

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500373

研究課題名(和文) 線条体外側部投射ニューロンにおける左右非対称遺伝子発現の生理的意義の解明

研究課題名(英文) Role of asymmetric gene expression in projection neurons in the lateral striatum

研究代表者

高橋 将文 (Takahashi, Masanori)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20361074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット線条体外側部におけるカドヘリン20 (Cdh20) 遺伝子発現細胞の分布と利き手との相関性を food reaching タスクと組織学的解析により検証した。近交系ラットでは、右利きと左利きの割合が半数であり、右利きラットでは、線条体の前方部におけるCdh20発現細胞数が右側で優位であった。左利きラットでは、Cdh20発現細胞数に左右差が認められなかった。これらの結果から、Cdh20発現細胞の分布と利き手との間に相関性がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined the correlation between distribution of Cdh20+ striatal projection neurons and handedness in inbred rats. We found that the ratio of right-handedness and left-handedness was equal and that the number of Cdh20+ striatal projection neurons increased in the right side of the anterior lateral striatum in right-handed rats. In left-handed rats, the number of Cdh20+ striatal projection neurons was similar in both sides of the anterior lateral striatum. Our results suggest that distribution patterns of Cdh20+ striatal projection neurons may link to the handedness in rats.

研究分野：神経発生学

キーワード：線条体 非対称発現 ラット

1. 研究開始当初の背景

脳は一見して構造的に左右対称に見えるが、ヒトにおいて、言語を処理する領域は左脳に局在し、利き手などの運動機能は右に偏る傾向がある。脳機能の左右非対称局在および側方化の分子基盤の解明は、神経情報処理のメカニズムや脳の進化を理解する上で重要な課題であるが、それらの分子基盤に関する研究はほとんど報告されていない。申請者は、これまでに脳の領域化における細胞接着分子カドヘリンファミリー遺伝子の解析を行ってきたが (Takahashi & Osumi, 2005, 2008, 2011)、ラット成体脳において、Type II サブタイプに属するカドヘリン 20 遺伝子が、左または右優位に発現している個体と左右対称に発現している個体が存在することを見いだした。

興味深いことに、線条体におけるカドヘリン 20 遺伝子の発現領域は、大脳皮質運動野および体性感覚野の 5 層ニューロンから選択的な投射を受ける線条体外側部に合致していた。ラットでは利き手および手の右使用への側方化が報告されていることから (Pence, 2002; Guven et al., 2003)、線条体におけるカドヘリン 20 遺伝子の非対称発現と利き手の運動機能に何らかの関連性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、生後脳におけるカドヘリン 20 遺伝子の線条体外側部特異的発現および左右非対称発現の生理的意義の解明に焦点を当て、未だ解明されていない、脳機能の左右非対称局在および側方化を生み出す分子基盤を明らかにすること目的とした。

3. 研究の方法

次の 3 つの課題に取り組んだ。1) Food reaching タスクと組織化学的解析を組み合わせることで、利き手を指標とした運動機能の側方化と線条体におけるカドヘリン 20 遺伝子の左右非対称発現との相関性を解析した。2) 線条体におけるカドヘリン 20 発現領域がどのように形成されるのかを、各種マーカー遺伝子との発現比較解析により検討

し、さらにカドヘリン 20 発現細胞の特徴についても各種マーカー遺伝子との比較により検討した。3) 線条体におけるカドヘリン 20 遺伝子現制御機構が、他の哺乳類動物種においても保存されているのかについて、組織化学的手法により検討した。

4. 研究成果

1) 利き手形成とカドヘリン 20 発現との相関性の解析

ラットにおいては利き手が存在し、集団レベルで見ると右利きの割合が約 70%、左利きが 20%、両利きが約 10% (判別不能を含む) であることが、過去の独立した幾つかの研究から示されていた (Pence, 2002; Guven et al., 2003)。まず、これらの文献を参考にして、food reaching タスクの効率的なプロトコルを確立した。9 週齢 (9W) から餌の種類を food reaching タスクに用いる小さいペレットに換え、その餌の量を調節しながら、10W までに体重を約 85-90% 程度に維持した。その後、1 日の餌取得トレーニングを行い、連続して 4 日間、各 50 回の餌取得タスクを行い、その過程を全てビデオに録画した。その後、通常の餌を通常量与え、3 日後 (11W に相当) において脳を摘出した。過去の研究では、Wistar などのクローズドコロニーラットを用いていることから、今回は、近交系とクローズドコロニーの両者を用いて、利き手の頻度をまず比較した。

小型の近交系ラットである F344 系統の雄 8 匹と、クローズドコロニーの SD ラットの雄 2 匹および雌 2 匹を用いて food reaching タスクを行った。どちらかの手の使用率が 95% 以上の場合、それを利き手として判別した。その結果、F344 系統においては、右利き (n=3/8) 左利き (n=5/8) の割合であり、SD 系統においては、右利き (n=4/4)、左利き (n=0/4) であった。F344 系統に関しては、さらに雄 2 匹について、12W で利き手判別を行い 13W で脳を摘出した。これらは 2 匹ともに右利きであった。これらの結果を踏まえると、F344 では右利きが (n=5/10)、左利きが (n=5/10) であり、近交系系統では、集団レベルでの利き手の側方化が弱い傾向にあると考えられた。一方 SD

ラットでは、解析個体数は少ないものの、右利き個体の割合が高いという過去の結果に近い傾向が認められた。

個体レベルでは、利き手が存在することから、次に、カドヘリン20遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。脳組織の調整は、摘出した無固定脳を素早く OTC コンパウンドに沈め、方向を調整した後に、ドライアイス/ヘキサン液中で、迅速低温冷凍した。線条体の前方部から後方部を含むように、16 μ m の連続切片を frontal section として作製した。切片の損傷がなく発現解析が達成できた 11W の F344 系統個体 (n=5) の内、右利き個体(n=2)では、線条体前方部でのカドヘリン20遺伝子の発現細胞の数が右側で優位であり (n=2/2)、左利き個体 (n=3)では、発現細胞の数の優位な左右差が認められなかった個体(2/3)と左側でやや発現細胞数が優位である個体 (n=1/3) が存在した。これらの結果から、線条体の前後方向におけるカドヘリン20発現の左右差と利き手の間に相関性があることが示唆された。

2) カドヘリン20遺伝子を発現する線条体腹外側ドメインの形成過程とカドヘリン20発現細胞の性質の解析

カドヘリン20遺伝子が発現する線条体腹外側ドメインの形成過程を明らかにするために、生後1-3週齢のSDラットにおいて、既知の線条体マーカー遺伝子との発現ドメインの比較を行った。1週齢では、線条体の前後方向に沿って、カンナビノイド受容体1 (CB1R) (Van Waes *et al.*, 2012) が線条体の中間部から前方にかけて発現し、G-protein coupled receptor 155 (Gpr155) (Trifonov *et al.*, 2010) は線条体の中間部から後方にかけて発現勾配が認められたが、カドヘリン20の発現は発現開始時からCB1RとGpr155が重なる中間部の狭い領域に限定されていた。2週齢から3週齢になるとカドヘリン20の発現は線条体の中間部に維持されていたが、CB1RやGpr155は線条体の前後に沿って発現領域が拡大した。成体になると、CB1, Gpr155およびカドヘリン20の発現は、背外側線条体 (dorsolateral striatum) に限定されるが、

Gpr155はCB1Rより内側に発現し、カドヘリン20はGpr155のさらに内側に発現していた。また、成体ラットにおいて、カドヘリン20の発現はGpr155と共発現しており、これらのニューロンの大部分はドーパミンD1受容体(Drd1)を選択的に発現する直接路ニューロンであることが判明した。このことから、カドヘリン20の発現で区別可能な直接路ニューロン新規サブタイプが存在することが明らかとなった。

3) 種間における線条体におけるカドヘリン20の発現制御の解析

カドヘリンサブタイプ遺伝子の発現様式は、鳥類と哺乳類においては保存されていないことが、多くの研究から示されている。一方、哺乳類間におけるカドヘリンサブタイプ遺伝子の比較解析の報告はこれまでにほとんどない。カドヘリン20遺伝子の線条体での発現が哺乳類種間で保存されているのかを、マウスおよびフェレットにおいて解析した。ラットでは、近交系およびクローズドコロニーのラットの両者において、カドヘリン20発現は線条体腹外側ドメインにおいて保存されていたが、少なくとも、B6系統のマウスの成体における線条体の線条体腹外側ドメインに発現は認められなかった。さらに、線条体の構造がヒトに近いフェレットでは、ラットの線条体腹外側ドメインに相当する被殻 (putamen) 領域においては、少数のカドヘリン20細胞が存在したが、ラットのように明確なドメインを形成することはなかった。マウスおよびフェレットにおいては、カドヘリン20は大脳皮質や小脳において、ラットと同様の細胞種に発現していたことから、カドヘリン20遺伝子の線条体での発現制御は、哺乳類間において多様化していることが初めて明らかとなった。

自治医大に赴任後、ラット飼育設備などのセットアップに時間を要したため、本研究で当初予定していたカドヘリン20遺伝子の発現制御における活動依存性については検討することができなかった。カドヘリン20遺伝子は線条体外側部に選択的に投射する大脳皮質の運動野や体性感覚野の投射ニュー

ーロンにも強く発現することから、今後、神経回路を操作することで、線条体におけるカドヘリン20遺伝子の発現制御機構を明らかにする必要がある。

今回の結果からは、運動機能左右非対称性について、遺伝子発現との関連性が明らかとなった。さらに本課題を発展させるためには、今後、遺伝子発現を容易に可視化することができるトランスジェニックラットを作製し、利き手が判別された個体において、より正確にカドヘリン20発現細胞の線条体内での分布パターンを個体毎に空間的に記述することが重要であると考えられる。

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5件)

1. Takahashi, M., Makino, S., Kikkawa, T. and Osumi, N. Preparation of rat serum suitable for mammalian whole embryo culture. *J. Vis. Exp.* Issue 90 (2014)

2. Kikkawa, T., Obayashi T., Takahashi, M., Fukuzaki, U, Numayama-Tsuruta, K., and Osumi, N. Dmrt1, a downstream target of Pax6, regulates the expression of proneural genes in the mammalian telencephalon. *Gene to Cells.* 18,636-49. (2013)

3. Shinohara, H., Sakayori, N., Takahashi, M. and Osumi N. Ninein is essential for the maintenance of the cortical progenitor character by anchoring the centrosome to microtubules. *Biology Open* 2, 739-749. (2013)

4. Yamanishi, E., Takahashi, M., Saga, Y., and Osumi, N. Penetration and differentiation of neural crest derived cells in the mouse telencephalon. *Dev. Growth Differ.* 54, 785-800 (2012)

5. Tsunekawa, Y., Britto, J.M., Takahashi, M., Polleux, F., Tan, S.S., and Osumi, N. Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates. *EMBO J.* 31, 1979-1992 (2012)

[学会発表](計5件)

1. Takahashi, M. and Kawakami, K. Characterization of Six4/Six5 deficient mice as a novel type of animal models for human omphalocele. 自治医科大学シンポジウム 2014年9月5日、下野

2. Takahashi, M., Qiling Xu, and David G Wilkinson. Visualization of zebrafish rhombomere-boundary formation using a modified multiple embryo-mounting method and short-time interval time-lapse confocal microscopy. 第46回日本発生生物学会 2014年5月29-30日、名古屋

3. Takahashi, M. and Kawakami, K. Characterization of Six4/Six5 deficient mice as a novel type of animal models for human omphalocele. 第199回日本解剖学会総会 2014年3月28日、下野

4. Takahashi, M. and Kawakami, K. Characterization of Six4/Six5 deficient mice as a novel type of animal models for human omphalocele. 第36回日本分子生物学会 2013年12月5日、神戸

5. Takahashi, M. and Kawakami, K. Characterization of Six4/Six5 deficient mice as a novel type of animal models for human omphalocele. 自治医科大学シンポジウム 2013年9月5日、下野

[図書](計1件)

1. Takahashi, M., Kikkawa, T., and Osumi, N. Gene transfer into cultured mammalian embryos by electroporation. *Neuromethods: Electroporation methods and neuroscience.* (2015) Springer

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
<http://www.jichi.ac.jp/biol/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 将文 (TAKAHASHI MASANORI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20361074

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：