

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17024055

研究課題名（和文） 大脳皮質領野の形成と機能に関わる分子の探索と機能解析

研究課題名（英文） Analysis for genes specifically expressed in primate neocortical areas

研究代表者

山森 哲雄 (YAMAMORI TETSUO)

基礎生物学研究所・脳生物学研究部門・教授

研究者番号：80260206

研究成果の概要（和文）：霊長類の領野間で顕著な発現差のある遺伝子を網羅的に解析し、霊長類大脳皮質が、視覚野特異的に発現する遺伝子群と連合野特異的に発現する遺伝子群の2群に分けられることを発見した。これらの領域は霊長類で特に発達している領野であり、霊長類に固有の高次脳機能の遂行に重要な役割を果たすと考えられる。更に、セロトニン受容体5HT1B・2A が視覚機能に果たす役割の一部を解明することが出来た。

研究成果の概要（英文）： We have identified the genes that are markedly expressed in primate neocortical areas by a large scale analysis and found that these genes can be classified into two groups: The primary visual area specific and association area specific genes. The two areas are highly developed in the primate neocortex and thus these genes may play certain important roles in the specification of the primate areas. We have also identified roles of 5HT1B and 5HT2A serotonin receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	28,300,000	0	28,300,000
2006年度	25,800,000	0	25,800,000
2007年度	24,200,000	0	24,200,000
2008年度	26,800,000	0	26,800,000
2009年度	28,500,000	0	28,500,000
総計	133,600,000	0	133,600,000

研究分野：分子神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：大脳皮質、領野、遺伝子発現、連合野、視覚野

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質領野は、成熟した個体では、明確にその機能が異なる。例えば、視覚野の神経細胞は、視覚刺激に応答するよう特化し、聴覚野の神経細胞は、聴覚刺激に応答するよう

特化している。このような、機能分担が予め遺伝的にプログラムされたものか（プロトマップモデル：Rakic, P., *Science* 241, 170-176, 1988）、あるいは、大脳皮質を構成する細胞自体は、いわば「白紙」の状態であって、視

床等を介した環境入力によって順次その性質が決定されて行くのか(プロトタイプモデル: O' Leary, D.D., Trends Neurosci., 12, 400-406, 1989)、2つの異なる説が提唱された。両説とも、それを支持する実験的証拠があって、約10年以上に亘って論争が続いたが、視床の発達が悪く、事実上、視床からの投射がないようなマウスの大脳皮質でも、大脳皮質の特定の領域に発現する遺伝子のパターンに変化がないものがあることが発見され、大まかな領域化は、遺伝的にプログラムされた過程であることが判った。その後の研究により、シグナルセンターからのFGFsやBMPs等のシグナル分子の分泌→転写因子→反撥・誘因分子の一連のカスケードにより、視覚野、運動野、体制感覚野等が構築される仕組みが明らかになってきた。しかし、多くの問題が未解決であり、例えば、①前述の領域特異的分子の発現は、領野とは一致せず、より広く発現している。従って、領域化から更に領野化を促す機構がある筈である。②げっ歯類の大脳皮質は、一次感覚野・運動野が大部分を占めている。ヒトを含む霊長類の領野形成には、更に追加されるべき機構があるのではないかと等の問題が残っている。げっ歯類では、領野間で特異的に発現する遺伝子を網羅的に探索する試みがされたが、領野間で顕著な発現の差を示す遺伝子は無いとされていた(O' Leary, D.D. & Nakagawa, Y., Curr Opin Neurobiol., 12, 14-25, 2002)。しかし、我々は、領野の良く発達した霊長類では、事情が異なるかもしれないと考えて、霊長類の代表的領野(前頭葉、運動野、側頭葉、視覚野)間で顕著な発現の差のある遺伝子を探索し、Differential Display法で一次視覚野に発現が顕著であるOCC1(Tochitani et al., Eur J Neurosci, 13, 297-307, 2001)と前頭・感覚連合野にその発現が顕著であるRBP(retinol binding protein)を見出した(Komatsu et al., Cereb Cortex, 15, 96-108)。

2. 研究の目的

大脳皮質は、感覚情報処理、認知、判断、行動決定等の高次脳機能に重要な役割を果たすが、ブロードマンによって領野(ヒトでは47)と呼ばれる区分に分けられる。領野は、更に幾つかの副領野からなり、各領野は、それぞれの機能を分担しながら、感覚受容から行動までの高次脳機能の遂行を可能にしている。近年、大脳皮質の形成機構が、次第に明らかになってきた。特に、マウスを用いた研究から、遺伝的にプログラムされたカスケードにより、大脳皮質の基本的領域決定が行われる機構について、分子レベルでの理解が急速に進んできた。しかし、ブロードマン自身の研究によって示されているように、霊

長類の大脳皮質は、げっ歯類に比べてもより複雑である。特に、霊長類固有の連合野等の進化的起源は、なお不明である。本研究課題では、霊長類の領野間でその発現に顕著な差のある遺伝子を網羅的に同定し、その発現パターンと機能的意義を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

我々は、こうした研究の成果を引き続き発展させるため、RLCS(restriction landmark cDNA scanning)法を用いて、アフリカミドリザルの大脳皮質から代表的4領野(前頭葉、側頭葉、運動野、一次視覚野)間で発現する遺伝子を10,000スポット以上網羅的に探索し、領野間で顕著な差のある遺伝子を同定した。RLCS法で、領野間で差のあるものについてRT-PCR法により定量した結果、4領野間で2倍以上の差のある遺伝子を20遺伝子余り、5倍以上の差のある遺伝子を5遺伝子見出した。これらの結果から、領野間での発現の差が2倍以下である遺伝子は、全遺伝子の99.8%、5倍以下である遺伝子は、99.95%程度であり、殆どの遺伝子は、霊長類の領野間で顕著な発現の差がないことが判った。本研究課題では、主に、領野間で顕著な差(5倍以上)のある遺伝子について、集中的に解析を行った。

4. 研究成果

(1) セロトニン受容体5HT1B, 5HT2A

RLCS法で領野間での発現差(11倍)の最も大きいスポット(RLCS15)は、セロトニン受容体5HT1Bであることが判明した。そこで、この遺伝子の詳細な発現解析を行った。その結果、5HT1Bは、全脳の冠状切片で視床の視覚中継核である外側膝状体と一次視覚野にその発現が顕著であることが判った。一次視覚野では、LGNからの直接の入力層である4Aと4Ca, bに顕著な発現が見られた。

他のセロトニン受容体のサブクラスを調べたところ5HT2Aでのみ、一次視覚野に顕著な発現が見られた(ただし、5HT1Bとは異なり、LGNには発現は見られず、またV1では、1層以外の層に広く発現が見られた)。

これらの発現パターンの生理的意味を明らかにする目的で、大阪大学の佐藤宏道教授との共同研究で、5HT1Bと5HT2Aに対する特異的アゴニストとアンタゴニストを用いて、一次視覚野神経細胞45個の刺激応答性の変化を調べた。その結果、刺激応答性の高い神経細胞では、5HT1Bアゴニストは、一例を除いて促進的に作用し、一方、刺激応答性の低いものの中には、抑制的に作用するものがある。次に、1個の神経細胞の応答性を刺激強度を変えて測定したところ、刺激強度が低い場合は、抑制し、刺激強度が強い場合は促進

する事が判った。更に、刺激下での神経細胞応答性と無刺激下での神経細胞応答性の割合を調べたところ、5HT1B アゴニストは、刺激に反応する神経細胞の発火の割合を促進することが判った。以上のことから、セロトニンは5HT1B に作用して、そのS/N (シグナルノイズ) 比を増大させることが示唆される。

一方、5HT2A に対するアゴニスト、アンタゴニストに対する一次視覚野神経細胞の応答性から、セロトニンは、視覚刺激が弱いときには、その応答性を強化し、逆に刺激応答性が強い時は、抑制する一種のゲインコントローラとして作用することが示唆された。5HT1B は軸索や軸索終末に局在することが知られており、一方5HT2A は、後シナプスに多いことから5HT1B と5HT2A の一次視覚野に於ける発現パターンは、視覚刺激に対して、前シナプスにある5HT1B が先ずS/N 比を上げるよう働き、次にシナプスにある5HT2A によるゲインコントロール機構によって補正される機構が示唆された。

(2) PNMA5

RLCS 法によって領野間の発現差の2番目に高い(10倍)RLCS16は小脳や脳幹での運動失調を示す、腫瘍随伴症候群(PN)の一つで産生される血清に反応するMA-1遺伝子ファミリーの一つであるPNMA5であることが判った。驚いたことに、PNMA5は、遺伝子配列や機能的相関からはRBPとは、程遠いと考えられるにもかかわらず、その発現パターンは非常に良く似ていることが判った。

他のPNMAファミリー遺伝子(PNMA1, PNMA2, PNMA3, MOAP1)は、PNMA5の様な前頭・感覚連合野特異的な発現パターンは示さなかった。ヒトPNMAファミリー遺伝子は、ヒトPNMA1遺伝子に対して、40-50%程度の相同性がある。また、PNMA5以外のファミリー遺伝子でコードされる蛋白質は、ヒトとマウスで74-92%程度の相同性がある。一方、PNMA5は、57%の相同性しか無く、更に、げっ歯類では、精巣での発現しか見られないことから、霊長類の連合野で特異的な機能を持つように進化した事が示唆される。

(3) SLIT1

RLCS 法で領野間で3番目に顕著な発現差(5.2倍)のある遺伝子の一つは、SLIT1である。SLIT1の発現をin situ hybridization法で調べたところ、前頭連合野でその発現が顕著であることが判った。

Slit1は、ショウジョウバエの幼虫の表皮のパターン形成に関与する遺伝子として報告されたものであるが、その後、哺乳類脊髄交連線維の中線交差に関連する等の反撥性の軸索ガイダンス分子であることが明らかになっている。しかし、霊長類の連合野では、SLIT1とその受容体であるROBO1,2が同じ神経細胞に共発現することから反撥因子と

して働く可能性は考えにくい。

げっ歯類の脳皮質では、5・6層の神経細胞にslit1とrobo1,2が共発現し、それらが樹状突起の発達と形成を促進するということが知られている(Whitford et al, Neuron, 33, 47-61)ので、霊長類の脳皮質でも同様の機構が考えられる。げっ歯類では、胎生期から5・6層予定細胞に発現し続けるが、霊長類では、ダイナミックな発現パターンの変化を経て、若年成熟個体で前頭連合野に特異的な発現パターンに落ち着く。この事は、げっ歯類の脳皮質と霊長類の脳皮質の相違(特に連合野の形成と発達)を明らかにする上で、重要な手がかりを与えてくれるものと思われる。

(4) OCC1 関連遺伝子

RLCS 法で領野間で発現の差の多い(3倍程度)ものの中に、testican (SPOCK) -1があった。testican-1は、OCC1を含めた6遺伝子のOCC1関連遺伝子の一つである。そこで、これら6遺伝子の発現パターンを調べたところ、testican-1, -2は、OCC1と領野間の発現差のレベルは異なるものの基本的に良く似た発現パターンを示し、SPARC 遺伝子は、RBPやPNMA5と良く似た発現パターンを示すことが判った。一方、testican-3, SC1は、発現レベルは異なるものの、領野間での差はなく、脳皮質全体に発現していた。

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21件)

① Sasaki T, Komatsu Y, Watakabe A, Sawada K, Yamamori T. Prefrontal-Enriched SLIT1 Expression in Old World Monkey Cortex Established during the Postnatal Development. Cereb Cortex. 2010 Feb 1. [Epub ahead of print] (査読有)

② Takaji M, Komatsu Y, Watakabe A, Hashikawa T, Yamamori T. Paraneoplastic antigen-like 5 gene (PNMA5) is preferentially expressed in the association areas in a primate specific manner. Cereb Cortex. 2009 Dec;19(12):2865-79. (査読有)

③ Watakabe A, Komatsu Y, Sadakane O, Shimegi S, Takahata T, Higo N, Tochitani S, Hashikawa T, Naito T, Osaki H, Sakamoto H, Okamoto M, Ishikawa A, Hara S, Akasaki T, Sato H, Yamamori T. Enriched expression of serotonin 1B and 2A receptor genes in macaque visual cortex and their bidirectional modulatory effects on neuronal responses. Cereb Cortex. 2009

Aug;19(8):1915-1928. (査読有)

④ Takahata T, Komatsu Y, Watakabe A, Hashikawa T, Tochitani S, Yamamori T. Differential expression patterns of occl-related genes in adult monkey visual cortex. *Cereb Cortex*. 2009 Aug;19(8):1937-1951. (査読有)

⑤ Takahata T, Higo N, Kaas JH, Yamamori T. Expression of immediate-early genes reveals functional compartments within ocular dominance columns after brief monocular inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 21;106(29):12151-12155. (査読有)

⑥ Watakabe A. Comparative molecular neuroanatomy of mammalian neocortex: what can gene expression tell us about areas and layers? *Dev Growth Differ*. 2009 Apr;51(3):343-354. (査読有)

⑦ Moroni RF, Inverardi F, Regondi MC, Watakabe A, Yamamori T, Spreafico R, Frassoni C. Expression of layer-specific markers in the adult neocortex of BCNU-Treated rat, a model of cortical dysplasia. *Neuroscience*. 2009 Mar 17;159(2):682-691. (査読有)

⑧ Hirokawa J, Watakabe A, Ohsawa S, Yamamori T. Analysis of area-specific expression patterns of RORbeta, ER81 and Nurrl mRNAs in rat neocortex by double in situ hybridization and cortical box method. *PLoS One*. 2008 Sep 25;3(9):e3266. (査読有)

⑨ Lyckman AW, Horng S, Leamey CA, Tropea D, Watakabe A, Van Wart A, McCurry C, Yamamori T, Sur M. Gene expression patterns in visual cortex during the critical period: synaptic stabilization and reversal by visual deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 8;105(27):9409-9414. (査読有)

⑩ Hirokawa J, Bosch M, Sakata S, Sakurai Y, Yamamori T. Functional role of the secondary visual cortex in multisensory facilitation in rats. *Neuroscience*. 2008 Jun 2;153(4):1402-1417. (査読有)

⑪ 三品昌美、山森哲雄、狩野方伸、村上富士夫、貝淵弘三編 「霊長類大脳皮質領野特異的発現遺伝子の解析」 『蛋白質 核酸 酵素』増刊号 共立出版 2008 53 巻 464-468 (査読無)

⑫ Takahata T, Hashikawa T, Higo N, Tochitani S, Yamamori T. Difference in

sensory dependence of occl/Follistatin-related protein expression between macaques and mice. *J Chem Neuroanat*. 2008 Jan;35(1):146-157. (査読有)

⑬ Nakamura K, Watakabe A, Hioki H, Fujiyama F, Tanaka Y, Yamamori T, Kaneko T. Transiently increased colocalization of vesicular glutamate transporters 1 and 2 at single axon terminals during postnatal development of mouse neocortex: a quantitative analysis with correlation coefficient. *Eur J Neurosci*. 2007 Dec;26(11):3054-3067. (査読有)

⑭ Watakabe A, Ichinohe N, Ohsawa S, Hashikawa T, Komatsu Y, Rockland KS, Yamamori T. Comparative analysis of layer-specific genes in Mammalian neocortex. *Cereb Cortex*. 2007 Aug;17(8):1918-1933. (査読有)

⑮ Sakata S, Yamamori T. Topological relationships between brain and social networks. *Neural Netw*. 2007 Jan;20(1):12-21. (査読有)

⑯ Watakabe A, Ohsawa S, Hashikawa T, Yamamori T. Binding and complementary expression patterns of semaphorin 3E and plexin D1 in the mature neocortices of mice and monkeys. *J Comp Neurol*. 2006 Nov 10;499(2):258-273. (査読有)

⑰ Takahata T, Komatsu Y, Watakabe A, Hashikawa T, Tochitani S, Yamamori T. Activity-dependent expression of occl in excitatory neurons is a characteristic feature of the primate visual cortex. *Cereb Cortex*. 2006 Jul;16(7):929-940. (査読有)

⑱ Yamamori T, Rockland KS. Neocortical areas, layers, connections, and gene expression. *Neurosci Res*. 2006 May;55(1):11-27. (査読有)

⑲ Watakabe A, Komatsu Y, Nawa H, Yamamori T. Gene expression profiling of primate neocortex: molecular neuroanatomy of cortical areas. *Genes Brain Behav*. 2006;5 Suppl 1:38-43. (査読有)

⑳ Komine Y, Nakamura K, Katsuki M, Yamamori T. Novel transcription factor zfh-5 is negatively regulated by its own antisense RNA in mouse brain. *Mol Cell Neurosci*. 2006 Feb;31(2):273-283. (査読有)

㉑ Sakata S, Yamamori T, Sakurai Y. 7-12 Hz

cortical oscillations: behavioral context and dynamics of prefrontal neuronal ensembles. *Neuroscience*. 2005;134(4):1099-1111. (査読有)

〔図書〕(計1件)

[1] 山森 哲雄 岩波書店 シリーズ進化学 第5巻 ヒトの進化 3章「脳の進化」109-135 2006

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山森 哲雄 (YAMAMORI TETSUO)
基礎生物学研究所・脳生物学研究部門・教授
研究者番号：80260206

(2) 研究分担者

渡我部 昭哉 (WATAKABE AKIYA)
基礎生物学研究所・脳生物学研究部門・助教
研究者番号：40290910
(H20-21：連携研究者)

小峰 由里子 (KOMINE YURIKO)
基礎生物学研究所・脳生物学研究部門・助教
研究者番号：90280586
(H20-21：連携研究者)

定金 理 (SADAKANE OSAMU)
基礎生物学研究所・脳生物学研究部門・助教
(H19：研究分担者に追加 H20-21：連携研究者)
研究者番号：90446261

尾上 浩隆 (ONOE HIROTAKA)
独立行政法人理化学研究所・分子イメージング科学研究センター 分子プローブ機能評価研究チーム・チームリーダー
研究者番号：80214196
(H20：研究分担者に追加)