

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700360

研究課題名（和文） マーモセット一次視覚野における細胞種特異的な機能解析

研究課題名（英文） Subtype-specific roles of neurons in primate primary visual cortex.

研究代表者

定金 理（SADAKANE OSAMU）

基礎生物学研究所・脳生物学研究部門・助教

研究者番号：90446261

研究成果の概要：霊長類の一次視覚野で特異的に発現レベルが高い遺伝子 *occ1* の機能について調べるため、エレクトロポレーション法を用いてマウスの大脳皮質に *occ1* 遺伝子を過剰発現させてその影響を形態学的、電気生理学的手法によって解析した。その結果、樹状突起上のスパイン数、細胞の基本的な膜特性には遺伝子発現の影響は観察されなかった。この結果は *occ1* 遺伝子の機能解析を今後推進するにあたって重要な基礎データとなる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学 神経・筋肉生理学

キーワード：大脳皮質、遺伝子、神経細胞

## 1. 研究開始当初の背景

神経回路内には多種多様な神経細胞種が存在し、それぞれが特異的な生理学的、生化学的な特性を示し、特異的な配線様式を持つ。神経系の機能の全容を理解するためには、各細胞種が果たす機能を明らかにしなければならない。これまでこうした細胞種特異的な神経回路に関する研究は主に海馬や小脳などの、神経細胞が整然と配列した構造を持つ器官において行われてきたが、ヒトを含む霊長類において最も顕著な発達が見られ、知覚・判断・行動などのより高次な機能を営むと考えられる大脳皮質に関してはほとんど研究が進んでいないのが現状である。本研究

は、分子生物学的手法と電気生理学的手法とを併用し、神経細胞の各サブタイプが果たす生理学的機能を解明したいと考えた。

## 2. 研究の目的

我々ヒトを含む霊長類の大脳皮質は非常に発達して複雑に領域分化しており、マカ属サルでは視覚野だけでも30以上の領域があるとされる。このように著しく進化した大脳皮質に、霊長類の高次脳機能の謎を解明するための重要な鍵があると考えられる。申請者が所属する研究室（基礎生物学研究所・脳生物学研究部門、山森哲雄教授）では、霊長類の領野特異的に発現する遺伝子を解析

することによって大脳皮質機能の問題に迫ることを目指してきた。本研究では、我々の研究室でこれまでに発見してきた領野特異的遺伝子についてその機能を調べる実験を行うことで、遺伝子発現パターンから分類した細胞サブタイプの役割を知ることを目指した。特に、霊長類第一次視覚野に特異的な発現を示す遺伝子 *occ1* に着目して研究を行った。

*occ1* は霊長類成体の大脳皮質一次視覚野で入力層に極めて特異的に発現する遺伝子として同定された (Tochitani et al., Eur J Neurosci, 2001; Takahata et al., Cereb Cortex, 2006)。 *occ1* が担っている機能の実際については未だ不明だが、興味深いことに *occ1* 遺伝子の発現は、視覚入力レベルに対する依存性を示す。すなわち、TTXを眼球に注入することで網膜神経節細胞の活動を遮断し一次視覚野への入力を低下させると、視覚遮断した眼球に対応した脳領域で *occ1* の発現が著しく低下する。こうした神経活動依存的な発現調節は、*occ1* 遺伝子が成体の視覚野における可塑性に関与している可能性を強く示唆している。

本研究では、分子生物学的、形態学的、電気生理学的手法を併用することで、*occ1* 遺伝子が成体の大脳皮質において果たす機能について知見を得ることを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) *occ1* 遺伝子のマウス大脳皮質へのエレクトロポレーション法による導入

E14またはE15のマウス胎児に対してエレクトロポレーション法により *occ1* 遺伝子の導入を行った。*occ1* 遺伝子とともにGFP遺伝子を加えることで、遺伝子が導入された神経細胞を同定することが可能である。コントロール個体としてGFP遺伝子のみを導入した個体も作成した。エレクトロポレーション法は研究協力者の渡我部昭哉博士によって行われた。

(2) 樹状突起上の突起数のカウント

以下に示す方法でスライス電気生理実験を行った後、電極内液に入れたバイオサイチンに対してストレプトアビジン-Cy3を用いて細胞を染色した。この試料を用いて、共焦点顕微鏡で樹状突起の画像を撮影し、スパインを含む突起構造の数をカウントした。撮影には60倍の水浸対物レンズを用いた。スパイン数のカウントは、頂上突起の最初の分枝から100  $\mu\text{m}$  について、25  $\mu\text{m}$  間隔で行った。

(3) スライス電気生理実験

上述したエレクトロポレーション法で *occ1* およびGFP遺伝子を導入した個体を用いてスライス電気生理実験を行った。生後3週令から4週令の遺伝子導入個体をイソ

フルランで麻酔して断頭し、脳を取り出した。脳は95%酸素、5%二酸化炭素のガスで飽和させ氷冷した人工脳脊髄液に漬けた。視覚野を含む後頭葉をブロックにし、ピプラトームで厚さ300  $\mu\text{m}$  の急性スライスを作成した。スライスは作成してから実験するまで、1時間はACSF中に置いた。その後、スライスを顕微鏡下の記録用チャンパーに置き、赤外微分干渉検鏡で細胞体を観察しながら電極を近づけ、パッチクランプ記録を行った。蛍光検鏡によって遺伝子導入細胞を選択した。記録はカレントクランプモードで行った。

### 4. 研究成果

(1) *occ1* 遺伝子導入による樹状突起微細形態への影響

*occ1* 遺伝子が大脳皮質神経細胞に過剰発現させた影響を細胞の微細形態のレベルで検討するため、共焦点顕微鏡を用いて樹状突起の観察を行い(図2A) 樹状突起上の各部分における突起数をカウントした(図2B) (コントロール、3個体、4細胞; *occ1*、1個体、3細胞)。その結果、コントロール個体と *occ1* 遺伝子導入個体とで、突起の数に有意な差はみられなかった(マンホイットニーU検定、 $p>0.05$ )。

(2) *occ1* 遺伝子導入による細胞生理学的な影響

*occ1* 遺伝子過剰発現の影響を細胞生理学的レベルで検討するため、スライス電気生理実験を行った(コントロール、3個体、9細胞; *occ1*、2個体、7細胞)。細胞膜の興奮性、活動電位の性質などの基本的な性質について解析を行った結果(図3) コントロール個体と *occ1* 遺伝子導入個体とで、いずれのパラメータについても有意な差はみられなかった(マンホイットニーU検定、 $p>0.05$ )。以下にその詳細を記す。

まず細胞膜の受動的な興奮特性について解析を行った。静止膜電位はコントロール個体で  $-67.7 \pm 2.0\text{mV}$  (平均  $\pm$  標準偏差)、*occ1* 遺伝子導入個体で  $-67.7 \pm 1.9\text{mV}$  であった(図3A)。-70pA から 30pA までの範囲で 10pA 間隔で電流を注入した際の膜電位応答から細胞膜の入力抵抗した結果、コントロール個体では  $95.5 \pm 38.9\text{M}$ 、*occ1* 遺伝子導入個体では  $76.9 \pm 38.6\text{M}$  であった(図3B)。-50pA の電流注入に対する膜電位応答の時間変化から時定数を計算した結果、コントロール個体では  $5.4 \pm 1.7\text{msec}$ 、*occ1* 遺伝子導入個体では  $5.3 \pm 1.1\text{msec}$  であった(図3C)。

さらに細胞の発火特性について解析を行った。まず活動電位を発生させるのに必要な電流量の最低値 (rheobase current) での活動電位の解析を行った。rheobase current は、コントロール個体では  $145.6 \pm 37.5\text{pA}$ 、*occ1*

遺伝子導入個体で  $165.7 \pm 61.9 \text{ pA}$  であった (図 3 D)。rheobase current における閾値電位は、コントロール個体では  $-34.1 \pm 6.9 \text{ mV}$ 、occ1 遺伝子導入個体で  $-37.4 \pm 2.6 \text{ pA}$  であった (図 3 E)。rheobase current における活動電位発生までに要する時間は、コントロール個体では  $139.3 \pm 63.7 \text{ msec}$ 、occ1 遺伝子導入個体で  $194.3 \pm 84.7 \text{ msec}$  であった (図 3 F)。rheobase current における活動電位の半値幅は、コントロール個体では  $0.56 \pm 0.17 \text{ msec}$ 、occ1 遺伝子導入個体で  $0.52 \pm 0.09 \text{ msec}$  であった (図 3 G)。rheobase current における活動電位の振幅は、コントロール個体では  $85.0 \pm 14.0 \text{ mV}$ 、occ1 遺伝子導入個体で  $92.5 \pm 7.2 \text{ mV}$  であった (図 3 H)。さらに、rheobase current の 2 倍の電流値を注入した際の応答から、連続した活動電位の発火パターンを解析した。この電流値における 500msec の電流注入の平均発火数は、コントロール個体では  $22.4 \pm 6.3 \text{ Hz}$ 、occ1 遺伝子導入個体で  $22.3 \pm 2.9 \text{ Hz}$  であった (図 3 I)。この電流値における最初の瞬時発火率 (1 発目と 2 発目の活動電位の時間間隔から計算) は、コントロール個体では  $99.9 \pm 57.3 \text{ Hz}$ 、occ1 遺伝子導入個体で  $102.7 \pm 45.9 \text{ Hz}$  であった (図 3 J)。この電流値における 2 番目の瞬時発火率 (2 発目と 3 発目の活動電位の時間間隔から計算) は、コントロール個体では  $38.9 \pm 23.2 \text{ Hz}$ 、occ1 遺伝子導入個体で  $34.1 \pm 3.9 \text{ Hz}$  であった (図 3 K)。

今回の実験ではエレクトロポレーション法を用いてマウスの大脳皮質に occ1 遺伝子を過剰発現させ、その影響を形態学的、電気生理学的手法によって解析した。その結果、樹状突起上のスパイン数、細胞の基本的な膜特性には遺伝子発現の影響は観察されなかった。この結果は occ1 遺伝子の機能解析を今後推進するにあたって重要な基礎データとなる。今後、occ1 遺伝子の機能をさらに解析するため、可塑性への影響等を検証する。

図 1 エレクトロポレーションによる遺伝子導入

A エレクトロポレーションによって遺伝子導入したマウス大脳皮質の切片を示す。遺伝子導入した細胞は GFP を発現している (緑色)。スライス電気生理実験を行った細胞はストレプトアビジン Cy3 によって染色してある (赤色)。

B スライス電気生理実験を行った神経細胞の拡大写真。左図が記録細胞、中図が GFP 蛍光、右図がマージ。記録した細胞は GFP 陽性である。

図 2 共焦点顕微鏡による突起のカウント

A 遺伝子導入細胞上の突起を共焦点顕微

鏡によって撮影した画像の例。

B 突起の数をカウントした結果。樹状突起上の各部分における突起の数。GFP のみ導入したコントロール個体 (Control) と occ1 遺伝子を導入した個体 (occ1) の結果を示している。エラーバーは標準偏差を示す。

図 3 遺伝子導入による影響の細胞生理学的な解析

- A 静止膜電位
- B 入力抵抗
- C 膜の時定数
- D 閾値電流
- E 閾値電位
- F 発火の応答速度
- G 活動電位の半値幅
- H 活動電位の振幅
- I rheobase current の 2 倍値における発火数の平均値
- J rheobase current の 2 倍値における 1 番目の瞬時発火率
- K rheobase current の 2 倍値における 2 番目の瞬時発火率

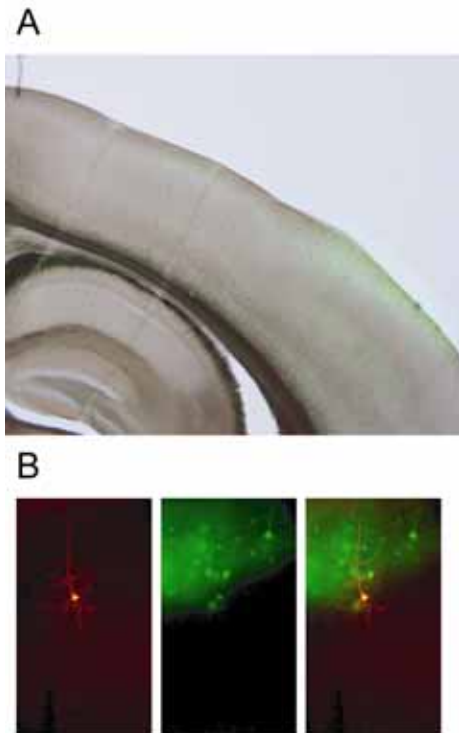
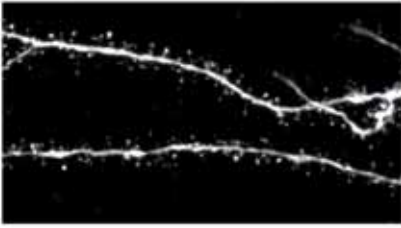
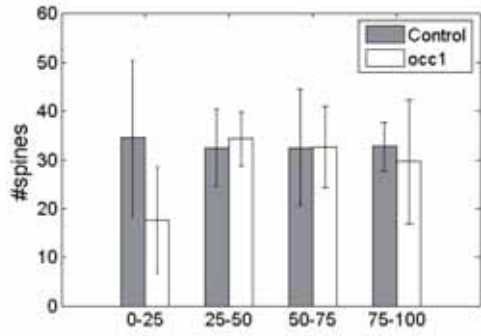


図 1

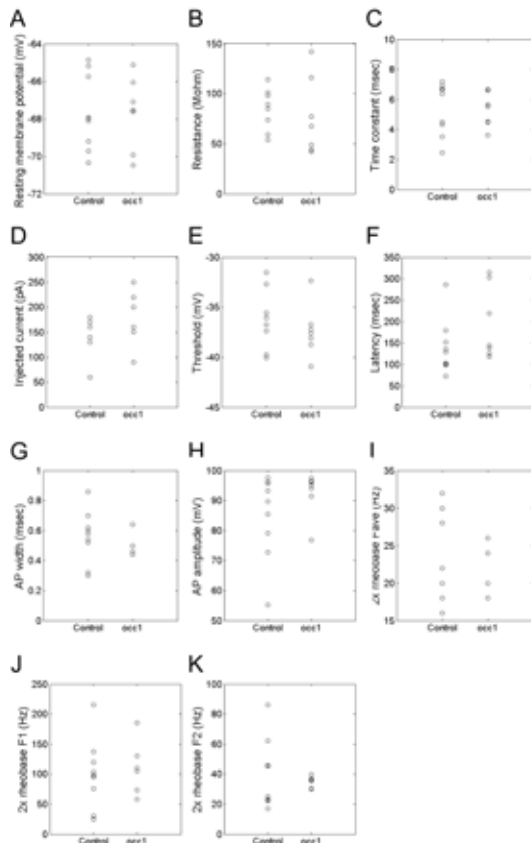
A



B



☒ 2



☒ 3

### 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)

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

定金 理 (SADAKANE OSAMU)

基礎生物学研究所・脳生物学研究部門・助教

研究者番号：90446261

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者