

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830011

研究課題名(和文)分子プロファイルに基づく聴覚系神経回路のトノトピー形成機構の解明

研究課題名(英文)Gene expression analysis along the tonotopic axis of the chicken

研究代表者

松井 亮介(Matsui, Ryosuke)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80633940

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)：聴覚神経系は音声周波数の高低順に規則正しく配置されるトノトピーと呼ばれる神経地図を形成する。トノトピーは周波数に基づいた情報処理に重要な構造であると考えられているものの、トノトピー形成の分子メカニズムに関しては未だに良く解っていない。本研究はトノトピー形成に関与する分子群の抽出を目的とし、層状核、大細胞核を対象とした網羅的な分子プロファイル解析を行なった。その結果、多数の分子が周波数依存的に発現していることが明らかになり、中でも軸索誘導に関与する分子が最も多いことがわかった。本研究によって得られた分子群は、トノトピー形成の分子メカニズムの解明に貢献するものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neurons in the auditory pathway are topographically arranged by their response to different auditory frequencies. Although tonotopic organization is a fundamental structure for frequency processing, the molecular mechanisms of the tonotopic map formation are largely unknown. In this study, we analyzed the gene expression profiles of two brainstem regions, nucleus laminaris and nucleus magnocellularis, to identify genes that are differentially expressed along the tonotopic axis. As a result, more than hundred molecules expressed in frequency-dependent manner and the most enriched pathway was axon guidance. These data should be useful for understanding the molecular mechanisms of the tonotopic map formation.

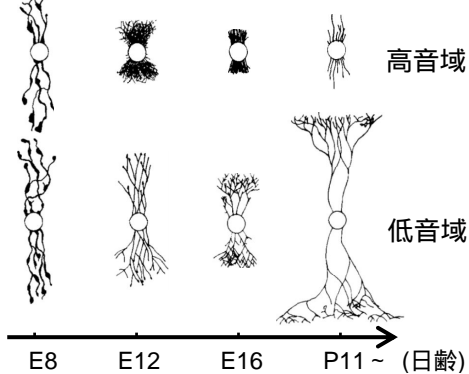
研究分野：神経科学

キーワード：音源定位 トノトピー 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

生物は、感覚器官により外界の様々な情報を収集することで環境に適した行動を選択しており、感覚情報の抽出・統合・認知などの処理は個体の生存に必要なものである。このような感覚情報の処理基盤の1つに、外界からの感覚情報を脳内において神経細胞の空間的な配置情報として表現する「神経地図」がある。例えば、嗅覚情報は嗅覚受容体の種類に対応した神経地図として表現され、視覚情報は網膜上に投影される像の位置関係に対応した神経地図(retinotopy: 網膜部位再現性)として表現される。一方、聴覚情報はトノトピー(tonotopy: 周波数局在性)と呼ばれる音声周波数の高低に対応した神経地図として表現される。トノトピーは内耳における周波数の分離に起因しており、内耳から大脳皮質に至る聴覚系経路において周波数に基づいた情報処理に重要な神経回路構造であると考えられている。また、音源位置弁別に重要な大細胞核-層状核回路は、神経回路形成に伴って周波数の高低に応じた樹状突起が形成されるというトノトピー特有の神経地図構造によって構築されている(図1:Smith et al. *JCN* 1981より改変)。

図1 トノトピーと樹状突起の対応関係
周波数の高低に応じた層状核神経細胞の形態形成の模式図。



トノトピーに基づいて聴覚情報がどのように符号化されているかという問題に関して、鳥類は脊椎動物の中で最も深い理解が得られている動物の1つである。しかしながら、従来から広く用いられている電極ポレーションやレトロウイルスといった遺伝子導入法は、トノトピーが形成される発生後期の遺伝子導入が難しく、また、神経回路やその形成時期に選択的な遺伝子操作技術も未確立であったことから、トノトピーの形成機構に関してはこれまでほとんど解明されていない。

このような技術的な問題を克服するため、研

究代表者はウイルスベクターの探索を行い、鳥類由来アデノ随伴ウイルス(A3V: Avian Adeno-Associated Virus)ベクターを用いることにより発生後期の聴覚系に対して効率的な遺伝子導入を行う事に成功した(Matsui et al. *PLoS ONE* 2012)。また、神経回路選択的・時期特異的に遺伝子導入を行うウイルスベクター(Sooksawate, Matsui et al. *Front Neural Circuits* 2013; Kinoshita, Matsui et al. *Nature* 2012)、及び遺伝子発現を抑制するRNA干渉ウイルスベクター(Sanuki, Matsui et al. *Nature Neurosci* 2011)の開発を行って来た。

2. 研究の目的

本研究は、網羅的な分子プロファイル解析によってトノトピーの形成に関わる遺伝的プログラムを抽出し、独自に開発したA3Vベクターによる遺伝子操作技術を駆使した分子機能の解析によってトノトピーの形成機構を解明することを目的とする。本研究期間内では、(図1)に示したように、トノトピー特有の神経地図構造を持つ大細胞核-層状核回路に着目し、以下のことを明らかにすることを目的とした。

(1) トノトピーの形成に関わる分子群

脳組織は多種類の細胞集団で構成されることから全体の分子プロファイルを調べるだけではトノトピーの形成に特有な分子群を抽出することは困難である。そこで、神経細胞の種類が少なく、樹状突起の形態からトノトピー構造が容易に判別できる大細胞核-層状核回路に着目し、周波数の高低ごとに神経細胞を単離する。トノトピーは周波数に基づいた神経回路網によって構築されていることから、周波数の高低間、及び神経回路を形成する大細胞核-層状核間に関してマイクロアレイを用いた分子プロファイルの比較解析を行う。得られた候補分子の中で、細胞間シグナル伝達と運命決定に関係する分子群に着目して発現パターンを解析し、トノトピー形成との時間的・空間的な相関を指標にしてスクリーニングを行う。

(2) 分子の機能解析に基づくトノトピーの形成機構

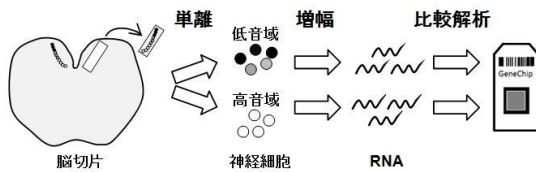
選別した分子に関して、A3Vベクターを用いて神経回路選択的・時期特異的に遺伝子操作(過剰発現やRNA干渉によるノックダウン)を行い、神経投射やシナプス形成、神経細胞の配置などの神経回路形成に与える影響、及び樹状突起の形態に与える影響を解析することで、トノトピー形成における分子機能を明らかにする。また、シグナル伝達の下流に位置すると考えられる分子の発現パターンの変化や、同様の表現型を示す分子を多重導入した際の影響を解析することでシグナル伝達経路を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞の単離、RNA の増幅と網羅的な分子プロファイルの解析

脳組織は多種類の細胞集団で構成されることから全体の分子プロファイルを調べるだけではトノトピーの形成に特有な分子を抽出することは困難である。そこで、神経細胞の種類が少なく、樹状突起の形態からトノトピー構造が容易に判別できる大細胞核-層状核回路に着目し、トノトピーを構成している神経細胞を周波数ごとに単離し、Affymetrix 社マイクロアレイによる分子プロファイルの比較解析を行った(図2)。

図2 分子プロファイル解析実験の概要



このような単離方法を用いる場合、回収できるRNAが極めて少量であるためPCR法によるRNAの増幅が必要であるが、従来のPCR法では内在的な分子プロファイルの大きな変動が見られることから回収細胞数を増やし、RNAの濃縮ステップを加える改良を行った。トノトピーは周波数に基づいた神経回路網によって構築されていることから、周波数の高低間、及び神経回路を形成する大細胞核-層状核間に関して分子プロファイルの比較解析を行い、リアルタイムPCRで検証した。

(2) 時間的・空間的な発現パターンの解析

上述の解析によって得られた候補分子に関して、細胞内局在データベースの検索、相同性やシグナル配列に基づいた細胞内局在の予測を行い、受容体とそのリガンド、細胞間接着分子、分泌分子などの細胞間シグナル伝達に関係する分子群、転写因子などの運命決定に関係する分子群をピックアップした。これらの分子群の発現パターンを免疫組織染色や*in situ*ハイブリダイゼーションにより解析し、トノトピー形成との時間的・空間的な相関の解析を行った。

(3) A3V ベクターを用いた遺伝子操作による分子機能の解析

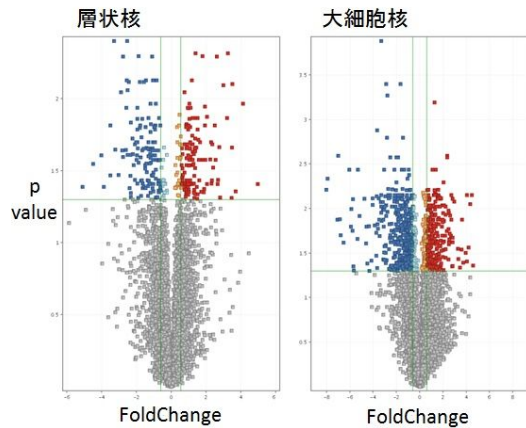
トノトピーの形成と関連性の高いと考えられる分子群に関して、A3V ベクターを用いて神経回路選択的・時期特異的に遺伝子操作(過剰発現やRNA干渉によるノックダウン)を行い、神経投射やシナプス形成、神経細胞の配置などの神経回路形成に与える影響を免疫組織染色や蛍光トレーサーの局所注入により解析した。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイによる比較解析

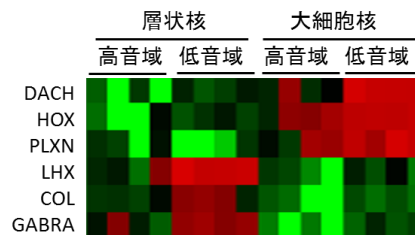
分子プロファイルの比較解析を行ったところ、層状核で209個、大細胞核で586個の分子について低音域と高音域で発現が有意に異なっていた(図3)。

図3 ボルケーノプロットによる比較解析



これらの分子の一部は過去の論文により示されたデータと一致しており、本研究の神経細胞の単離、RNAの増幅に基づいた実験系は周波数依存的な分子群の抽出に有効であることを示している。また、転写因子LHXファミリーなど複数の遺伝子は層状核、大細胞核の両方で発現差を示したことから、層状核、大細胞核のトノトピー形成・形態形成における共通の分子メカニズムの存在が示唆される(図4)。

図4 ヒートマップによる発現パターンの比較



(2) 遺伝子オントロジー解析

遺伝子オントロジーコンソーシアムに登録されている鶏の遺伝子オントロジー情報を用い、発現差を示した分子群をPANTHER(Thomas et al. *Genome Res* 2013)により解析したところ、層状核では軸索誘導や形態形成に属する分子が有意に多く、大細胞核では神経系発生に属する分子が有意に多い事がわかった(表1)。

表1 遺伝子オントロジー解析

層状核	遺伝子数	p値
motor neuron axon guidance	4	0.017
anatomical structure morphogenesis	20	0.0053
大細胞核	遺伝子数	p値
nervous system development	36	0.029

(3) シグナル経路解析

リアクトームデータベース (Jupe et al. *Curr Protoc Bioinformatics* 2016) に登録されているヒトのシグナル経路情報を用い、発現差を示した分子群のシグナル経路解析をしたところ、層状核では軸索誘導シグナル、インターロイキンシグナルに属する分子が有意に多く、大細胞核では細胞外マトリックス分解シグナルに属する分子が有意に多い事が示された (表 2)。

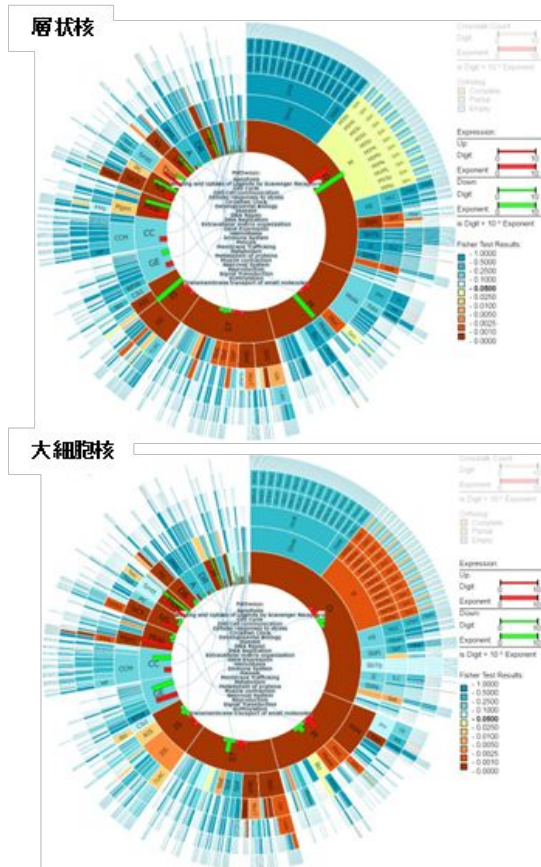
表2 シグナル経路解析

層状核	遺伝子数	偽発見率
Axon guidance	25	0.012
Interleukin-4 and 13 signaling	7	0.045

大細胞核	遺伝子数	偽発見率
Degradation of the extracellular matrix	8	0.0029

また、PathRings (Zhu et al. *BMC Bioinform* 2016) により全シグナル伝達経路を円形に可視化したところ、層状核と大細胞核において有意なシグナル経路 (暖色) が類似していることが示された (図 5)。

図5 PathRingsによるシグナル経路の比較



これは層状核、大細胞核のトノトピー形成・形態形成における共通のシグナル経路の存在を示唆しているものと考えられる。

(4) リアルタイム PCR による検証

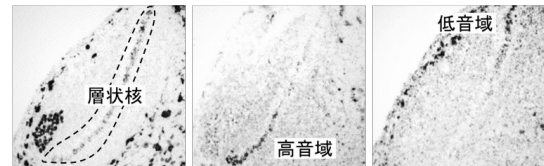
マイクロアレイの比較解析によって得られた分子群及びデータベース解析によって得られた分子群に関して、リアルタイム PCR

による検証を行なったところ、検証した 80% 以上にあたる分子 (層状核 78 個、大細胞核 96 個) が有意な発現差を示した。これは神経細胞の単離、RNA の増幅に基づいたマイクロアレイ解析によって再現性の高いデータが得られたことを示している。

(5) 発現パターンの解析

リアルタイム PCR で得られたデータを元に *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現パターンの解析を行なった。軸索誘導、転写因子、栄養因子など多数の分子が高音域または低音域に偏った発現パターンを示すことが明らかになった (図 6)。

図6 *in situ*ハイブリダイゼーションによる発現解析

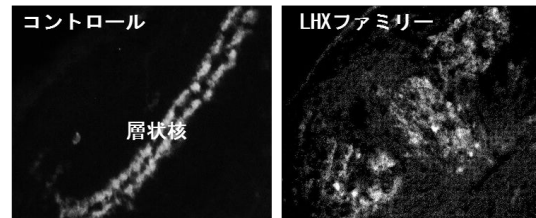


コントロール(左)と比べ、WNT ファミリー(中央)は高音域に、LHX ファミリー(右)は低音域に発現している。

(6) 過剰発現による影響の解析

A3V ベクターを用いて過剰発現を行い、神経投射やシナプス形成、神経細胞の配置などの神経回路形成に与える影響を解析した。層構造の消失、神経細胞の配置の異常、形態の異常など、遺伝子により様々な影響が観察された (図 7)。

図7 A3Vによる過剰発現



(7) RNA 干渉によるノックダウン

内在的な分子機能を調べることを目的に A3V ベクターに shRNA、miRNA などを組み込んで解析したものの、ノックダウンによる明確な影響は確認できなかった。そこで *in situ* ハイブリダイゼーションによるノックダウン効率の確認を行ったところ、*in vitro* においては十分な抑制効果が確認できる場合でも *in vivo* においてはほとんど抑制できていないことがわかった。これは A3V による層状核、大細胞核における shRNA、miRNA の発現がノックダウンを目的とした場合には不十分であるためであると考えられる。

本研究は層状核、大細胞核を対象とした初めての網羅的分子プロファイル解析であり、多数の分子が周波数依存的に発現していることが新たに示された。中でも神経系発生や

軸索誘導に関係する分子が有意に多く含まれることが遺伝子オンロジー解析及びシグナル経路解析から明らかになった。これはトノトピーが厳密な神経回路の形成によって構築されることを反映しているためだと推測される。一方で内耳において周波数依存的に発現し、トノトピー形成に重要であることが報告されている DNER、BMP、RALDH (Kowalik et al. *Dev Biol* 2011, Mann et al. *Nat Commun* 2014, Thiede et al. *Nat Commun* 2013)などの周波数依存的な発現は見られなかった。これは末梢の感覚受容器におけるトノトピー形成と中枢への伝達過程におけるトノトピー形成とは異なる分子メカニズムが存在している可能性を示していると考えられる。また、リアルタイム PCR、*in situ* ハイブリダイゼーションによる検証によって再現されたことから、本研究の目的の1つであった「トノトピーの形成に関わる分子群の抽出」は概ね達成できたものと考えている。しかしもう1つの目的であった「分子の機能解析に基づくトノトピーの形成機構の解明」は内在的な分子機能の解析に至らず、期間内に達成することはできなかった。今後は解析技術のさらなる改良や解析可能な動物種を用いることでこの問題を克服したいと考えている。

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

松井 亮介 (MATSUI RYOSUKE)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：80633940

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

京都大学・医学研究科
渡邊 大 (DAI WATANABE)

[その他]

<http://www.phy.med.kyoto-u.ac.jp/>