

単一ニューロンの形態解析を基盤とした神経回路構造の研究

Studies of Neural Circuit Structure by Analysis of Single Neuron Morphology

古 田 貴 寛

Takahiro Furuta

京都大学大学院医学研究科高次脳形態学教室

要 旨 我々は、単一ニューロンの形態学的所見を積み上げることと、回路構造とニューロンの活動特性の関係性を調べる研究を行っている。ここで、この戦略に則した実験の三つの例を示す。1つ目は、組替ウイルスによる、皮質-脊髄投射ニューロンの軸索の標識である。単一ニューロン由来の軸索が、高い頻度で様々な皮質下領域に側枝を送るのが分かった。二つ目は、免疫染色を施したサンプルを、集束イオンビームを装備した走査型電子顕微鏡での観察に適用する実験である。超微細形態における免疫反応が三次元的に観察できた。三つ目は、ラットヒゲ感覚システムにおいて、juxtacellular labeling法を用いた実験である。視床ニューロンの受容野の大きさと、それらのニューロンが脳皮質に送る軸索の皮質内分布との関係を明らかにした。こうしたボトムアップの実験が、神経回路のしくみを説明する理論的モデルの構築に役立つと期待している。

キーワード：神経回路、単一ニューロンの形態と活動特性、Sindbis ウイルス、juxtacellular labeling

1. はじめに

人間の脳は、他の生物のそれと比べ、大きく発達しており、この器官が人間を人間足らしめる知性を生み出していることは、誰も疑うことは無いであろう。多くの脳研究者がこの脳のしくみを明らかにしたいと考えている。脳ではニューロンが活動することによって情報を符号化しており、その活動はシナプス結合を介して別のニューロンを興奮させ、あるいは抑制することにより、情報の伝達や処理が行われる。人間の脳は一千億個以上のニューロンで構成されており、それら多数のニューロンが複雑に結合して巨大な神経回路を形成しているが、その神経回路があまりにも巨大で複雑であるが故に、そのしくみを解き明かすのは非常な困難を伴うこととなっている。神経回路のしくみは時に電気回路のそれに例えられる事がある。電気回路は抵抗やコンデンサ等の電氣的素子が電線でつながったものである。一方、脳ではニューロンを素子と考えれば、その素子同士がシナプスを介して結合し、情報処理を行う神経回路が形成されているとも考えられる。電気回路のしくみを調べる方法として、最も有効なのは、その設計図あるいは回路図を見て理解することである。また、回路が作動している際にどこでどのような電圧が生じているかをテスターなどで調べるのも有効であろう。この方法論を神経回路の解析に持ち込むとすれば、回路図を調べることは、1つ1つのニューロンの結合を形態学的に調べて全体像を再構築する作業と考えることが出来るし、電気回路にテスター

を当てることは、ニューロンの活動を電気生理学的に調べることに似ている。私はこれらの方法を組み合わせ、神経回路の構造と活動の関係性を明らかにすることで、その回路のしくみを理解したいと考えている。本稿では、脳のメカニズムを解明する為に我々がとる戦略、つまり単一神経細胞の形態解析を基盤とした神経回路構造を明らかにする実験および、その回路構造とニューロンの活動特性との関係性を明らかにする実験を紹介する。

2. 背 景

神経回路の構造を単一細胞レベルから観察し再構築することを試みるためには、まず単一細胞を可視化しなければならない。ニューロンの形態を可視化する方法はいくつかあるが、単一ニューロンの形態を他と分離して観察できる方法はそれほど多くない。ゴルジ染色はニューロンの全体像を可視化する有力な方法であるが¹⁾、この方法では成体動物で軸索がほとんど染色されないことや、ランダムに細胞が染色されるため、目的のニューロンが可視化されるとは限らないこと等の欠点があり、精密な神経回路の解析には不十分であった。また、sharp electrodeを用いた細胞内染色によってニューロンの形態を可視化する方法は、細胞の活動特性を調べる電気生理学的な方法と組み合わせることが出来るため、有意義な方法であるが、手技の安定性が低く、ほとんどの場合は観察範囲が狭く限定される脳スライスにおいて適応される。このように、これら従来の方法を用いただけでは、「神経回路の構造を単一細胞レベルから観察し再構築する」という目的を達成することが不可能、あるいは、あまりにも非効率的で長大な時間が必要とされることになる。よって、これら従来の方法

〒 606-8501 京都市左京区吉田近衛町
TEL: 075-753-4331
2013年8月8日受付

の弱点を補う新規の方法を開発する必要があった。

1970年代以降では遺伝子工学が発達してきており、それを生物学における様々な研究に適用することによって、これらの分野における研究成果が飛躍的に増大している。その中でも、組替えウイルスを用いて生体内の細胞に遺伝子を導入する技術は、柔軟で汎用性があることや成功率が高いことから、多くの研究者に広く利用されている。我々は、緑色蛍光タンパク (GFP) を発現する組替え Sindbis ウイルスを作製し、これをラット生体に注入することにより、ニューロンの形態をよく可視化できることを報告した²⁾。以下の「3. ウイルスを用いたニューロンの可視化」では、この組替え Sindbis ウイルスを利用して神経回路構造の解析を行う例をお示しする。

細胞内記録/標識法は、鋭い先端を持ったガラス電極を細胞内に刺入し、細胞内電位の変化を記録するとともに、細胞標識物質を細胞内に注入することにより細胞の形態を可視化する方法である。上述のように、この方法は、単一ニューロンの形態学的特徴と活動特性とを直接関連づけて解析することの出来る非常に有益な手法であることはよく知られている。しかし、この手法の安定性や成功率はあまりに低く、最近では動物生体でこの方法を適応しているケースはとても少ない。細胞内記録/標識法の成功率の低さを補う方法として、Pinault は、neurobiotin 等の細胞標識物質を含んだガラス電極を用いて、細胞外記録を行ったニューロンに対して、そのガラス電極経由で一定の電流を注入することにより、記録された細胞を特異的に標識するという技術を報告した (juxtacellular labeling 法)³⁾。この技術は細胞外にガラス電極を維持して記録を行うものであるため、細胞内電位を測ることは出来ないが、活動電位の記録の安定性と細胞標識の成功率が高いことが大きな利点である。ただし、この juxtacellular labeling 法では、標識が弱い傾向があり、軸索の先端などは観察しにくいという弱点があった。我々は標識物質を変更する等の改良を加え、長い軸索の先端部まで見えるように juxtacellular labeling 法を発展させた。この技術を用いた解析の例として、視床のニューロンの活動様式と、記録されたニューロンが脳皮質に投射する軸索の形態的特徴との関連性を明らかにした研究結果を「4. juxtacellular labeling 法を用いた単一ニューロンの解析」にお示しする。なお、本稿で紹介する実験は全てラットを用いて行われたものである。

3. ウイルスを用いたニューロンの可視化

我々は、膜移行性シグナルを付与した GFP を発現する組替え Sindbis ウイルスを作製した。この GFP には growth-associated protein-43 由来の palmitoylation signal を N 末側に融合してあり、完成した GFP には脂肪酸が結合することになる (palGFP)。脂肪酸は疎水性が高いので、リン脂質二重膜に突き刺さるような状態で安定し、その結果、palGFP は細胞膜にぶら下がるような形になる。これにより palGFP が細胞の輪郭を縁取るように標識し、細胞の形態がより良く可視化される⁴⁾。一方、人工核酸の運び手となる Sindbis ウィ

ルスは RNA ウイルスであるトガウイルス科に分類され、神経細胞を始め様々な細胞種に感染することが知られている。この組替えウイルスの内部には次の世代を生み出すための構造タンパク質をコードする RNA が含まれていないため、細胞に感染してもウイルスが増殖して感染が広がっていくということが起こらないという実験上の安全が確認されている。作製した組替えウイルスを動物生体の神経組織に注入すると、ウイルスがニューロンに感染し、その感染したニューロンは palGFP を発現することによって形態を現す。このとき、感染するニューロンの数は注入するウイルス粒子の数に依存するが、たとえ少量のウイルスを注入した場合でも感染が起これば、その標識が強いものになるということが、従来の標識物質を注入してニューロンを可視化する方法と大きく異なる点である。

3.1 ウイルスによる軸索の可視化

このウイルスは通常、細胞体や軸索から感染するため、ウイルス濃度を薄めた液を目的の細胞の存在する場所に注入することによって、それらの細胞に感染させ、そこから伸びる軸索を観察するという手法で研究を行って来た^{5~7)}。ここでは、その方法を少しアレンジして、軸索から感染を起こした実験を紹介する。

大脳皮質には運動制御に関わる領域があり、大脳基底核や小脳などと共同して運動に関わる情報処理を行っていると考えられている。それらの回路から最終的な運動コマンドを出力するのは、一次運動野の 5 層に存在するニューロンであることが知られている。運動野 5 層ニューロンは長い軸索を下方に伸ばし、筋肉を直接駆動する脊髄や下位脳幹に運動制御情報を送るのであるが、その道中で他の様々な領域に側枝を出していることが知られている。つまり、最終的な運動コマンドを中枢の中で別の場所にフィードバックしていることが推測される。この軸索投射において、多数の軸索によって情報がコードされている訳だが、一本一本の軸索がどれくらいの割合でどのような領域に側枝を出しているかは明らかでなかった。そこで我々は組替え Sindbis ウイルスを用いて、皮質から脊髄に軸索を送るニューロンを標識し、それらの持つ軸索一本一本の形態を解析した。

皮質から脊髄に投射する軸索が脊髄で束になっている場所を狙ってウイルスを注入した (図 1A)。目的の軸索からウイルスが感染すると、ウイルス粒子は軸索を逆行して大脳皮質にある細胞体まで到達し、そこで GFP の発現が起こる。大脳皮質で GFP を発現したニューロンは脊髄まで軸索を送っていたということになる。ラット一匹あたりの大脳皮質における感染細胞の数は 0 から 4 個であった。感染細胞があった脳を GFP に対する免疫組織学的方法で染色すると、感染細胞の細胞体や樹状突起がゴルジ染色されたように精細に可視化された (図 1B)。さらに、それだけでなく、細胞体周辺にある軸索や、皮質から出て脊髄まで伸びていく軸索も観察することが出来た。これらの軸索が辿る典型的なコースは以下のようなものである。まず皮質を下方に出て白質を貫くと線条体

(CPu) に入り、そこで枝分かれを見せて (図 1C), 側枝は線条体内で展開する (図 1D). 軸索の本線はそのまま下方に進み, 視床の前まで来てそこで後方に向かって枝を出す (図 1E). その枝は多くの場合, 不確帯 (ZI) という構造に入力する (図 1F). さらにそこから後方に向かう軸索本線は脳幹の橋に達し, 橋核 (Pn) に側枝を送る (図 1G, H). 軸索本線は最終的に脊髄に向かうが, 注入部位周辺には GFP で標識された (つまりウイルスに感染した) 構造物が多くあり, その場所での形態解析は出来ない. この他にも様々な領域に側枝が伸びることが観察されたが, 上に挙げた三つの領域は, 皮質から脊髄に送られる軸索の側枝を特に高い頻度で受けることが分かった. この機構がどのような役割を果たすのかはまだ明らかでないが, 運動コマンドのコピーを利用することによって, 予定された運動と実際の運動の誤差を検出して, 運動の微調節をしたり, 次の運動コマンドの計算を行ったりするのではないかと想定される. こうした機能に上の三つの領域は深く関わっているのかもしれない.

3.2 ウイルスによる樹状突起の可視化と解析

この組替え Sindbis ウイルスに感染したニューロンでは, 軸索だけでなく, 入力を受ける場所である樹状突起も非常に明瞭に観察される. このことを利用して, 線条体のニューロンがどのように興奮性入力を受けるのかを定量的に確かめる実験を行った.

上にも述べたように, 線条体は運動制御に関わる場所と考えられているが, その主たる入力源は脳皮質と視床である. 線条体に存在するニューロンの大多数が抑制性の投射型ニューロンであり, 興奮性入力を各々の樹状突起で直接受ける. 細胞種によって入力様式は異なるのか, また, 単一ニューロンの樹状突起上において, 細胞からの距離によって入力密度が違うのか, といった事柄を形態学的かつ定量的に解析し, この領域が持つ神経回路の構造的な特徴を記載したいと考えた.

この研究では, 薄めたウイルス液を線条体に注入し, 少数のニューロンが標識されるような条件で実験を行った. 感染したニューロンを含む切片には, 興奮性入力の化学的マーカーである vesicular glutamate transporters (VGluT1/2) に対する免疫染色を施し, 蛍光標識を行う. 共焦点レーザー顕微鏡を用いて, 感染したニューロンを観察し, ターゲットとなる樹状突起の場所を決定する (図 2A). ターゲットの樹状突起を共焦点レーザー顕微鏡で拡大して, z 方向に少しずつずらした連続画像で撮影すれば, 3 次元の形態データを取得することが出来る. 図 2B は免疫染色された興奮性入力 (赤色) と GFP で標識された樹状突起 (緑色) との立体的な位置関係を示している. このようにして得られたデータで, 樹状突起に対し近接している興奮性入力を数え, 定量的な解析が可能となった. 近接しているということは, そこでシナプス結合を形成している可能性があることを示唆するが, 実際にシナプスを形成しているかどうかは電子顕微鏡による観察が必要である. そこで, レーザー顕微鏡で撮影した切片を, 電子顕微鏡で観察するための染色に供し (ここでは GFP を増感

銀粒子で, VGluT2 を DAB で標識した), 集束イオンビーム (FIB) を装備した走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察する (図 2C). FIB-SEM は通常, 工学分野で利用されるものであ

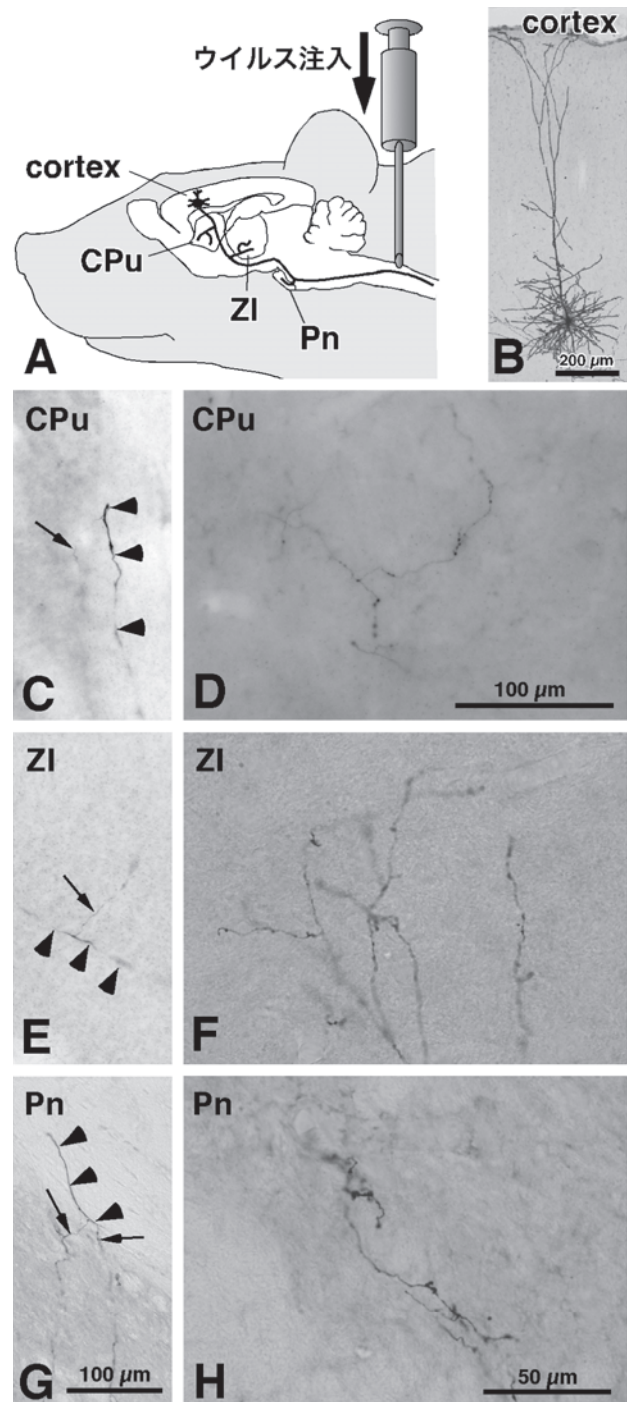


図 1 組替え Sindbis ウイルス注入による, 皮質-脊髄路ニューロンの標識

A: 注入方法と神経細胞の標識を示す模式図. B: 組替えウイルスに感染した大脳皮質ニューロンの細胞体と樹状突起. C: 線条体 (CPu) における枝分かれ. 矢頭は主軸索を示し, 矢印は側枝を示す. D: 線条体における側枝. E: 不確帯 (ZI) における枝分かれ. 矢頭は主軸索を示し, 矢印は側枝を示す. F: 不確帯における側枝. G: 橋核 (Pn) における枝分かれ. 矢頭は主軸索を示し, 矢印は側枝を示す. H: 橋核における側枝.

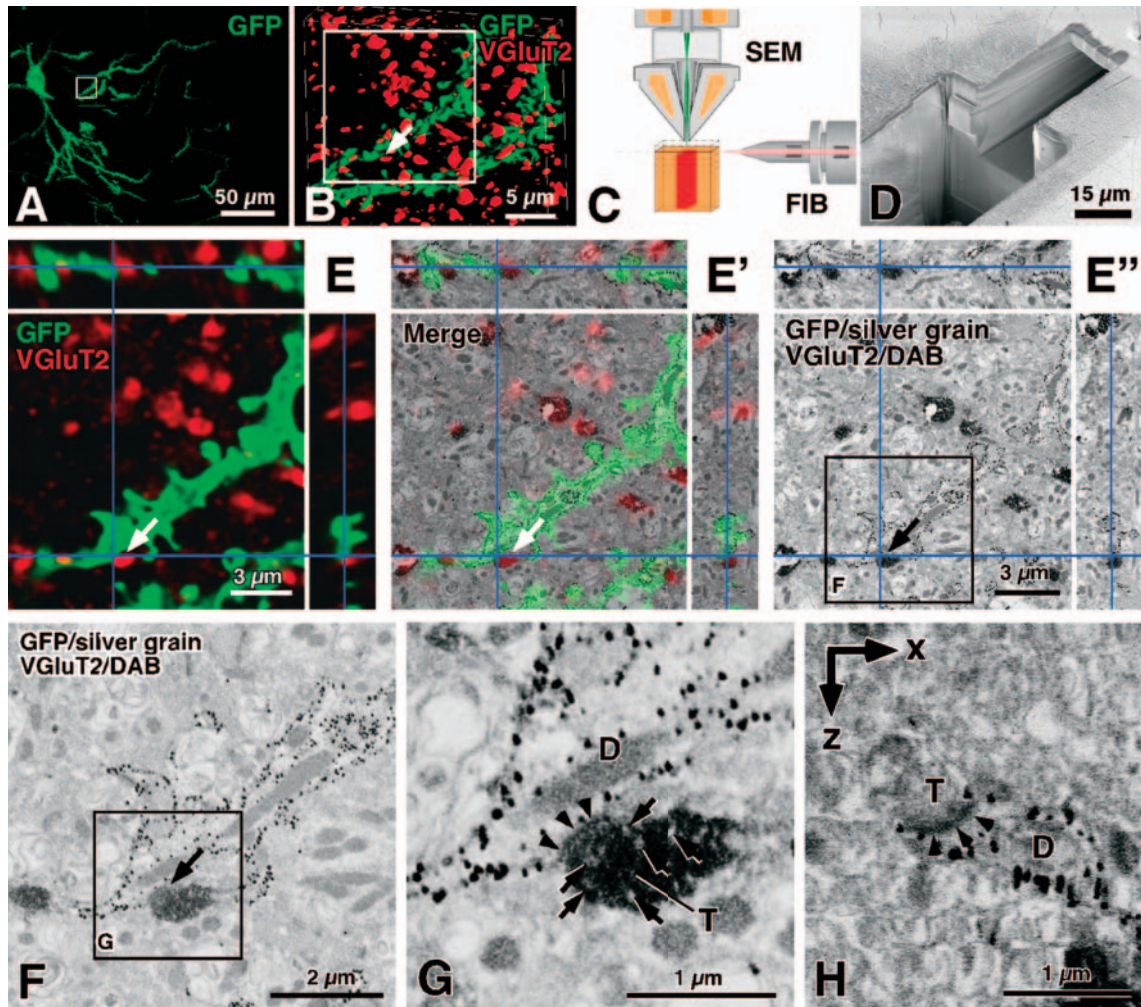


図2 ウイルスと免疫染色によって標識した切片を共焦点レーザー顕微鏡とFIB-SEMで観察する実験（文献9より改変して転載）。A: GFPで標識されたニューロンの全体像。B: 共焦点レーザー顕微鏡で拡大して撮影された樹状突起（緑）とVGluT2陽性神経終末（赤）の位置関係を三次元的に表示している。C: FIB-SEMのしくみを示す模式図。D: FIB-SEMで目的の場所を削りながら撮影した後のサンプル。E-E'': 共焦点レーザー顕微鏡の三次元的像とFIB-SEMで得た三次元的像がよく一致している。F: 増感銀粒子で標識された樹状突起とDABで標識されたVGluT2陽性神経終末をFIB-SEMで撮影したところ。B, E-E'', F内の矢印は全て同じ神経終末と樹状突起の結合を示している。G: 矢頭はシナプス後膜を示している。矢印はDAB標識された終末内に見える小包様構造。H: FIB-SEMにて取得した超微細構造の三次元データをX-Z断面で表示している。矢頭はX-Y平面にほぼ平行なシナプスを示している。

り、SEM内で観察対象をFIBによって加工し、そのままSEM観察を行うということが可能である。近年では、このFIB-SEMの技術を、脳などの生体試料の観察に応用する実験が行われている⁸⁾。本研究では、サンプルの観察面を薄く削り取っては撮影するということを連続的に繰り返し（図2D）、超微細構造の三次元的データを得る。SEMの反射電子像はサンプル表面の組成を反映したものになるので、結果として、超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察して得られる画像を反転したものに近い像が得られる。図2E-E''は共焦点レーザー顕微鏡で得た三次元データと、FIB-SEMによって得られた三次元的データがよく一致することを示している。もちろんFIB-SEMで得られたデータの方がはるかに解像度が高いことは言うまでもない。標識された樹状突起を見ると、細胞膜に沿って増感銀粒子が並んでいることが分かり、ねら

い通りpalGFPが細胞膜直下に分布していることが示されている（図2F）。ある興奮性終末は共焦点レーザー顕微鏡で近接が確認された（図2B, E内の矢印）が、この終末は電子顕微鏡で見ると間違いなく樹状突起とシナプス結合を形成していることが確認できた（図2G）。このように比較的広い視野を持つ共焦点レーザー顕微鏡の観察と、高い解像度を持つ電子顕微鏡の観察を重ね合わせることで、単一ニューロンの全体像の中で興味のある場所を高い解像度で確認することが可能になった⁹⁾。超微細構造の三次元的データは、ウルトラミクロトームによる連続超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察することでも得ることが出来るが、FIB-SEMによる観察ではz軸方向の解像度が高いため、三次元データをx-z平面で観察したとき、透過型電子顕微鏡ではうまく観察できないシナプスが明確に確認できるという利点がある（図2H）。さらに、

FIB-SEMでは自動的に組織を削って撮影できるため、連続超薄切片の作製、画像の撮影、画像の重ね合わせ、といった労力が大幅に削減され、また、時間も短縮することが出来る。

4. juxtacellular labeling法を用いた単一ニューロンの解析 (形態的特徴と活動特性の関係性)

神経回路においては、ニューロン同時の結合様式がその回路の機能に大きな影響を与えていると想像される。神経回路のメカニズムを理解するためには、ニューロンが形成する回路の構造だけでなく、同時にそれらのニューロンの活動様式と回路の構造の関係性を知ることが大変重要である。ここで紹介する研究は、ラットで顕著に発達した体性感覚系であるヒゲ感覚システムを題材として、juxtacellular labeling法を適用することにより、神経回路の構造と活動様式の直接的な関係を単一ニューロンレベルで明らかにする試みである。

4.1 ラットのヒゲ感覚システムの概要

暗い場所や時間帯でよく活動するにもかかわらず、発達した視覚系を持たないラットは、ヒゲ感覚を利用して周囲の空間的情報を得ている。ラットにとってヒゲ感覚は最も優先的な感覚系の1つであり¹⁰⁾、それに関わる中枢の構造も大きく、発達している。実験動物を研究に利用する時、その動物種で最も大きく発達したシステムを対象とするのは常套手段であり、したがって触覚の研究のためにはラットのヒゲ感覚システムが大変適していると言える。

ラットの長いヒゲは鼻のすぐ後、吻部に生えており、その毛根を包む毛包は規則正しく配列されている。この配列は個体間でも不変であるため、一本一本のヒゲには番地のような名前がついている(例:A1, A2, B1, B2...)。毛包の中の機械受容器がヒゲに対する機械的刺激を神経活動に変換する。一次求心性線維は三叉神経となって脳幹に侵入し、三叉神経核に向かって枝を出して入力する。三叉神経核は、いくつかの領域に分けられており、この中でも特に主感覚核と脊髄路核中間亜核がヒゲ感覚システムにおける一つ目の中継核として重要である¹¹⁾。三叉神経核から第二の中継核である視床に投射するニューロンは、視床後内側腹側核(VPM)等に軸索をのばし、標的となる視床ニューロンを興奮させる。その興奮は視床ニューロンが大腦皮質に軸索を投射することによって伝えられるが、後内側腹側核は主に一次体性感覚野の4層と6層に投射することが知られている¹¹⁾。この経路全体において重要なことは、ヒゲ刺激に反応するニューロンが一本一本のヒゲに対応して群をなして分布しており、整然としたヒゲの配列が三叉神経核でも視床でも大腦皮質でも再現されているということである¹²⁻¹⁴⁾。このことは基本的には体部位表現(somatotopy)の一種であると考えられるが、隣り合うヒゲに対応する領域がほとんど重なり合うことなく明確な境界線を持っていることが特徴的である。特に大腦皮質一次体性感覚野の第4層を表面に水平な切片で観察すると、蜂巣状の構造が認められ、それがヒゲの配列と対応しているわけであるが、一本のヒゲと対応する領域をバレル(barrel)とよび、バレル

とバレルの間の領域をセプタ(septa)とよんでいる¹⁵⁾。

ヒゲ刺激に対するニューロンの反応特性は、主に麻醉下のラットを用い、人工的にコントロールされた機械的刺激によってヒゲを一定の方向へ押すという方法で調べられてきた。ヒゲを刺激する装置としてよく用いられるものの一つはピエゾ素子である。ピエゾ素子は電圧をかけると正確に変形する素材であり、これを利用することによりヒゲを任意の方向に押して刺激を作り出すことができる。ピエゾ素子によるヒゲ刺激と細胞外記録を組み合わせることによりニューロンの反応特性を調べることができる(図3A)。視床のヒゲ領域に存在するニューロンはこの受動的なヒゲ刺激に対して発火活動を見せる¹⁶⁾。大腦皮質一次体性感覚野のバレル野に存在するニューロンの大多数もヒゲ刺激に反応するが、ニューロンが存在する場所や層によって反応の大きさや反応潜時、受容野の大きさ等が異なっている¹⁷⁾。末梢からの情報が皮質に到達するのは非常に速く、皮質の中で最も早く反応するニューロンは刺激の開始から十ミリ秒ほどの潜時で反応し始めるものがある。典型的なバレル内4層のニューロンは、その細胞体が所属するバレルが対応するヒゲの刺激に対してはよく反応するが、その隣のヒゲに対してはほとんど反応しないことが知られている。一方、セプタに存在するニューロンはもっと多くのヒゲに反応する傾向がある。つまり、バレルの中とセプタでは受容野の大きさが異なるといえる。

4.2 セプタ領域ニューロンを駆動する入力

上で説明したように、大腦皮質一次体性感覚野において、バレルの中のニューロンとセプタ領域のニューロンとでは、それぞれの受容野の大きさに違いがある。バレル内のニューロンは、1つのヒゲに反応するという性質を持つ視床ニューロンから入力を受け、駆動されているので、受容野が小さいという性質を持つ。一方、セプタのニューロンはどのニューロンから入力を受け、大きな受容野という性質を持つのであろうか。視床からセプタへ投射する経路を調べるためにjuxtacellular labeling法を用いて実験を行った。Juxtacellular labeling法では、標識物質を入れたガラス電極で細胞外記録を行った後、そのままそのパルス状の電流を流すことによって記録を取った細胞のみに標識物質を注入し、単一ニューロンの形態を可視化する方法である³⁾。我々は標識物質としてbiotinylated dextran amineを採用することにより、視床から大腦皮質まで伸びる長い軸索の可視化に成功した¹⁸⁾。視床後内側腹側核においてヒゲ刺激に対する反応を調べた結果、後内側腹側核の中央部のニューロンは一本のヒゲに反応するのに対し、背側部では複数のヒゲに反応する(つまり受容野が大きい)ニューロンが見つかった(図3B)。こうした生理学的特性を同定したニューロンにjuxtacellular labeling法を適用することによってそのニューロンの形態を可視化することができた(図3C, D)。視床から大腦皮質に到達する軸索(図3E)をトレースし、その分布を見ると、受容野がヒゲ一本のみである典型的な視床ニューロンは受容野に対応するバレル内に終末を集中させているのに対し(図3G)、複数の

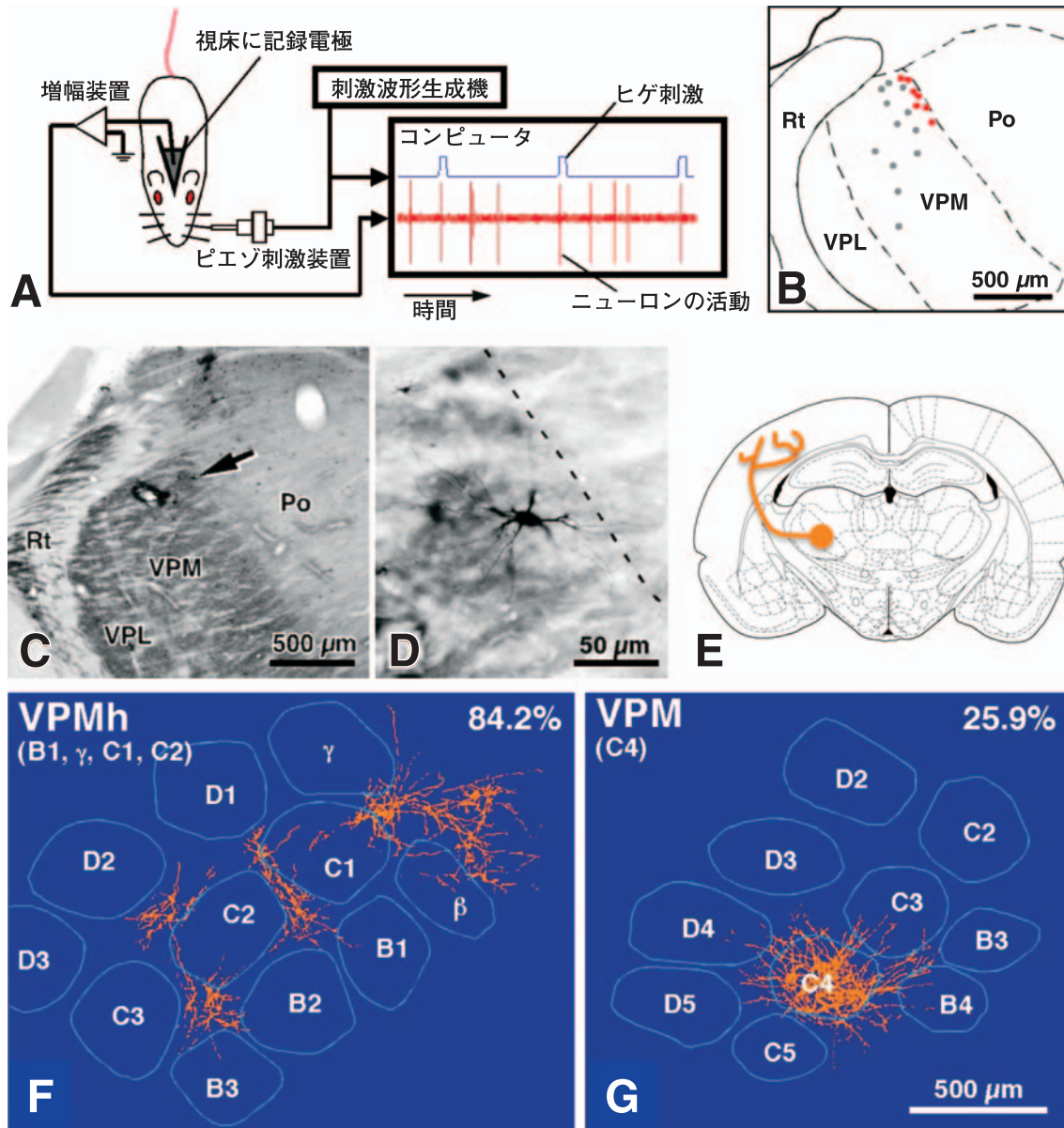


図3 ラットヒゲ感覚システムにおいて、juxtacellular labeling法を用いて明らかにした受容野の大きさと軸索分布パターンの関係 (文献18より改変して転載)。

A: ヒゲ刺激に対するニューロンの反応を調べる実験セットアップ。B: 視床の後内側腹側核における、複数のヒゲに反応するニューロン (赤い丸) と単一のヒゲに反応するニューロン (灰色の丸) の分布。C, D: juxtacellular labeling法によって標識された視床ニューロン。E: 視床から大脳皮質に投射する軸索を示す模式図。F: 複数のヒゲに反応する (受容野の大きい) 視床ニューロンは、大脳皮質一次体性感覚野のパレルとパレルの隙間 (セプタ) に軸索を投射する。パーセンテージはパレルの外側に分布する終末の割合を示す。G: 単一のヒゲに反応する視床ニューロンはそのヒゲに対応するパレルの中に主として軸索を投射する。

ヒゲに反応するニューロンはその軸索終末をパレルとパレルの間のセプタに多く分布させていることが明らかになった (図3F)¹⁸⁾。このように質の違う情報が、別々の経路で別々の入力端子を使って大脳皮質に届けられているということが、その後の大脳皮質における情報処理様式に貢献するものと推測される。

5. 今後の技術的展開

神経回路構造のエッセンスは、ニューロン同士がシナプス

を介して形成する結合様式である。したがって、シナプス結合の分布を解析することは回路構造の理解において非常に重要である。しかし、現時点では、シナプスの存在を形態学的に解析するためには、厳密に言えば、電子顕微鏡的手法に依る以外に手段がない。しかし、対象となる神経組織全体を連続超薄切片にして観察するのは、あまりに時間がかかるので現実的でない。また、上に紹介したように、超微細構造の連続画像を自動的に取得する方法が発達して来ているが、まだ、その視野が狭いなどの問題がある。この方法に関しては、ハー

ドウェアの大型化や、処理するコンピュータシステムのパワーアップ等といった「力技」で解決していくのかもしれない。一方、最近では、電子顕微鏡を使用しないでシナプス結合の解析を行うアイデアが出てきつつある。それは、シナプス結合を越えて受け渡される物質を遺伝子工学的にニューロンに発現させようというものである。例えば、組替え狂犬病ウイルスを利用した例は既に報告されている¹⁹⁾。また、順行性にシナプスを越えて受け渡されることが知られている小麦胚凝集素 (WGA) を利用した例も学会等で見受けられるようになった。これらの技術が成熟すれば、電子顕微鏡を用いなくても、ある1つのニューロンに入力する(あるいはある1つのニューロンから入力を受ける)ニューロンの集団を標識し、光学顕微鏡で解析することが可能になるかもしれない。また、最近では、動物生体において、電気穿孔法によって単一細胞に遺伝子を導入する技術が発表された²⁰⁾。これらを組み合わせれば、あるニューロンの活動特性を記録した後、そのニューロンにシナプスを越える物質を発現させることにより、ニューロンの活動特性とその入出力構造の関係を明らかにすることが出来るようになるかもしれない。

神経科学の研究業界では、神経活動イメージング等の神経活動記録法や遺伝子工学を応用した手法が非常に発達しており、近年の発表論文のほとんどがこうした最新技術に関わっているのが現状である。一方で、顕微鏡を用いた形態学的研究は、ともすれば、時代遅れと見なされがちである。しかし、形態学的手法は、神経回路の複雑な構造を高い解像度で直接的に観察し、信頼度の高いデータを得られる点で他の手法には代えがたいものである。ここでその一端を紹介したように、新しい技術と形態学的解析とを組み合わせることは、神経回路メカニズムの理解に貢献する重要なデータを得るための、必要不可欠なアプローチの1つとなり得ると確信している。

6. おわりに

本稿で紹介したように、我々は単一ニューロンの形態学的データを積み上げることによって、神経回路の構造を再構築し、さらにそこに組み込まれるニューロンの活動特性と関連づけて解析することにより、回路のメカニズムの一端を示唆する基礎的な所見を報告してきている。これは非常にボトムアップ的な戦略であって、その行く道は険しく長い。いつも足下ばかりを見ている目を上げて、遙か前方を眺めた時に、ふと思うことがある。一体、どんなデータが得られれば、我々は神経回路のメカニズムを説明できるのだろうか。どのような研究結果が得られた時に、我々はその仕組みを理解したということになるのだろうか。この問に対する明確な答えを筆者はまだ持っていないが、おぼろげながら思うことは、理論的なモデルを構築する必要があるのではないかということである。そのモデルが脳の働きをうまく説明できる、あるいは、脳の機能をシミュレート出来るということが最終的なゴールなのかもしれない。もちろん筆者にはそのようなモデルを構

築するような知性は備わっていないが、どこかにいる天才がいつかそのようなモデルを構築する際に少しでも貢献できるような基礎的なデータを、地道に積み上げていきたいと思う。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon の Nadia Urbain 教授、鹿児島大学の園村貴弘助教、京都大学大学院医学研究科高次脳形態学教室の金子武嗣教授および、Laval 大学ロバートジファード研究所の Martin Deschenes 教授との共同で行われた。特に金子武嗣教授と Martin Deschenes 教授には、本研究の遂行にあたり、多くのご支援とご助言をいただいたので深くお礼申し上げる次第である。

文 献

- 1) Ramón y Cajal, S.: *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados.*, Madrid, Moya (1899–1904). (英語訳本 Swanson, N. and Swanson, L.W.: *Histology of the nervous system of man and vertebrates.*, New York, Oxford University Press (1995))
- 2) Furuta, T., Tomioka, R., Taki, K., Nakamura, K., Tamamaki, N. and Kaneko, T.: *J. Histochem. Cytochem.*, **49**, 1497–1508 (2001)
- 3) Pinault, D.: *J. Neurosci. Methods.*, **65**, 113–136 (1996)
- 4) Moriyoshi, K., Richards, L.J., Akazawa, C., O'Leary, D.D.M. and Nakanishi, S.: *Neuron*, **16**, 255–260 (1996)
- 5) Kuramoto, E., Furuta, T., Nakamura, K.C., Unzai, T., Hioki, H. and Kaneko, T.: *Cereb. Cortex*, **19**, 2065–2077 (2009)
- 6) Matsuda, W., Furuta, T., Nakamura, K.C., Hioki, H., Fujiyama, F., Arai, R. and Kaneko, T.: *J. Neurosci.*, **29**, 444–453 (2009)
- 7) Ohno, S., Kuramoto, E., Furuta, T., Hioki, H., Tanaka, Y., Fujiyama, F., Sonomura, T., Uemura, M., Sugiyama, K. and Kaneko, T.: *Cereb. Cortex*, **22**, 2840–2857 (2012)
- 8) Knott, G., Marchman, H., Wall, D. and Lich, B.: *J. Neurosci.*, **28**, 2959–2964 (2008)
- 9) Sonomura, T., Furuta, T., Nakatani, I., Yamamoto, Y., Unzai, T., Matsuda, W., Iwai, H., Yamanaka, A., Uemura, M. and Kaneko, T.: *Front Neural Circuits*, **7**, 26 (2013)
- 10) Vincent, S.B.: *Behav. Monographs.*, **1**, 7–85 (1912)
- 11) Deschenes, M.: *Scholarpedia (peer-reviewed open-access encyclopedia)*, **4**, 7454 (2009)
- 12) Ma, P.M. and Woolsey, T.A.: *Brain Res.*, **306**, 374–379 (1984)
- 13) Sugitani, M., Yano, J., Sugai, T. and Ooyama, H.: *Exp. Brain Res.*, **81**, 346–352 (1990)
- 14) Simons, D.J. and Woolsey, T.A.: *Brain Res.*, **165**, 327–332 (1979)
- 15) Woolsey, T.A. and Van der Loos, H.: *Brain Res.*, **17**, 205–242 (1970)
- 16) Simons, D.J. and Carvell, G.E.: *J. Neurophysiol.*, **61**, 311–330 (1989)
- 17) Petersen, C.C.: *Neuron*, **56**, 339–355 (2007)
- 18) Furuta, T., Kaneko, T. and Deschenes, M.: *J. Neurosci.*, **29**, 4089–4095 (2009)
- 19) Wickersham, I.R., Lyon, D.C., Barnard, R.J., Mori, T., Finke, S., Conzelmann, K.K., Young, J.A. and Callaway, E.M.: *Neuron*, **53**, 639–647 (2007)
- 20) Oyama, K., Ohara, S., Sato, S., Karube, F., Fujiyama, F., Isomura, Y., Mushiake, H., Iijima, T. and Tsutsui, K.I.: *J. Neurosci. Methods.*, **218**, 139–147 (2013)