

氏 名 栃 谷 史 郎

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第535号

学位授与の日付 平成13年3月23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4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 The gene, *occl1*, is preferentially expressed in the primary visual cortex in an activity-dependent manner: a pattern of gene expression strikingly related to the functional area in macaque neocortex

論文審査委員	主 査 教授	長濱 嘉孝
	教授	山森 哲雄
	教授	上野 直人
	教授	野田 昌晴

The mammalian central nervous system consists of quite various types of neurons. Nowhere is this neuronal diversity more apparent than in the cerebral neocortex. The neuronal diversity in the neocortex may be, at least in part, reflected in the neuronal molecular properties. Marker molecules to visualize specific subsets of neurons are useful for studying how the neocortex is organized to function. One approach to identify such molecular markers is to examine the differences in molecular properties among morphologically and physiologically distinct neuronal cell types. The adult mammalian neocortex is subdivided into functional areas that have distinct neuronal cell types. In order to find molecular markers, he applied differential display to compare mRNA expression in the anatomically and functionally distinct areas of the adult macaque neocortex. Macaque neocortices were selected as the materials to compare because neocortical differentiation is more fully expressed in macaques than in the other mammalian model organisms such as mice and rats. He performed the comparison of mRNAs using differential display method because he can compare many kinds of mRNAs at the same time with limited amount of mRNA by the method.

As a result, he found that a gene was preferentially transcribed in the posterior region of the neocortex. The gene was designated as *occ1*. Screening a cDNA library from the occipital neocortex of a macaque and complete sequencing analysis revealed that *occ1* encodes a macaque homologue of a secretable protein, TSC-36/follistatin-related protein (FRP). Overexpression studies using COS7 cells and Western blotting using antiserum generated against the product of *occ1* showed that the product is released from the transfected cells after undergoing posttranslational modification. *In situ* hybridization histochemistry showed that *occ1* is expressed in the neurons of neocortex. The hybridization signals were occasionally observed in the processes of neurons. Taking into account this observation and the presence of cytoplasmic polyadenylation element in 3'-UTR of *occ1* mRNA, the *occ1* mRNA localized in the neuronal processes raised the possibility that the *occ1* mRNA undergo cytoplasmic translation in the processes. *In situ* hybridization with tissues throughout the macaque neocortical hemisphere confirmed the preferential distribution of *occ1* in the occipital neocortex, especially the primary visual cortex (area 17). *occ1* expression showed a characteristic laminar pattern in area 17, being high in layers II, III, IVA and IVC of area 17. The laminar distribution of *occ1*-positive neurons in area 18, adjacent to area 17, was completely different from that in area 17. The signals were most frequently observed in the lower one third of layer III and throughout the layer IV. In the other region of neocortex, the primary somatosensory cortex and the primary auditory cortex could be identified by densities and patterns of staining. In addition, *occ1* transcription was observed selectively in cells of the magnocellular layers in LGN and the specific subtype of neurons in the hippocampal formation. Dual labeling immunohistochemistry showed that the *occ1*-positive neurons in area 17 include both

GABA-positive aspiny inhibitory cells and α subunit of type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMKII α)-positive spiny excitatory cells. This data showed an aspect of the expression of *occ1* that *occ1* is expressed in various types of neurons in a particular region. He next applied *in situ* hybridization histochemistry to monocularly deprived monkey tissues, which showed that the *occ1*-mRNA level markedly decreased in the deprived ocular dominance columns of area 17. The reduction in *occ1* mRNA reached up to 57% in layer III and 74% in layer IVC β . The data suggested that *occ1* mRNA expression is subject to afferent-dependent regulation. From these, he concluded that the expression of *occ1* mRNA can be useful as a molecular marker to visualize a specific subset of neurons which are preferentially localized in particular laminae of area 17 and consist of various morphological and physiological neuronal types.

It is known that there happen the two major developmental events in the primary visual cortex of macaque during the first several months after birth, the duration of the sensitivity of ocular dominance columns to monocular deprivation and the increase and peak of synaptogenesis. It is thought that the secretable molecules expressed in an activity-dependent manner play an important role in these developmental events, which raises the possibility that *occ1* is also involved in the events. He next analyzed the expression pattern of *occ1* and the change in the relative amount of *occ1* mRNA in the primary visual cortex in newborn (1-2 day old), 3-month old (92-97 day old) and adult monkeys in order to explore whether there is a temporal correlation between these events and the change in *occ1* mRNA expression. *In situ* hybridization showed that the laminar expression pattern of *occ1* in area 17 changes as development proceeds. Optical density measurements showed that the relative amount of *occ1* mRNA in area 17 ever increase gradually during postnatal development and get the highest at adult. Furthermore, the analysis on the change in optical density of hybridization signals showed that the increase of *occ1* expression in layer IVC β is the largest. These data suggest that *occ1* expression may increase in an activity-dependent manner during the postnatal developmental events and further imply that *occ1* plays a role in these developmental events. Examination on the patterns of *occ1* mRNA expression in areas 17 and 18 in newborn and 3-month old monkeys showed that area 17 displayed a characteristic pattern of *occ1* mRNA expression that clearly differs from that of the adjacent area 18, suggesting that *occ1* can be used as a marker for neurons in area 17 at these stages as it can in adult neocortex.

The region-selective and activity-dependent *occ1* expression in adult macaque neocortex raised a question 'How does the expression contribute to the function of neocortex?' In order to answer the question, the further examination on the function of *occ1* in neurons from many aspects is needed. The information about the function of *occ1* would provide a new insight into the functional organization of neocortex.

論文の審査結果の要旨

大脳皮質は、ヒトにおいて最も良く発達し、機能的、組織学的に異なる視覚野、聴覚野等の「領野」と呼ばれる多数の領域を形成する。「大脳皮質領野」の高次脳機能における重要性は、解剖学的、生理学的知見の蓄積により、近年益々明らかになってきているが、従来より、その形成機構に関して、予定大脳皮質細胞が分裂層にある時に、既に領野特異性が決定されているという考えかたと、その後の視床からの入力により始めてその運命が決定されるという2つの異なる考え方がある。げっ歯類を用いた最近の研究により、少なくとも前者の予めプログラムされた機構があることは証明されつつあるが、一方、ferretを用いた実験では、内側膝状体(MGN)からの入力を遮断して、外側膝状体(LGN)からの入力を受けようになった予定聴覚野が視覚野細胞の特性を持つようになったとの信頼できる報告もあり、両者の機構がそれぞれ、どの程度大脳皮質領野の決定に関与するのかは、なお議論の渦中にある。

申請者は、この問題に具体的な解答を与える為には、これまでにその報告がない大脳皮質領野特異的なマーカーを分離することが重要であると考え、Differential Display法を用いて、領野特異的に発現する遺伝子の同定を行った。材料としては、大脳皮質が特に良く発達している霊長類を用いた。その結果、視覚野に特異的に発現する遺伝子 occ1 (occipital lobe 1) を見い出した。遺伝子解析の結果、この遺伝子は、ヒトやげっ歯類で TSC-36/FRP として報告されている遺伝子のサル homologue であることが判明した。サル大脳皮質に対して、occ1 遺伝子をプローブとして用いた in situ hybridization を行ったところ、第一次視覚野(17野)に最も強く発現し、18野でかなり発現が低下すると共に、後頭部から前脳部に移行するに従って、シグナルが殆ど消失することを見い出した。これは、細胞構築学的に定義された大脳皮質領野特異的に発現する遺伝子のおそらく最初の報告である。次に、申請者は、occ1 遺伝子が一次視覚野(17野)の IVC β 層で最も強く発現し、しかもそれが、興奮性、抑制性の何れの神経細胞にも発現しており、occ1 遺伝子の発現が細胞種特異的ではなく、領野特異的であることを示した。更に、片眼に TTX を注入したサルにおいて、網膜からの入力が遮断された眼優位性カラムで数日以内に occ1 の発現が急速に低下することを見出し、occ1 の一次視覚野に於ける神経活動依存性を明らかにした。特定の大脳皮質特異性と神経活動依存性という2つの特徴を持つ遺伝子は、これまでに報告されておらず、その点でも極めてユニークな遺伝子である。最後に、申請者は、新生児、3ヶ月児の視覚野に於ける occ1 の遺伝子発現を調べ、視覚野特異的という基本的なパターンは、新生児の段階で既に見られるがそれが成熟に伴って、特に IVC β で次第に強くなることを明らかにした。

以上のように、霊長類大脳皮質の領野特異的発現を示す遺伝子を同定し、さらにそれが神経活動依存的であることを示した申請者の研究の意義はきわめて大きく、今後における当該分野の研究を拓くものであり、学位論文に値するものである。

学位論文として提出された研究結果について口頭発表させた後、4名の審査委員が論文内容、関連分野の一般知識、及びその背景となる基礎的知識について質問を行った。それらの質問に対する申請者の応答は適切であった。英語に関する能力に関しても、学位論文が英文で書かれていること、さらにその内容を主体とした原著論文も当該研究分野の国際

誌に発表になっていることから判断して、充分であると判断した。これらの試験結果と学位論文の内容から、学位と取得するに値すると判断した。