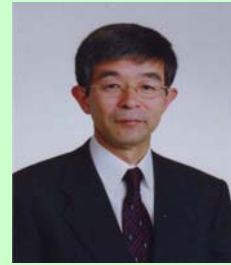


大脳皮質介在ニューロンの移動・配置と領野特異性の形成  
Migration, disposition of cortical interneurons and  
establishment of area specificity



村上 富士夫 (Fujio Murakami)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究の概要

脳の神経細胞は投射ニューロンと局所回路ニューロンによって構成され、脳の機能は両者が協同して働くことで実現される。本研究では、大脳皮質のGABA作動性局所回路ニューロンに焦点をあて、これが皮質内にどのようにして組み込まれて行くのかを明らかにすることを目的としている。これまでの研究から、これらのニューロンは、脳の接線面で全方向に長距離に移動し、それが少なくとも数日間持続するなど複数のゾーンで興味深い動きを示すことが分かってきた。またこれらの動きを *in vivo* でも確認した。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：大脳皮質、介在ニューロン、細胞移動、GABA、GFP

1. 研究開始当初の背景・動機

脳の神経細胞は投射ニューロンと局所回路ニューロンによって構成されるが、前者の多くは興奮性ニューロン、後者の多くは抑制性ニューロンである。大脳皮質では興奮性ニューロンは皮質原基の脳室層で産生されるが、GABA作動性の抑制性ニューロンは前脳腹側部の基底核原基で産生された後、接線方向に移動して大脳皮質に到る。我々は最近グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD67)遺伝子座に緑色蛍光蛋白質(GFP)をノックインしたマウス(GAD67-GFPマウス)を用いて、解析した。その結果、大脳皮質に到達したGABA作動性ニューロンの移動様式はそれまでに考えられていたよりも遙かに複雑であり、以前にはあまり注目されていなかった辺縁帯においても多様な方向性をもった移動をすることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

そこでGABA作動性ニューロンがいかにして皮質内に配置、分配されるのかが問題となる。考えられる可能性の一つはこれらのニューロンは移動開始以前からその運命が定まっており、それにしたがって異なる皮質の部位に移動して行くというものである。二番目は皮質に移動するGABAニューロンは様な性質を有しており、皮質に拡がった後にそれぞれの領野に応じた性質を獲得するという考えである。本研究ではこれらの仮説を検証するとともに、皮質の領野特異性の獲得における抑制性ニューロンの関与を検討する。

3. 研究の方法

皮質でのGABA作動性ニューロンの動きを追うために、GAD67-GFPマウスを使用した。また、長距離に互る移動の可否の検討のため、胎生15.5日目に脂溶性色素のDiDをガラス電極で皮質に注入し、1.5または3日後に胎仔を固定して標識された細胞の分布の解析を行った。また特定の部位に起源を有するGABA作動性ニューロンの移動を解析するため、DsRed遺伝子を電気穿孔法で胎仔のmedial ganglionic eminence(MGE)に導入し、数日間待った後、皮質を展開してreal-time imagingを行った。

これまでに購入した主な購入設備は以下の通りである。

- ・顕微鏡 XYステージ
- ・分光光度計
- ・Microplate Luminometer
- ・CO2インキュベータ
- ・リニアスライサー

4. これまでの成果

DiDは前頭葉、頭頂葉または後頭葉に注入したが、何れの場合も、注入後3日目には注入部位から2ミリ以上離れた脳表面の部位に標識ニューロンが観察された(Tanaka et al., 2006)。これは辺縁帯に到達したGABAニューロンは接線方向に長距離に互って移動することを意味している。また、GABAニューロンが辺縁帯において数日間という極めて長期にわたって滞留するという驚くべき可能性を示唆している。

また GABA ニューロンの起源の一つである MGE 由来の GABA ニューロンを特異的に標識し、その移動の様子を辺縁帯で観察するため、DsRed 遺伝子を電気穿孔法で胎仔の MGE に導入し、皮質を展開して real-time imaging を行った。その結果、やはり全方向に向かう GABA ニューロンの移動が観察された。このことは起源とは関係なく GABA ニューロンは多方向への移動をすることを意味している。辺縁帯での全方向への GABA ニューロンの移動は切片標本では観察することが出来なかったが、皮質を展開して表面からアクセスすることで、観察することが出来た。したがって全方向への GABA ニューロンの移動は辺縁帯以外でも起こっている可能性が考えられる。技術的制約のため、表面から離れた部位の GABA ニューロンの移動の可視化は困難である。しかし、脳室帯のニューロンは観察可能であろうと考え、皮質を展開し上下反転させて置いた標本を作製して脳室層のニューロンの動態を解析した。その結果、興味深いことに脳室層のニューロンも脳室に平行な面において全方向へ向かって移動していることが明らかになった (Tanaka et al., 2006)。

5. これまでの進捗状況と今後の計画  
本研究は極めて順調に進んでいる。大脳皮質介在ニューロンの発生に関する研究は、世界中の多くの研究者がしのぎを削って行っている。最もホットな課題のひとつは介在ニューロンの多様性が如何なる機構によって生み出されるかという問題であるが、これと切り離せない問題が、如何なる機構により多様な性質を持った介在ニューロンが適切に皮質内に配置されるのかという問題である。この問題への答えを得るためには皮質という限られた領域内での神経細胞の移動を追う必要があり、これは容易なことではない。特に介在ニューロンは我々のこれまでの研究により皮質内で複雑な動きをすることが示唆されており、この問題の追求の困難さが予想されていた。我々はこの困難な問題を real-time imaging を用いることで克服した。また imaging にはこれまで我々が用いてきた GAD67-GFP mouse に加えて MGE への蛍光蛋白遺伝子の電気穿孔による導入、そして生きた胎仔へ脂溶性色素の注入という新たな手段も加えることにより、単一の介在ニューロンの皮質内における長期 (数日) に亘る、また長距離の移動を世界で初めて観察することに成功した。また、これまで得られた結果が、in vivo での細胞の挙動を反映しているが否かを確認するために、最近 in vivo imaging による移動の観察に成功した。また GABA ニューロン成熟の過程の可視化にも成功した。今後はこれらの研究をさらに発展させていく予定である。

6. これまでの発表論文等  
(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. Kobayashi, H., Yamamoto, S., Maruo T., and **Murakami, F.** Identification of a cis-Acting Element Required for Dendritic Targeting of activity-regulated cytoskeleton-associated protein mRNA. *E. J. Neurosci.*, 22, 2977-2984, 2005
2. Kawauchi, D., Taniguchi, H., Watanabe, H., Saito, T. and **Murakami, F.** Direct Visualization of Nucleogenesis by Precerebellar Neurons : Involvement of Ventricle-directed, Radial Fibre-Associated Migration. *Development*, 133, 1113-1123, 2006
3. Taniguchi, H., Kawauchi, D., Nishida K. and **Murakami, F.** Classic Cadherins Regulate Tangential Migration of Precerebellar Neurons in the Caudal Hindbrain. *Development* 133, 1923-1931, 2006
4. Tanaka, D.H., Maekawa, K., Yanagawa, Y., Obata, K. and **Murakami, F.** Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex. *Development*, 133, 2167-2176, 2006
5. Andrews, W., Liapi, A., Plachez, C., Camurri, L., Zhang, J., Mori, S., **Murakami, F.**, Parnavelas, J.G., Sundaresan, V. and Richards, L.J. Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. *Development*, 133, 2243-2252, 2006
6. Kadison, S.R., **Murakami, F.**, Matisse, M.P. and Kaprielian, Z. The Role of Floor Plate Contact in the Elaboration of Contralateral Commissural Projections Within the Embryonic Mouse Spinal Cord. *Dev. Biol.* 296, 499-513, 2006
7. Zhu, Y., Guthrie, S. and **Murakami, F.** Ephrin-A/EphA controls the rostral turning polarity of a lateral commissural tract in chick hindbrain, *Development*, 133: 3837-3846, 2006
8. Tashiro, Y., Yanagawa, Y., Obata, K. and **Murakami, F.** Development and Migration of GABAergic Neurons in the Mouse Myelencephalon. *J. Comp. Neurol.*, 503, 260-269, 2007
9. The role of Slit-Robo signaling in the generation, migration and morphological differentiation of cortical interneurons. Andrews, W., Barber, M., Hernandez-Miranda, L.R., Xian, J., Rakic, S., Sundaresan, V., Rabbitts, V.H., Pannell, R., Rabbitts, P., Thompson, H., Erskine, L., **Murakami, F.** and Parnavelas, J.G. *Dev Biol.*, 313, 648-58, 2007

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/murakami-lab/>