

平成 21年 6月 3日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500304

研究課題名（和文） 哺乳類大脳新皮質の分子比較解剖学的研究

研究課題名（英文） Comparative neuroanatomy of mammalian neocortex

研究代表者

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

研究成果の概要：

層特異的遺伝子を使った興奮性ニューロンの分類と特徴付けを試み、以下の結果を得た。

(1) ラットにおいて層特異的発現を示す RORbeta, ER81, Nurr1 遺伝子は、領野特異的パターンを同時に示す。主成分解析から、それぞれの発現パターンは、「一次感覚野～連合野」「頭頂領域～側頭領域」という軸に沿った発現分布を示すことが分かった。このことは、この二つの要因が皮質形成の鍵である可能性を示している。

(2) マウス・ラットにおいて CCK と PCP4 遺伝子は、6層においてそれぞれ皮質、視床に投射する興奮ニューロンサブタイプによく対応することが分かった。CCK はサルでも皮質投射との相関を示したが、PCP4 は、一次視覚野以外では6層の発現は見られなかった。このような大きな種差は、皮質と視床の関係がネズミとサルで変化している可能性を示している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：層特異的遺伝子、レンチウイルス、逆行性トレーサー、遺伝子発現プロファイリング、大脳新皮質、霊長類、皮質ニューロン、脳進化

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始時点で、私はいくつかの層特異的遺伝子がサル、ネズミ間で保存された発現パターンを示すことをすでに報告していた。

このことは、これらの遺伝子が種間で保存された役割を果たすことを示唆している。重要なのは、これらの遺伝子発現は「層特異的」というより細胞タイプ特異的だということだ。私たちが開発した蛍光2重ISH

を使えば、同じ層に存在していても違うマーカー遺伝子を発現するニューロンを区別することができる。つまり、種間を越えて保存されているのは、恐らくある特性を持ったニューロンサブタイプなのである。問題は、遺伝子マーカーで区別できるニューロンタイプが、皮質回路においてどのような機能的な役割を果たしているかということだが、この点を理解するためにはそれぞれのニューロンタイプが、皮質内外とどのような結合をしているかを知ることが重要だと考えた。例えば、6層ニューロンには、視床に投射するニューロンと皮質に投射するニューロンが存在するが、この2種類は遺伝子発現パターンで区別できるだろうか？また外部投射パターンだけでなく、皮質内部での結合特性にも、異なるニューロンタイプには決まったパターンがあるのではないかと。これらの疑問を解明することは、皮質の基本構造を理解する上で重要である。また、皮質の領野分化や進化を理解するためには、種間で保存された基本構造がいかに変化しているかを知る必要がある。以上の背景を持って本研究は提案された。

## 2. 研究の目的

さまざまな遺伝子マーカーを使って、皮質の特定の細胞タイプを見分ける。さらにそれぞれのタイプの外的、内的結合特性を調べる。後者については、そのための解析方法を新規に開発する。最終的には、それぞれについてサルとネズミ間での比較を行い、保存された性質と、変化した性質を同定する。

## 3. 研究の方法

皮質ニューロンの分類には、蛍光2重ISH法を用いた遺伝子発現プロファイリングを使う。サルとネズミの比較により、保存されている基本的な部分と、変化している部分を明らかにする。分類したニューロンの外的結合様式は、FluoroGoldなどの逆行性トレーサーと蛍光ISH法を組み合わせる。内的結合特性を調べる前段階として、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入法を確立する。

## 4. 研究成果

### (1) 層特異的遺伝子の領野特異的発現。

層特異的遺伝子は、細胞タイプのマーカーとして有用であるだけでなく、さまざまな領野差を示す。当研究室の廣川研究員とともに、ラット脳において遺伝子発現量を

定量的に解析する方法（Cortical Box法：図1参照）を使って領野プロファイリングを行い、領野の特性を遺伝子発現をベースに解析した。

この仕事は、本研究の目的と一見直接結びついてはいないが、皮質全体の機能を考える上で重要な発見である。

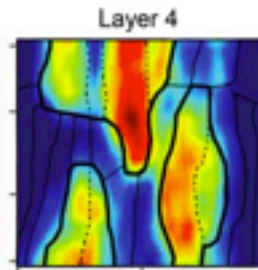


図1：Cortical Box法を使った遺伝子解析法。ラット皮質を仮定の箱状構造に変換し、標準化を可能にした。図では、RORベータ遺伝子の4層での発現分布が疑似カラーで表示されている。発現が強い部分は、体性感覚野、聴覚野、視覚野といった一次感覚野に相当する。

### (2) PCP4 遺伝子と CCK 遺伝子の投射様式

この二つの遺伝子は、6層において相補的な発現様式を示す（図2参照）。実は、それぞれの遺伝子は、視床、皮質に投射する興奮ニューロンサブタイプによく対応することが分かった（図3参照）。CCKはサルでも皮質投射との相関を示したが、PCP4は、一次視覚野以外では6層の発現は見られなかった。このような種差が意味することはまだ分からないが、機能との関連を考える上で重要な発見である。

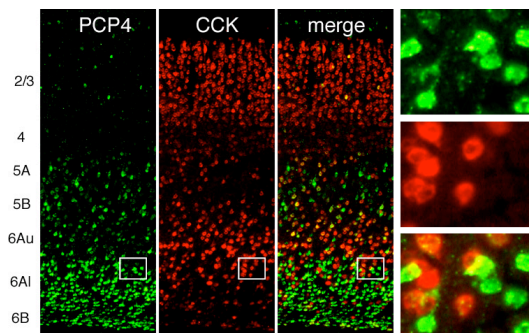


図2：PCP4/CCK 遺伝子のラット視覚野における蛍光2重ISH法。6層において、この両者は相補的な発現を示す。

緑：視床投射ニューロン

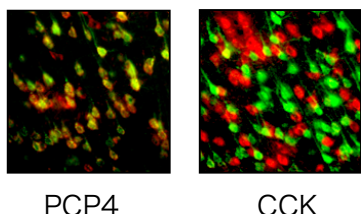


図3：視床投射ニューロンの遺伝子発現パターン。FluoroGoldを視床に注入し、皮質の視床ニューロンを逆行性に標識したサンプルを使って、PCP4, CCK 両遺伝子の蛍光 ISH 法を行った。PCP4 とはほぼ完全に重なっているが、CCK とはまったく重なっていないことに注意。

### (3) レンチウイルスによる遺伝子導入

京大金子研、福島医科大学小林研との共同研究で、それぞれ TET-OFF システムを使った強力な発現誘導 (図4参照)、及び逆行性レンチウイルスベクターシステムを使った in vivo 遺伝子導入が可能になった。現在この二つの方法を組み合わせる実験を行っている。

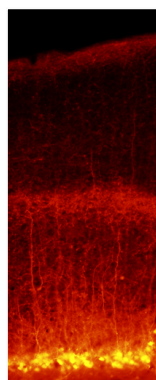


図4：TET システムによる赤色蛍光物質の強力な発現。

6b 層のニューロンに、赤色蛍光物質をコードするレンチウイルスが感染し、1週間で詳細な形態が観察できるほど強い発現が見られた。これは、抗体による増幅をしていないことに注意。

## 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3件)

① 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):343-54. 総説 査読有り

② Watakabe A., Komatsu Y, Sadakane 他14名 Enriched Expression of Serotonin 1B and 2A Receptor Genes in Macaque Visual Cortex and their Bidirectional Modulatory Effects on Neuronal Responses. Cereb Cortex. 2008 [Epub ahead of print] 査読有り

③ 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. 査読有り

[学会発表] (計2件)

### ① 第38回北米神経科学学会

Akiya Watakabe., Noritaka Ichinohe, Sonoko Ohsawa, Takeshi Kaneko, Kathleen S. Rockland, and Tetsuo Yamamori

Expression of Cholecystokinin (CCK) and purkinje cell protein 4 (PCP4) mRNA distinguishes two populations of pyramidal neurons in rat cortical layer 6

2008年11月19日米国ワシントンDCにてポスター発表

### ② 第31回日本神経科学学会

Akiya Watakabe., Noritaka Ichinohe, Sonoko Ohsawa, Kathleen S. Rockland, and Tetsuo Yamamori

Comparative analyses of cck, sema3E and pcp4 mRNA expressions in monkeys and mice: molecular signatures of deep layer neurons

2008年7月10日東京国際フォーラムにてポスター発表

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/brish>

本研究に用いている in situ hybridization 法の普及を目的としてホームページを作成した。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

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

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし