えば、視覚の回路を見るためには、実験動物に麻酔をかけて網膜に注射しますが、眼が非常に腫れます。炎症のために、経路が機能的におかしくなっていることも考えられます」

2つ目は、打ち込むのに熟練した技術を要することだ。動物の個体ごとに、その時の状態ごとに、打ち込むべき場所が微妙に変わってくるので、熟練者でもすべて成功するわけではない。

3つ目は、WGAが打ち込まれた場所周辺のすべての神経細胞に取り込まれてしまうことだ。そのため機能の違う回路が存在しても、その区別はつかない(図1上)。

「脳の中では、同じ場所にさまざまなタイプの神経細胞があるので、これでは選択的トレーサーとしての役目を果たせません」

そこで吉原チームリーダーたちは、これらの問題を解決する新しい方法を考えた。

● WGAを特定の神経細胞に作らせる

● WGAの遺伝子(WGAのメッセンジャーRNAを鋳型として作ったcDNA)を卵の中に導入し、WGAを自ら生産できるトランスジェニック動物を作るというのが、吉原チームリーダーたちのアイデアだった。このとき大事なのが、特定の神経細胞にだけWGAの遺伝子を発現させることだ。

「神経細胞のタイプごとに遺伝子の発現を調節する領域『プロモーター』が違いま

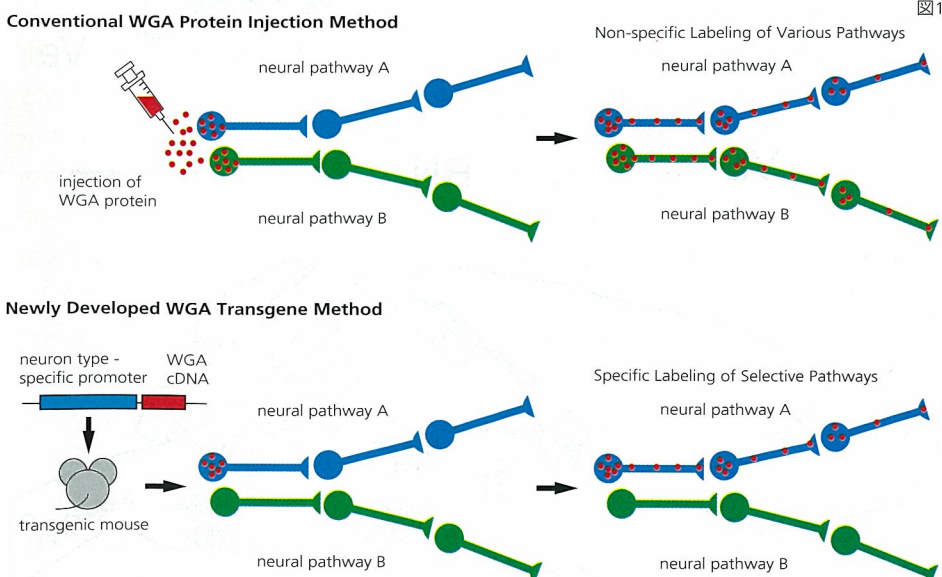


図1

す。最近ではいろいろなプロモーターがわかってきているので、WGAの遺伝子に付けるプロモーターを選べば、対象とする神経細胞にだけWGAを生産させることができるはず（図①下）」

現在までに約10種類のプロモーターを使い、さまざまな神経細胞でWGAを発現させている。中でも成功したマウスの2つの系を紹介しよう。

● 運動を調節する神経回路を見る

小脳は運動のコントロールや学習を担当しているが、その中心はプルキンエ細胞である。L7とよばれるプロモーターは、プルキンエ細胞で遺伝子を非常に高い確率で発現させることが知られている。これをWGAの遺伝子に付けてマウスの受精卵に導入して、トランスジェニックマウスの4つのラインを作った。すると3つのラインにおいて、プルキンエ細胞でWGAが生産されていることが確認された。

プルキンエ細胞を神経回路の起点の一次ニューロンとすると、次には小脳中心部の小脳核の神経細胞に繋がり（二次ニューロン）、さらに視床の腹外側核や中脳の赤核の神経細胞に繋がること（三次ニューロン）が知られている。マウスの脳を使って、プルキンエ細胞でWGAが生産されていることが確認できた3つのラインを調べてみると、二次ニューロンの部位にも、さらには三次ニューロンの部位にもWGAが存在していた（図②）。

「三次ニューロンの先に四次もありますが、現在使っている検出法ではそこまでは見えません。一次ニューロンで生産された量の何%かが二次ニューロンへ運ばれ、

さらにその何%が三次ニューロンへと運ばれる。どんどん減るので、検出できなくなるのです」

この問題の解決には、一次ニューロンでのWGAの発現量を増やすか、あるいは検出感度を上げることが必要だ。従来はWGAの抗体を使って検出していたが、「WGAの遺伝子に酵素の遺伝子を融合させ、さらにニューロン間をWGAとともに運ばせて、WGAと同時にその酵素も特定の細胞で発現させ、さらにニューロン間をWGAとともに運ばせて酵素反応で検出する方法を現在開発中です」

● 嗅覚や視覚を支配する神経回路を見る

● 鼻腔内嗅上皮には嗅神経細胞があるが、

OMPとよばれるプロモーターはこの神経細胞で遺伝子を高い効率で発現させることができる。WGAの遺伝子はこのプロモーターを付けてマウスの受精卵に導入し、5つのラインを作ったところ、4つのラインで嗅神経細胞におけるWGAの存在が確認された。

嗅覚の系でも、WGAが嗅神経細胞から二次ニューロンである嗅球神経細胞、さらには三次ニューロンである嗅皮質のニューロンへと運ばれていることが示された（図③）。その他に、「ショウジョウバエの視覚経路については、慶應義塾大学医学部の岡野栄之教授との共同研究ですでに論文発表をしていますし、マウスの視覚経路についてもデータをまとめているところです。また、味覚経路についても、そういう実験のできるマウスを作っています」

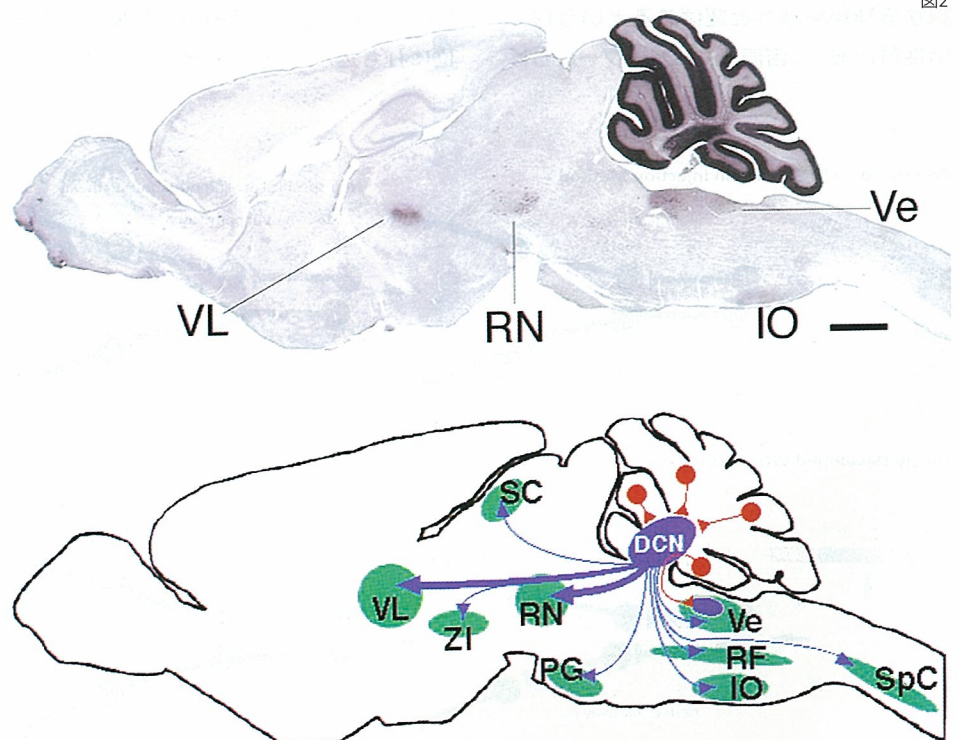


図2

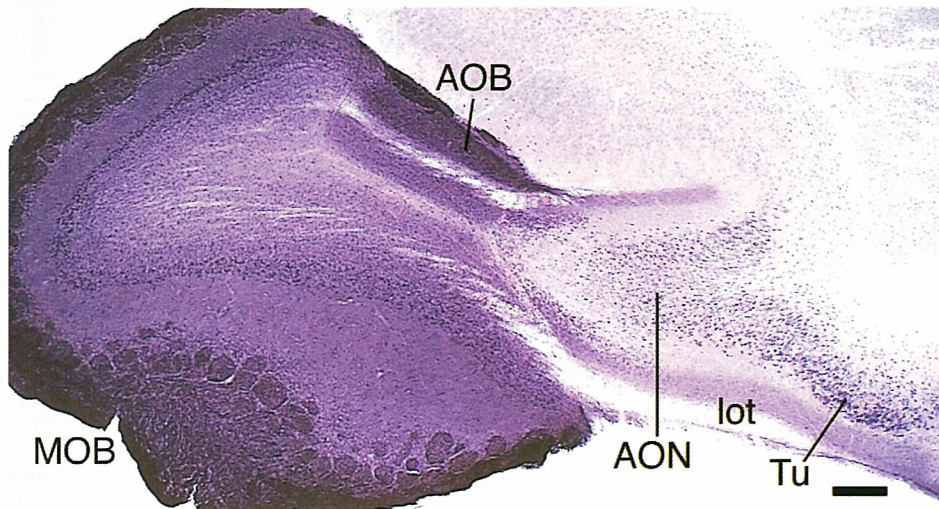


図3: WGAトランスジェンによる嗅覚系神経回路の選択的可視化

●
 文責: 広報室
 監修: 脳科学総合研究センター
 ニューロン機能研究グループ
 シナプス分子機構研究チーム
 チームリーダー 吉原良浩
 取材・構成: 由利伸子

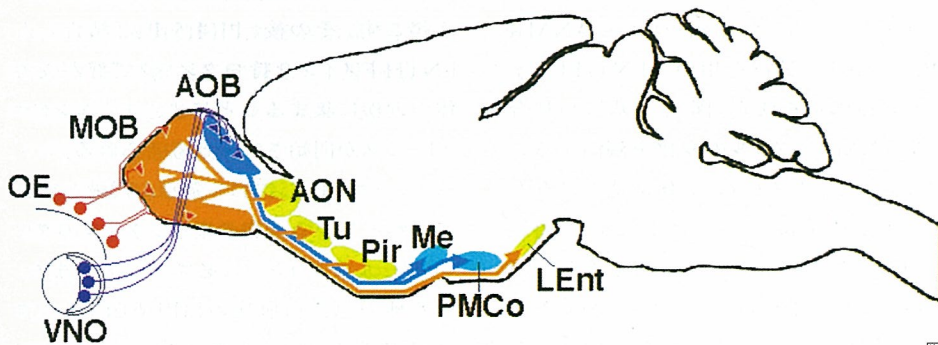


図3

● ノックアウトマウスと かけ合わせる

神経回路の可視化は、いろいろな研究分野への応用が考えられる。そのひとつがノックアウトマウスとWGAを発現するマウスとの交配である。ノックアウトマウスは人為的にある特定の遺伝子を壊したマウスで、そのためにさまざまな障害がある。

例えば、運動障害のあるノックアウトマウスと、小脳プルキンエ細胞でWGAを発現するマウスとを掛け合せて、神経回路のどこが正常で、どこに異常があるかを確かめることのできるマウスを作れば、障害の原因を突き止めることができる。吉原チームリーダーは嗅覚異常の研究でこの方法を使おうとしている。

「そのためのノックアウトマウスを作ったばかりです。見た目はピンピンしているので、嗅覚異常があるかどうかを確かめることから始めねばなりません」

また、ノックインマウスを作る研究も始まっている。WGAの遺伝子を受精卵に導入すると、染色体のいろいろな場所にランダムに入っていく。WGAのDNAは周囲

のDNAの影響を受けながら発現するので、プロモーターを選んでも期待通りに発現しない場合がある。予想より狭い範囲でしか発現しなかったり、予想に反した神経細胞で発現したりする。

「これを解決するには、ある特定の遺伝子座に相同組み換えによってWGAの遺伝子を入れたノックインマウスを作る技術を利用しなければならず、これも始めたところです」

この技術が確立されれば、プロモーターのわからない神経細胞でもWGAを発現させることができるようになる。例えば嗅覚の場合、ある特定の匂い分子受容体の遺伝子が存在する場所にWGAの遺伝子を導入すると、その受容体を発現した神経細胞がどのような回路を形成するかがわかり、特定の匂いがどのようなパターンで伝えられるのかを明らかにすることができるだろう。

● 生きた状態で神経回路を見る

● WGAの存在を抗原抗体反応で調べる方法は、脳の切片を使うもので、動物が生きたままの状態ではその神経回路の形成の様

子を知ることはできない。

「検出感度を上げることも大事ですが、たとえ感度は落ちるとしても、生きたままの状態で見ること重要です」

このために吉原チームリーダーたちは、クラゲやイソギンチャクから採った蛍光を出すタンパク質を使うシステムを開発中だ。蛍光タンパク質の遺伝子をWGAの遺伝子に融合させ、発現した蛍光タンパクがWGAと一緒に神経細胞から神経細胞へと運ばれていくかどうかを培養細胞で確かめている最中だ。これが成功すれば、次は生体内で運ばれるかどうかを確かめることになる。

「生きたマウスを使って脳の状態を調べることは非常に難しいので、私たちはまず、ゼブラフィッシュという魚を使ってみようと考えています」

ゼブラフィッシュの卵は透明なので神経系の発生を外から観察でき、また突然変異体や外来遺伝子を導入した個体も作りやすく、さらに1世代が3ヶ月と短いため、神経回路の研究にはうってつけの脊椎動物だ。吉原チームリーダーたちは、その嗅神経細胞でのみ発光するWGAが発現するようなシステムを作りたいと考えている。

「受精後10数時間で嗅神経細胞ができ、20数時間で他の神経細胞との結合が起きるので、二晩ほど徹夜して共焦点レーザー顕微鏡で観察しさえすれば、ゼブラフィッシュの嗅覚の回路形成をリアルタイムで見られることになりますね」

こうして新しい神経回路の可視化方法は研究者の夢を次々と広げ、実現させていく。