

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640016

研究課題名(和文) マーモセット視覚野光誘導系を用いた活動依存的遺伝子発現調節因子の同定法の開発

研究課題名(英文) Developing the system to identify the regulatory genes in the primary visual cortex using a light inducible IEG expressions in marmosets

研究代表者

山森 哲雄 (Yamamori, Tetsuo)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：80260206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、マカカザルの大脳皮質の大脳皮質に顕著に発現する遺伝子は、視覚野に選択的に高く発現する遺伝子と連合野に選択的に高く発現される2群の遺伝子に分類できることを示し、領野特異的と活動依存性の2つのパラメーターは、それぞれの種において、異なることを見出した。本研究により、マカカ領野特異的発現遺伝子のメチル化解析から、視覚野特異的発現遺伝子の非メチル化CpG領域の特定の配列が活動的遺伝子発現を制御していることをみいだした。更に、マーモセット視覚野に於ける光誘導系の確立により、げっ歯類の活動依存的発現制御とは異なるマーモセット視覚野における新しい発現制御様式の解析系を確立した。

研究成果の概要(英文)：We previously identified two groups of genes highly expressed in the primate neocortex: One group of the genes are high the primary visual cortex (V1) and the other group of the genes are high in association areas. The comparative analysis among several representative primate species indicate the area-selective expression and activity dependent expression can be separated each other. In this study, we wanted to identify the molecular mechanisms responsible such a segregation. We found that the promoter region of association area selective genes are highly methylated while the methylation of the V-selective genes are low. We then proved that MBD4 positively controls the high expression of association area selective genes. To understand the molecular mechanisms that control the activity dependent expression of V1-selective genes a light inducible gene expression system in marmoset V1 using immediate early genes and confirm the existence of the ocular dominance column in the marmoset V1.

研究分野：分子脳科学

キーワード：大脳新皮質 視覚野 連合野 メチル化 MBD4 IEG 眼優位性カラム

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、マカカザルの大脳皮質の領野特異的発現遺伝子の網羅的探索とこれらの遺伝子発現の詳細な解析から、霊長類の大脳皮質に顕著に発現する遺伝子は、視覚野に選択的に高く発現する遺伝子と連合野に選択的に高く発現される2群の遺伝子に分類できることを示した (Yamamori, T., Progress Neurobiol., 2012)。

この知見をもとにこの研究開始当初までに、以下の3つのラインの研究を行ってきた。

(1) 申請代表者がマカカザルで見出した霊長類大脳皮質領野特異的発現遺伝子の霊長類における系統的発現解析から、原猿、新世界ザル、旧世界ザルにおけるこれらの遺伝子発現パターンを比較検討した。その結果、領野特異的と活動依存性の2つのパラメータは、それぞれの種において、異なることを見出した (Takahata et al., Cereb. Cortex, 2011)。

(2) マカカ領野特異的発現遺伝子のメチル化解析から、視覚野特異的発現遺伝子の非メチル化 CpG 領域の特定の配列が活動的遺伝子発現を制御していることをみいだした (詳細は研究成果の欄に記述)。

(3) マーモセット視覚野に於ける光誘導系の確立により、げっ歯類の活動依存的発現制御とは異なるマーモセット視覚野における新しい発現制御様式を明らかにした。

これらの研究を踏まえて、本研究提案では、マーモセットにおける活動依存的遺伝子発現を制御する分子機構の解析を目指した。

2. 研究の目的

本研究計画では、上述のような研究背景に基づき、以下の研究達成目標を掲げて研究を行った。

(1) 視覚野と連合野の領野特異的発現を制御している分子機構(メチル化とメチル化による発現制御)の解明

(2) マーモセットを用いた、視覚野における遺伝子発現誘導機構の解明。

3. 研究の方法

上記の研究目標を達成するため、以下の方法を用いて研究を行った。

(1) 視覚野と連合野特異的に発現する遺伝子の発現制御機構を解明するため、視覚野と連合野特異的に発現する遺伝子の発現制御のメチル化とメチル結合蛋白質による制御機構の解明。

(2) 霊長類視覚野での遺伝子発現制御機構を解明するため、マーモセット一次視覚野に於ける活依存的遺伝子発現により同定した眼優位性カラムを指標に、霊長類一次視覚野における活動依存的遺伝子発現機構の制御様式を分子レベルから解明する。

(3) 上記目的のため、AAV ベクターを用いた遺伝子導入システムの開発を行う。

4. 研究成果

上記の研究方法に即して以下の研究結果を得た。

(1) 視覚野と連合野特異的発現遺伝子の発現制御機構を解明するため、連合野特異的発現遺伝子

(PNMA5, RBP4, SLIT1) と視覚野特異的発現遺伝子 (5HTR1B, 5HTR2A, FSTL1/OCC1) のプロモーターの CpG 領域のメチル化レベルを調べた。その結果、連合野特異的発現3遺伝子の CpG 領域のメチル化レベルは高く、視覚野特異的発現3遺伝子のメチル化レベルは、いずれも低かった(図1、Hata et al., J. Neurosci., 33, 19704-19714, 2013 に公表)。しかし、メチル化レベルは、遺伝子毎に決まっており、視覚野と連合野間で差はなかった。

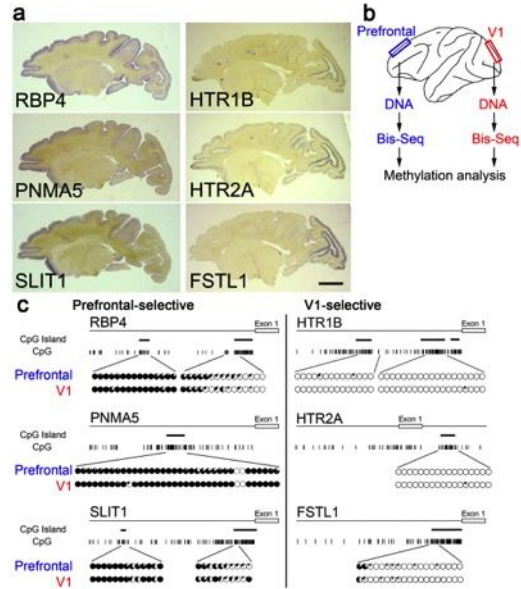


図 1

もし、メチル化レベルが連合野特異的発現遺伝子と視覚野特異的発現遺伝子の発現レベルを決定しているとすれば、これは、どのように説明できるだろうか? 一つの可能性は、メチル化領域を認識するメチル化結合蛋白質の霊長類大脳皮質に於ける発現分布を調べた。その結果、MBD 4 のみが領域間の発現差があり、連合野で選択的に高かった。そこで、培養ヒト神経芽細胞と成熟個体に於ける MBP4 の機能を LoF (loss of function) と GoF (Gain of function) を AAV ベクターを用いて調べた (図 2、Hata et al., J. Neurosci., 33, 19704-19714, 2013 に公表)。

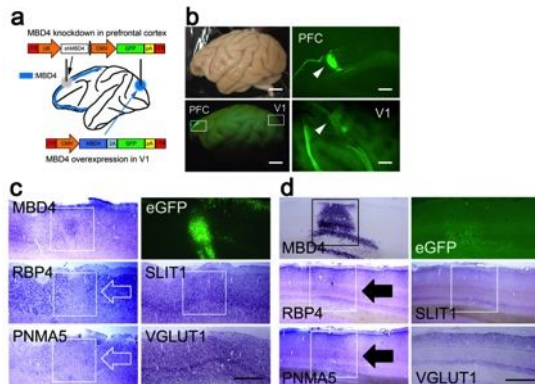


図 2

その結果、MBP 4 の発現が高い連合野では、LoF では、PNMA5 と RBP4 の発現が低下し、発現が低い

視覚野では、GoF で発現が増加することを証明することができた。

これらの結果について以下のように考察している。

連合野では、発生のおそらく初期の段階から連合野で発現している遺伝子については、既にプロモーター部の CpG 領域は、高度にメチル化している。これは、連合野だけではなく、視覚野でも同様である。しかし、メチル結合蛋白質の一つである MBD4 遺伝子は、連合野で高く、視覚野で低く発現しているため、MBD4 は、事実上は、連合野のみ連合野特異的遺伝子 (RBP4 や PNMA5) と結合し、視覚野では他の MBD 蛋白 (例えば、MeCP2) のメチル化領域での結合と競合し、MBD4 は殆ど結合できない。その結果、MBD4 を介した PNMA5 と RBP4 の転写促進は、連合野のみで見られる (図3)

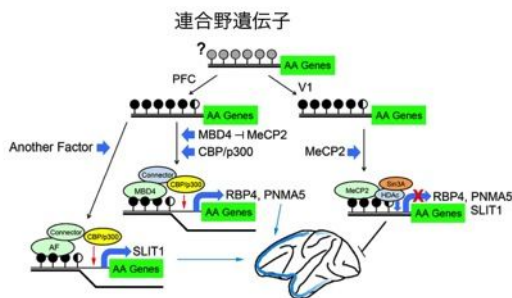


図3

一方、視覚野特異的発現遺伝子は、連合野、視覚野のいずれにおいてもメチル化は殆どみられない (図4) この非メチル化が発生の何れの段階から見られるのかは、現在検討している。

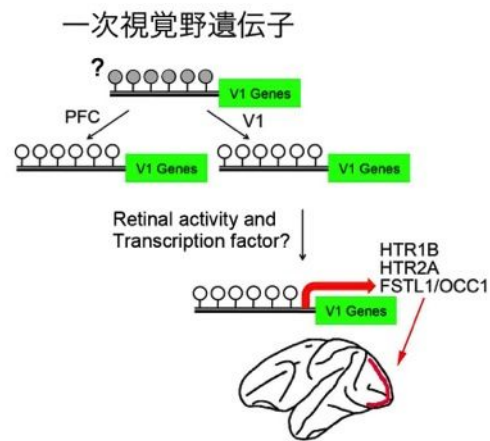


図4

これらの、非メチル化領域の転写制御機構を明らかにするために以下の実験系を立ち上げた。

(2) 霊長類一次視覚野に於ける活動依存的遺伝子発現制御機構を解明するために、マーモセットの一次視覚野に於ける最初期遺伝子の発現を調べた。そのため、Markstahler 等 (J Comp Neurol. 393:118-34, 1998) によって、開発された TTX を片眼に注入、暗闇に 24-48 時間おいた後、光照射によって一次視覚野に誘導される最初期を in situ hybridization 法によって検出すること

によって、成熟マーモセットに於ける眼優位性カラムの存在の確証を得た (図5、Nakagami Y., et al., Front. Neural Circuits 7,43, 2013)。我々

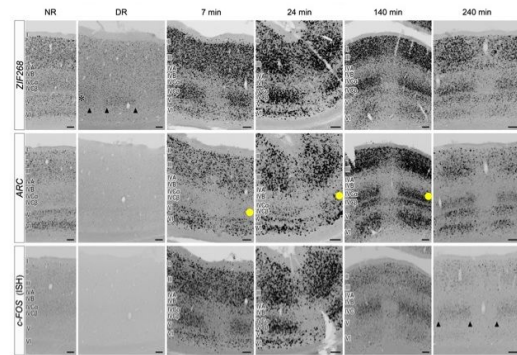


図5

は、以下の AAV ベクターを用いた遺伝子操作系を霊長類適用可能な形に開発し、それを用いて、眼優位性カラムを指標にマーモセット視覚野における活動依存的な発現制御機構を解析できる系を開発した。

(3) 大脳皮質領野特異的発現遺伝子の機能を解析するためには、霊長類に適用可能な遺伝子操作法を確立しなければならない。その為、ウイルスベクター法を用いた遺伝子操作法確立を目指し、AAV ベクターの異なる血清型 (1,2,5,8,9) による感染性の違いをマウス、マーモセット、マカカの大脳皮質で比較した (Watakabe, A., et al., 93, 144-157, 2014)。また、逆行性ベクターと二重感染法を用いた大脳皮質と皮質下結合解析へ適用した (Watakabe et al., Front Neural Circuits 8, 110, 2014)。

### 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6件)

#### 1. ウイルスベクターを用いた霊長類大脳皮質遺伝子導入システムの開発

Watakabe A, Ohtsuka M, Kinoshita M, Takaji M, Isa K, Mizukami H, Ozawa K, Isa T, Yamamori T. Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. *Neurosci Res* 93, 144-157 (2014). (査読有)

#### 2. 大脳皮質領野特異的発現遺伝子のメチル化

とメチル化結合蛋白質 MBD4 による発現制御  
Hata K, Mizukami H, Sadakane O, Watakabe A, Ohtsuka M, Takaji M,

Kinoshita M, Isa T, Ozawa K, Yamamori T.  
DNA methylation and methyl-binding  
proteins control differential gene expression  
in distinct cortical areas of macaque monkey.  
J Neurosci 33, 19704-19714 (2013). (査読有)

<<http://www.brain.riken.jp/jp/faculty/details/83>>

<<http://www.nibb.ac.jp/~divspe1/>>

3、活動依存的遺伝子発現を用いたマーモセット視覚野に於ける眼優位性カラムの存在の確証

Nakagami Y, Watakabe A, Yamamori T.  
Monocular inhibition reveals temporal and  
spatial changes in gene expression in the  
primary visual cortex of marmoset. Front  
Neural Circuits 7, 43 (2013). (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

山森哲雄 ウイルスベクターを用いたマーモ  
セット脳での遺伝子操作技術 第4回日本マ  
ーモセット研究会 2015.1.23 犬山国際観光  
センター「フロイデ」(愛知県犬山市)

Watakabe A, Takaji M, Kato S, Kobayashi K,  
Mizukami H, Ozawa K, Ohsawa S, Matsui R,  
Watanabe D, Yamamori T. Corticothalamic and  
corticocortical cells in mouse M1 exhibit  
layer- and area-specific elaboration  
of axon collaterals. 2014.11.17 (2014 Annual  
Meeting of Society for Neuroscience, Washington  
DC, U.S.A.)

仲神友貴、渡我部昭哉、竹森洋、山森哲雄 マ  
ーモセット一次視覚野における光刺激依存的  
な遺伝子発現調節機構の解析

第37回日本神経科学学会大会 2014.9.13 パシフ  
ィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計1件)

Chapter 13 Genes Selectively Expressed in the  
Visual Cortex of the Old World Monkey in  
「Cortical Development: Neural Diversity and  
Neocortical Organization」(Kageyama, R. and  
Yamamori T Eds) Springer (Tokyo, Heidelberg,  
New York, Dordrecht, London) 2013, 263-276

〔産業財産権〕

出願状況該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山森 哲雄 (Yamamori, Tetsuo)  
国立研究開発法人理化学研究所  
脳科学総合研究センター・チームリーダー  
研究者番号: 80260206

(2) 研究分担者

該当なし

7. [その他]

研究室ホームページ