

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700352

研究課題名(和文) 特異的プロモータを用いた大脳皮質長連合線維の解析

研究課題名(英文) Analysis on the long association fibers in the cerebral cortex using a specific promoter

研究代表者

岡 雄一郎 (Oka, Yuichiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30614432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大脳皮質の領野間回路の構造と形成機構を明らかにすることを目的として、この回路を構成する長連合ニューロン特異的な遺伝子を同定し、そのプロモータを利用して長連合ニューロンとその軸索を可視化した。まず、マイクロアレイ解析などにより長連合ニューロンに発現する遺伝子を得た。次にこれらの遺伝子のプロモータ制御下に蛍光レポーターを発現するプラスミドベクターを作製してマウス胎児の大脳皮質に導入し、生後に脳組織を摘出して長連合ニューロンとその軸索が標識できることを確認した。現在、軸索伸長過程の経時的観察を行っている。また、解析の効率化のため、SeeDB法を用いた大脳皮質透明化プロトコルを確立した。

研究成果の概要(英文)： In this study, we identified the genes specifically expressed in the long association neurons connecting distant cortical areas in order to examine the detailed axon projection patterns and developmental processes of the circuit. First, we identified the genes expressed in the long association neurons by microarray analysis comparing gene expression profiles of the long association neurons and the callosal neurons, followed by double staining analysis combining retrograde tracing and in situ hybridization. We then used the promoters of these genes to drive the expression of the fluorescent reporter. We visualized the long association neurons and their axons by introducing the reporter constructs into the embryonic cortex and are currently analyzing the development of the neural circuit by examining the axonal patterns at different stages. For efficient observation and analysis, we also set up the tissue clearing procedure for the cortex using SeeDB method.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学

キーワード：神経回路網 分子神経生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) 大脳新皮質の異なる頭葉を結ぶ長連合線維

大脳新皮質は特定の情報を処理する多くの領野に分かれており、それらは連合線維と呼ばれる皮質間結合によって接続されている。長連合線維は其中でも異なる頭葉に存在する離れた領野を結ぶ神経連絡で、各領野で処理した情報を統合する高次の情報処理に関わっていると考えられている。また、近年では、自閉症と長連合線維異常の関連を示す報告もなされてきている(Jou et al., 2011 Am J Neuroradiol など)。長連合線維を構成する神経細胞(長連合ニューロン)は、大脳新皮質6層構造のII/III層およびV層に存在する。II/III層では左右の大脳半球を結ぶ交連線維を構成する交連ニューロンと長連合ニューロンが混在し、V層にはこれらに加えて皮質下に接続する投射ニューロンも混在している。霊長類では長連合ニューロンは主にII/III層に存在するとされているが、マウスにおいてはV層の方が多くの長連合ニューロンを含んでいるとの報告があり(Mao et al., 2011 Neuron)、我々も逆行性トレーサー分子の注入実験によって同様の観察を得ていた。ヒトでは大脳皮質全域における長連合線維の走行が記述されているが、マウスにおいてはその全容が十分に記述されていない。また、いずれの生物種においても、個々の長連合ニューロンがどの領野に、どのように軸索を伸ばし、標的領域においてどのような接続様式を示しているかという細胞レベルでの知見はほとんどない状況であった。また、長連合線維は投射線維や交連線維と比べるとその形成時期が遅い(Mitchell & Macklis, 2005 J Comp Neurol)が、その形成の詳細な分子機構についての知見はほとんどない。

(2) 長連合ニューロン特異的プロモータの同定

長連合ニューロンは同じ層内で他の細胞種と混在しており、同じタイミングで誕生した神経細胞に外来性遺伝子を導入できる子宮内電気穿孔法を用いても、選択的に標識するのは困難である。そこで、長連合ニューロンに特異的なプロモータを用いて必要な遺伝子を発現させる戦略が必須となる。研究代表者は平成23年度の科学研究費(研究活動スタート支援)に採択された研究課題「大脳皮質長連合線維の回路構造と形成機構の解析」において、予備実験として子宮内電気穿孔法によりマウス大脳皮質のII/III層の細胞を蛍光タンパク質tdTomatoで標識し、長連合ニューロンの軸索は生後21日目には投射先でよく分枝していることを見出した。そこで、この時期に大脳皮質の様々な領野に逆行性トレーサーを注入して長連合ニューロンを可視化し、これらの細胞をレーザーマイクロダイセクション(LMD)によって回収して

total RNAを調製し、DNAマイクロアレイ解析を開始した。

2. 研究の目的

長連合ニューロンを選択的に標識して、長連合線維の細胞レベルでの回路構造(長連合ニューロンの軸索投射パターンとその接続様式)とその分子レベルでの形成機構を明らかにすることを目的とし、また将来的な長連合回路の機能解析のための実験系を確立する。

3. 研究の方法

(1) 長連合ニューロンの選択的な標識に必要な長連合ニューロン特異的プロモータの同定

逆行性トレーシングで標識した長連合ニューロンと交連ニューロンの遺伝子発現をDNAマイクロアレイ解析で比較して候補遺伝子を同定し、それらの遺伝子のプロモータ制御下に蛍光レポーターEGFPを発現するDNAコンストラクトをマウス胎児の側脳室に子宮内電気穿孔法により導入して、適切な細胞と軸索が標識されているかどうかで評価した。

マイクロアレイによるスクリーニングを補完するアプローチとして、既知の層特異的遺伝子の中に長連合ニューロンに発現する遺伝子がないか、in situ ハイブリダイゼーションとFluoroGoldによる逆行性トレーシングを組み合わせた2重染色によりスクリーニングを行った。

(2) 長連合ニューロンの軸索伸長過程の観察は、(1)で得られたコンストラクトを用いて、子宮内電気穿孔法による導入後、継時的にサンプリングしてEGFPにより蛍光標識された軸索の走行パターンを観察・解析した。

(3) 長連合ニューロンが接続した後シナプスニューロンを解析するために、(1)で得られたプロモータを用いて経シナプストレーサーであるWGAを発現させるコンストラクトを作製した。

4. 研究成果

(1) 長連合ニューロン特異的プロモータの同定

蛍光マイクロスフェアを用いた逆行性トレーシングにより1次体性感覚野の長連合ニューロンと交連ニューロンを標識し、各層からレーザーマイクロダイセクションによって標識された細胞を1000個程度ずつ集め、各細胞集団の遺伝子発現プロファイルをDNAマイクロアレイ解析で比較した。たんぱく質をコードする遺伝子の中で長連合ニューロンに高い発現を示す約50種類の候補遺伝子に関して大脳皮質での発現パターンをin situ ハイブリダイゼーションを行い、10種類以上に関して層特異的な発現を確認した。さらに、逆行性トレーシングとin situハイ

ブリダイゼーションを組み合わせた2重染色による絞り込みを行い、5種類の遺伝子に関して長連合ニューロンでの発現を確認した。

既知の層特異的な遺伝子に関して、逆行性トレーサーFluoroGoldを注入したマウスの脳組織に対するin situハイブリダイゼーションを行った。その結果、長連合ニューロンに発現する遺伝子が1種類同定できた。

上記とで得られた候補遺伝子の遺伝子座を含むBACクローンを入手し、これらの遺伝子の翻訳開始点にEGFPあるいはCreを導入したコンストラクトを大腸菌内の相同組み換えを用いて作製した。これらのDNAコンストラクトをマウス胎児の側脳室に子宮内電気穿孔法により導入して、長連合ニューロンとその軸索を蛍光標識できるものを少なくとも1種類得た。

(2)(1)のコンストラクトを胎生15日目に子宮内電気穿孔法で導入し、経時的に脳組織をサンプリングして標識された軸索の走行パターン解析を開始した。その過程で、個々のニューロンの軸索の全体像を効率よく把握するために、脳組織の透明化と大脳皮質全体のイメージングを行う必要があったので、最近報告されたCLARITYとSeeDBの2種類の方法で透明化の条件を検討した。どちらの方法でもイメージングに用いるのに十分に透明化することができた。CLARITYは高い透明度の方で時間とコストを要するのに対し、SeeDBはCLARITYほどの透明度はないが大脳皮質のイメージングには十分な透明度は得られ、かつ、簡便で安価である。したがって、SeeDBによる透明化で観察を行うこととした。

(3)(1)で得られたプロモータの制御下にWGAを発現するコンストラクトを作製した。具体的にはCre/loxPシステムを利用した2つのプラスミドを、子宮内電気穿孔法で同時に大脳皮質に導入し、長連合ニューロンでWGAが発現するようにした。

今後は引き続き長連合ニューロンの軸索伸長過程の経時変化の観察を行うとともに、WGAに対する免疫組織染色を行って長連合線維の回路構造を明らかにし、さらに今回同定した特異的なプロモータを利用して長連合ニューロンの欠失や神経活動調節を行う系を構築して、長連合回路の機能解析へと進めていく予定である。

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)

[雑誌論文](計 4件)

Xie MJ, Yagi H, Kuroda K, Wang CC, Komada, M, Zhao H, Sakakibara A, Miyata T, Nagata K, Oka Y, Iguchi T, Sato M.
WAVE2-Abi2 complex controls growth cone

activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration.

Cereb. Cortex 2013; 23(6): 1410-23.

doi: 10.1093/cercor/bhs123. (査読あり)

Ahuja G, Ivandic I, Saltürk M, Oka Y, Nadler W, Korsching SI.

Zebrafish crypt neurons project to a single, identified mediodorsal glomerulus.

Sci Rep. 2013;3:2063.

doi: 10.1038/srep02063. (査読あり)

Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, Hirotsune S.

Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly.

Sci Rep. 2013;3:1224

doi: 10.1038/srep01224. (査読あり)

Ahuja G, Nia SB, Zapilko V, Shiriagin V, Kowatschew D, Oka Y, Korsching SI.

Kappe neurons, a novel population of olfactory sensory neurons.

Sci Rep. 2014 Feb 10;4:4037.

doi: 10.1038/srep04037. (査読あり)

[学会発表](計 8件)

岡雄一郎 他, マウス大脳皮質長連合ニューロン特異的な遺伝子の同定. (嗅覚情報処理の神経基盤 - 匂い分子から嗅覚神経回路、行動・情動まで - 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク支援ワークショップ、ポスター、平成24年9月15日、東京大学、ポスター発表)

岡雄一郎 他, マウス大脳皮質長連合ニューロン特異的な遺伝子の同定 (第35回日本神経科学大会、平成24年9月19日、名古屋国際会議場、ポスター発表)

Oka Y., et al. Identification of long association neuron-specific genes in the mouse cerebral cortex. (Symposium on sensory systems & neural circuits、平成25年2月11日、東京大学、ポスター発表)

岡雄一郎 他, マウス大脳皮質長連合ニューロン軸索の可視化の試み (第118回日本解剖学会総会・全国学術総会、平成25年3月30日、かがわ国際会議場、ポスター発表)

Oka Y., et al. マウス大脳皮質長連合ニューロンの選択的標識. (Neuro2013、平成25年6月21日、京都国際会館、ポスター発表)

Oka Y, et al. Visualizing long association neurons in the mouse cerebral cortex. (包

括脳ネットワーク夏のワークショップ、平成 25 年 8 月 31 日、名古屋国際会議場、ポスター発表)

岡雄一郎、マウス大脳皮質長連合ニューロンの軸索投射の可視化(第 89 回日本解剖学会近畿支部学術集会、平成 25 年 11 月 30 日、奈良先端科学技術大学院大学、口頭発表)

岡雄一郎、大脳皮質長連合ニューロンの軸索伸長過程の解析(第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会(シンポジウム「大脳皮質を起点とした神経回路形成」、平成 26 年 3 月 27 日、自治医科大学、オーガナイザー・口頭発表)

〔図書〕(計 2 件)

岡雄一郎、佐藤真 脳科学辞典「皮質板」、「蓋板」 <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/皮質板>、<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/蓋板>、平成 25 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.anat2.med.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 雄一郎 (OKA, Yuichiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：3 0 6 1 4 4 3 2