

氏 名 小松 勇介

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 813 号

学位授与の日付 平成 16 年 9 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 霊長類の皮質領野間での遺伝子発現比較

論文審査委員	主査	教授	諸橋	憲一郎
		教授	上野	直人
		教授	野田	昌晴

論文内容の要旨

霊長類の脳皮質の領野は解剖学的、機能的に明瞭に区別され、脳機能発現における重要な構造単位となっている。一方、近年分子生物学により神経細胞の構造や活動機構などについて分子基盤が深まってきている。また、ゲノムシーケンスの解読と DNA アレイや遺伝子操作技術の向上により、よりシステマチックな分子生物学的研究が可能になってきた。彼は皮質機能を分子生物学的知見により理解を深めるため、領野特性に対する分子学的アプローチを試みた。まず Differential display 法により、領野間で発現差を示す遺伝子をスクリーニングした。比較は前頭葉の連合野 (FD Δ)、側頭葉の視覚連合野 (TE)、1次運動野 (FA)、1次体性感覚野 (PC)、1次視覚野 (OC) の5つの機能的、空間的に異なる領野でおこない、2種類の異なる発現パターンを示す分子をクローニングすることができた。Retinol-binding protein (RBP) は連合野である FD Δ 、TE で高く、FA で中程度、PC で低レベルの発現を示した。OC ではほとんど発現は観察されなかった。これに対し、parvalbumin (PV) は OC でもっとも高く次に PC、FA や TE では低く、FD Δ ではもっとも低かった。さらに RBP 発現の高い領野特異性を *in situ* hybridization で組織学的に解析した。RBP mRNA の発現は連合野では 2, 3, 5 層で高く、1次視覚野では明らかな発現は 2 層の最上部の薄い層に弱くみられただけであった。その他の感覚野でも 1次視覚野ほどではないが発現は低く、2 から 3 層の上部に限局し、5 層には弱いシグナルが観察されただけであった。また、視覚経路にそって RBP の 2 - 3 層における分布は段階的に 3 層深部へ向かって増加した。これらの層分布は 1次視覚野に特異的に発現する *occ1* の発現分布と相補的であった (Tochitani *et al.*, 2001)。さらに、*occ1* の発現が視床神経核からの投射に空間的に相関するのに対し、RBP 発現は視床神経投射の終末の分布とは逆相関を示し、RBP の発現分布は視床とはなく皮質内での結合に対応しているようであった。また、新生仔の発現パターンから RBP の領野差のある発現は生後発生の段階で完成することがわかった。さらに RBP のマウスやラットでの発現は、領野差はあるものの、サルとはまったく異なり、層状の発現は観察されなかった。これらの発現分布の様相は RBP が霊長類の連合野の構造基盤を明らかにするための分子的、進化的アプローチを可能にすることを示唆している。

さらに、RLCS (Restriction Landmark cDNA Scanning) 法により領野間の遺伝子発現の違いを比較した。この方法は cDNA を 2 本鎖まで合成し、2 回制限酵素で切断し、各切断ごとに電気泳動を行い 2 次元展開して一度に数百から 1000 個近い種類の遺伝子発現をスポット状のシグナルとして比較でき、Differential display 法に比べよりシステマチックである。RLCS 法により PC を除く 4 領野について、11 の制限酵素の組み合わせにより得られた 11 種類のスポットパターンから 22 個の遺伝子 (重複があり、26 個のスポット) が領野差のある発現を示すものとしてスクリーニングされた。これは皮質における遺伝子発現のごく少数 (<< 1%) が領野差のある発現を示すことが推測される。また領野差の再現性を確認するための RT-PCR の結果より得られた遺伝子発現プロファイルでは、FD Δ と OC とが相反することが示された。TE は FD Δ と類似するものの、異なるプロファイルであった。FA は OC や連合野のどちら

にも類似せず、独特な発現プロファイルを示した。このような機能領野に対応した遺伝子発現の違いは、領野間の機能とそれに関係する構造の異質性について、固有の分子制御機構が存在することを示唆している可能性が考えられる。

論文審査結果の要旨

大脳皮質は、霊長類において殊に発達し、領野と呼ばれる組織化学的・機能的に異なる単位からなる事が知られているが、その分子的な基礎に関しては未解決な問題が多く、各領野で、特異的に発現する分子マーカー等も殆ど知られていない。そこで、申請者は、Differential Display 法と RLCS (restriction landmark cDNA scanning) 法を用いて、前頭葉 (Bonin と Bailey, 1947 による FD Δ 野)、側頭葉視覚連合野(TE 野)、一次運動野(FA 野)、一次体性感覚野(PC 野)、一次視覚野(OC 野)の成熟マカカサルスの 5 領野間で異なる遺伝子発現を示すものを探索した。その結果、まず、Differential Display 法により、一次視覚野 (OC 野) に於いて少なく、連合野(FA Δ 野, TE 野)に発現量が多い遺伝子 RBP (Retinol-binding protein)を見い出した。In situ hybridization による詳細な解析の結果、RBP 遺伝子の発現が以下の特徴を示すことが明らかになった。1) 一次感覚野で少なく、高次感覚野と高次連合野が多い。2) 一次感覚野で発現量が多いことが知られている Parvalbumin や occ1 の発現している領域では発現が少なく、それらの発現との対比性を示す。3) 大脳皮質視覚野に於いては、一次視覚野では、2 層表層に発現するのみであるが、腹側高次視覚野へ移行するに従って、2 層から 3 層深部へとその発現が増加し、TE 野では、4 層を除く全層で発現が見られる。4) 高次連合野では、2、3、5 層で発現が強い。5) 大脳皮質の RBP 陽性細胞は、主に興奮性細胞である。6) 大脳皮質以外では、海馬、線状体、扁桃体に RBP の強い発現がみられた。7) RBP の発現は、生後直後では、2 次視覚野から連合野に亘る大脳皮質の広い領域に於いて 2、3 層のみに見られ、成熟個体でみられる連合野の特異的発現は、主に、生後形成されると考えられる。こうした RBP 遺伝子の発現の特徴は、これが霊長類の連合野特異的に発現する遺伝子の最初の報告であるのみならず、RBP がレチノールを細胞内に運搬することにより、細胞内のレチノイド代謝を制御し、その結果、連合野の機能に何らかの積極的役割を演じる可能性を示唆しており、今後、高次脳機能に重要な役割を果す連合野の分子レベルでの理解に重要な貢献するものと考えられる。

申請者は、更に、RLCS 法を用いて、上記 5 領野において、顕著な発現の差異がみられるものを 20 遺伝子余り分離し、それらの遺伝子の領野間に於ける発現プロファイルの比較検討を行った。RLCS により分離した遺伝子の発現解析の研究は、現在進行中であるが、RBP 発現に関する研究は、既に Cerebral Cortex に公表されており、学位授与に必要な要件を十分満たしている。

まず、学位申請論文の内容を 25 分間口頭発表してもらい、その後、審査委員が質疑応答を行った。その結果、申請者が学位論文の関連分野の研究内容を良く理解し考えていることが判かった。また、申請者を筆頭著者とする主論文が国際誌に受理されており、英語力も十分である。以上より、申請者の学力を学位授与に相応しいレベルに達していると判定した。