

氏 名 仲神 友貴

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大乙第228号

学位授与の日付 平成25年9月27日

学位授与の要件 学位規則第6条第2項該当

学位論文題目 Monocular inhibition reveals temporal and spatial changes
in gene expression in the primary visual cortex of marmoset

論文審査委員 主査 教授 上野 直人
教授 山森 哲雄
准教授 椎名 伸之
教授 森 郁恵 名古屋大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

霊長類は外界からの情報を得るための多くを視覚に頼っており、高度な情報処理機構を有している。視覚研究において、一次視覚野 (V1) ニューロンの反応特性やその神経回路、長期の可塑性などは多くの知見があるが、V1 ニューロン自身が視覚入力を受けたその時に分子レベルでどのような挙動を示すのかは、あまり知られていない。神経活動依存的な遺伝子発現は、外界からの刺激に加え、分子自身の機能に応じて発現が調節されており、電気生理学的な活動測定とは異なる視点から V1 ニューロンの活動を見られると考えられる。そこで本研究では、小型の霊長類のコモンマーモセットを用いて、光刺激で惹起される遺伝子発現の経時変化とその転写調節機構を、組織学的手法により解析した。

活動依存的な遺伝子として、霊長類 V1 特異的発現遺伝子の *HTR1B*, *HTR2A*、最初期遺伝子 (IEGs) である *ZIF268*, *ARC*, *c-FOS* を用いた。これまでに霊長類 V1 特異的発現遺伝子は、いずれもテトロドトキシン (TTX) での単眼遮蔽によって遮蔽眼の投射先での mRNA の発現量が減少し、その発現が網膜からの活動依存的であることが報告されているが (栃谷等、2001。高畑等、2009。渡我部等、2009)、それらが視覚入力によってどのように誘導されるのかはわかっていなかった。また、IEGs はニューロンの活動マーカーとしてよく用いられ、ネコやげっ歯類の実験から V1 でもその発現が視覚入力開始 1 時間以内にピークレベルに達することが知られている。しかし、霊長類 V1 での入力開始直後の知見はなく、発現がピークレベルにあるとき、どのようなパターンを示すかは、ニューロンの活動を知る上で非常に興味深い点である。

本研究では、視覚入力の有無による遺伝子発現パターンを同一個体で比較するため、成体のマーモセットに TTX で単眼遮蔽し、活動依存的な遺伝子発現をベースラインレベルまで落とすために 1 - 2 日の暗所飼育 (DR) を行った。その後、ケージの前面から強い光を 0、7、24、140、240 分間照射し光刺激を与え、すぐに脳を灌流固定して、*in situ* ハイブリダイゼーション法 (ISH) により遺伝子発現を調べた。

単眼遮蔽した個体の IEGs の mRNA 発現パターンから、まず、マーモセットの眼優位性カラム (ODCs) の存在が強く示唆された。旧世界ザルでは左右の眼からの入力が V1 上の隣り合った異なる領域に投射し上下層へ伝えられる ODCs の構造をもつが、新世界ザルではその有無は種によって異なり、マーモセットの ODCs の存在は未だ不確定であった。これまで 4C β 層では ODCs の存在が示唆されていたが (Markstahler 等、1998)、本研究の単眼遮蔽したすべての個体において、V1 での IEGs の発現が 4C β 層だけでなく、入力を直接受けない 2 - 6 層全てを貫通するカラム状のパターンを示し、マーモセットにも旧世界ザル同様の機能的な ODCs の構造が存在する確証を得た。

また、*HTR1B*, *HTR2A* はマーモセットでもマカクザル同様、4C 層の遮蔽眼の投射先カラムで mRNA 発現が減少し、縞状のパターンを示した。更に、光刺激 0 分 (DR) でも同様のパターンが見られたことから、*HTR1B*, *HTR2A* は網膜の自発発火によって一定量の遺伝子発現が誘導されていると考えられる。また、各時点での発現量を比較すると、*HTR2A* は光刺激 240 分まででは発現量に有意な差は見られなかったが、*HTR1B* は 140、240 分で刺激時間に比例して発現量の上昇し、網膜の自発発火に加え、光刺激による発現誘導の機構があることが示唆された。

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

一方、IEGs の mRNA の発現パターンは、光刺激直後から短時間で大きく変化し、遺伝子毎に固有のタイムコースをとった。更に、同じ遺伝子であっても、層ごとにその発現のタイムコースが異なる事が明らかになった。例えば、*c-FOS* の mRNA は光刺激後 7 分で全層に発現が見られるが、その後 24 分をピークに発現量は急激に減少し、140 分までに 6 層で、240 分後には全層で *c-FOS* の mRNA 発現は殆ど消失する。一方、*ARC* は光刺激後 7 分では 4C 層以外の 2-6 層で既に mRNA が発現しているが、入力層である 4C 層では 24 分までには *ARC* の mRNA は殆ど発現が見られない。その後 *ARC* の mRNA 発現は光刺激 140 分に全層でピークを迎え、4C 層から減衰する。これらのことから、同じ遺伝子でも層によって転写調節の機構が異なる事が示唆された。視覚入力による IEGs の経時的な発現量変化は、ラットやネコなどで調べられているが、いずれも層特異的な発現変化は報告されていない。本研究で明らかになった V1 での層特異的な遺伝子発現調節は、視覚情報の並行処理を行い、層の機能がより特化した霊長類の一次視覚野の特性を反映していると考えられる。

これら IEGs の発現調節機構を調べるため、転写因子 cyclic-AMP response element-binding protein (CREB) に着目した。CREB は活動依存的な遺伝子発現のキーレギュレーターといわれており、活動依存的な Ser-133 残基のリン酸化により活性化され、下流遺伝子の転写を誘導する。驚くべきことに、免疫組織化学染色 (IHC) によるマーモセット V1 での Ser-133 リン酸化 CREB (pCREB) は、DR や遮蔽眼の投射先カラムで常にシグナルが見られた。また、IEGs の転写が最も活発な光刺激 24 分では 4C β 層の入力を受けているカラムでシグナルが著しく減少し、IEGs と相補的なパターンを示した。その後、4C β 層での pCREB は光刺激 240 分にかけて徐々に増加し、これらの結果から、活動依存的な CREB の脱リン酸化という、新たな調節機構の可能性を示唆した。また、リン酸化非依存的な CREB 活性化の可能性を調べるため、Transducer of regulated CREB (TORC) に注目した。TORC1 は活動依存的に核へ移行し、Ser-133 リン酸化非依存的に CREB に結合して下流遺伝子の転写を活性化する。4C β 層での TORC1 の局在を IHC で調べると、DR では細胞質に局在しているが、光刺激 7 分、24 分の健常眼の投射先カラムでは核内にもシグナルが見られ、光刺激 140 分以降では再び細胞質に局在した。このとき TORC1 依存的な下流遺伝子とされる Salt-inducible kinase1 (SIK1) の mRNA 発現が、V1 で活動依存的に見られたことから、TORC1 がマーモセットの V1 で活動依存的な遺伝子発現へ寄与していると考えられる。SIK は TORC を介した CREB の抑制因子であることが報告されており、視覚入力依存的な活動依存的な遺伝子発現が、マーモセット V1 の 4C β 層では (p)CREB - TORC1 - SIK1 によってフィードバック制御されている可能性が示された。本研究の結果から、視覚入力によってマーモセットの V1 では様々な因子の発現が短時間の間に大きく変化し、その調節機構も層毎に異なることが示唆された。このことは、複雑な情報処理を行う霊長類の一次視覚野では、層の働きが分子レベルでも大きく異なり、それぞれの細胞ごとに厳密に調節されていると考えられる。

博士論文の審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

申請者は新世界ザルのコモンマーモセットを用い、視覚刺激で誘導される一次視覚野 (V1) における遺伝子発現の経時変化を組織化学的手法により解析した。視覚入力による遺伝子発現パターンを同一個体で比較するため、テトロドトキシン (TTX) で生体マーモセットの単眼の活動を遮蔽し、活動依存的な遺伝子発現をバックグラウンドまで落とす目的で、1-2日の暗所飼育を行った。その後、0,7,24,140,240分間の光照射後、脳を灌流固定した。霊長類視覚野特異的な活動依存的遺伝子として、HTR1B,HTR2A,最初期遺伝子として、ZIF268, ARC, c-FOS の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法 (ISH) を用いて調べ、新世界ザルではその存在になお議論があった眼優位性カラムの存在をマーモセットにおいて証明した。次に、最初期遺伝子の mRNA 発現を調べ、2-6層に亘る眼優位性発現パターンを確認した。更に、TTX 処理後、暗闇でも HTR1B, HTR2A の発現が著しく低下したことから、網膜の自発発火によっても遺伝子発現が誘導されていることを示した。最初期遺伝子の mRNA の発現パターンは、光刺激直後から、層・細胞種ごとに時間および空間的制御を受けている事を明らかにした。従来、げっ歯類やネコなどでは、視覚入力による最初期遺伝子の V1 の層特異的な発現変化は報告されておらず、マーモセット V1 での視覚入力依存的な遺伝子発現の層特異的な調節は、霊長類一次視覚野の特性であると考えられる。これらの発現調節機構を知るため、転写調節因子の cyclic-AMP response element-binding protein (CREB) の発現を調べた。マーモセット V1 での Ser-133 リン酸化 CREB(pCREB)抗体を用いた免疫組織化学法 (IHC) では、暗所飼育時から2-6層で pCREB のシグナルが見られたが、光刺激後24分後、4Cβ層でのみ活動眼の投射先のカラムで、pCREB の著しい減少が見られた。その後、4Cβ層での pCREB シグナルは回復する。これらの結果から、げっ歯類とは異なる活動依存的な CREB の脱リン酸化という、霊長類一次視覚野における新たな転写調節機構の可能性を示唆した。次に、リン酸化非依存的に CREB に結合する活性化因子 Transducer of regulated CREB(TORC) 蛋白質の発現パターンを IHC 法で調べ、4Cβ層では、7分と24分で活動眼投射カラム内のニューロンで核移行することを見出した。また、視覚刺激によって TORC1 依存的な下流遺伝子とされる Salt-inducible kinase1(SIK1)の mRNA の発現誘導を観察したことによって、TORC1 がマーモセットの V1 で活動依存的な遺伝子発現へ寄与していることを示した。SIK は TORC を介した CREB の抑制因子であることが報告されており、マーモセット V1 4Cβ層で pCREB-TORC1-SIK1 の相互作用によって活動依存的な遺伝子発現調節がなされている可能性を示唆した。

以上、本研究は、マーモセット眼優位性カラムの存在証明と層・細胞種特異的発現調節、更にその分子機構の解明に繋がる研究であり、学位授与に十分値する研究であると判断した。