

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791009

研究課題名(和文)

大脳新皮質形成期における脳室下帯特異的発現遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)

Developmental roles of the subventricular zone-specific gene in the mammalian brain.

研究代表者

荒巻 道彦 (ARAMAKI MICHIIHIKO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：20338099

研究成果の概要(和文)：

げっ歯類以降の哺乳類の大脳皮質は6層構造から成り、各層を構成する神経細胞は密に連絡してネットワークを形成している。特にヒトにおいては、極めて複雑な神経細胞間の線維連絡を発達させたことで高次脳機能を獲得したと考えられている。発生期に認められる脳室下帯には膨大な数の神経細胞を産生するための前駆細胞が認められる。本研究ではマウスとヒトの脳室下帯に認められる遺伝子の発現量が異なる可能性を示し、その遺伝子発現制御のメカニズムについて検討した。

研究成果の概要(英文)：

Mammalian cerebral cortex consists of six layers. Neurons in each layer communicate with each other and develop the complex networks. Highly sophisticated neuronal networks are considered to be origins of higher-order brain function in humans. Mammalian subventricular zone (SVZ) includes progenitor cells which generate massive amount of neurons during the brain development. In this study, we examined the expression level of SVZ-specific gene in human and mouse brain and proposed the microRNA-mediated regulatory mechanism of SVZ-specific gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの大脳新皮質形成期には、先に誕生した神経細胞を後から生まれた細胞が追い抜くこと (inside-out pattern) で6層構造が形成される。大脳新皮質形成期に脳室下帯で誕生した細胞は、法線方向に脳室下帯まで移動する。脳室下帯を構成する神経細胞は極めて特徴的な形態を呈し、多極性細胞と呼ばれる。そして脳室下帯で約 24 時間滞留した後に、多極性細胞から双極性細胞へと形態を変化させ、脳表面へ向かって移動を再開する。移

動の再開と同時期に細胞体から神経線維の伸長を開始する。神経細胞は、神経線維を介して他の神経細胞と密に連絡し、複雑なネットワークを形成するようになる。ヒトは、大脳皮質の6層構造とそれに伴う複雑な神経細胞間の線維連絡を発達させたことで高次機能を獲得したと考えられている。大脳皮質の6層構造はげっ歯類以降の哺乳類で獲得された特異的な構造で、2層から4層の発達が高次の脳機能に極めて重要な役割を果たしていると考えられている。最近の研究成果によ

ると、脳室下帯を構成する神経細胞の多くは、大脳皮質へ移動した後に2層から4層を構成すると考えられている。また、脳室下帯に含まれる神経細胞の一部は分裂能を持つことも報告されている。すなわち、脳室下帯を構成する神経細胞は、その一部が分裂能を持ち、最終的にヒトの高次脳機能を担う大脳皮質の2層から4層を構成する神経細胞となる。前述の如く大脳皮質は、ヒトに至る進化の過程で神経細胞数を増加させ(6層構造の獲得)、神経細胞間の複雑な神経線維連絡を発達させた。脳室下帯は神経細胞が神経線維を伸長し始める時期に相当すること、脳室下帯を構成する神経細胞が大脳皮質の2層から4層を形成することから、脳室下帯における神経細胞の役割を解明することで、進化のメカニズムの一端を明らかにすることが出来るのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

我々は、既に脳室下帯に特異的に発現する遺伝子を多数同定している。これらの遺伝子は、脳室下帯のみに発現し、大脳皮質の他の領域には発現していないことから、脳室下帯における神経細胞の機能に重要な役割を果たしているものと考えられる。本研究では、脳室下帯特異的発現遺伝子の1つである、UNC-5 homolog D (Unc5D) 遺伝子に注目し、その機能解析を行うことを目的とした。Unc5D 遺伝子は、線虫からヒトに至るまで多くの生物種で認められ、ヒトでは8番染色体短腕(8p12)に位置している。ヒトとマウスは同じ哺乳類に属し、6層構造の大脳皮質を持つ。しかし、高次脳機能を担うといわれるヒトの大脳皮質の2層から4層は、マウスの2層から4層と比べると高度に発達している(Molnar et al, Eur J Neurosci. 23(4):921-34.)。チンパンジーからヒトに進化する過程でUnc5D 遺伝子が何らかの有利な機能を獲得したとすれば、Unc5D 遺伝子の機能はマウスとヒトの間でも異なるはずである。そこで、申請者は、マウスの大脳皮質を用いてUnc5D 遺伝子の機能解析を行い、進化のメカニズムの一端を明らかにしたいと考えた。

## 3. 研究の方法

### (1)Unc5D 遺伝子の発現検討

まず、発生期のマウス大脳におけるUNC5Dの発現パターンを経時的に免疫組織化学染色法を用いて検討した。胎生13.5日、15.5日、18.5日のマウス胎仔を用いて新鮮凍結切片を作製した。作製した新鮮凍結切片を用いて、UNC5D 遺伝子の免疫染色を行なった。以前の報告からUNC5D 遺伝子の発現量は極めて微量であることから、検出方法としてTSA 免疫組織化学染色増感システムを用いた。同様に、ヒトのUNC5D 遺伝子の発現パターン

についても胎生20週の新鮮凍結切片を用いて検討した。マウスで使用した抗UNC5D抗体は、ヒトのUNC5D 蛋白を抗原として使用して作製されたものである。ヒトにおいてもマウスと同様にUNC5D 遺伝子の発現量は極めて微量であることが予想されたことから、検出方法としてTSA 免疫組織化学染色増感システムを用いた。

### (2)Unc5D 遺伝子の3' UTRの同定

ヒトおよびマウスのUnc5D 遺伝子の3' Untranslated region(UTR)領域を同定した。種々の公共のデータベースに登録されている配列からマウスUnc5D 遺伝子の3' UTRの長さを同定し、それを基にNorthern blot解析を行った。マウス胎生16日目のdorsal cortex からtotal mRNA およびpoly(A)+RNAを抽出した。なお、ヒトのサンプルが入手できなかったことからヒトのUnc5D 遺伝子の3' UTR 領域についてはデータベースに登録されている情報を用いて以降の解析を行った。

### (3)定量PCR法によるUnc5D 遺伝子の発現検討

ヒトおよびマウスのUnc5D 遺伝子の発現量は極めて微量である。そこで両者の発現量の違いを定量するために定量PCR法を用いて解析を行った。使用したサンプルは、マウス胎生13.5日目、15.5日目、18.5日目とヒトの胎生19週目、20週目、21週目、22週目とした。ヒトとマウスの遺伝子の発現量を比較するために内部コントロールとして2種類の遺伝子を用いた。1つ目の内部コントロールは定量PCRで広く使用されている $\beta$ -actinとした。 $\beta$ -actinに加えてSVZ特異的に発現する遺伝子を2つめのコントロールとする必要があることから、ヒトにおいてもマウスにおいてもSVZに発現していることが確認されているNeuroD 遺伝子を内部コントロールとして用いた。以上の2つの内部コントロール遺伝子を用いて、ヒトおよびマウスのUnc5D 遺伝子の発現量を定量し、以下の式で数値化した。

$$\text{Unc5D}/(\text{NeuroD}/\beta\text{-actin})$$

また、内部コントロール遺伝子の発現量に依存しない方法として、実際のコピー数を計算し、ヒトとマウスの発現量の比較を行った。

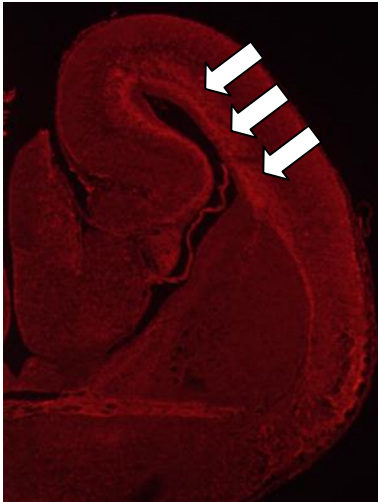
### (4)Unc5D 3' UTRに結合することが予想されるmicroRNAの同定

遺伝子の3' UTR領域には様々な情報が含まれていると考えられており、特に遺伝子発現に関する情報は非常に重要な役割を担っていると考えられる。microRNAは主に遺伝子の発現に関わる短いRNAで、遺伝子の3' UTR領域に結合して作用することが知られている。そこでinformaticsの手法を用いてUnc5D 遺伝子の3' UTRに結合しうるmicroRNAを同定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Unc5D 遺伝子の発現検討

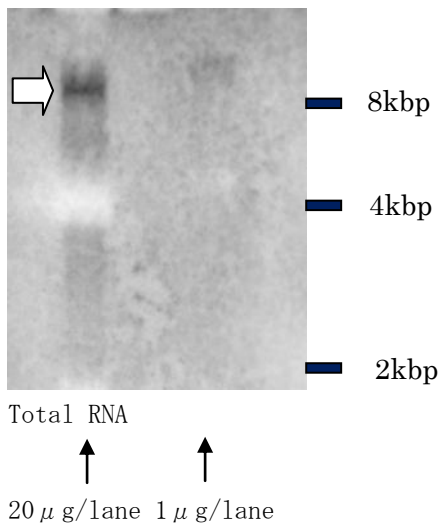
抗 Unc5D 抗体を用いた免疫染色の結果を示す。マウスの E13.5、E15.5、E18.5 のいずれの発生段階においても Unc5D は SVZ に発現していることが確認された。また、ヒトにおいても Unc5D の発現が認められた。



マウス胎生 18.5 日目

##### (2) Unc5D 遺伝子の 3' UTR の同定

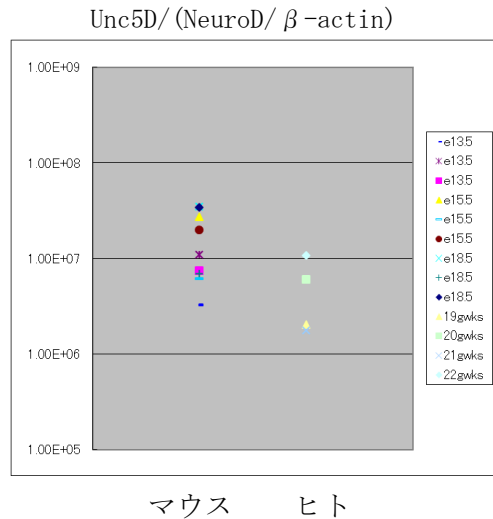
マウスの Northern blot 解析の結果を示す。NCBI などの公共のデータベースから得られたマウス Unc5D の 3' UTR の長さは 6049bp であった。今回 Northern blotting によって推測される 3' UTR の長さもおおよそ 6kbp であることから、マウス Unc5D の 3' UTR の長さはデータベースに記載されている 6049bp であると判断した。



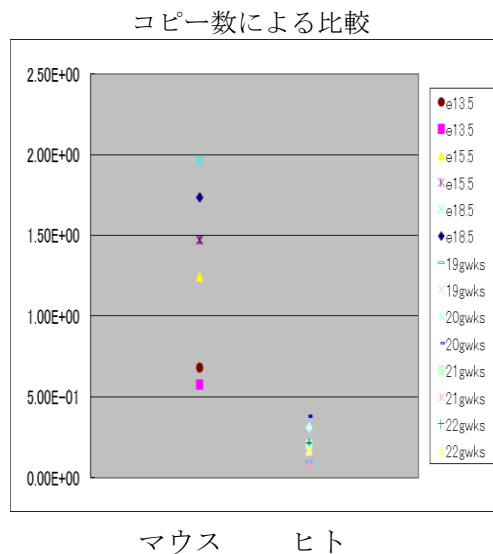
なお、ヒトの Unc5D の 3' UTR の長さについてはデータベースの情報から 4100bp であると考えて検討を進めた。

##### (3) 定量 PCR 法による Unc5D 遺伝子の発現検討

ヒトおよびマウスの Unc5D 遺伝子の発現量の比較を示す。



次に、コピー数を計算して比較したグラフを示す。



以上の結果から、マウスおよびヒトの Unc5D の発現量には違いが認められ、ヒトにおいてはマウスと比べて Unc5D の発現量が低い傾向が認められた。

##### (4) Unc5D 3' UTR に作用しうる microRNA の同定

northern blot 解析法および公共のデータベースから同定した 3' UTR の配列を基に、informatics の手法を用いてヒトおよびマウ

スの Unc5D の 3' UTR に結合することが予想される microRNA を同定した。候補となる 3' UTR の領域に結合する microRNA を他の哺乳類の microRNA の有無とともに表に示した。

Human miRNA	Chimpanzee homolog miRNA	Mouse homolog miRNA	Rat homolog miRNA
hsa-miR-330-3p	-	mmu-miR-331-5p	rno-miR-331
hsa-miR-130b	ptr-miR-297	mmu-miR-297a	rno-miR-297
hsa-miR-510	-	-	-
hsa-miR-1183	ptr-miR-1183	-	-
hsa-miR-193a-3p	-	-	-
hsa-miR-639	-	-	-
hsa-miR-662	-	-	-
hsa-miR-581	ptr-miR-581	-	-
hsa-miR-140-5p	ptr-miR-139	mmu-miR-140	rno-miR-139-5p
hsa-miR-200c	ptr-miR-320b	mmu-miR-33	rno-miR-196b
hsa-miR-146b-3p	ptr-miR-147b	(ptr-miR-669b) may be typo?	part of rno-miR-551b
hsa-miR-320	ptr-miR-320c	-	-
hsa-miR-1184	ptr-miR-1184	-	-
hsa-miR-636	ptr-miR-637	-	-
hsa-miR-490-3p	-	-	-
hsa-miR-126	ptr-miR-126	mmu-miR-125b-5p	rno-miR-125b-5p
hsa-miR-587	part of ptr-miR-587	-	-
hsa-miR-361-3p	-	mmu-miR-362-5p	rno-miR-215

hsa-miR-301b	ptr-miR-765	mmu-miR-674	rno-miR-770
hsa-miR-34b	ptr-miR-220b	-	-
hsa-miR-148a	ptr-miR-1292	mmu-miR-181a	rno-miR-20a
hsa-miR-744	ptr-miR-191	mmu-miR-874	-
hsa-miR-220a	ptr-miR-219-2-3p	-	-
hsa-miR-766	-	-	-
hsa-miR-423-5p	ptr-miR-423	-	-
hsa-miR-494	ptr-miR-495	mmu-miR-376c	-
hsa-miR-659	-	-	-
hsa-miR-193-5p	ptr-miR-21	mmu-miR-191	rno-miR-191
hsa-miR-548l	ptr-miR-1302	-	-
hsa-miR-188-5p	part of ptr-miR-188	mmu-miR-187	rno-miR-187
hsa-miR-136	ptr-miR-135b	mmu-miR-135a	rno-miR-135a
hsa-miR-424	ptr-miR-424	mmu-miR-679	rno-miR-425
hsa-miR-885-5p	ptr-miR-758	mmu-miR-374	-
hsa-miR-129-3p	ptr-miR-136	mmu-miR-128	rno-miR-128
hsa-miR-1233	-	-	-
hsa-miR-940	ptr-miR-940	-	-
hsa-miR-1276	ptr-miR-1276	-	-
hsa-miR-199a-5p	-	-	-
hsa-miR-1262	-	-	-
hsa-miR-1304	ptr-miR-1306	-	-

今後、これらの microRNA が実際に Unc5D の発現量に影響を与えるか否かを検討し、同定された microRNA を介した発現調節機構が進化的に持つ意味についてさらに研究を発展させていく計画である。

## 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)  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒巻 道彦 (ARAMAKI MICHHIKO)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教  
研究者番号：20338099