

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830013

研究課題名(和文) 大脳皮質聴覚野の機能マップを生み出す並列神経回路の構築メカニズムの解明

研究課題名(英文) A study on molecular mechanisms of the parallel organization of auditory thalamocortical projections

研究代表者

竹本 誠 (Takemoto, Makoto)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：20543408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、大脳皮質聴覚野(聴覚皮質)に見られる複数の亜領野からなる「機能マップ」の回路基盤である視床から聴覚皮質への並列投射の形成に関わる分子メカニズムの解明を目的としていた。そのために、DNAマイクロアレイを用いてマウス視床内側膝状体腹側核(MGv)に特異的な遺伝子の探索を行った。その結果、発達期マウスのMGv内側から外側への発現勾配を示す膜たんぱく質遺伝子を同定した。この発現パターンは、視床-聴覚皮質の並列投射マップのパターンに対応したものであった。このことから、これらの遺伝子が発達期において、視床-聴覚皮質の投射形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to reveal the molecular mechanisms of a parallel organization of auditory thalamocortical projections in mice. To identify genes involved in the formation of the auditory thalamocortical projections, we searched for genes with differential expressions in the auditory thalamus, the medial geniculate nucleus (MGN), by using a DNA microarray. As a result, we found two genes encoding membrane proteins that strongly expressed in the ventral division of the MGN (MGv) with a medial-high / lateral-low expression gradient. The direction of this expression gradient in the MGv largely corresponded to the topography of auditory thalamocortical projections. Our results provide two candidate MGv genes that might be involved in the formation of parallel auditory thalamocortical circuitries during development.

研究分野：神経科学

キーワード：聴覚神経回路

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の聴覚神経系は、内耳有毛細胞から螺旋神経節、蝸牛神経核、上オリーブ核、外側毛帯、下丘、内側膝状体を経て大脳皮質聴覚野(以下、聴覚皮質)へ至る経路を有する。内側膝状体から聴覚皮質への経路は、主に、音の基本情報を一次聴覚野へ伝達する lemniscal 経路と、聴覚以外の感覚を含む複合感覚や情動的な情報を伝達する non-lemniscal 経路の二つに分類され、lemniscal 経路は、内側膝状体腹側核(MGv)、non-lemniscal 経路は、内側核や背側核などから聴覚皮質へ至ると考えられていた。一方で、聴覚皮質は、複数の垂領野からなることが知られている。マウスではこれまでに、lemniscal の情報を受け一次聴覚野(A1)および前聴覚野(AAF)と、non-lemniscal の情報を受け二次聴覚野(A2)、超音波領域(UF)、背側後側領域(DP)が知られていたが、近年新たに、我々が島皮質聴覚野(IAF)を同定し(Sawatari et al., 2011)、後に塚野らが背側内側領域(DM)を見出したことにより(Tsukano et al., 2015)、現在では少なくとも7つの垂領野を持つことが分かっている。しかしながら、内側膝状体からこのような数多くの聴覚皮質垂領野への情報伝達経路の詳細については、十分に解明されていなかった。特に、MGvからの lemniscal 経路については、音の周波数勾配のマップがMGvでは一つだけ存在し、その情報をA1とAAFにそれぞれ分岐させることにより、各垂領野において周波数勾配のマップがそれぞれ表現されるというモデルがこれまで提唱されていた(Hackett et al., 2011)。

我々は、独自に同定したIAFについて、視床からの入力経路を明らかにするために、蛍光標識された逆行性トレーサーを用いた神経回路標識法による解析を行った。その結果、IAFがMGvの腹側内側部から入力を受けていることが明らかになった。さらに、A1、AAF、およびIAFが、MGv内での局在の異なる細胞群から並列的に入力を受けていることが明らかになった(Takemoto et al., 2014)。この結果は、これまでの lemniscal 経路のモデルである、MGvの単一領域からA1・AAFへの分岐型神経回路とは異なり、MGv内の複数領域の各々から聴覚皮質の異なる垂領野への並列型神経回路という新しいモデルを提唱するものとなった(Takemoto et al., 2014)。

## 2. 研究の目的

これまでの研究により、MGvの内側腹側から聴覚皮質の吻側腹側に隣接するIAFへ、MGvのIAF投射領域を除く内側部から聴覚皮質の吻側部に位置するAAFへ、MGvの外側部から聴覚皮質の尾側部に位置するA1への topographic な視床-皮質投射パターンが明らかとなった(Takemoto et al., 2014)(図1)。このことは、発生期において、概ね、

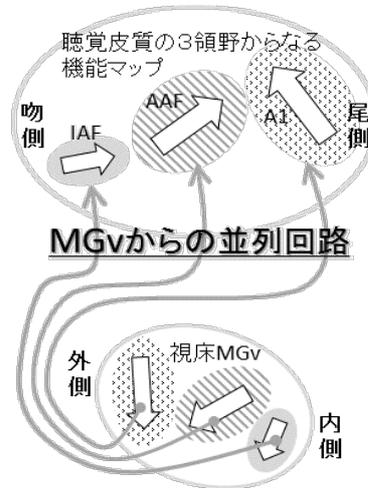


図1 聴覚皮質の機能マップを支える並列回路  
白矢印：応答する音の違い(低音→高音)

MGvにおける内側-外側のマップが聴覚皮質において吻側-尾側に投影されるように聴覚神経系の視床-皮質投射が形成される可能性を示唆している。これまでに、視床-皮質投射形成の分子メカニズムとして、チロシンキナーゼ型受容体 Eph とそのリガンドである Ephrin をはじめとする複数の分子が視床、大脳皮質、または視床軸索の途中経路において発現勾配を示しており、その濃度勾配に従って視床軸索が標的領域へ誘導されることが示唆されている(Polleux, 2005)。しかし、聴覚皮質の垂領野への視床軸索投射の分子メカニズムについては、全く解明されていない。そこで本研究では、発生期においてMGvに発現する遺伝子から視床-聴覚皮質垂領野投射形成に関わるものを同定することにより、聴覚皮質において複数の垂領野で構成される機能的マップの形成機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 発達期 MGv からの total RNA 抽出

視床-皮質投射形成が行われている発達期(生後5日目)マウスの視床スライスからMGv内側部と外側部を切り分け、各々から total RNA を抽出した。

### (2) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

Affymetrix社のDNAマイクロアレイを用いて、MGv内側部と外側部において発現レベルの異なる遺伝子の探索を行った。

### (3) In situ ハイブリダイゼーションによる候補遺伝子の発現パターン解析

DNA マイクロアレイの解析で得られた候補遺伝子について、MGvにおける発現パターンを解析するために、in situ ハイブリダイゼーションを行った。

### (4) 候補遺伝子の MGv における過剰発現および発現抑制が軸索投射に及ぼす影響の解析

候補遺伝子の視床-皮質投射形成への寄与を調べるために、まず、発現用および発現抑制用のプラスミドを作製した。次に、in utero エレクトロポレーション法を用いて、発現用プラスミドを本来の発現の低い MGv 領域に、発現抑制用プラスミドを本来の発現の高い MGv 領域にそれぞれ導入して、導入された MGv 細胞の軸索投射パターンへの影響を調べた。

#### 4. 研究成果

(1)MGv 内側-外側間で発現レベルの異なる遺伝子の同定

DNA マイクロアレイを用いた解析の結果、MGv において内側 > 外側または内側 < 外側という発現レベルを示す可能性のある遺伝子が複数得られた(未発表)。

(2)MGv において発現勾配を示す遺伝子の同定

In situ ハイブリダイゼーション法を用いて、DNA マイクロアレイで得られた候補遺伝子の発現期マウス MGv における発現パターンを解析した。その結果、複数の遺伝子が MGv に発現することが確かめられた。その中で、膜タンパク質をコードする 2 つの遺伝子は、いずれも MGv の内側で高く外側で低い発現勾配を示すことが明らかになった(図 2、未発表)。

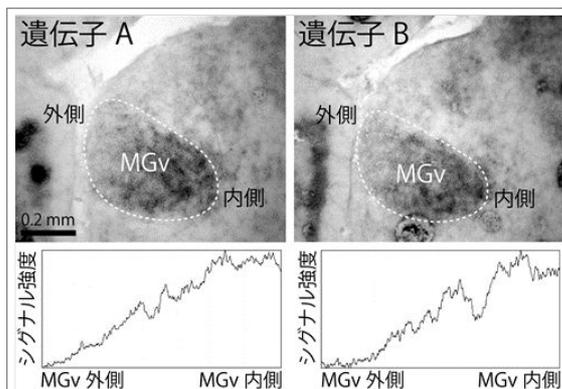


図2. 発現期マウス視床MGvにおいて発現勾配をもつ遺伝子を同定

(3)候補遺伝子の MGv における過剰発現および発現抑制の解析

MGv において発現期に発現勾配を示す 2 つの遺伝子のうち、一方については、GFP 融合タンパク質をコードする発現プラスミドを取得し、さらに、発現抑制のための siRNA 配列をデザインし shRNA 発現用のプラスミドを構築した。これらを用いて、MGv での本来の発現パターンを変化させるために、内側膝状体細胞が第三脳室から生まれる時期とされる胎生 11 日目に in utero エレクトロポレーション法により第三脳室の脳室帯細胞にプラスミドを導入した。しかしながら、現時点では、MGv への遺伝子導入効率が悪く、この遺伝子の従来の発現パターンを変化させるまでには至っていない。今後、エレクトロポレーションの時期および第三脳室脳室帯に

おける導入位置を詳細に検討することにより、MGv へのプラスミドの局所導入を実現させたい。

#### <引用文献>

Hackett TA, Barkat TR, O'Brien BM, Hensch TK, Polley DB. Linking topography to tonotopy in the mouse auditory thalamocortical circuit. *Journal of Neuroscience*, 2011, Volume 31, Issue 8, Page 2983-2995.

Polleux F. Genetic mechanisms specifying cortical connectivity: let's make some projections together. *Neuron*, 2005, Volume 46, Issue 3, Page 395-400.

Sawatari H, Tanaka Y, Takemoto M, Nishimura M, Hasegawa K, Saitoh K, Song WJ. Identification and characterization of an insular auditory field in mice. *European Journal of Neuroscience*, 2011, Volume 34, Issue 12, Page 1944-1952.

Tsukano H, Horie M, Bo T, Uchimura A, Hishida R, Kudoh M, Takahashi K, Takebayashi H, Shibuki K. Delineation of a frequency-organized region isolated from the mouse primary auditory cortex. *Journal of Neurophysiology*, 2015, Volume 113, Issue 7, Page 2900-2920.

#### 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)

Meikui Wu, Makoto Takemoto, Makoto Taniguchi, Toru Takumi, Toshiro Okazaki, Wen-Jie Song. Regulation of membrane KCNQ1/KCNE1 channel density by sphingomyelin synthase 1. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2016, Volume 311, Issue 1, Page C15-23. 査読有 doi: 10.1152/ajpcell.00272.2015.

Masataka Nishimura, Hiroyuki Sawatari, Makoto Takemoto, Wen-Jie Song. Identification of the somatosensory parietal ventral area and overlap of the somatosensory and auditory cortices in mice. *Neuroscience Research*, 2015, Volume 99, Page 55 - 61. 査読有 doi: 10.1016/j.neures.2015.06.001.

Yasufumi Hayano, Kensuke Sasaki, Nami Ohmura, Makoto Takemoto, Yurie Maeda, Toshihide Yamashita, Yoshio Hata, Kazuhiro Kitada, Nobuhiko Yamamoto. Netrin-4 regulates thalamocortical axon

branching in an activity-dependent fashion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, Volume 111, Issue 42, Page 15226 - 15231. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1402095111.

Makoto Takemoto, Kayoko Hasegawa, Masataka Nishimura, Wen-Jie Song. The insular auditory field receives input from the lemniscal subdivision of the auditory thalamus in mice. Journal of Comparative Neurology, 2014, Volume 522, Issue 6, Page 1373 - 1389. 査読有 DOI: 10.1002/cne.23491.

〔学会発表〕(計 6件)

Meng Sun, Makoto Takemoto, Wen-Jie Song. Patchy organization of thalamocortical axons in layer II of the mouse auditory cortex. 第39回日本神経科学大会 パシフィコ横浜 2016. 7. 20-22.

Meikui Wu, Makoto Takemoto, Makoto Taniguchi, Toru Takumi, Toshiro Okazaki, Wen-Jie Song. Sphingomyelin synthase 1 modulates KCNQ1/KCNE1 channel surface expression. 第39回日本神経科学大会 パシフィコ横浜 2016. 7. 20-22.

Masataka Nishimura, Makoto Takemoto, Wen-Jie Song. Optical imaging-based parcellation of the marmoset auditory cortex. 第39回日本神経科学大会 パシフィコ横浜 2016. 7. 20-22.

竹本 誠、宋 文杰 マウス島皮質聴覚領域の視床-皮質間および皮質-皮質間神経連絡の解析 第38回日本神経科学大会 神戸国際展示場 2015. 7. 28-31.

竹本 誠、長谷川 佳代子、宋 文杰 マウス島皮質における聴覚領域の神経回路 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会 合同大会 神戸国際会議場 2015. 3. 21-23.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/department/physiol2/physiol2.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹本 誠 (TAKEMOTO, Makoto)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：20543408

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

長谷川 佳代子 (HASEGAWA, Kayoko)