

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20700281

研究課題名 (和文) 脳の非対称性獲得における分子基盤の解明

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of establishment of brain asymmetry

研究代表者

高橋 将文 (Masanori Takahashi)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20361074

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、ラット線条体側方領域および大脳皮質体性感覚野におけるカドヘリン 20 遺伝子の左右非対称発現細胞の種類を解析した。線条体のカドヘリン 20 発現細胞はすべて淡蒼球に投射する間接路および、黒質網様部に投射する直接路の投射ニューロンであることが明らかになった。さらに、ラットにおけるカドヘリン 20 遺伝子の左優位発現と利き手と関係を明らかにするために、food reaching テスト装置を独自に作製し、成体ラットの利き手の同定に成功した。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, I examined characters of cells expressing *cadherin20* in the lateral striatal region and somatosensory cortex in adult rats using *in situ* hybridization and immunohistochemistry. These studies revealed that all *cadherin20*+ cells in the lateral striatum were both direct and indirect pathways medium spiny projection neurons. I also established the method to determine relationship between asymmetric expression of *cadherin20* and handedness in rats. We could distinguish left or right-handedness of rats using this method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：(A) 分子・細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景

脳が高次機能を発揮するためには、胎生期における脳の領域化が正確に行われ、配置されるニューロンの中に神経回路が正確に構

築される必要がある。申請者はこれまでに、げっ歯類における脳の領域化のメカニズムを解明するために、領域特異的に発現する転写因子や細胞接着分子の役割を解析してき

た (Takahashi & Osumi, 2002; Takahashi et al., 2002; Takahashi & Osumi, 2005)。申請者は、ラットにおいて同定したカドヘリン 20 遺伝子が (Takahashi & Osumi, 申請時、論文投稿中)、成体においては、大脳皮質ニューロンおよび線条体外側部ニューロンにおいて、左脳で優位に発現している興味深い現象を見いだした。カドヘリンファミリー分子は、近年、シナプス形成やシナプス伝達などの制御に関わることが報告されている重要な因子である (Takeichi & Abe, 2005)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、カドヘリン 20 遺伝子のラット成体脳における左右非対称発現に焦点を当て、1) カドヘリン 20 の詳細な発現解析と発現細胞の性質および発現細胞が形成する神経回路の同定、2) 活動依存的発現制御の検討、3) カドヘリン 20 のシナプス形成における役割の解析、の 3 つの課題を遂行し、未だ解明されていない、脳の左右非対称性およびそれらを生み出す分子基盤について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

成体ラット脳におけるカドヘリン 20 遺伝子発現細胞の解析は無固定凍結切片を用いた *in situ hybridization* 法と免疫組織化学法により行った。胎児での遺伝子発現の解析は固定凍結切片を用いて行った。

成体ラットの利き手判定テストは、底面が 10cm 四方で高さが約 30cm のボックスの中にハンドリングしたラット入れ、餌を置く筒が結合した透明の前面板の方向から、ビデオ撮影を行なった。そして、右手および左手を筒の中に入れる回数を記録し、その使用頻度を解析した。

4. 研究成果

本研究では、成体脳における機能的左右性形成の分子基盤解明を目的として、20 年度は、カドヘリン 20 遺伝子の発現様式および細胞特性の解析を中心に行った。8 週齢ラットの

線条体側方領域および大脳皮質体性感覚野におけるカドヘリン 20 遺伝子の非対称発現がいつから開始するのかを検討するため、まず、クローズドコロニーラット (SD ラット) の胎児期および 4 週齢雄における発現様式を解析した。胎齢 12.0 から、生まれる直前の胎齢 20.5 においては、将来の線条体および大脳皮質領域での発現は認められず、4 週齢ではその発現が認められたことから、カドヘリン 20 遺伝子の発現は生後に調節されていることが明らかになった。興味深いことに、8 週齢ラットにおいて、カドヘリン 20 遺伝子が左右対称に発現する個体も存在することが明らかになった。このことから、左右非対称性発現には何らかの活動依存性が存在することが示唆された。8 週齢の線条体における脳におけるカドヘリン 20 遺伝子の発現細胞種を同定するために、*in situ* ハイブリダイゼーション法と免疫染色法による 2 重染色を行った。線条体には淡蒼球または中脳黒質網様部へ投射する 2 種類の投射ニューロンと少なくとも 5 種類の介在ニューロンが存在することが知られており、投射ニューロンのサブタイプはエンケファリン陽性、サブスタンス P 陽性により区別できる。線条体側方領域のカドヘリン 20 陽性細胞のほとんどはエンケファリン陽性であるが、やや背側部のカドヘリン陽性細胞はエンケファリン陰性であったことから、少なくとも、カドヘリン 20 遺伝子は淡蒼球へ投射ニューロンには発現していることが明らかになった。以上の結果は第 31 回日本神経科学大会 (2008 年 7 月 10 日、東京) において初めて研究発表を行った。

21 年度は、成体脳における機能的左右性形成の分子基盤解明を目的として、さらに、線条体でのカドヘリン 20 遺伝子発現細胞種の特特定を進めた。まず、カドヘリン 20 遺伝子発現細胞の中に介在ニューロンが含まれるかどうかを明らかにするために、線条体投射ニューロンにのみ発現する転写制御因子 CIPT2 (COUP TF1-interacting protein 2; Arlotta et al., 2008) に注目し、その抗体を用いて、*in situ* ハ

イブリダイゼーション法と免疫染色法による2重検出を行った。その結果、カドヘリン20遺伝子を発現する全ての細胞はCIPT2陽性であった。したがって、前年度の結果と合わせると、カドヘリン20遺伝子は介在ニューロンには発現せず、その発現は直接路および間接路の投射ニューロンのどちらにも発現することが明らかとなった。一方、作製したカドヘリン20タンパク質に対する2種類のウサギポリクローナル抗体は、免疫組織化学においては特異性が得られず、線条体および大脳皮質ニューロンにおけるカドヘリン20タンパク質局在は明らかにすることができなかった。今後、シナプスレベルの解析のため、より特異性の高い抗体を作製する必要があると考えられる。

さらに21年度は、前年度に引き続き、カドヘリン20遺伝子の左右非対称性発現の出現頻度の解析を進めた。その結果、左右脳において対称に発現する個体数は、左脳優位に非対称に発現する個体数より多く、偏りが存在することが示唆された。興味深いことに、ラットにおける利き手判定としてfood reaching テストが過去に行われ、いくつかの報告でも、ラットはその約70%は右手優位であり、約20%は左手優位、残り約10%は両利きであることが報告されている (Tsai and Maurer, 1930; Pence, 2002; Guven et al., 2003; Elalmis et al., 2003)。そこでカドヘリン20遺伝子発現の左右差と利き手との間に関連性があるのかどうかを明らかにするために、ラットの利き手テストを立ち上げた。先行研究を参考にし、Food reaching テスト装置を独自に作製し、利き手テストの予備的実験を行った。ハンドリング後40分間に餌を取る5回の試行のうち、明らかに右手または左手を優位に使用する個体を同定することが出来た。したがって、利き手を判別した個体において、カドヘリン20遺伝子の発現様式と利き手との関係性を解析することが実際に可能になると考えられる。

本研究期間内において、当初計画していた左右非対称発現における活動依存的制御につ

いての解析は行うことができなかった。最近、ヒトの研究において、利き手の変更訓練は線条体の領域の体積変化という構造変化が生じることが報告され、生後の利き手使用の可塑性と脳機能における線条体の重要性が指摘されてきている (Kloppel et al., 2010)。今後、ラットをモデルとして、前肢の使用の制限などがカドヘリン 20 遺伝子の発現やシナプスレベルにおける構造変化に与える影響について解析を進め、生後の発達の可塑性制御の問題にアプローチできると考えられる。

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 4 件)

1. Takahashi, M., and Osumi, N. Expression study of *cadherin7* and *cadherin20* in the embryonic and adult rat central nervous system. *BMC Dev. Biol.* 8, 87 (2008) 査読有
2. Takahashi, M., Nomura, T., and Osumi, N. Transferring genes into cultured mammalian embryos by electroporation. *Dev. Growth Differ.* 50, 485-497 (2008). 査読有
3. Nonomura, K., Takahashi, M.*., Wakamatsu, Y. Takano-Yamamoto, T., and Osumi, N. Dynamic expression of *Six* family genes in the dental mesenchyme and the epithelial ameloblast stem/progenitor cells during murine tooth development. *J. Anat.* 216, 80-91. (2010) (*Corresponding author) 査読有
4. Numayama-Tsuruta, K., Arai, Y., Takahashi, M., Sasaki-Hoshino, M., Funatsu, N., Nakamura, S., and Osumi, N. Downstream genes of *Pax6* revealed by comprehensive transcriptome profiling in the developing rat hindbrain. *BMC Dev. Biol.* 10, 6. (2010) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Takahashi, M., and Osumi, N. The expression of *cad20* mRNA represents a novel subtype of striatal projection neurons and brain asymmetry. 第 31 回日本神経科学大会 Neuroscience2008 2008 年 7 月 10 日 東京

2. **Takahashi, M.**, and Osumi, N. Pax6 is involved in specification of rhombomereboundary cells in the rat hindbrain. CDB Symposium 2009 Shape and Polarity. 2009, March 23, Kobe
3. **Takahashi, M.**, and Osumi, N. Pax6 is involved in specification of rhombomereboundary cells in the rat hindbrain. 第9回日本分子生物学会春期シンポジウム. 2009年5月11日、宮崎
4. **Takahashi, M.**, and Osumi, N. Pax6 is involved in specification of rhombomere boundary cells in the rat hindbrain. Construction and Reconstruction of the Brain. 2009, October 9, Awaji
5. **高橋将文**、哺乳類菱脳における境界の維持のメカニズム シンポジウム「仙台動物発生コロキウム」2010年1月22日 仙台 (招待講演)

〔図書〕 (計1件)

Nomura, T, **Takahashi, M.**, and Osumi, N. E lectroporation into cultured mammalian embryos. *Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology*. Springer, 129-141 (2009).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 将文 (Masanori Takahashi)

(東北大学・大学院医学系研究科・助教)

研究者番号 : 20361074

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし