

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09935

研究課題名(和文) グルタミン酸脱炭酸酵素ノックアウトラットを用いた中枢性視覚障害の検討

研究課題名(英文) Evaluation of central visual deficits in GAD KO rats

研究代表者

今村 一之 (Imamura, Kazuyuki)

前橋工科大学・工学部・学長

研究者番号：30203326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抑制性神経伝達物質GABAの合成酵素としてそれぞれ、gad1、gad2遺伝子でコードされるGAD67、GAD65が知られている。本研究では、それぞれの遺伝子を遺伝子編集技術を用いて欠損させたラットを用いて眼優位可塑性(ODP)におけるそれぞれの酵素分子の役割について調べた。単眼の視覚刺激によって大脳視覚野第4層に誘導される最初期遺伝子c-fosの発現を評価する事でODPを評価した。その結果、マウスにおいては出生致死でこれまで研究不可能であったGAD67分子について、そのノックアウトラットにおいて、GAD65ノックアウトラットと同様にODPが有意に阻害されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感受性期内の片眼の使用不可によって、その眼が大脳視覚野のニューロンから機能的に遮断され、正常に視体験した眼によって代替されてしまう(眼優位可塑性)。これまで、抑制性伝達物質GABAによる眼優位可塑性制御が、その合成酵素の遺伝子欠損マウスの研究によって示されてきた。GABAの合成酵素には、GAD65とGAD67という二つのサブタイプの存在が知られているが、GAD67遺伝子の実験的欠損はマウスにおいては出生致死であり、これまで検討することが不可能であった。本研究では遺伝子欠損ラットにおいてGAD67の機能を評価し、世界で初めてGAD67が眼優位可塑性に重要な働きをしていることを解明した。

研究成果の概要(英文)：The synthetic enzymes of inhibitory neurotransmitter GABA are GAD67 and GAD65. We studied the roles of these two subtypes in the regulation of ocular dominance plasticity (ODP) by use of knockout rats for each genes.

Two series of knockout rats were produced by use of TALEN or CRISPER/Cas 9 gene editing systems. To avoid the sampling biases, we used the c-Fos activity mapping method in which the number of immuno-positive neurons were evaluated in layer IV of the binocular zone of primary visual cortex, ipsilateral to the stimulated eye.

As already shown in the knockout mice, GAD65 knockout rats exhibited significant decrease in ODP. Previously, the involvement of GAD67 has been difficult to show, because the knockout of this gene is lethal in mice. We firstly demonstrated that the ODP is significantly suppressed in GAD67-knockout rats in different manner. The results suggested these two enzymes regulate ODP with different manner.

研究分野：神経科学

キーワード：眼優位可塑性 GABA GAD65 GAD67 ラット 遺伝子編集 最初期遺伝子 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

生後発達初期の比較的厳密に規定された期間内に片眼瞼を縫合し、片方の目の入力を剥奪すると第一次視覚野の元来両眼に反応するニューロンの遮蔽された目の刺激に対する反応が抑制され、ニューロンは正常に視体験をした目の刺激にのみ選択的に反応ようになる。この現象は、多くの哺乳類の第一次視覚野で確認されており、眼優位可塑性(Ocular Dominance Plasticity, ODP)と呼ばれている。ODPが発見された当時は、微少電極を用いて個々の視覚野ニューロンの左右の目のそれぞれに独立して与えられた視覚刺激に対する反応を比較することで眼優位性を決定し、多数の記録データから眼優位性ヒストグラムを作成し、その変化を元に可塑性の評価を行っていた。この評価系が機能する条件は如何にサンプリングバイアスを避けるかに尽きる。ODPの対象となる視覚野に存在する無数のニューロンからどのようにデータを採取するかによって、結果の解釈に大きなバラツキが生じることが懸念される。申請者は、主にネコの第一次視覚野において、安定してODPを計測する手法をマスターし、多くの研究成果を発表してきた。その纏めとして、ODPが発現するためには視覚野の神経活動が必要であること、視覚情報を搬送する神経活動以外に可塑性そのものをコントロールするシステムが正常に動作していることを主張してきた。後者として中枢ノルアドレナリン系が該当することを示してきた。

その後ODPの評価方法も多様な手法が提案、検証され、また、視覚野内での要因の実験的操作についても多くの挑戦がなされてきた。申請者等が開発した単眼の視覚刺激によって視覚野に惹起される最初期遺伝子 c-fos 陽性細胞数を指標に用いた神経活動マッピング法(c-Fos Activity Mapping, c-Fos-AM)がその一つにあげられる。また、従来は主として薬理的な手法を用いて行われてきた実験を遺伝子ノックアウト動物を利用した方法に推移してきた。

ナトリウムチャンネルブロッカーのテトロドトキシンを視覚野に局所的に持続注入する方法が採用され、電気生理学的な方法を用いて視覚野の神経活動がODP発現に必須であることが示された。視覚野神経活動を調節する抑制性の神経伝達を担う分子はGABAであるが、GABA_A受容体のアゴニストを同様に投与することで同様な結論が導き出されている。これらの実験では評価すべき視覚野ニューロンの視覚反応が正常に記録できるようになるまで一定期間暗室内に動物を置き、このような時間遅れがある中で電気生理学的記録を行わなければならないという制約があった。視覚野神経活動を調節する抑制性の神経伝達を担う分子はGABAであるが、この伝達物質の合成酵素GADには分子量の異なる二つのサブタイプ(GAD65, GAD67)が存在している。本研究が開始される少し以前にGAD65遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究が行われ、GAD65がODP発現に必須の分子であることが証明された。しかし、GAD67の関与については、この分子のノックアウトマウスが口蓋裂の為出生致死であり、検討する事が不可能であった。また、これらの実験はマウスの視覚野ニューロンの電気生理学的な記録方法が適用されており、上述したサンプリングバイアスの問題が完全にクリアされているとは結論づけがたい。

そのような状況の中、分担研究者の研究室で遺伝子編集の技術を用いて、GADノックアウトの生産法が確立し、マウスと異なり、GAD67のノックアウトにおいても一定の数のラットが生後発達初期に十分に生存することが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでノックアウトマウスを用いることが不可能であったGAD67ノックアウトラットを用いてODPにおける当該分子の役割を明らかにすること、また、GAD65ノックアウトラットとの違いを調査することで両サブタイプの役割の違いについて考察することを目的とする。さらに、申請者等が開発してきたcFos-AM法を用いてODPを評価する事でサンプリングバイアスを回避した評価法を用いた研究を実施することを目指した。

3. 研究の方法

3.1 使用動物

遺伝子編集技術(GAD65についてはTALEN法をGAD67についてはCRISPR/Cas9法)を適用してノックアウトラットを得た(文献1)。GAD65について、野生型(WT, N=18)、二本鎖DNAの片方のGAD67遺伝子が欠損しているヘテロ型(Hetero, N=16)、両方のGAD65遺伝子が欠損したホモ型(Homo, N=10)、合計44匹を用いた。GAD67については、WT(N=9)、Hetero, N=8)、Homo, (N=9)合計26匹のラットを用いた。遺伝子型の判定はそれぞれのGAD遺伝子の挟むように設計されたプライマーを用いてPCR法にてそれぞれの遺伝子を100万倍に増幅し、アガロースゲル電気泳動にてDNAを分離し、対応する反応生成物の有無を解析した。

3.2 片眼遮蔽と単眼視覚刺激

イソフルラン麻酔下で生後4週齢のラットの上下眼瞼を切除し縫合した。二週間後に片眼球硝子体腔に5mMのテトロドトキシン(TTX)を1 μ l注入し、24hrの完全暗室飼育を行った。その後実験室環境に60min間暴露することで視覚刺激を行った。

3.3 c-Fos Activity Mapping (c-Fos-AM) 法 (文献2)

光刺激後に深麻酔下で経心灌流固定されたラットから抜脳し、後頭極から 2.0 mm の第一次視覚野中心から 50 μm 厚の組織切片を 3 枚連続して得て、400 μm の間隔で 4 群の組織切片を得た。このようにして取得したそれぞれの群の 1 枚目を第 1 次視覚野両眼(0c1b)領域を決定するため Nissl 染色、2 枚目を c-Fos 免疫染色、3 枚目を第 4 層境界を抽出するためにチトクローム酸化酵素染色に用いた。申請者等が確立した方法(文献2)に従い、刺激眼と同側の 0c1b 第 4 層領域内の c-Fos 免疫陽性細胞の発現数を手動、あるいはオリジナルに作成した細胞カウントプログラムを用いて計測した。

4. 研究成果

4.1 GAD65KO ラットにおける眼優位可塑性評価

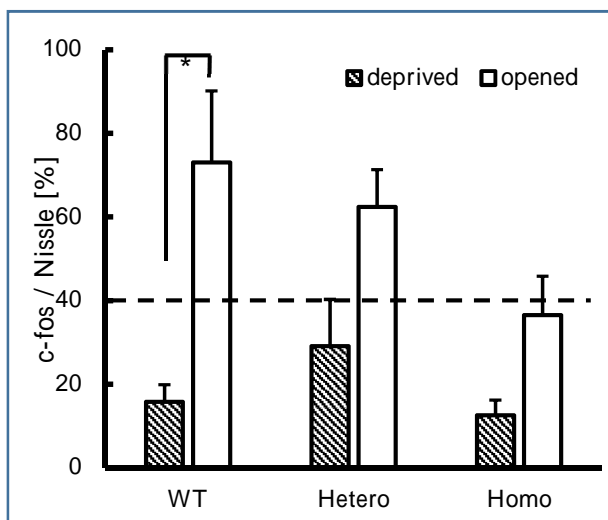


図1 c-Fos Activity Mapping (GAD65KO ラット)

による免疫陽性細胞数も野生型に比べて増加傾向が弱く、両眼刺激による c-Fos 免疫陽性細胞の誘導に統計学的に有意差は認められなかった。以上の結果から、GAD65KO ラットにおいて、眼優位可塑性が抑制されていることが示された。この結果は、GAD65KO マウスを用いて行われた電気生理学的研究成果(文献3)を支持するものである。但し、正常眼と剥奪眼の刺激により誘導される c-Fos 免疫陽性細胞数には野生型ラットに認められる可塑性現象と同様な変化が残存していることがわかった。これは、GAD65 遺伝子の欠損を他のシステムが補償している可能性を示唆している。

4.2 GAD67KO ラットにおける眼優位可塑性評価

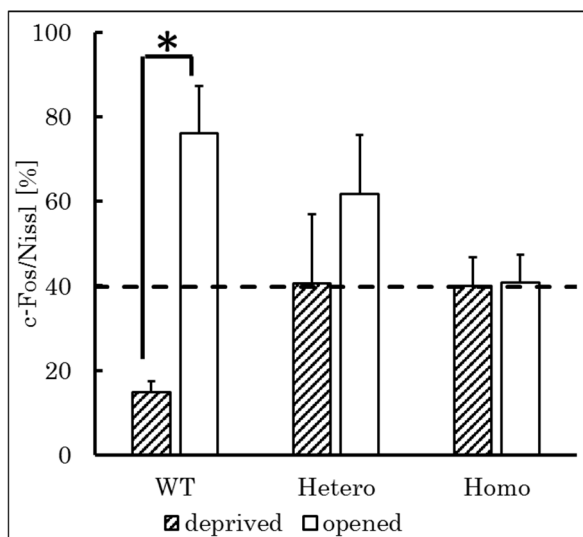


図2 c-Fos Activity Mapping (GAD67KO ラット)

野生型ラットを用いた c-Fos-AM において、遮蔽眼の刺激による計測領域内の c-Fos 免疫陽性細胞数は減少 (図1斜線カラム) し、正常に視体験した眼の刺激による細胞数は増加 (図1白抜きカラム) した。両者の差は統計学的に有意であった (Bonferroni, $p < 0.05$)。このことは、申請者等の確立した手法で得られた正常ラットの結果を再現するものであった。

GAD65KO ヘテロ型においては、同様な変化が認められるが、遮蔽眼刺激による c-Fos 免疫陽性細胞数の低下が十分でなく、また、正常に視体験した眼の刺激によって誘導される細胞も野生型までは増えることがなく、両者の差に統計学的な有意差は検出されなかった。さらに Homo 型では、正常眼の刺激

GAD67 KO ラットを用いた同様の実験で、野生型の c-Fos-AM の結果は、遮蔽眼と正常眼の刺激によって誘導される免疫陽性細胞数には統計学的に有意な差が認められ、眼優位可塑性が正常に発現しているのに対して、ヘテロ型の群では、正常眼の刺激により誘導される c-Fos 免疫陽性細胞数は、ある程度増大するものの、遮蔽眼の刺激による細胞数が減少する現象が抑制されることがわかった (図1の中央の一组のカラム)。さらにホモ型のラットにおいては、正常眼刺激に対する免疫陽性細胞数の増大も完全に抑制された (図1の右端の一组のカラム)。以上の結果から、GAD67KO ラットにおいて、眼優位可塑性がほぼ完全に阻害されることが明らかになった。GAD67 は、ラットにおいて眼優位可塑性の発

現に極めて重要な働きをしていることが示された。また、本研究では、GAD67KO ラットに5ヶ月間にわたる単眼遮蔽を施し、同様な検討を加えている。結果は、GAD67KO ラットにおいて長期間の単眼遮蔽を施行することで、開眼刺激により優位な免疫陽性細胞を遮蔽眼刺激で有意な細胞数の減少を確認することができた。この結果は、GAD67KO ラットにおいて、長期の単眼剥奪によ

り眼優位可塑性が誘導されることを示唆している。

4.3 まとめ

本研究において、出生致死の為、これまで全く研究することができなかった GAD67 遺伝子の眼優位可塑性における役割を明らかにすることができた。これまでノックアウトマウスを用いて研究されてきた GAD65 に比べて、可塑性抑制作用はより大きいことが分かった。これは、両酵素の細胞内局在と関連があると考えられる。GAD65 が神経終末での GABA 需要に応じて合成を行っている一方、GAD67 は細胞体に存在し、ベースラインの GABA 合成に関与していると考えられている。GAD67KO ラットの脳での GABA 含有量は野生型のほぼ半分まで減少しているのに対して、GAD65KO では、これより減少が少ないことが明らかになってきており、GABA 減少量と可塑性阻害に相関がある可能性が考えられる。事実、本研究において GAD67KO ラットにおいても長期間の単眼遮蔽を施すことによって ODP が発現することから、ベースラインの GABA 合成が低下しても、GAD65 による合成がその低下分を補うことができる可能性が考えられた。

タングステン微小電極を用いてラットの視覚野 0c1b 領域の細胞の光応答を記録した(図3)スクリーン上を左右に移動するスリット光刺激に対応してスパイク発射が認められる。この記録では、マルチユニット記録になっており、スパイク波形によりシングルユニットに分離する必要があるが、この図で明らかのように電極先端周囲の複数の細胞は同じような反応を示すことから、電気生理学的手法を用いて眼優位ヒストグラムを作成する際には、サンプリングバイアスを十分にコントロールする必要がある。脳表から 2 mm 程度の皮質の中で眼優位ヒストグラムを構成するに十分な数のニューロンを得ることは困難であり、マウスやラットを用いた電気生理学的評価法の大きな問題となっている。今回適用した c-Fos-AM 法は、そのようなサンプリングバイアスを必要とせず、可塑性の評価に適用可能であることが再確認された。



現在様々なイメージング手法が取り入れられ、眼優位可塑性の評価法も工夫されているが、ラットはネコ、サルやヒトと異なる眼球の配置から、ヒトが頭の動きを打ち消すととも周周を見渡すために、両眼はともに動き、常に同じ対象を追いかけるが、ラットでは概して眼は反対の方向へ動く。ラットが頭を一方に向けると、下側の眼は上に動き、反対側の眼は

図3 麻酔下のラット 0c1b 領域の神経細胞の光応答
(マルチユニット記録、スケールは、1 秒)

下に動く。このように両眼立体視の脳内機構がネコやサルとラット、マウスでは大きな相違がある事が明らかになっている。申請者等は眼優位可塑性の動作機構が、ネコとマウスでは基本的に異なる可能性を議論してきた(文献4)が、今回の結果を他の動物種においても確認していく必要性が新たに見いだされた。

【参考文献】

1. Fujiwara, K., Kakizaki, T., Jiang, W., Miyata, S. and Yanagawa Y. (2021) Characterization of glutamate decarboxylase 67-kDa and 65-kDa isoforms knockout rats. 細胞, 53 (7), 439-443.
2. Nakadate, K., Imamura, K. and Watanabe, Y. (2013) c-Fos activity mapping reveals differential effects of noradrenaline and serotonin depletion on the regulation of ocular dominance plasticity in rats. Neurosci. 235, 1-9.
3. Fagiolini, M. and Hensch T. (2000) Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. Nature, 404(6774), 183-6.
4. Kasamatsu, T. and Imamura, K. (2020) Ocular dominance plasticity: Molecular mechanisms revisited. J. Comp. Neurol., 528(17), 3039-3074.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 T. Kasamatsu, K. Imamura	4. 巻 528
2. 論文標題 Ocular dominance plasticity: Molecular mechanisms revisited	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Comp. Neurol.	6. 最初と最後の頁 3039-3074
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.25001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 H. Kuai, N. Zhong, J. Chen, Y. Yang, X. Zhang, P. Liang, K. Imamura, L. Ma, H. Wnag	4. 巻 75
2. 論文標題 Multi-source brain computing with systematic fusion for smart health	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Information Fusion	6. 最初と最後の頁 150-167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.inffus.2021.03.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 H. Kuai, J. Chen, X Tao, K. Imamura, P. Liang and N. Zhong	4. 巻 12960
2. 論文標題 Exploring the brain information processing mechanisms from functional connectivity translational applications.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Informatics 2021, LNAI	6. 最初と最後の頁 99-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-886993-9_10	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Y. Manaka, Y. Ohno, A. Horikoshi, K. Imamura	4. 巻 20(4)
2. 論文標題 A parsimonious laboratory system for the evaluation of rat reaching task: recovery from the massive destruction of motor area.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Integr. Neuroscience	6. 最初と最後の頁 955-965
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31083/j.jin2004096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Y. Ohno, A. Horikoshi, K. Imamura	4. 巻 -
2. 論文標題 Reaching task in rats: Quantitative evaluation and effects of 6-OHDA into the striatum.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Motor Behavior	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00222895.2022.2061410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 手島俊祐、今村一之
2. 発表標題 新規的な漫然運転防止システムの開発
3. 学会等名 日本福祉工学会 第24回学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柿崎 利和 (Kakizaki Toshikazu) (50375531)	群馬大学・大学院医学系研究科・助教 (12301)	
研究分担者	柳川 右千夫 (Yanagawa Uchio) (90202366)	群馬大学・大学院医学系研究科・客員教授 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------