

幼児・子供の健全なコミュニケーション能力の発達に重要な 大脳の発育メカニズムの解明

Analysis of the mechanisms to regulate brain development essential to progress communication skill

研究代表者 自然科学研究機構 生理学研究所 助教 富田 江一
Koichi Tomita
Assistant Professor
National Institute for Physiological Sciences,
National Institutes of Natural Sciences

和文アブストラクト 幼児・子供の健全なコミュニケーション能力の発達には、大脳の正常な発育が必須であると考えられる。つまり、大脳の正常な発育プロセスを研究することが、幼児・子供の健全なコミュニケーション能力の発達を研究することに繋がる。また、大脳は、個体発生以降、周囲の環境に適応しながら可塑的に発育することが知られている。申請者は、以上のことを踏まえ、視覚系をモデルとして、大脳の可塑的発育プロセスを制御するメカニズムを解明することで、幼児・子供のコミュニケーション能力の発達プロセスへの理解を深めようと考えている。

Abstract Normal differentiation of the brain is known to be essential to progress communication skill of child, suggesting that the analysis of the process to form functional brain can clarify the mechanisms of how child acquires communication skill. Postnatal differentiation of the brain requires incoming information from outside world, and this process is what is called activity-dependent brain differentiation. Taken together, by analyzing the mechanisms of activity-dependent brain differentiation in the visual systems as models, I try to gain better understanding underlying the process to obtain normal communication skill during childhood.

1. 研究目的

幼児・子供の健全なコミュニケーション能力の発達には、大脳の正常な発育が必須であると考えられる。大脳は、個体発生以降、周囲の環境に適応しながら可塑的に発育する。本研究では、大脳可塑性研究の中でも一番の研究対象である視覚系に注目し、視覚系の可塑的発育メカニズムの解明を行い、最終的に幼児・子供の健全なコミュニケーション能力の発達へ寄与する提言を行

うことを目標とする。現在までに行われてきた視覚系の可塑的発育プロセスを対象とした研究は、現象論的解析が主であり、これらの研究を通して、臨界期と呼ばれる発育期の一時期、左・右眼からのバランスの取れた視覚入力によって視覚系大脳の正常な発育は促されると明らかにされた。しかしながら、依然としてこの可塑的現象を説明する詳細な分子メカニズム・細胞メカニズムの解明には至っていない。

本研究では、視覚系の可塑的発育メカニズムの解明を目標として、当該分野において一番有名な眼優位カラム(図 1)をモデルとして利用し研究推進する。眼優位カラムは、2 人の有名なノーベル賞学者 Hubel と Wiesel によって発見された、遠近感の知覚に必須の機能ユニットである。左・右眼からの視覚入力、左・右分別されたまま中継核である外側膝状体を通過し、最終的に大脳皮質第一次視覚野の左・右眼優位カラムにそれぞれ投射する(図 2)。つまり、左眼刺激に特異的に反応する神経細胞群を左眼優位カラム、右眼刺激に反応する細胞群を右眼優位カラムと呼ぶ。

本研究を開始するにあたり、申請者は、上記研究命題を解析する上で必要不可欠と思われる眼優位カラムに特異的な分子マーカーの単離に世界で初めて成功していた。本研究では、この分子マーカーをフルに活用して、視覚系の可塑的発育プロセスを制御する、分子メカニズム・細胞メカニズムの解明を目指している。最終的には、得られる成果を通して、幼児・子供のコミュニケーション能力をアップさせる研究提言を出来ればと考えている。

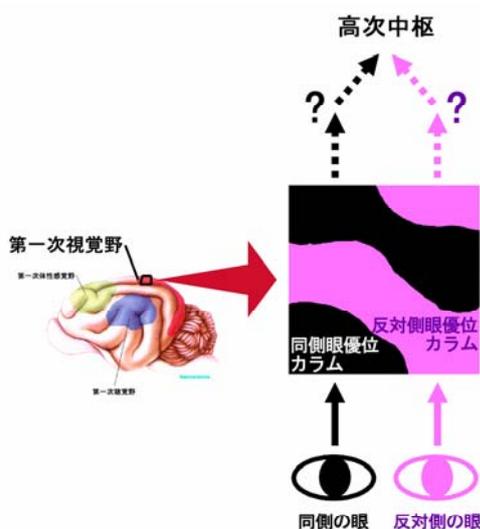


図 1. 遠近感の認知に必須の視覚経路

2. 研究経過

2.1. 同側眼優位カラム特異的シャペロンと

しての再同定と分子構造

申請者は、本研究を開始するにあたり、発育期の左眼優位カラムに特異的なシャペロンの単離に成功していた。しかしながら、その後の詳細な検討の結果、発育期において、このシャペロンは左眼優位カラムに特異的なのではなく、同側眼優位カラムに特異的ということが分かった。つまり、このシャペロンは、左大脳半球の第一次視覚野においては左眼優位カラムに、右大脳半球の第一次視覚野においては右眼優位カラムに一致して発現していることを確認した(図 2)。

続いて、このシャペロンの全長を第一次視覚野由来の cDNA library から単離したところ、少なくともショートとロングの 2 つのタイプが存在することが分かった。今後は、ショートとロングのいずれが同側眼優位カラムにより特異的な分子構造学的検討を加える。

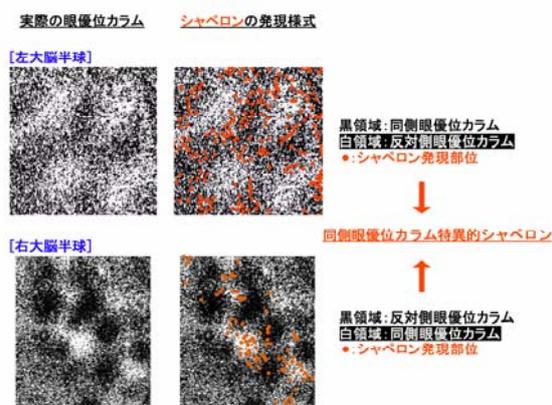


図 2. 可視化した眼優位カラムと同側眼優位カラム特異的シャペロン

2.2 同側眼優位領域を可視化する遺伝子改変マウスの作製

眼優位カラムの可塑的発育プロセスを細胞レベルで検討するために、以下のように研究を遂行している。

同側眼優位カラム特異的シャペロンを利用し、第一次視覚野内で同側眼優位領域のみが可視化される遺伝子改変マウスの作製を試みている。マウスにおいて、一方の大脳半球に注目した場合、第一次視覚野への視覚入力は、反対側からのものが 90%以上

を占める。マウス大脳皮質に、申請者が単離に成功した同側眼優位カラム特異的のシャペロンを強制発現させることで、第一次視覚野内に、同側眼から主に視覚入力を受ける同側眼優位領域をかなり持ったトランスジェニックマウスを作製することができる。加えて、これと同時に蛍光タンパクである GFP を共発現させることで、同側眼優位カラム特異的のシャペロンによって誘導された同側眼優位領域の可視化が可能となる(図 3)。実際には、多くの脳領域で発現している Thy1 因子の promoter 下に、順に loxP-stop cassette-loxP 配列・同側眼優位カラム特異的のシャペロン・IRES 配列・GFP を持つトランスジェニックマウスと、大脳皮質で特異的に発現している Emx1 因子の promoter 下に Cre recombinase を持つトランスジェニックマウスを掛け合わせ、大脳皮質だけに同側眼優位カラム特異的のシャペロン・IRES 配列・GFP を発現させる(図 4)。現在は、トランスジェニックマウスを作製する上で一般的な雄性前核注入法以外に、未受精卵に精子と目的遺伝子を注入する細胞質内精子注入(ICSI)法の 2 種類の方法を用い、これら動物の作製を行っている。

今後は、4.2.に記述するごとく、このマウスの GFP タンパクを長期的に追跡することで、眼優位カラムの可塑的発育プロセスで機能する細胞メカニズムの解明を目指す。

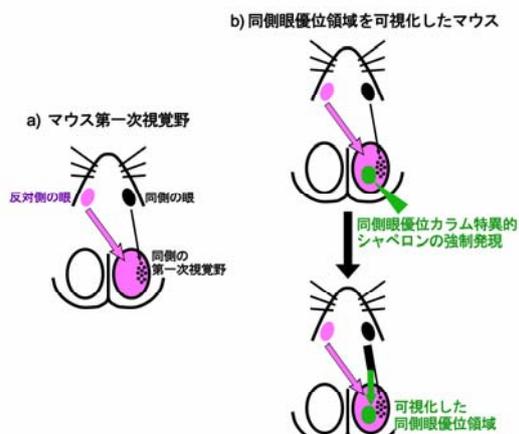


図 3. 同側眼優位領域を可視化したマウス

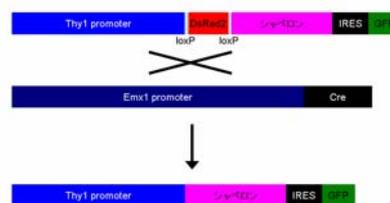


図 4. 同側眼優位領域を可視化するストラテジー

2.3. 同側眼優位カラム特異的のシャペロンに結合する臨界期因子の単離

眼優位カラムの発育過程で同側眼優位カラム特異的のシャペロン上に発現誘導される因子(臨界期因子)が眼優位カラムの発育を誘導すると考え、このシャペロンに結合する因子の単離を行っている。

ただし、2.1.のごとく、この同側眼優位カラム特異的のシャペロンはショートとロングの 2 種類のタイプを持ち、さらにショートとロングでは結合する因子が異なることが予想されるため、まずショートとロングのいずれが同側眼優位カラムにより特異的かを検討している。その結果を基に、4.3.に記述するごとく、同側眼優位カラムにより特異的なタイプに結合する因子を酵母の 2-hybrid 法を用いて単離する予定である。これらの成果から、最終的に、眼優位カラムの発育をコントロールする分子メカニズムを明らかにできる。

上記実験をスムーズに進めることを目標に、酵母の 2-hybrid 法を行うための機器等の準備を済ませた。

3. 研究成果

2.1.に記述したごとく、眼優位カラムの発育期、左眼優位カラム特異的に発現していると思われていたシャペロンは、実際には同側眼優位カラムに特異的であることが分かった。

発育期における、眼優位カラム形成という点に眼を向ければ、これは非常に大きな発見と考えられる。眼優位カラム形成時には、同側眼優位カラムに比べ反対側眼優位カラムの神経活動はかなり活発である。現

在までの多くの研究報告によると、発育期に神経活動の活発な領域・神経細胞ほどその占有領域を増やし、反対に神経活動の低い領域・神経細胞はその占有領域を失うことが分かっている。この法則に基づけば、発育期に反対側眼優位カラムが占める領域は増加し、同側眼優位カラムの占有領域は顕著に減少するはずだが、実際はそうではない。つまり、発育期の同側眼優位カラム領域に発現している何らかの因子が、反対側眼優位カラム領域の拡大と、その同側眼優位カラム領域への侵入を防いでいると想像される。申請者が発見した同側眼優位カラム特異的シャペロン、あるいはそこに集まる臨界期因子がそれを担っていると強く予想される。今後は、この仮説の立証を行い、眼優位カラムの可塑的発育メカニズムを明らかにしたい。

さらに、上記課題を探究することは、正常な脳の発育メカニズムの解明に繋がり、最終的には、幼児・子供のコミュニケーション能力の発達プロセスの詳細を明らかにすることになる。

以上、シャペロンの同側眼優位カラム特異的発現の発見は、学術的にインパクトの大きい成果と考えられる。

4. 今後の課題と発展

4.1. 同側眼優位カラム特異的シャペロンの分子構造学的検討

同側眼優位カラム特異的シャペロンにはショートとロングの2つのタイプが存在することが分かったが、そのいずれが同側眼優位カラムにより特異的なのかを *in situ* hybridization 法により検討する。

さらに、両方のタイプがタンパクとしても翻訳されているかを調べ、加えて、核酸レベルでの同側眼優位カラム特異性がタンパクレベルでも保存されているかを明らかにする。

この結果は、4.3.を進める上での重要な情報となるので、慎重に検討することが大切

である。

4.2. 同側眼優位領域を可視化する遺伝子改変マウスを用いた解析

第一次視覚野内で同側眼優位領域のみが蛍光タンパク GFP で可視化される遺伝子改変マウスを作製後、このマウスの GFP タンパクを長期的に追跡することで、眼優位カラムの経時的動態を観察する。最終的に、この結果から、眼優位カラムの可塑的発育過程で機能する細胞メカニズムが導き出せる。

4.3. 同側眼優位カラム特異的シャペロンに結合する臨界期因子の単離

4.1.の結果から、同側眼優位カラム特異的シャペロンに存在するショートとロングの2つのタイプのうち、同側眼優位カラムにより特異的なタイプを 4.1.の課題で明らかにした後、このタイプに結合する因子を酵母の2-hybrid法を用いて単離する。さらに、得られた因子も同側眼優位カラム特異的に発現しているか検討し、それを満たした因子が最終的に眼優位カラムの発育を誘導する臨界期因子と考えられる。

これら臨界期因子の分子機能を検討することで、最終的に、眼優位カラムの発育をコントロールする分子メカニズムが明らかとなる。

4.4. 今後の発展

以上の研究を通して、視覚系の可塑的発育メカニズムが解明され、最終的には、幼児・子供のコミュニケーション能力をアップさせる指針を提言できると期待している。

5. 発表論文リスト

1. Tomita K, Hubener M, Bonhoeffer T. A search for molecular factors specific for cat developing OD columns. in preparation.