

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22123009

研究課題名(和文) 領野・層発現分子の機能的意義の解明

研究課題名(英文) Analysis for the functional significance of area and layer selective genes

研究代表者

山森 哲雄(Yamamori, Tetsuo)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：80260206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 135,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、霊長類の大脳皮質領野に顕著に発現する遺伝子の網羅的解析から、視覚野と連合野に特異的に発現する2つの遺伝子群を明らかにしてきた。本研究では、(1)視覚野と連合野での特異的発現制御に、連合野特異的発現遺伝子のプロモーター部での高メチル化と視覚野特異的発現遺伝子のプロモーター部での低メチル化を見出した。更に、メチル化結合蛋白MBD4によって、連合野特異的発現遺伝子(SLIT1, RBP4)が制御されていることを明らかにした。(2)マーマセット視覚野で遺伝子発現を用いて眼優位性の存在の確証を得た。(3)霊長類の大脳皮質にウイルスベクターを応用する為のシステムを開発した。

研究成果の概要(英文)：We identified the two group of genes that are selectively expressed in the primate neocortical areas using large scale analysis: One group of the genes is specifically expressed in the association areas and the other is specifically expressed in the primary visual area. In this study, we found the following results during the term. (1) We examined the promotor region of the association area selective genes and found highly methylated while that of the primary visual area is little methylated. We then found that MBD4 regulated the association selectively expressed genes (PNMA5 and RBP4). (2) We confirmed the existence of the ocular dominance column in the primary visual cortex in marmosets using immediate early gene expression. (3) We developed the virus vector systems so that we are able to apply the systems to the primate neocortex.

研究分野：分子脳科学

キーワード：大脳皮質 層 領野

### 1. 研究開始当初の背景

大脳新皮質は、哺乳類にのみ観察され、全ての哺乳類で6層を有する構造体である。大脳新皮質の層構造は、発生に伴って、新たにできた細胞が前にできた細胞を乗り越えて、新たな層を作る事によって形成され、折り畳まれたシートのように頭蓋の中に収容されている。大脳皮質は、6層構造から成るとともに、領野と呼ばれる機能的単位から成っている。

1990年代にマウスを用いて、大脳皮質領野に特異的に発現する遺伝子の網羅的解析からは、大脳皮質に特異的に発現する遺伝子は同定されなかった。

そこで、研究代表者は、1990年代後半から、霊長類の代表的領野で特異的に発現する遺伝子を網羅的に検索し、その発現解析を詳細に行った。これらの遺伝子発現の制御と機能を解析することを目的として研究を開始した。

### 2. 研究の目的

領域代表者は、霊長類の領野間で顕著な発現の差のある遺伝子を探索し、連合野特異的・視覚野特異的な2群に分かれることを明らかにしてきた。本研究計画では、これらの霊長類特異的発現遺伝子の発現と機能を解明することを目指して、以下の研究達成目標を掲げて研究を行った。

- (1) 視覚野と連合野の領野特異的発現を制御している分子機構の解明
- (2) 霊長類の大脳皮質領野特異的発現遺伝子の機能解析と霊長類での解析手段の開発

### 3. 研究の方法

上記の研究目標を達成するため、以下の方法を用いて研究を行った。

- (1) 視覚野と連合野特異的に発現する遺伝子の発現制御機構を解明するため、視覚野と連合野特異的に発現する遺伝子の発現制御のエピジェネティック制御機構の解明。
- (2) 霊長類視覚野での遺伝子発現制御機構を解明するため、マーモセット一次視覚野に於ける活動依存的発現遺伝子を用いた、眼優位性カラムの構造と機能の解析。
- (3) 霊長類の領野特異的発現遺伝子の発現制御と機能解析のため、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入システムの開発。

### 4. 研究成果

上記の研究方法に即して以下の研究結果を得た。

- (1) 視覚野と連合野特異的発現遺伝子の発現制御機構を解明するため、連合野特異的発現遺伝子 (PNMA5, RBP4, SLIT1) と視覚野特異的発現遺伝子 (5HTR1B, 5HTR2A, FSTL1/OCC1) のプロモーターの CpG 領域のメチル化レベルを調べた。その結果、連合野特異的発現3遺伝子の CpG 領域のメチル化レベルは高く、視覚野特異的発現3遺伝子のメチル化レベルは、いずれも低かった。しかし、メチル化レベルは、遺伝子毎に決まっており、視覚野と連合野間で差はなかった。もし、メチル化レベルが連合野特異的発現遺伝子と視覚野特異的発現遺伝子の発現レベルを決定しているとしたら、こ

れは、どのように説明できるだろうか？一つの可能性は、メチル化領域を認識するメチル化結合蛋白質の霊長類大脳皮質に於ける発現分布を調べた。その結果、MBD4のみが領域間の発現差があり、連合野で選択的に高かった。そこで、培養ヒト神経芽細胞と成熟個体に於ける MBP4 の機能を LoF (loss of Function) と GoF (Gain of Function) を AAV ベクターを用いて調べた。その結果、MBP4 の発現が高い連合野では、LoF では、PNMA5 と RBP4 の発現が低下し、発現が低い視覚野では、GoF で発現が増加することを証明した (図1、Hata et al., J Neurosci., 33, 19074-19714, 2013)。

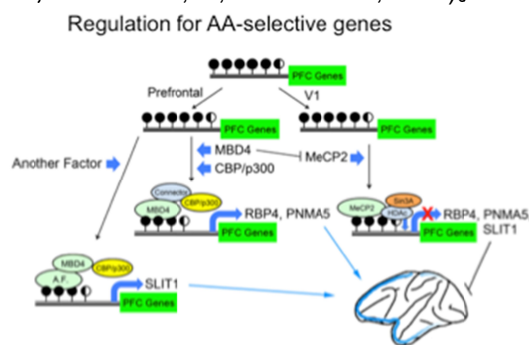


図1

(2) 霊長類一次視覚野に於ける活動依存的遺伝子発現制御機構を解明するために、マーモセットの一次視覚野に於ける最初期遺伝子の発現を調べた。そのため、Markstahler 等 (J Comp Neurol. 393:118-34, 1998) によって、開発された TX を片眼に注入、暗闇に 24-48 時間おいた後、照射光によって一次視覚野に誘導される最初期を in situ hybridization 法によって検出することによって、成熟マーモセットに於ける眼優位性カラムの存在の確認を得た (Nakagami Y., et al., Front. Neural Circuits 7, 43, 2013)。

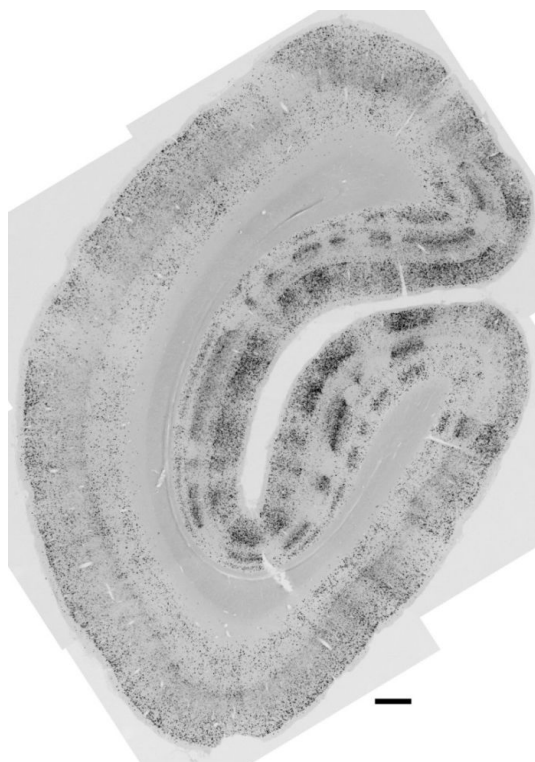


図2

(3) 大脳皮質領野特異的発現遺伝子の機能を解析するためには、霊長類に適用可能な遺伝子操作法を確立しなければならない。その為に、ウイルスベクター法を用いた遺伝子操作法確立を目指し、AAVベクターの異なる血清型(1,2,5,8,9)による感染性の違いをマウス、マーモセット、マカカの大脳皮質で比較した(Watakabe, A., et al., 93, 144-157, 2014)。また、逆行性ベクターと二重感染法を用いた大脳皮質と皮質下結合解析へ適用した(Front Neural Circuits 8, 110, 2014)。

(4) 当研究室で開発したWheel running systemを用いて、ドパミン受容体D1RとD2Rのgeneral knockout(KO)マウスを用いて、運動学習能力を測定した。その結果、これまで、遺伝的背景をできるだけ均一化した、D1R-KOとD2R-KOマウスでの詳細な比較がなかった、運動学習能力の正確な判定が可能となった。この結果、Rotarod法では計測できない運動学習能力をWheel running systemで測定できることが証明された(Nakamura T., et al., Front Integr Neurosci 8, 56, 2014)。

## 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25件)含邦文

1、Watakabe A, Ohtsuka M, Kinoshita M, Takaji M, Isa K, Mizukami H, Ozawa K, Isa T, Yamamori T. Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. Neurosci Res 93, 144-157 (2014). (査読有)

2、Wheel running systemを用いたD1R, D2Rノックアウトマウスの解析

Nakamura T, Sato A, Kitsukawa T, Momiyama T, Yamamori T, Sasaoka T. Distinct motor impairments of dopamine D1 and D2 receptor knockout mice revealed by three types of motor behavior. Front Integr Neurosci 8, 56 (2014). (査読有)

3、大脳皮質領野特異的発現遺伝子のメチル化とメチル化結合蛋白質MBD4による発現制御  
Hata K, Mizukami H, Sadakane O, Watakabe A, Ohtsuka M, Takaji M, Kinoshita M, Isa T, Ozawa K, Yamamori T. DNA methylation and methyl-binding proteins control differential gene expression in distinct cortical areas of macaque monkey.

J Neurosci 33, 19704-19714 (2013). (査読有)

4、活動依存的遺伝子発現を用いたマーモセット視覚野に於ける眼優位性カラムの存在の確証  
Nakagami Y, Watakabe A, Yamamori T. Monocular inhibition reveals temporal and spatial changes in gene expression in the primary visual cortex of marmoset. Front Neural Circuits 7, 43 (2013). (査読有)

5、大脳皮質領野特異的発現遺伝子の発現パターンとその機能的意味

Yamamori T. Selective gene expression in regions of primate neocortex: implications for cortical specialization. Prog Neurobiol 94, 201-222 (2011). (査読有)

[学会・シンポジウム発表](計28件)

Tetsuo Yamamori Gene manipulation in the marmoset brain 第3回日本マーモセット研究会大会 2013.12.13 九州大学(福岡)

山森哲雄 「神経疾患・損傷モデルとしての霊長類における神経科学的研究」第36回日本神経科学大会 2013.6.21 国立京都国際会館(京都)

山森哲雄: The ocular dominance column and gene expression upon light stimulation in the marmoset primary visual cortex. 第一回日本マーモセット学会 2013.02.28. 慶應義塾大学(東京)

Yamamori T. The ocular dominance column and gene expression upon light stimulation in the marmoset primary visual cortex. 国際シンポジウム「感覚受容と神経回路」2013.02.12 東京大学(東京)

Yamamori T. Molecular Biological approaches to study the functional roles of the primate brain. 霊長類脳科学シンポジウム 2012.2.22-24, 東京医科歯科大学(東京)

Yamamori T. Genes specifically expressed in the primate neocortical areas and their functions. First RIKEN international symposium Tokyo, Feb 03, 2011 東京理科大学(東京)

[図書](計1件)

Chapter 13 Genes Selectively Expressed in the Visual Cortex of the Old World Monkey in 「Cortical Development: Neural Diversity and Neocortical Organization」(Kageyama,R. and Yamamori T Eds) Springer (Tokyo, Heidelberg, New York, Dordrecht, London) 2013

[産業財産権]  
出願状況該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山森 哲雄 (国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー)  
研究者番号：80260206

(2)研究分担者

研究分担者 川口泰雄 (生理学研究所・大脳皮質研究部門・教授)研究者番号：40169694

研究分担者： 窪田芳之(生理学研究所・大脳皮質機能研究系・准教授)研究者番号：90192567

研究分担者： 佐々木哲也(国立精神・神経医療研究センター・微細構造研究部・研究員)研究者番号：10634066

研究分担者： 木津川尚史(大阪大学・生命機能研究科・准教授)研究者番号：10311193)

連携研究者： 坂野仁 (福井大学・医学部・特命教授)研究者番号：90262154

7、〔その他〕

研究室ホームページ

<<http://www.brain.riken.jp/jp/faculty/details/83>>

<<http://www.nibb.ac.jp/~divspe1/>>

参考 新学術領域「大脳新皮質構築」ホームページ 計画班員として

<<http://www.md.tsukuba.ac.jp/neocortex/>>