

学位論文

霊長類の皮質領野間での遺伝子発現比較

総合研究大学院大学

生命科学研究科

分子生物機構論専攻

小松勇介

## 目次

序文	3
第一章	6
1-1 方法と材料	6
1-2 結果	12
1-3 議論	19
第二章	37
2-1 方法と材料	37
2-2 結果	40
2-3 議論	41
謝辞	47
参考文献	48

## 序文

脊椎動物の脳皮質は進化上もっとも発達した脳組織と考えられている (Hofman, 1989)。霊長類の進化においても脳全体に対し皮質の割合は増してきて (Stephen et al., 1981; Frahm et al., 1982; Hofman, 1989; Clark et al., 2001)、ヒト特有の知性を生むのに関わったと一般に考えられている。実際には脳の進化とはどのような質的变化を伴うものであったかまだよくわかっていないが、近年、ゲノムプロジェクトの推進と分子生物学的技術の発展により生命科学は体系的なアプローチの方法を得て遺伝子や蛋白質の働きを通じた生物の全体像に対する理解を深めようとしている中、DNA アレイを用いた研究が、ほ乳類の脳の進化は多様な遺伝子発現の変化を伴う可能性を指摘し始めている (Preuss et al., 2004; Dorus et al., 2004)。脳・神経系では、神経伝達物質が起こす一連の分子の反応や細胞骨格の形成と制御、また軸索誘導の機構などさまざまなことが分子・蛋白間の相互作用によって説明されるようになってきた。したがって、それら脳における遺伝子発現の種間比較では、このような分子レベルでみた個々の神経細胞の活動や維持のメカニズムの変化が霊長類の脳の質的進化に関わっている可能性を示唆している。さらに、そのような分子的に異なる神経細胞が構成する神経回路の性質も違ってくる可能性が考えられる。そこで私は、皮質の進化に伴い高度に分化したと考えられる機能上、構造上のひとつの単位である皮質領野を分子生物学的アプローチの対象とし、霊長類の脳皮質に固有な神経細胞の性質、ひいては脳機能発現のための固有の神経システムを明らかにすることを試みている。

皮質領野は細胞の層的分布や大きさを反映した細胞構築像をもとにヒトを含む様々な動物種について、20 世紀の初頭に Brodmann により初めて体系的に記された

(Brodman, 1909)。その後多くの研究者により細胞構築像、組織化学像、電気生理学的記録や領野間の神経結合関係などにより、また現在ではポジトロンエミッショントモグラフィー (PET)、機能的核磁気共鳴イメージング (fMRI) や光学的多点計測 (optical recording) などの脳活動に関するイメージング技術の向上により領野の定義や分布は改変され機能的な皮質マップへ変貌を遂げようとしている。

一方、皮質領野の働きを生み出す固有の分子機構を明らかにしようという試みは緒についたばかりであり、いまだそのような議論が出来る分子はわずかである (Hendry et al., 1984; Levitt, 1984; Wong-Riley, 1989; Arimatsu et al., 1994; Tochitani et al., 2001)。そこで私は、感覚野、運動野や連合野と、異なった脳機能的性質をしめす領野を対象に、遺伝子発現の違いを明らかにした。第一章では、対象となる領野間の cDNA プロファイルを differential display (DD) 法にて比較した結果を記した。DD 法では、1 次運動野、1 次視覚野、前頭前野の連合野、視覚性連合野、および 1 次体性感覚野という 5 つの領野間で比べ、連合野でもっとも高い発現を示す分子と 1 次視覚野でもっとも高い発現を示す分子とをクローニングした。

連合野で高い発現を示した遺伝子は plasma retinol-binding protein (RBP)、感覚野で高い発現を示した遺伝子は parvalbumin (PV) であった。PV はカルシウム結合蛋白であり、その免疫反応は高次領野よりも 1 次感覚野に多く存在する抑制性神経細胞の一群に分布することが既に報告されていた。RBP は肝臓で合成され、肝臓に蓄えられたビタミン A を肝臓外組織へ血流を介して輸送するための分泌蛋白質である。今回、初めて霊長類の中樞神経系で、*in situ* hybridization を用いて組織学的に RBP 遺伝子の発現分布を調べた。

*RBP* 遺伝子は連合野の 2、3、5 層の主に興奮性神経細胞で高い発現をしめした。一方、1 次感覚野では発現は低く、2 層から 3 層上部に分布が限られていた。特に 1 次視覚野 (V1) では 2 層の上部の薄い層に限られていた。また、視覚情報が V1 から視覚連合野へ向けて皮質を伝播されていく経路にそって *RBP* の発現は徐々に発現層分布を 3 層深部へむかい広がっていた。この層分布の変化は *occ1* の発現パターンと相補的であった。また、視床からの投射神経の神経終末の広がりとも逆相関を示した。さらに皮質下において、連合野と強く結合のある領域で *RBP* は選択的に発現していた。このような発現様式から、*RBP* の発現は連合野とその関連皮質下領域の形成と機能を研究する上で有効なマーカーとなるであろう。また、*RBP* の神経系での分子機能解析が進めば、霊長類の新皮質における領野や層の分子的特性について新たな理解を与えてくれるかもしれない。

第二章では領野機能の多様性に遺伝子発現の規則性がどのように対応しているかを調べるために、さらにシステマティックなスクリーニングを RLCS (restriction landmark cDNA scanning) 法を用いて行った結果を記した。RLCS 法では前頭前野の高次連合野、視覚性連合野、1 次運動野、1 次視覚野の 4 領野の比較を行った。その結果、機能的に異なるこれらの領野間で個性的な遺伝子発現プロファイルを観察した。1 次視覚野は高次連合野とは相反するプロファイルを示す傾向があった。1 次運動野では他の領野と異なる独自の発現プロファイルを示した。このような機能領野の違いに応じた遺伝子発現の変化が反映する領野構造の成り立ちと分子の働きについての研究は、複雑な脳機能の発現に対する分子的理解へ向けての指針を提示する。

## 第一章 領野特異的遺伝子とその組織学的な発現解析

### 1-1 方法と材料

#### 動物

体重 2.9~4.5 kg の若い成体マカクサルを用いた。カニクイザル (*Macaca fascicularis*) 2 個体を differential display (DD) 法に用いた。In situ hybridization 法では若い成体ニホンザル (*Macaca fuscata*) 3 個体を用いた。新生仔 3 個体 (生後 1 日および 2 日) および TTX を網膜注入したサル 2 匹の組織は以前に Tochitani らが報告したものをを用いた (Tochitani *et al.*, 2001)。胎生期 90 日齢のサルを 1 個体用いた。動物の扱いは以下のガイドに従っておこなった: the animal care guidelines of Okazaki National Research Institute, Japan, and the NIH, USA.

#### サンプリング (図 1-1)

mRNA 抽出用の大脳皮質領野のサンプリングは von Bonin and Bailey (1947) のアトラスに従い、脳溝を指標に行った。FD $\Delta$ は主溝 (ps: principal sulcus, 図 1-1) 両側の脳回より採取した。ここは高次連合野 (46 野、9 野など) が含まれる。FA は 1 次運動野で、中心溝 (cs: central sulcus, 図 1-1) 前部の脳回に相当する。中心溝後ろ側の脳回には 1 次体性感覚野に相当する PC がある。上側頭溝 (sts: superior temporal sulcus, 図 1-1) の腹側の脳回からは視覚性連合野に相当する TE をサンプリングした。1 次視覚野に相当する OC は月状溝 (lu: lunate sulcus, 図 1-1) の後ろ側で外側カルカリン溝上部 (ecal: external calcarin sulcus, 図 1-1) の後頭葉の大半を占める。各部位から切り取られた脳組織は直ぐにドライア

イス上で凍らし、実験開始まで $-80^{\circ}\text{C}$ ~ $-130^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## DD 法

Total RNA の抽出は acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method (Chomczynski and Sacchi, 1987) に基づいて行った。ホモジナイザー（ヒスコトロン; Microtec Nitio, Chiba, Japan）にて 10 ml グアニジン溶液中で凍らしてある脳組織 0.5~1 g を破碎した。その後 2 M ナトリウム酢酸 (pH4.0) を 1 ml 加え、水飽和酸性フェノールを等量加え混濁後、5 分間放置し、さらにクロロホルムを 5 ml 程加えて混合し氷の上で 5 分間放置したのち遠心し、上清とフェノール層とに分離させた。これを再度繰り返したのち上清を回収して、イソプロパノールを等量加えて遠沈してペレットを得た。70%エタノールでペレットを洗って乾燥させた後、再びグアニジン溶液に溶解し先と同様な割合でフェノールとクロロホルムを混ぜ合わせて遠心し上清を回収したのち、2 度のエタノール沈殿のあと、ペレット乾燥後に DEPC (diethyl pyrocarbonate; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 処理した滅菌水に溶解した。その後 RQ1 RNase-free DNase (Promega, Williamsburg, IA) 処理を行ない、グアニジン溶液で用量を増したのち酸性フェノール/クロロホルム処理を行なった。上清を回収し、上清と半量分の高塩濃度溶液 (1.2 M NaCl, 0.8 M Na-citrate) とイソプロパノールをそれぞれ加えて低分子核酸 (tRNA や壊れた RNA) を除去しながら沈殿させた後、エタノール沈殿を行ない、DEPC 処理水に溶解し、逆転写反応にもちいた。 *in vitro* の逆転写反応は MMLV (GIBCO BRL/Invitrogen: Life Technologies, San Diego, CA) を用いて、市販のプロトコールにしたがった。蛍光 DD は carboxy-X-rhodamine (ROX) 標識アンカ

プライマーを用いて、Yoshikawa らのプロトコールにしたがって行った (Yoshikawa *et al.*, 1998)。ROX アンカープライマーは 5'-AAGCTTTTTTTTTTTG-3'、5'-AAGCTTTTTTTTTTTC-3' (Takara Shuzo, Otsu, Shiga, Japan) を用いた。13mer のオリゴヌクレオチドを、GenHunter Corporation (Nashville, TN) で合成し、任意プライマーとした。DD により差が示されたバンドは切り取り、その中に含まれる cDNA 断片を pBluescript II (KS+) vector (Stratagene, La Jolla, CA) の *Eco* RV 切断部位に挿入し、クローニングを行った。大腸菌により増幅されたプラスミドを用いて挿入配列の解析をおこなった。それら配列をもとに PCR プライマーを設定し、領野差の再現性を確認した。

#### PCR プライマーと *in situ* hybridization プローブの合成

*occ1* を除くサル *in situ* hybridization 用プローブ合成のための PCR プライマーはデータベース上のヒト遺伝子の配列をもとに設定し、アフリカミドリザルの cDNA を用いて行った。(1) サル RBP 遺伝子 (GenBank: X00129, nt 133-862 に相当); (2) サル glutamate decarboxylase 1, 67kDa (GAD67; corresponding to GenBank: BC037780, nt 422-1051 に相当); (3) サル vesicular glutamate transporter 1 (VGluT1; corresponding to GenBank: AB032436 nt 204-1093 に相当)。ラット、マウスに対する RBP プライマーはサルと同じものを用いた。各 PCR 産物は pBluescript II (KS+) ベクターの *Eco* RV 切断部位に挿入し、大腸菌に取り込ませて増幅したプラスミドは *Eco* RI もしくは *Sal* I で切断しアンチセンス、センスプローブ合成時の鋳型とした。*occ1* に対するプローブは GenBank AB039661 (Tochitani *et al.*, 2001) 由来である。RNA プローブ合成には digoxigenin



(DIG)-UTP labeling kit (Roche Diagnostics, Basel Switzerland) を用いた。  
double *in situ* hybridization ではDIGプローブの他に fluorescein (FITC)-UTP  
labeling kit (Roche Diagnostics) を用いてプローブを合成した。

#### 脳組織の処理

サルはケタミン(16 mg/kg body weight、 intramuscular injection)で沈静化し  
ネンブタール(60 mg/kg body weight、 intraperitoneal injection)で深麻酔を  
行ない、体温程に温めた 0.9% NaCl (2 U/ml heparin) を心臓からかん流させた  
後、氷冷 4% paraformaldehyde / 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) を流した。取  
り出した脳はさらに室温で 3~4 時間ほど固定液に浸透させてから、4 °C で 30%  
sucrose/0.1 M phosphate buffer に 移して固定液を置換させた。ドライアイスパ  
ウダーで凍らした脳組織は厚さ 40 µm に切って用いた。連続切片はチオニン染色  
(Nissl 染色)、*in situ* hybridization、parvalbumin 抗体染色、cytochrome oxidase  
組織染色(Wong-Riley, 1979)に用いた。*in situ* hybridization は *RBP* と *occ1* に  
ついて隣接切片でおこなった。マウス monoclonal anti-parvalbumin antibody  
(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を parvalbumin 免疫染色に用いた。切片は 0.3%  
Triton X-100/5% normal donkey serum / 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 中  
で 1 時間ブロッキングを行い、1/5000 希釈した 1 次抗体液中[0.3% Triton  
X-100/1% normal donkey serum/0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)]で 4 °C、12  
時間放置した。その後切片をよく洗い、1/500 希釈した 2 次抗体液[0.3% Triton  
X-100 / 1% normal donkey serum / 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)]中、室温  
で 2 時間放置した。2 次抗体は抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immunoresearch

Laboratories, West Grove, PA) を用いた。シグナルの検出は avidin-biotin-peroxidase method (Vectastain ABC reagents, Vector Laboratories, Burlingame, CA) に従った。

#### *in situ* hybridization

*in situ* hybridization は以前に報告されたやり方におおよそ従った (Liang *et al.*, 2000)。切片は 1-6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  proteinase K で 30 分、37 °C で処理し、アセチル化後、0.5-1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DIG 標識 RNA プローブの入ったハイブリダイゼーションバッファー中 60 °C で反応させた。ハイブリダイゼーション後、切片は 2X SSC/50% formamide/0.1% N-lauroylsarcosine 中 55 °C で 15 分、2 回洗った。その後 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase A (Sigma-Aldrich) を含む RNase buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、500 mM NaCl] 中で 37 °C、30 分反応させた。その後の切片の洗いは 2X SSC/0.1% N-lauroylsarcosine で 37 °C、15 分、2 回、さらに 0.2X SSC/0.1% N-lauroylsarcosine で 37 °C、15 分、2 回行った。ハイブリダイゼーション後のプローブは alkaline phosphatase が結合した抗 DIG 抗体で標識され、DIG nucleic acid detection kit (Roche Diagnostics) を用いて検出した。センスプローブでの交差反応はほとんど検出されなかった。

#### Double *in situ* hybridization

切片は 15  $\mu\text{m}$  の厚さに切った。ハイブリダイゼーション前処理と洗いは前述した通りである。ハイブリダイゼーションバッファーには 500 ng/ml ずつ DIG 標識と FITC 標識プローブを加えた。horseradish peroxidase が結合した抗 DIG 抗体

(Roche Diagnostics) を用いたプローブ検出は TSA™ (Tyramide Signal Amplification) Plus DNP System (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) により感度を増幅した。チラミドにより沈着した DNP は Alexa488 が結合した抗 DNP 抗体 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) で蛍光検出した。FITC 標識プローブは alkaline phosphatase が結合した抗 FITC 抗体を反応させたのち、Fast Red (Roche Diagnostics) による蛍光検出をおこなった。

## 1-2 結果

### DD 法によるスクリーニング

2組のプライマーセット、(アンカープライマー: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTG-3'、任意プライマー: 5'-AAGCTTGATCGTC-3') と (5'-AAGCTTTTTTTTTTTC-3'、5'-AAGCTTGATCGAG-3')、を PCR-DD 法により、それぞれから異なる傾向を示す差のあるバンドが得られた。プライマーセット後者からは OC で高く、次に PC、FA、そして連合野 (FD $\Delta$ 、TE) では低く、特に FD $\Delta$  ではもっとも低いというパターンを示した。このバンドからサブクローニングされた遺伝子はカルシウム結合蛋白である PV であり、すでに免疫染色の結果で、PV 陽性細胞の数が 1 次視覚野などの 1 次感覚野で高く、感覚連合野で低いこと報告されており (Kondo *et al.*, 1999)、今回の結果はそれと矛盾はなかった。一方、前者のプライマーセットから得られたバンドは OC ではほとんど検出されず、連合野で強かった (図 1-1 B)。このバンドからは血しょう型レチノール結合蛋白 (plasma retinol-binding protein: RBP) がクローニングされた (GenBank accession number X00129 nt 599-879, with the 10-bp gap sequence between nt 817 and 818)。これらの分子に関しては RT-PCR 法で再現性を確かめた。

### RBP mRNA 発現の脳皮質領野および層分布における選択性

RBP 遺伝子の発現を *in situ* hybridization にて確認した。脳の正中線に対し、垂直な切断面 (coronal section) で脳全体を観察した (図 1-2)。RBP の発現パターンは DD と同様の傾向を示した。前頭葉と側頭葉前部を含む切片の皮質では RBP mRNA のシグナルが強く (図 1-2 section 1~7)、一方 1 次視覚野の存在する後頭葉

の切片では染色が薄かった（図 1-2 section 15~17）。詳細に領野間での層分布を確認すると、一般に連合野では2、3、5層に強いシグナルが分布していた（図 1-3 A、B、C、D、E、I）。また、感覚連合野では、6層の発現も比較的明瞭であった（図 1-3 E、I）。1次感覚野では連合野に比べ層分布は狭まり、2~3層上部に主に分布が限られていた（図 1-3 G、H、M）。特に1次視覚野では、2層の表層にのみ明らかな *RBP* シグナルが分布していた。また、1次感覚野から2次、3次感覚野を経て感覚連合野に至る感覚情報処理に関わる経路で *RBP* の発現は段階的に広がり、4層より上の層では3層の深部へ向けて広がっていき、5-6層では（層分布が広がるというよりも）全体的にシグナルの強さを増していく傾向が観察された。サルで発達した視覚情報処理にかかわる経路では特にこれらの傾向がはっきり観察できた。視覚情報処理の腹側経路（V1⇒V2⇒V4⇒TE0⇒TE）を例として図に示した（図 1-3 I~M）。運動野では層分布は感覚野に類似していて、2-3層の上部と5層に散発的な強いシグナルが存在するパターンだった。

#### 皮質以外の大脳領域での選択的な発現

*RBP* mRNA の発現は皮質以外の領域においても選択的で顕著な発現が観察された。扁桃体での発現は外側核で発現が低く、側底核、中心核において発現レベルが高かった（図 1-4 A）。これは Nissl 染色と比較しても判った（図 1-4 B）。新線条体の尾状核（caudate）と梨状核（putamen）のどちらも前側では発現レベルは等しく明瞭なシグナルがみられたが（図 1-4 D）、後方では尾状核の発現が比較的高いようにみえた。後方の梨状核内では、背側よりも腹側の発現が高かった（図 1-4 E、F）。海馬体の歯状回ではセンス・プローブでもかすかなシグナルがみえたものの、

アンチセンス・プローブのシグナルは明らかにそれより強いことから顕著な *RBP* mRNA の発現があると考えられる (図 1-4 C)。そのほか、CA1、3、4 で明瞭に発現が見られた。CA2 でも明瞭なシグナルが確認できたが、やや他の領域に比べると発現レベルが低くみえた。これは *RBP* の発現は *occ1* の発現と相補的であると考えられる (Tochitani *et al.*, 2003)。

#### *RBP* と *occ1* の相補性

連合野で高く 1 次感覚野、特に 1 次視覚野で低い発現を示す *RBP* の発現パターンは *occ1* と相補的な発現を示すと考えられた。そこで *RBP* の隣接切片にて *occ1* の発現を確認した (図 1-5 A)。脳側面から切り進めて得られた切片 (parasagittal section) では *occ1* の発現は以前の報告通り後頭葉を広く占める 1 次視覚野で顕著な発現を、一方、連合野のある側頭葉や前頭葉ではかなり低い発現であった (図 1-5 A 下)。興味深いのは視覚経路に相当する領域で *RBP* が連合野に向かうに連れて漸進的に発現レベルを高めるのに対し、*occ1* の発現は発現レベルが低下していた。層分布を確認すると、V1 では以前の報告通り 2 層から 4 層にかけて強い発現が観察され、V2 では 3 層深部に限局して層状に発現が観察された (図 1-5 B 下)。V2 以降の視覚経路 (脳前部に向けて) ではこの 3 層深部の発現が低下し、視覚連合野ではほとんど観察されなかった。一方、先に記述したように *RBP* の発現はこの 3 層深部で視覚経路もしくは前後軸にそって発現を強めていった (図 1-5 B 上)。このような相補性は視覚野だけでなく体性感覚野や聴覚野に関連した感覚経路でも観察された。Double *in situ* hybridization では、V2 の 3 層深部では *occ1* mRNA 陽性の細胞でも弱く *RBP* を発現していたので、3 層深部における相補性は細胞種

の変化というよりも、これらの分子の発現制御が層によって違うことを反映しているのかもしれない。また、*RBP*は6層について感覚連合野と他の連合野の発現がやや異なっていたが、*occ1*でも感覚連合野と他の連合野との発現パターンの違いがみられた。前頭前野の発現は *occ1* の強いシグナルは主に4-5層に散発的に分布し、特に6層に集中していた。このような *occ1* の強いシグナルは視覚連合野ではほとんど見られなかった。(図 1-5 B 下)

#### 感覚入力との関係

V1における *occ1*の発現は網膜の活動に依存した外側膝上体の神経活動に関係していることが以前に報告されていた。したがって、1次視覚野での低発現は視覚入力によって制御されている可能性が考えられた。このことを確かめるために、片眼にテトロドトキシン (TTX) を注入し *occ1* の活動依存性を確かめたサルで1次視覚野で *RBP* の発現を確認した。*occ1* の発現が低下した眼優位性カラムに相当する近接切片中の場所で *RBP* の発現は上昇することはなかった。このことは *RBP* の発現は視覚入力に依存して抑えられているのではないと考えられ、*RBP* の発現と視覚刺激に由来する外側膝上体の神経活動との直接的な関係は否定された。また、2層上部の薄い *RBP* の層状発現については、*occ1* のそれと比べると明瞭な発現変化はなかったが、やや発現が低下しているように見られた。視覚入力に依存した神経活動の影響で間接的に1次視覚野内で低下した神経活動に、*RBP* の発現は依存しているのかも知れない。

*RBP* の発現と感覚刺激との直接的な関係を否定する知見は cytochrome oxidase (CO) 活性による染色や視床由来の PV 陽性繊維の分布と比較した場合にも示唆され

た。C0 活性は1次感覚野に豊富に存在し、視床からの投射神経の活動に依存していると考えられている(Wong-Riley, 1989; Morel *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2002)。また、サルでは視床からの投射神経は PV 免疫反応陽性であることが知られている(Steriade *et al.*, 1997)。RBP はこれらと領野および層分布において相補的な発現をしていた。

RBP の *in situ* hybridization の隣接切片で、C0 は1次聴覚野の中央層(3層深部から4層)で高い活性を示し、隣接した2次聴覚野でそれは低下しているのが観察された(図 1-6 H)。1次、2次聴覚野で視床からの神経投射が密な中央層あたりに PV 免疫反応を示す繊維の叢が確認され、それは2次聴覚野よりも1次聴覚野で広く密に観察された(図 1-6 G)。RBP の発現は先の結果と同様に、感覚経路において段階的な発現変化を示した(図 1-6 F)。また、RBP の2層から3層上部までの限局した明瞭な発現は PV 免疫反応陽性線維叢を避けているように見えた。体性感覚野では1次野(S1)内でC0活性とPV免疫反応陽性の神経線維叢の密度や分布は異なっていて、どちらも area 3b でもっとも富み、隣接した同じS1の area 1との境界が観察された(図 1-6 B, C)。RBP はこれらの領野間の変化に対しても相補的な発現変化を示した(図 1-6 A, D)。しかしながら、そのような明瞭な相補性は高次感覚野である area 5 では判別できなかった(図 1-6 E)。これは、皮質内には内在性神経細胞の一群に PV 反応陽性細胞がみられるが、それら内在性の線維と区別できなかったためである。同様なことが1次視覚野についても観察された。

#### RBP 陽性細胞種

皮質の細胞はグルタミン酸を伝達物質とする興奮性細胞と GABA を伝達物質とする



抑制性細胞の2種類に大別できるが、*RBP*の発現は密で層状であることから、おもに興奮性の細胞であることが予想された。double *in situ* hybridizationの結果はそれを支持するものであった(図1-7)。グルタミン酸性神経細胞のマーカースとして、vesicular Glutamate transporter (VGluT1) (Fujiyama *et al.*, 2001)とGABA性神経細胞のマーカースとしてGAD67に対するプローブを用いた。TE野の結果では*RBP*はグルタミン酸性神経細胞に発現し(図1-7 A)、GABA性神経細胞には稀にしか重ならなかった(図1-7 B)。Area 1やV1、V2など*RBP* mRNAの層分布がより限局している領野でも似たような傾向が観察された(図1-7 C, D)。

#### *RBP*の領野差形成時期

*RBP*の発現パターンは前後軸にそって漸進的な発現変化を示す傾向がある。哺乳類の胎生期における大脳の発生段階で前後軸にそった遺伝子の発現勾配がみられ、そのような発生初期に生じる神経細胞もしくはその前駆細胞間での遺伝子発現制御における多様性が大脳皮質の領域化に関係していると考えられている。サルでも胎生期で、将来層構造を形成するグルタミン酸性細胞の前駆細胞が産生される大脳皮質脳室帯で転写因子のそのような発現勾配が報告されていて、*RBP*の発現変化は胎生期でみられるそのような領域化の直接的な影響下にある可能性があった。しかし、胎生期、新生仔での発現パターンはそれを否定するものであった。生後1日から2日の個体では、V1-V2の境界はすでにみられたが、成体で2から3層の上部に限局していたV2の発現は2-3層全体に広がっており、しかもシグナル強度は強かった(図1-8 A)。一方、逆に前頭葉の連合野では5層の強い発現が見られず、2-3層に限られた発現になっていたため、V2と連合野の領野差は生後形

成されることがわかった（図 1-8 B）。また、2-3 層が形成される胎生期 90 日では *RBP*mRNA のシグナルは確認されなかった。このことは大脳皮質脳室帯でみられた転写因子の空間的な発現変化が反映している細胞種の分化に *RBP* の発現が直接関係していないことを示唆する。

#### げっ歯類の皮質での *RBP* 発現

*RBP* の発現をマウス、ラットにおいて確かめた（図 1-9）。どちらの動物においてもサルの発現パターンとは異なり、層状のシグナル分布は示さず、わずかな強いシグナルが散在しているだけであった。これは *double in situ hybridization* の結果からグルタミン酸性の神経細胞ではなく、主に GABA 性の細胞であることがわかった。領野差は存在し、1 次視覚野（V1）と隣接する 2 次視覚野（V2）とを比べると明らかに V2 での分布は密であった（図 1-9 a, b）。また同様に 1 次体性感覚野でも後肢に対応する領域（S1HL）は運動制御にも関わっていて、バレルフィールドに対応する領域（S1BL）と異なり運動野に近い性質も示すことが知られている。*RBP* の発現は S1HL でより密な発現を示していた（図 1-9 c, d）。

#### 1-4 議論

DD 法にてスクリーニングされた *RBP* mRNA の発現分布を *in situ* hybridization にて観察し、神経細胞に発現しかつ領野差があることが新たに示された。発現分布の偏りは機能的な脳領域の違いに対応しているようである。また、そのような分布は最近注目されつつあるレチノイドと脳高次機能との関わりに、*RBP* が関与している可能性を示唆する。

#### 脳におけるレチノイン酸の活性と *RBP* 発現との相関

ビタミン A はベータ・カロチンとして植物から、レチニルエステルとして動物組織から摂取される。小腸の乳び管を通して肝臓のイトウ細胞でレチニルエステルとして保存される (Goodman *et al.*, 1984; Malik *et al.*, 2000a)。肝臓外組織に運搬される場合にはレチノールとして取り出され、*RBP* とプレアルブミンである transthyretin (*TTR*) と複合体を形成し、血中へ分泌される (Ong, 1994; Malik *et al.*, 2000a)。各組織には *RBP* に対する受容体が存在するという知見があり、レチノール (ビタミン A アルコール) の効率のよい取り込みに *RBP* が貢献している可能性が示唆されている (Ong, 1994; Malik *et al.*, 2000a)。細胞に取り込まれたレチノールは alcoholdehydrogenase (*ADH*) によって可逆的に酸化され、レチナールとなる (Duester, 2000, 2001)。レチナールは視物質 (Appelbury *et al.*, 1986) や retinal dehydrogenase (*RALDH*) の基質として用いられる (Duester, 2000, 2001)。*RALDH* の反応は不可逆的にレチナールをレチノイン酸 (*RA*) に酸化する (Duester, 2000, 2001)。最近の報告では成体の脳神経細胞で *ADH* や *RALDH* が発現しているという報告がなされている (Wagner *et al.*, 2002; Galter *et al.*, 2003)。

RA は転写活性を示すレチノイドの代謝産物であり、核内受容体ファミリーの一員である retinoic acid receptor (RAR) や retinoid X receptor (RXR) のリガンドとして働く。これらの受容体はプロモーター領域にある RA 応答配列 (RARE) と呼ばれる核酸配列を標的として働き、RARE は多くの遺伝子が持つことが知られている (Gudas *et al.*, 1994; Clagett-Dame *et al.*, 1997)。それ故、RA に由来する転写活性は発生段階のさまざまな組織で形態形成や細胞分化において重要な役割を果たしている。後脳では RA は後から前へ濃度勾配をもって、分節化に重要であることが知られている (Gavalas, 2002)。前脳の領域化についても RA の関与が示唆されている (LaMantia *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 2001)。一方、最近では胎生期だけではなく生後発生での RA の関与が示唆されている。RALDH3 はマウス生後初期に一過性に側坐核、嗅球そして大脳皮質に発現していることが報告された (Wagner *et al.*, 2002)。興味深いのはサルの新生仔における *RBP* の発現と同様に V1 と V2 の境界がみられ、2~3 層に限局した発現であることである。*RBP* のプロモーター領域には RARE が存在し、*in vitro* で RA による転写の上昇が確認されているので (Mourey *et al.*, 1994; Panariello *et al.*, 1996; Clagett-Dame and Plum, 1997)、新生仔における *RBP* の発現は RA 活性と関係があるのかもしれない。生後の神経回路の再構築は脳が感覚入力に適応するのに必要だと考えられている (Rakic, 1988; Batardiere *et al.*, 2002)。RA の強力な転写活性が 2 次感覚野から高次連合野での環境入力に反応した生後の領野分化に関わるという考えは興味深い。サルの新生仔で RALDH がマウスと同様な高い発現を示すかどうかを確かめたい。

成体の脳でも今回の研究で見られた *RBP* mRNA の特徴的な分布と重なる領域で

の可塑的变化にレチノイドが関与している可能性が報告されている。げっ歯類の海馬では RAR や RXR の高い発現が報告されている (Zetterstrom *et al.*, 1999; Krezel *et al.*, 1999)。また、海馬の髄膜で RALDH1, 2 の発現が知られている (Wagner *et al.*, 2002)。実際、ビタミン A 欠乏症の成体ラットやマウスにおいて、CA1 のシナプスの可塑性が低下し (Misner *et al.*, 2001)、関連記憶の障害が生じることが報告されている (Cocco *et al.*, 2002; Etchamendy *et al.*, 2003)。

成熟した神経系において RA の転写活性のある領域を、レポーターマウスを用いてより直接的に調べた報告がある (Haskell GT *et al.*, 2002)。このマウスでは direct repeat 5 RARE 配列 (二つの RARE 配列の間に 5 塩基のインターバルをもつ) に *LacZ* 遺伝子を融合させた配列が導入されている。この導入された遺伝子が発現している領域は脊髄の背側角、嗅球、手綱複合核、扁桃核そして大脳皮質においても確認された。今回の実験では脊髄や嗅球を確認できなかったが、*RBP* はサルの外側手綱核や扁桃核において発現を示した。

しかしながら、げっ歯類の皮質での発現はサルに比べて限局したものだ。皮質下領域でもマウス、ラットでレチノイドの代謝が重要と思われる海馬や手綱核では *RBP* の発現は見られなかった。これらの種差を説明するには、多くのことを検討しなければならないが、一つの可能性としては、サルにおいては *RBP* の転写制御に RA 以外の要素も考慮しなくてはならないのかもしれない。そのような発現制御機構の獲得は哺乳類の連合野とその関連領域の進化を特徴付けるかもしれない。

神経疾患が示唆するレチノイド代謝の脳における役割について

ヒトの神経疾患から脳高次機能維持において RBP の関与する RA 合成経路が果たす役割を推測することが出来るかもしれない。その候補となる疾病にはアルツハイマー病、統合失調症、前頭側頭型痴呆症 (Davidsson *et al.*, 2002a)、パーキンソン病などが上げられる。アルツハイマー病の患者では脳脊髄液への RBP の分泌が低下し (Davidsson *et al.*, 2002b; Puchades *et al.*, 2003)、アミロイドの抽出物の中に RBP に対する免疫反応性が確認されている (Maury and Teppo, 1987)。加えて、ヒト RBP の遺伝子座は染色体 10q24 に位置しているが、この傍にはアルツハイマー病の発症と相関をもつマーカー配列が存在している (Bertram *et al.*, 2000; Goodman and Pardee, 2003)。さらにレチノイド関連遺伝子の遺伝子座と遅延型アルツハイマー病関連遺伝子の遺伝子座との比較解析によりレチノイドの代謝の異常がアルツハイマー病と関係している可能性が推測されている (Goodman and Pardee, 2003)。より直接的なレチノイド代謝異常の証拠として、患者の海馬ではレチナルデハイドから RA への合成が通常群に比べ高くなっていることが報告されている (Conner and Sidell, 1997)。また、アルツハイマー病の病理組織像からも RA の関わりが類推される。アルツハイマー病ではコリン性神経細胞の変性がよく知られているが、同時に RA によって分化・成熟することも知られている。RA により choline acetyltransferase (ChAT) や vesicular acetylcholine transporter の発現、それから ChAT 活性や細胞内部のアセチルコリン濃度が上昇することなどが *in vitro* の研究で示されている (Pedersen *et al.*, 1995; Berse and Blusztajn, 1995; Malik *et al.*, 2000b)。さらに、コリン性神経細胞やコリン性神経支配のある領域は、大脳基底核、辺縁系皮質や連合野であり (De Lacalle and Saper, 1997; Dickson, 1997; Wisniewski *et al.*, 1997; Clippingdale

*et al.*, 2001; Selkoe, 2001; Kar and Quirion, 2004)、今回明らかになった *RBP* の発現が高い領域と一致している。*RBP* の発現を利用したこれらの領域での細胞分類からアルツハイマー病やコリン性神経細胞とレチノイド代謝との更なる関連性が見つかるかも知れない。

統合失調症とレチノイドとの関連についてはいくらか矛盾した結果が得られている。ある型の統合失調症についておこなったマクロアレイ解析ではレチノイドの代謝にかかわる遺伝子の発現について有意な差は得られなかった (Middleton *et al.*, 2002)。しかしながら、Goodman は3つの独立した路線からの根拠がレチノイドと統合失調症との関連を示唆していることを総説でまとめている (Goodman, 1998; Citver *et al.*, 2002)。1) レチノイドの過剰・欠乏疾患で見られる奇形が統合失調症の患者やその親族で見られる。2) 統合失調症に関わる遺伝子の遺伝子座はレチノイド代謝にかかわるの遺伝子の遺伝子座に近い。3) ドーパミン D2 受容体やその他の統合失調症に関連すると考えられている遺伝子の発現は RA によって制御されうる。RA の転写活性の強力さから、*RBP* の関連するレチノイドの代謝が攪乱することによって統合失調症に関係する連合野に特異的な損傷を及ぼすかもしれない (Weiberger and Berman, 1998; Buchsbaum *et al.*, 2002; Kurachi, 2003)。

パーキンソン病は黒質-線条体経路の阻害によって発症する。マウスでは、RAR  $\beta$  や RXR  $\gamma$  が強く海馬で発現している。これらの遺伝子の二重変異マウスではドーパミン D1 および D2 受容体の発現が内腹側の線条体で低下することが報告されている (Krezel *et al.*, 1998)。さらにこのマウスでは運動機能の低下がおり、コカインに対する反応性が消失する (Krezel *et al.*, 1998)。これらの報告は潜在的な RA とパーキンソン病との関連を示唆しているのかもしれない。しかし、*RBP*

の発現はこの運動機能に RA が関わるという可能性とは相関が低いようである。サルの線条体は尾状核と梨状核とに分かれ、尾状核は主に前頭前野と、梨状核の背側部は運動機能に関わる皮質と強く結合している。それ故尾状核は認知などの高次機能 (Alexander *et al.*, 1986; Yeterian and Pandya, 1994)、梨状核は自発的運動学習に関わるとされている (Alexander, 1986)。実際パーキンソン病の患者では梨状核での病変が尾状核よりも重いことが報告されている (Moszczynska *et al.*, 2004)。RBP の発現は梨状核後部の上側では顕著な発現は観察されず、皮質での発現パターンとあわせて運動機能よりは認知などの高次機能により関連しているのかもしれない。しかしながら、パーキンソン病では痴呆をとまなうことがあり、アルツハイマー病と類似して、コリン性神経細胞の変性をともない、辺縁系の神経核や大脳皮質まで病変が見られることがある (Emre *et al.*, 2003)。RBP のかわるレチノイドの代謝異常はこのようなパーキンソン病のある病型には関連しているのかもしれない。

#### 分子の機能

RBP は  $\beta$ -バレル 3 次構造を有し、小型で疎水性のリガンドに対する担体として働くリポカリンスーパーファミリーに属している (Flower, 1996)。神経系においても RBP は RA 合成に必要な基質となる脂溶性ビタミンのレチノールの供給に関わることが予想される。一方、レチノールは RBP と結合することで細胞内での酸化から間逃れ、さらに細胞外へ分泌されれば細胞内の RA 濃度に間接的に影響することも考えられる。RBP が存在することで、RA 濃度調節を介した神経細胞間の情報伝達が可能になっているのかもしれない。もしくはレチノールという脂物質の酸化



を調節することで、フリーラジカルの濃度を調整し、細胞の損傷や修復の制御に関わるのかもしれない。何れにせよ、RBP の大脳における選択的な発現パターンからその分子機構は連合野やそれに関連する神経核の分子的性質を特徴付けるのに重要と考えられるが、その解明は今後の研究にゆだねられる。

#### *RBP* の発現分布と解剖学的構造との相関

*RBP* の皮質での発現特徴は1次視覚野から視覚連合野にかけての層分布の増加である。2～3層上部に *RBP* 陽性細胞が集まっていることから、皮質間の投射に関連している可能性が考えられる。

*RBP* の発現が見られる2層では、視覚野や他の感覚野では皮質間フィードバック結合の出力層の一つとして知られている (Rockland and Pandya, 1979; Felleman and Van Essen, 1991)。また、2層の神経細胞の樹状突起は1層の細胞とともにフィードバック結合の標的とされている (Rockland and Pandya, 1979; Felleman and Van Essen, 1991)。この点では、*RBP* の発現分布と同様に、視覚経路を進むにつれてフィードバック投射細胞の分布と終末の広がり観察されるのは興味深い (i. e., TE0 to V4; Rockland *et al.*, 1994: see fig. 21)。加えて、2層の神経細胞の突起は広く水平結合に関与することが知られている (Lund *et al.*, 1981; Yoshioka *et al.*, 1992; Fujita and Fujit, 1996)。これらの2層の結合環境は情報伝達を統合的に処理することにかかわることを示唆する。

実際に特徴的な2次視覚野 (V2) における2層の働きが電気生理学的手法により報告されている (Shipp and Zeki, 2002)。V2d で C0 染色を行うと皮質表面に対し垂直な機能的分かれたカラム様の構造を可視化する。C0 の染色具合から濃い、

薄い、中間ストライプと 3 種類に分けられる。それぞれ、色、方向、動きの視覚属性に対し特異的に反応することが以前から知られているが、Zeki らの報告ではこのような反応特性は 3 層深部から 4 層にかけてみられ、2 層（や 6 層）ではより薄れ、一つのストライプ内で各視覚属性に反応するようになるという。

感覚経路において段階的に増加と相関をもつ要因としてこの他に錐体細胞の樹状突起構造の変化が上げられる。Lucifer yellow の細胞内注入により基底樹状突起の広がりや枝分かれの程度、そしてスパインの密度などが増加することが調べられている (Elston *et al.*, 1999 ; Elston, 2001)。さらに前頭前野においてもこれらの樹状突起の構造要素が高い値をしめすことも報告されている (Elston, 2000 ; Elston *et al.*, 2001)。

皮質と密に結合している扁桃体では、*RBP* の発現は外側核で低く、副核、中心核で高い発現を示している。これらの神経核は一方向的な結合によって連なっていて、それぞれが皮質と固有な結合をもっている (Stefanacci and Amaral, 2002)。外側核は視覚領野からの神経支配を受けており、基底副核へ投射している。基底副核は密に前頭葉や辺縁皮質と結合し、中心核へ投射している。Amaral らのグループはこの扁桃体神経核の連なりは未知もしくは潜在的に危険と思われるものに対して文脈依存性の恐怖反応を示すための回路基盤だという仮説を提唱している。興味深い可能性としては *RBP* の選択的発現は解剖学的、機能的な扁桃体や皮質の階層性に関連しているのかもしれない。

*RBP* mRNA は線条体の尾状核や腹側梨状核の後方部で明瞭な発現がみられた。前述の通り、これらの神経核は高次ないし視覚連合野と結合を有している (Alexander *et al.*, 1986; Webster *et al.*, 1993; Yeterian and Pandya, 1994)。

一方、背側梨状核では運動野や体性感覚野と強い結合を有している (Alexander *et al.*, 1986)。

以上、RBPが発現している領域は、*occ1*の発現がみられ視床由来のPV 反応陽性線維が占めている感覚刺激に対し位相的な関係をもつ領域とは違い、統合的な情報処理に関わることを示唆している。さらに RBP 分子の機能や種間比較の考察を付け加えると、RBP の関わるレチノイド代謝は選択的に霊長類の脳の高次機能獲得や社会性行動について重要な役割を果たしているのかもしれない。これまでに連合野は脳活動と解剖学的な結合条件とで主に定義されてきたが、RBP やレチノイドの脳における働きについての研究は霊長類の連合野の成り立ちや働きについての分子基盤を与えてくれるであろう。

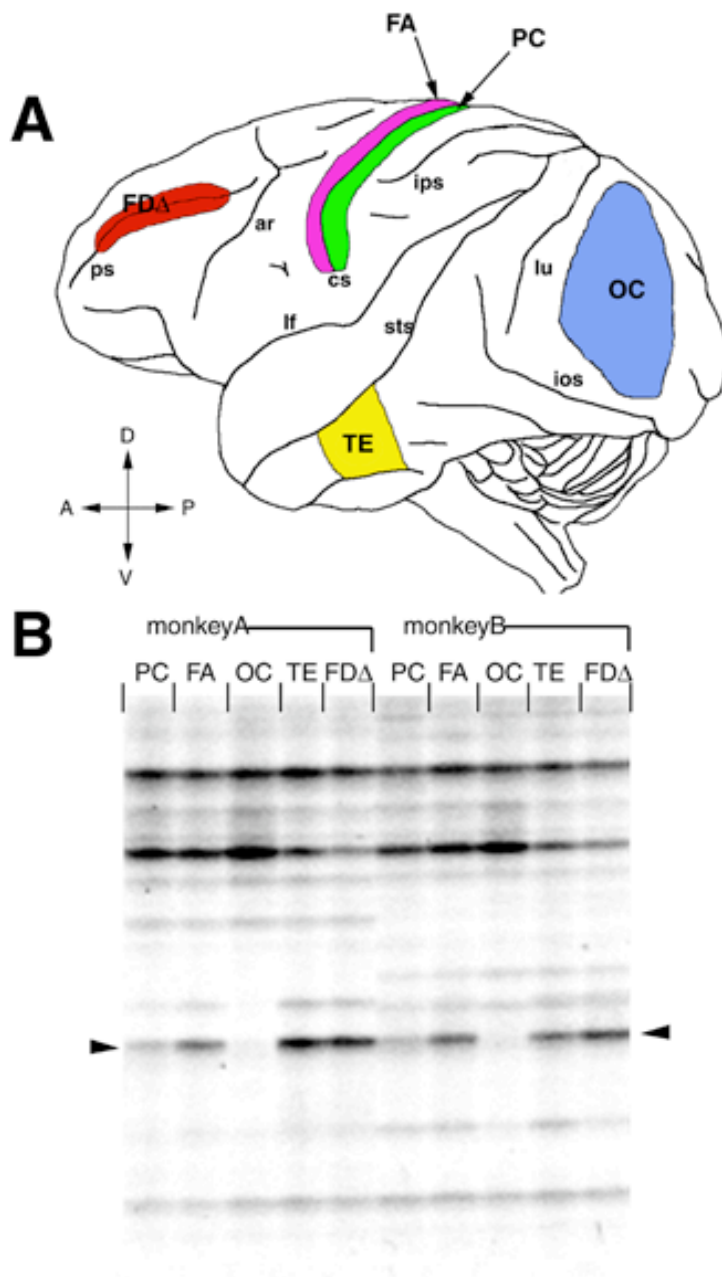


図 1-1  
 Differential display 法による 5 領域の比較 (A) サルの大脳の側面図。differential display 法に用いたサンプルは図の中で色分けされた 5 箇所から採取した。FD $\Delta$  (赤) : principal sulcus (ps) と両側の脳回。高次連合野。OC (青) : lunate sulcus の後方と inferior occipital sulcus (ios) の上方。1 次視覚野。FA (紫) と PC (緑) : それぞれ central sulcus (cs) の前部と後部。1 次運動野と 1 次体性感覚野。TE (黄色) : superior temporal sulcus (sts) の腹側の脳回。視覚性連合野。その他の略記は以下。  
 Ar : arcuate sulcus、lf : lateral fissure、ips : inferior parietal sulcus、D : dorsal、V : ventral、A : anterior、P : posterior。  
 (B) differential display で示された RBP に相当するバンド。FD $\Delta$  と TE のレーンで強く、PC で弱く、OC のレーンではほとんどみられなかった。個体差の確認のために、2 個体 (monkey A、B) を同時に扱った。

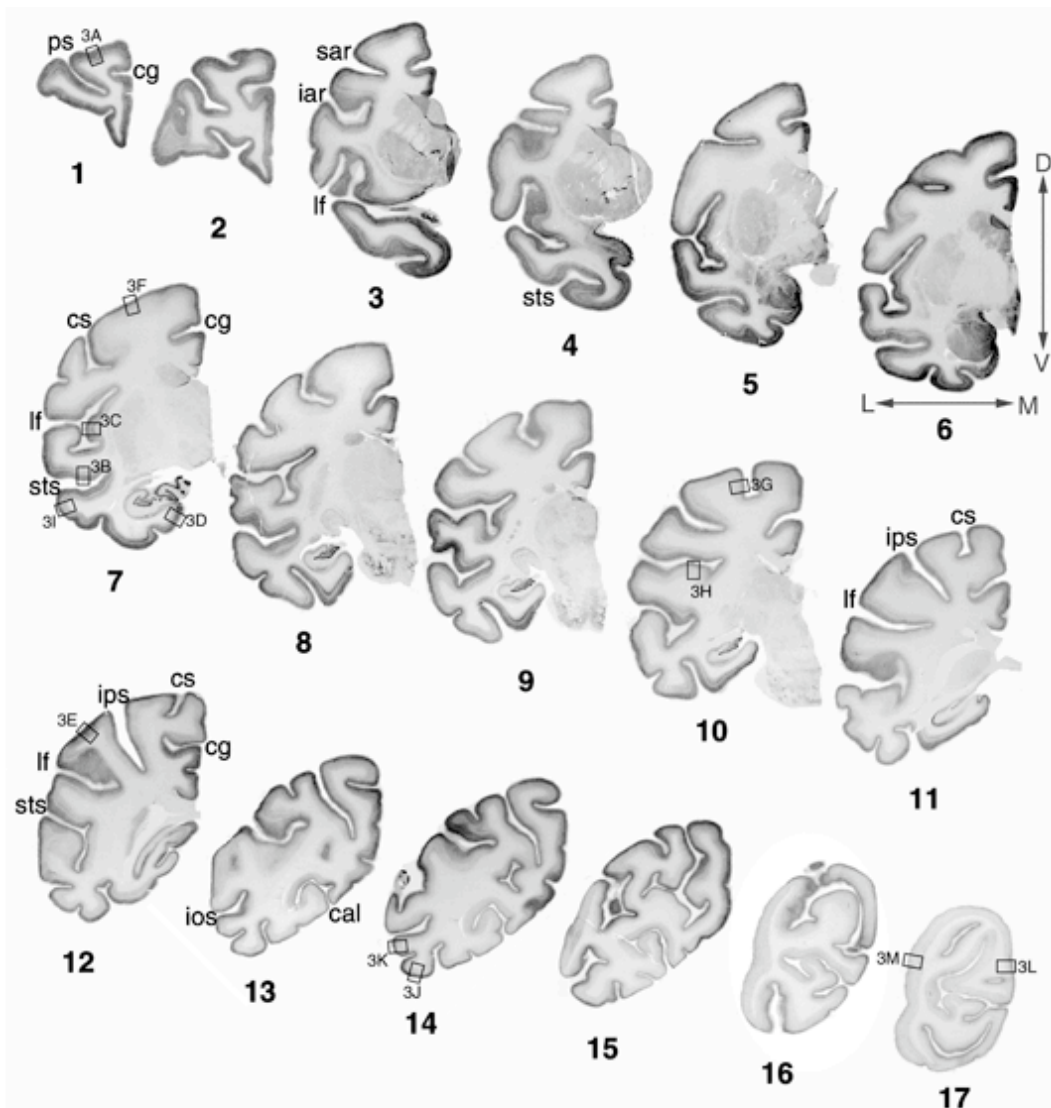


図 1-2

*in situ* hybridizationにより RBP 発現分布を示す。coronal section を脳の前から後ろの順に並べた (1~17)。RBP の発現は全ての皮質領野で発現していたが、様々な発現のレベルを呈していた。四角で示した領域は図 1-3 の狭角図で示す。脳溝の略記は以下である。cg: cingulate sulcus, sar: superior arcuate sulcus, iar: inferior arcuate sulcus, cal: calcarine sulcus。他の略記は図の 1-1 と同様である。切片の向きは D: dorsal, V: ventral, L: lateral, M: medial で表している。Scale bar=20 mm

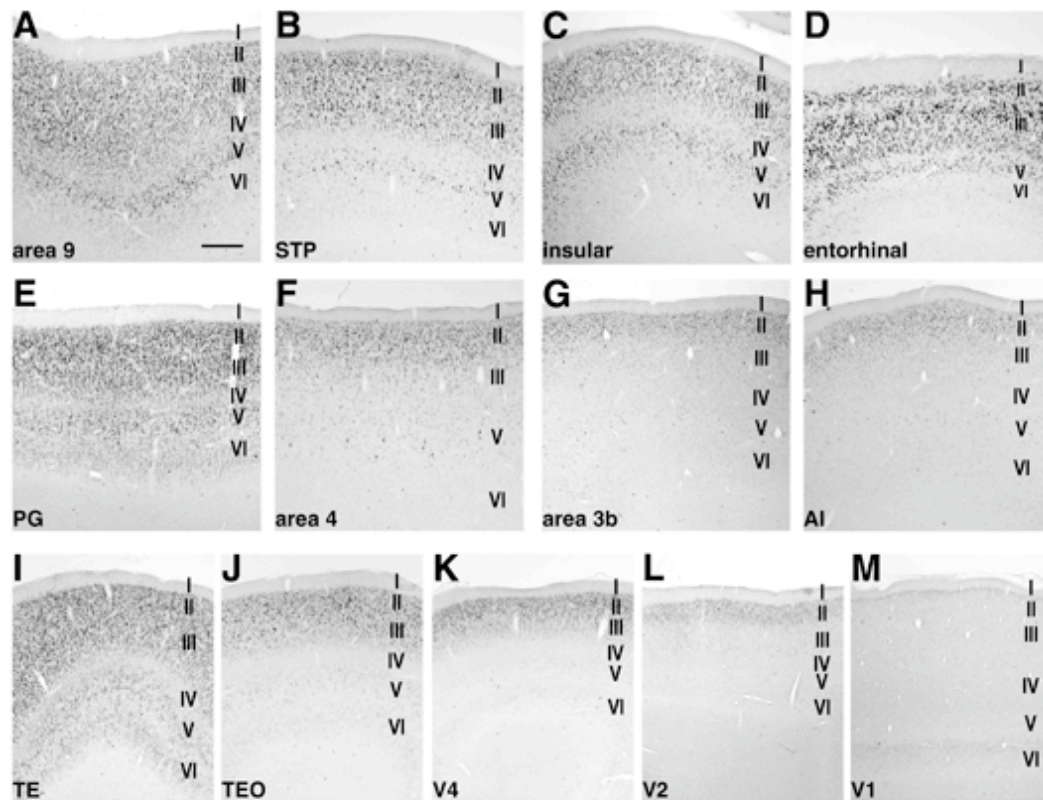


図 1-3  
 皮質における RBP mRNA の層分布。A ~ E は連合野と辺縁系皮質に相当する。(A) area 9、(B) STP (superior temporal area)、(C) dysgranular insular cortex、(D) entorhinal cortex、(E) PG (parietal association cortex)、(F) area 4 (primary motor cortex)、(G) area 3b (primary somatosensory area)、(H) AI は primary auditory cortex。最下段の領野の並びは腹側視覚経路に相当する。(I) TE、(J) TEO、(K) V4、(L) V2、(M) V1。Scale bar = 500  $\mu$ m



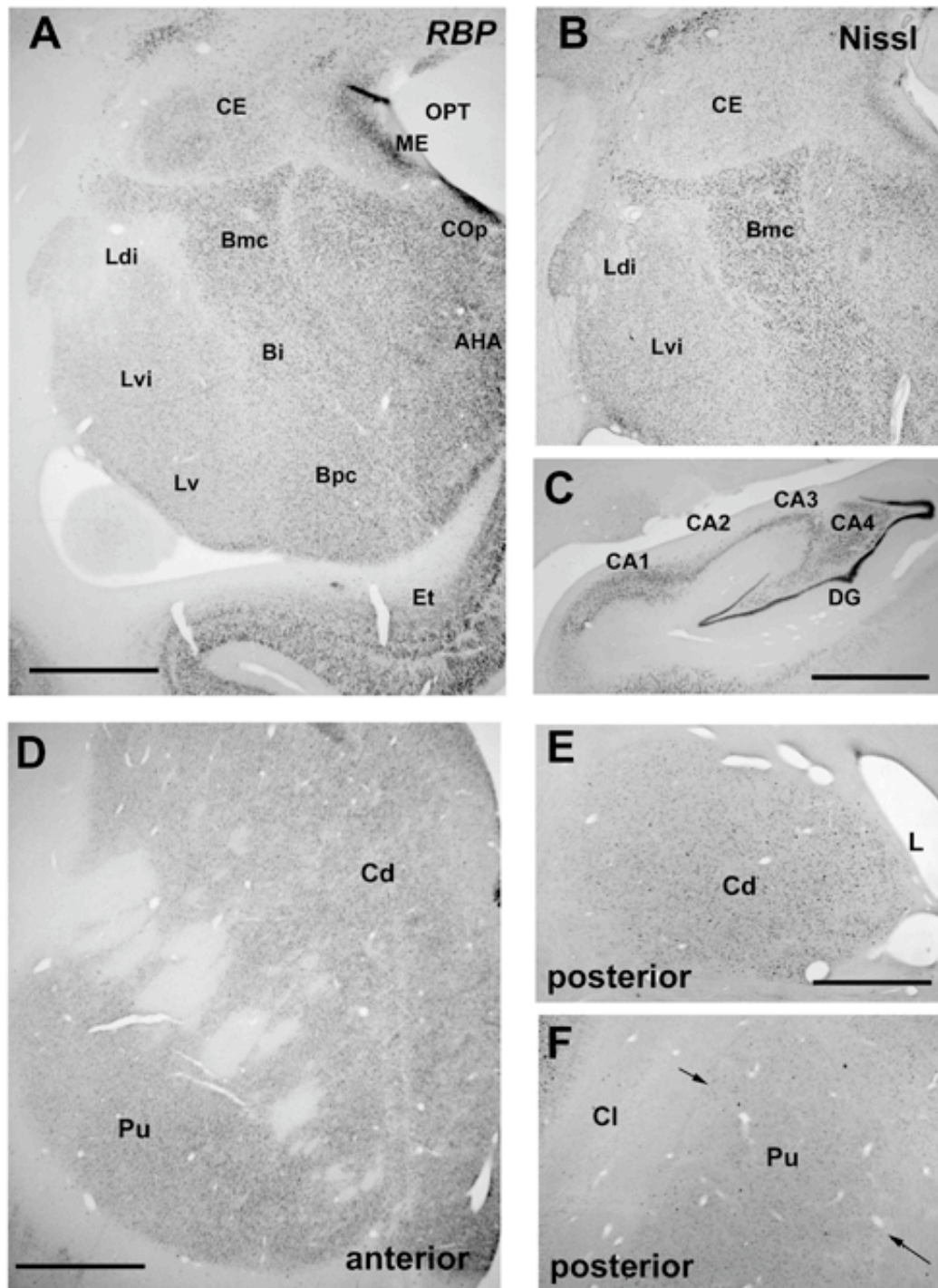


図 1-4  
 皮質下領域での RBP mRNA の分布。扁桃体における RBP mRNA 発現 (A) と Nissl 染色 (B)。海馬体における RBP 発現 (C)、線条体の前部 (D) と後部 (E and F)。略記: CE、central nucleus; Ldi、dorsal intermediate subdivision of the lateral nucleus; Lvi、ventral intermediate of the lateral nucleus; Lv、ventral subdivision of the lateral nucleus; Bmc、magnocellular subdivision of the basal nucleus; Bi、intermediate subdivision of the basal nucleus; Bpc、parvocellular subdivision of the basal nucleus; ME、medial nucleus; Cop、posterior cortical nucleus; AHA、amygdalohippocampal area; DG、dentate gyrus; Cd、caudate nucleus; Pu、putamen; Cl、posterior claustrum; L、lateral ventricle。それぞれ、Scale bar = 2mm

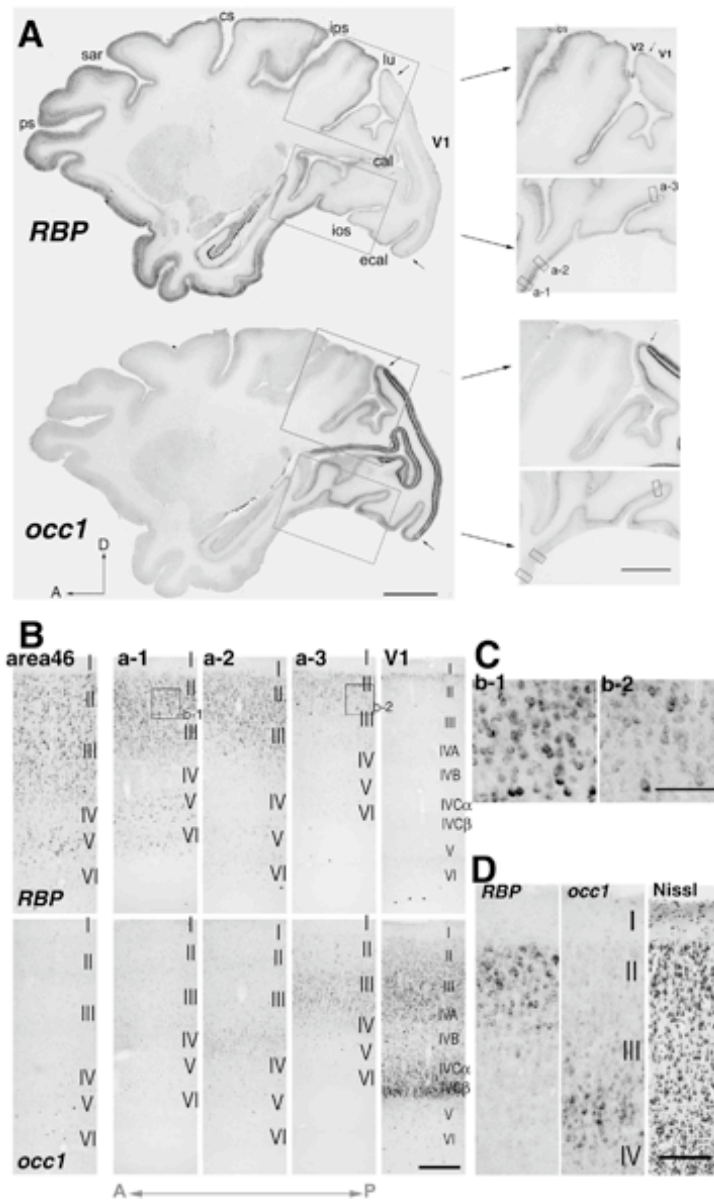


図 1-5  
 相補的な *RBP* と *occ1* の発現。(A) parasagittal 切片における *RBP* mRNA シグナル (上) と *occ1* シグナル (下)。囲まれた領域は右のパネルで拡大されている (a-1~3 はさらに B で拡大されている)。Scale bar = 10 mm。矢印は V1 と V2 の境界を指す。Scale bar = 5 mm。(B) 層分布の変化。前側の領野に向かうにつれ、*RBP* シグナルは徐々に 2 層から 3 層深部へ向けて広がっていく (V1、a-1~3 上)。area 46 や a-1 ではおおくのシグナルが 1 層を除く層で確認されている。特に 2、3、5 層で強い発現が見られる。下段では *RBP* の隣接切片での *occ1* の発現を確認している。Scale bar = 150  $\mu$ m。(C) 2-3 層の 1 細胞あたりでの *RBP* 発現レベルの変化。シグナルは前側の領野で強くなっている。(e.g., a-1 > a-3)。Scale bar = 100  $\mu$ m。(D) *RBP* と *occ1* の 2-3 層内での分布の違い。Scale bar = 150  $\mu$ m。



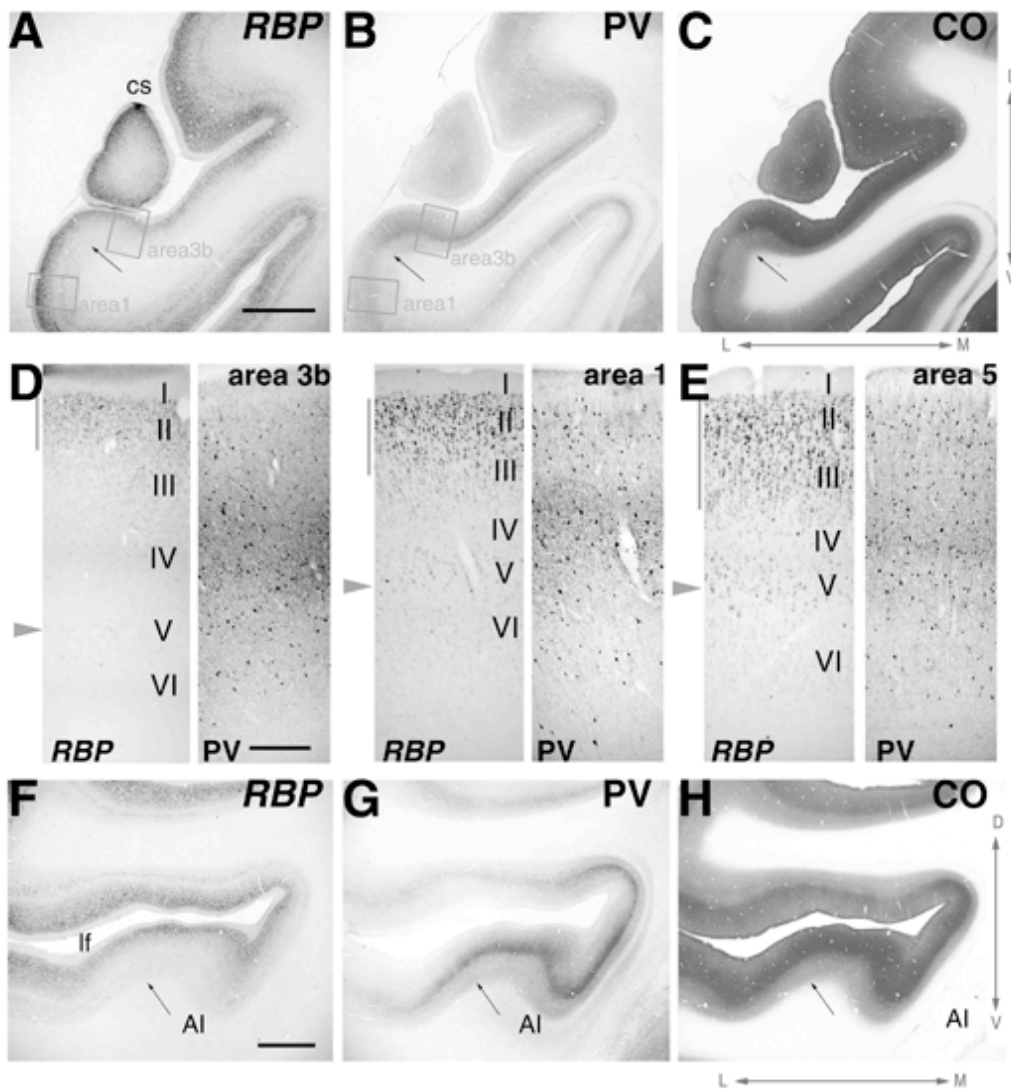


図 1-6

1次体性感覚野 (SI) と聴覚野 (AI) 近辺での RBP mRNA シグナルの分布。(A) area 3b は area 1 に比べ発現レベルが低い。(B, C) parvalbumin の抗体染色や cytochrome oxidase の組織染色で area 3 の外側の領野境界が確認できる。(A) と (B) において四角で囲まれた領域は (D) で拡大している。Scale bar = 2.5 mm。(D) area 3b において RBP mRNA シグナルは中央層で低下している。対して parvalbumin の免疫染色はその領域で豊富である。Area 1 でも同様なことがいえるが、RBP の発現は強まって広がり、parvalbumin の抗原陽性領域は狭まっている。(E) ではそのような RBP と parvalbumin との相補的な関係が観察しにくい。Side bars; RBP 強シグナルの 2-3 層での広がりの目安。矢頭は 5 層の発現。Scale bar = 350  $\mu$ m。(F, G, H) RBP 発現と parvalbumin 抗体染色や cytochrome oxidase の組織染色との相補的な関係は AI とその隣接する領野 (2次聴覚野) との間でも確認された。矢印は領野の境界。lf: lateral fissure。Scale bar = 2 mm

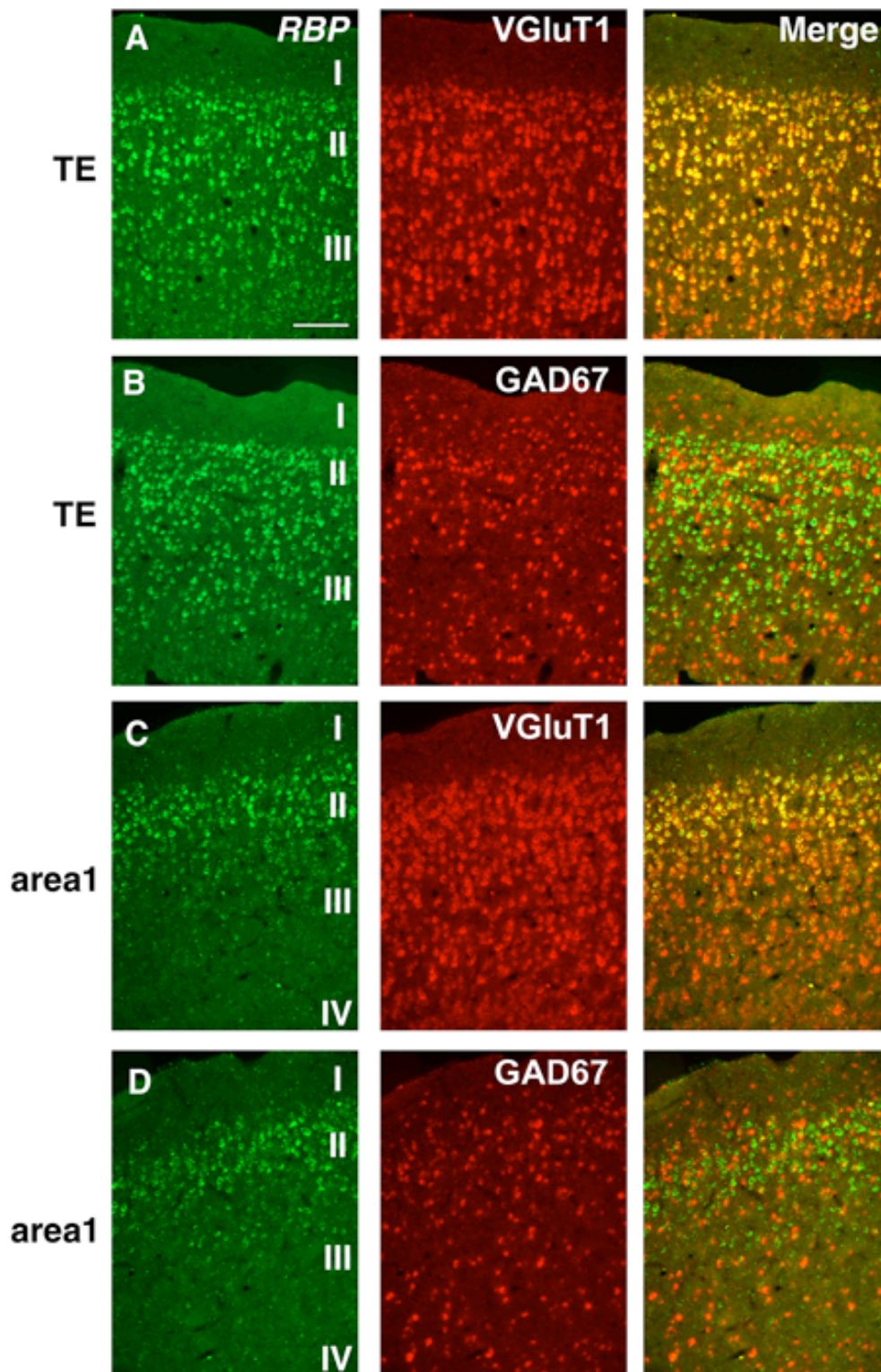


図 1-7  
*RBP* mRNA の発現は主に興奮性神経細胞で見られる。(A、C) *RBP* mRNA (左、Alexa 488、緑) は TE や *RBP* の発現がより狭い area 1 でも 2-3 層の VGlut1 陽性細胞群で強く発現している (中央、Fast Red、赤)。(B、D) *RBP* の発現 (左、Alexa 488、緑) は GAD 67 陽性細胞群 (中央、Fast Red、赤) では限られている。  
 Scale bar = 150  $\mu$ m

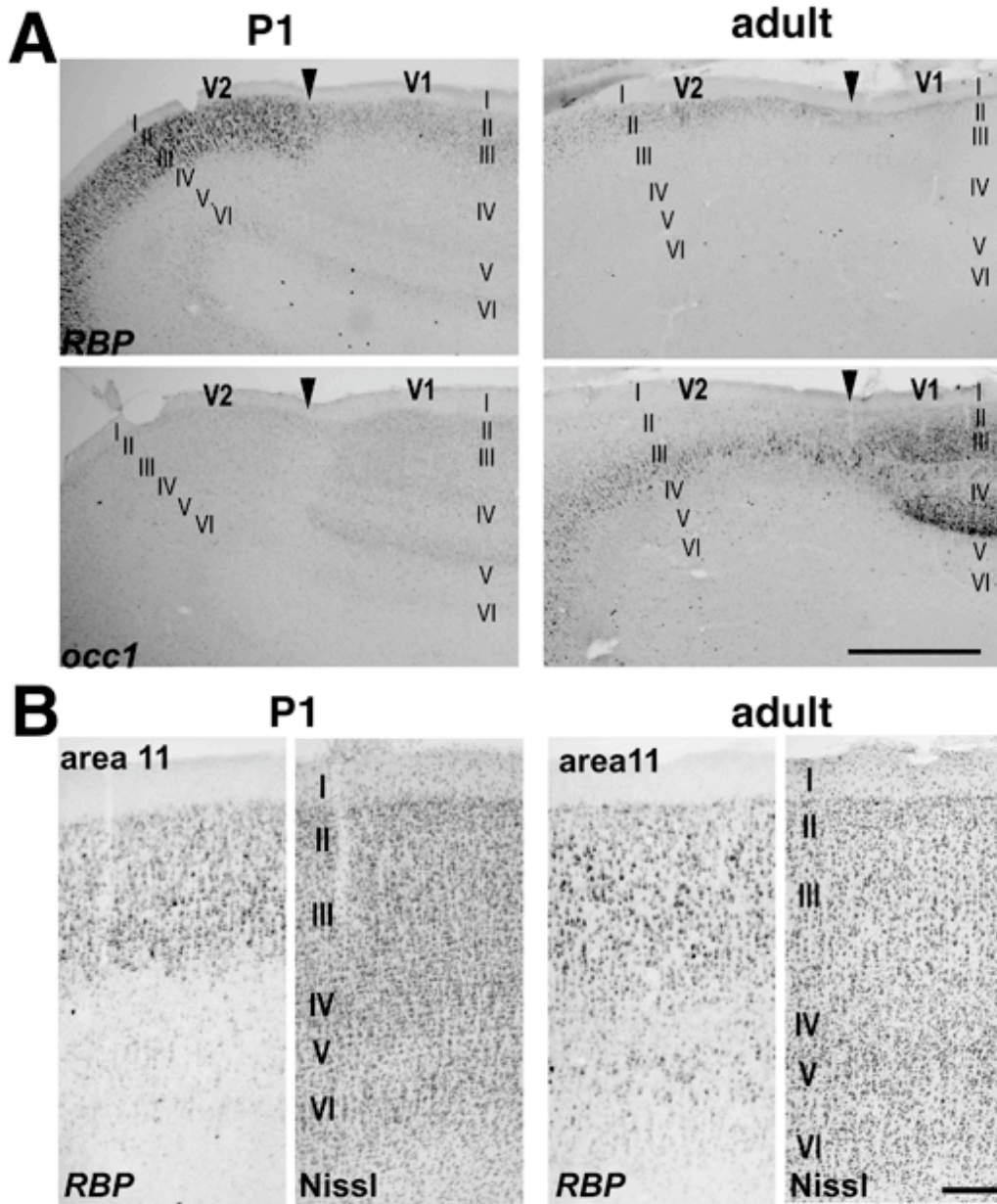


図 1-8  
 新生仔における *RBP* mRNA シグナルの層分布。(A) 上：サルの生後 1 日目 (左) と成体 (右) の V2 における *RBP* の発現。矢印は V1-V2 の境界。Scale bar = 1  $\mu$ m。(B) 連合野における生後 1 日目と成体との比較。新生仔では 5 層の発現がまだ顕著ではない。  
 Scale bar = 250  $\mu$ m



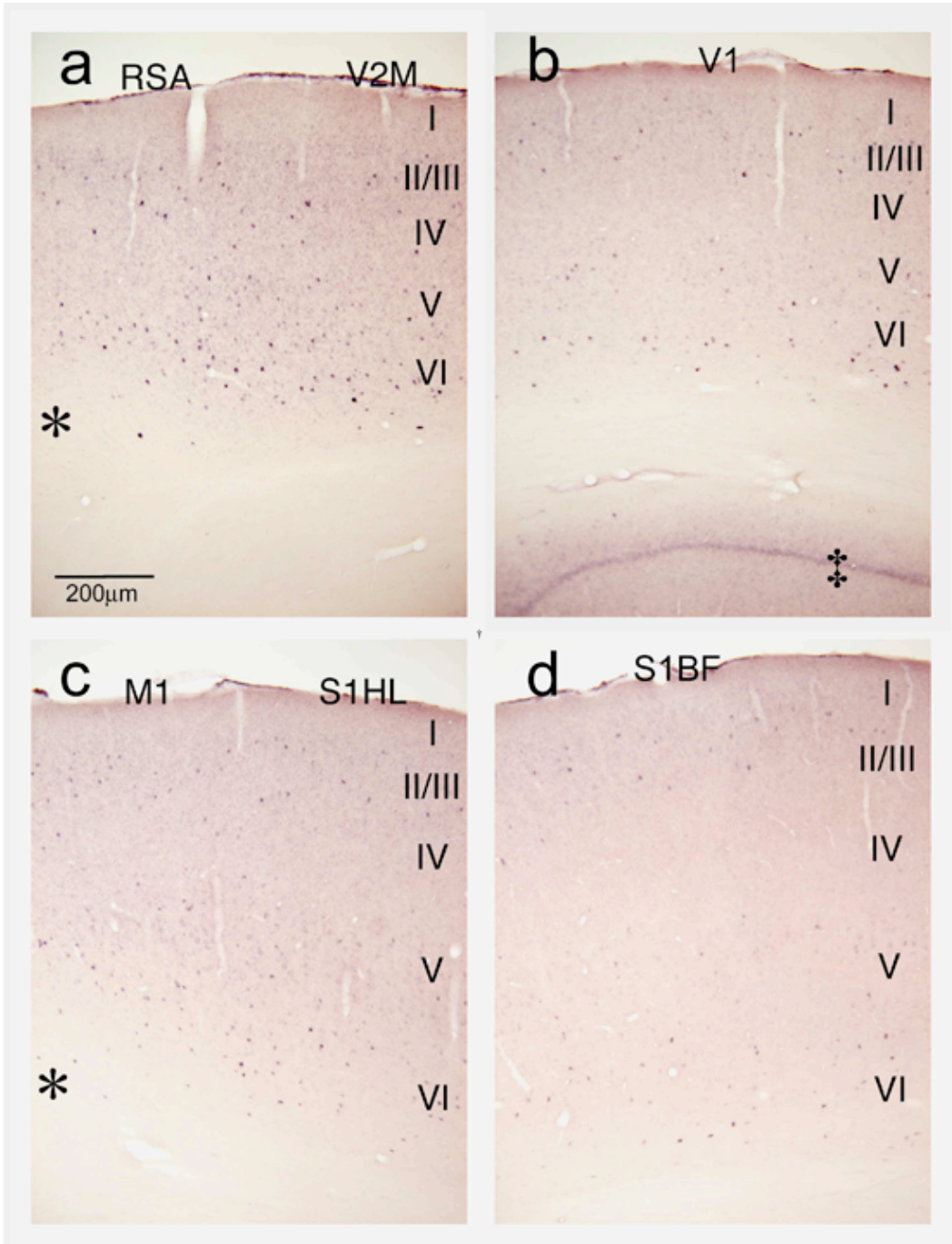


図 1-9  
ラットの皮質における RBP の発現。サルと同様に V1 と V2 で発現差が見られるが、散発的な発現 (a, b)。1 次体性感覚野 (S1BF : barrel field) でも運動関連領野 (S1HL, M1) に比べると発現レベルは低い。

## 第二章 領野固有の遺伝子発現プロファイル

### 2-1 材料・方法

#### RLCS 法 (図 2-1)

RLCS 法は以前に報告された方法に従った (Mayumi et al., 1998; Shintani et al., 2004)。RNA の抽出は DD 法の場合と同様に低分子 RNA を除いたものを準備した。dT オリゴがついているマグネットビーズ (BioMag mRNA purification kit; PerSpective Biosystems, Framingham, MA) を用いて添付のプロトコールに従い、poly(A)+ RNA を精製し、cDNA 合成を行った。合成には NotI 認識部位を含み 5' 端がビオチン化された以下 4 種類のアンカープライマーの混合液を用いた;

3'-AM(T)<sub>15</sub>CCCGCCGGCGAGCGCTAGATCTTGATCAG-5'-biotin

3'-GM(T)<sub>15</sub>CCCGCCGGCGAGCGCTAGATCTTGATCAG-5'-biotin

3'-CM(T)<sub>15</sub>CCCGCCGGCGAGCGCTAGATCTTGATCAG-5'-biotin

3'-TM(T)<sub>15</sub>CCCGCCGGCGAGCGCTAGATCTTGATCAG-5'-biotin (M=A or G or C)。また、

合成反応は Superscript™ Choice system (GIBCO BRL/Invitrogen: Life Technologies, San Diego, CA) を用い、2 本鎖まで合成し、制限酵素による切断をおこなった。一度目の切断を行う前に、T7 sequenase (version 2.0; USB corporation, Cleveland, OH) と 1 mM ddNTPs (2',3'-Dideoxynucleoside triphosphates) を反応液 (50 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT) に加えてブロッキングを行った。その後 cDNA を 6 塩基認識酵素の制限酵素をもちいて切断し、切断部位の 3' 端に <sup>32</sup>P 標識ヌクレオチドで標識をおこなった。3' 端に [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP が標識される制限酵素として、*MunI* (Takara)、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP が標識できる酵素として *BlnI* (Takara)、*BspEI*、*BspHI*、*NcoI*、*XmaI* (New England Biolabs

Inc, Beverly, MA)、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$  を標識する *Asp718*、*Bam*HI、*Bst*EII (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)、*Bc*I (Toyobo, Osaka, Japan)、*Bsr*GI、*Kas*I (New England Biolabs)、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$  で標識する *Apa*I (Toyobo) の計 13 酵素を用いた。標識された DNA の断片はアンカープライマーが含まれるもののみをアビデンが結合したマグネットビーズ (DynaBeads Oligo (dT)<sub>25</sub>; Dynal, Oslo, Norway) にて回収後、*Not*I (New England Biolabs) による切断で遊離し、一次元目の泳動を 1%アガロース/0.1 M Tris、40 mM NaOAc、36 mM NaCl、4 mM EDTA (pH8.0) (SeaKem GTG agarose; FMC BioProduct, Rockland, ME) で行った。泳動後、ゲルの中で 4 base-cutter (*Hinf*I) にて切断し、6%ポリアクリルアミドゲルにて 2 次元目の泳動を行った。一次元、二次元目の泳動槽はどちらもバイオクラフト (Tokyo, Japan) で作られたものを用いた。泳動終了後はクロマトグラフィー紙 (Whatman 3MM chr; Whatman) にゲルを吸着・乾燥させ X 線フィルム (X-OMATTM AR;Kodak) にシグナルを感光させた。X 線フィルムを目視で比べ、領野間で差のあるスポットを検出した。スポットを切り出し、透析チューブ内で溶出し、DNA 断片を回収して、アダプター・ライゲーションを行った (表 2-1)。アダプター配列 (short) をもちいて PCR を行ない増幅した DNA 断片は pBlueScriptII の *Eco*RV 切断部位に挿入後大腸菌にトランスフェクションしサブクローニングを行った。コロニーから直接 PCR を行い得られた cDNA フラグメンは 4 塩基認識酵素 (*A*/I; Toyobo) によるプラスミドの切断パターンを解析し、出現頻度の高いパターンのプラスミドから RT-PCR により領野差を確認した。

RT-PCR

RLCS 法で得られた領野差のある核酸配列はデータベース上でホモログ遺伝子を同定し、RT-PCR で再現性を確認した。RT-PCR 産物は 1 %アガロースゲルで泳動したのち、TAE (40 mM Tris, 40 mM glacial acetic acid, 1 mM EDTA (pH8.0)) に 0.01% (V/V) SYBR Green I (BioWhittaker Molecular Application; Rockland, ME) を加えた液にて染色して、FMBIO (Takara) で検出し解析をおこなった。PCR は各遺伝子につき cDNA の希釈列 (1/8、1/4、1/2、1、2) をつくり、シグナルが飽和しないのサイクル数で行った。RLCS で確認された領野差と同じ傾向を 2 個体以上で示した場合に陽性クローンと判断した。

## 2-2 結果

RLCS 法では、13 種類の 6 塩基認識酵素と 1 種類の 4 塩基認識酵素で、13 種類のスポットパターンを 4 領野間で得て比較した。そのうち 67 の差のあるスポットを切り出し、領野差のある遺伝子の同定を RT-PCR により 2 個体以上で確認した。そのうち 26 のスポットから発現に領野差のある遺伝子がクローニングされ、残りの 41 スポットから同定された遺伝子は、領野差がないかもしくは領野差は個体間ではらついていた。さらに領野差のある遺伝子群のなかで 2 つの異なるスポット由来のクローンが同じ遺伝子であったケースが 4 組あったので、領野差のある遺伝子は 22 種類であった。RT-PCR の結果の一部より、領野の遺伝子発現プロファイルの傾向を図 2-2 に示した。この図では各遺伝子につき FD $\Delta$ 、TE、OC、FA 間でもっとも高い発現を示す分子の RT-PCR のシグナル値を 1 として、各領野との比を計算した。連合野 (FD $\Delta$ 、TE) で対極的な発現プロファイルを示した。連合野で高い発現を示す遺伝子 (図 2-2、1~7) は OC で低い発現を示す傾向が見られた。それに対し、1 次視覚野 (OC) でもっとも高い発現を示す遺伝子 (図 2-2、8~12) は連合野でもっとも低い発現を示すことが多かった。連合野のなかでも TE に関しては FD $\Delta$  に比べ比較的かたよりの少ない発現プロファイルを示した。FA でもっとも高い発現を示す遺伝子もあり (図 2-2、13~17) が、FD $\Delta$  や OC のような大きな偏り (4 倍以上) を示す遺伝子はなかった。



## 2-3 議論

RLCS 法で領野差のある遺伝子をスクリーニングしたことにより、領野間での遺伝子発現プロファイルの違いに傾向があることがわかった。大脳皮質領野は伝統的に連合野、運動野、感覚野と機能的に大別されてきたが、遺伝子発現の違いはこの機能領野の違いに対応し、とくに連合野と一次視覚野が相補的であることがわかった。

### 領野差のある遺伝子のスクリーニングとその展望

RLCS 法は DD 法に比べると煩雑であるが、PCR を行わないので、低い温度での任意プライマーのアニーリングによる擬陽性シグナルの増幅 (Bauer *et al.*, 1993; Guimaraes *et al.*, 1995) や発現量の高い遺伝子を増幅しやすいという偏りも生じない (Bertioli *et al.*, 1995)。エンドラベルによりシグナルの強度は発現量について定量性がある。また、原理的に一度の実験にて 1000 種類近い遺伝子やスプライシング異形体を比較することができる。このような RLCS 法を用いた実験により、領野差を示す遺伝子群を同定でき、2 つのことが推測できた。一つは領野差を示す遺伝子群は脳の遺伝子発現からみると少数であると思われることである。RLCS 法の各制限酵素セット間で得られた領野差のある遺伝子は 0~6 個でスポット全体の 1% に満たないほどであった。

二つ目は図 2-2 より各機能的領野は固有の遺伝子発現プロファイルを持ち、それらの固有性は領野機能の違いに関連している可能性である。最も相反するパターンを示したのが 1 次視覚野と前頭葉の高次連合野であった。また、視覚性連合野は同じ連合野である高次連合野と類似したパターンであった。さらに 1 次運動

野は独自のプロファイルを示していた。このような遺伝子の発現パターンの特徴意味する可能性としては、皮質の機能的な異質性には分子的な根拠が存在するかもしれないということである。神経細胞の構造や発火の制御から、神経細胞間での情報伝達に至るまで分子レベルで明らかになりつつあるなかで、異なる遺伝子発現または分子的性質を示す神経細胞が神経回路に対し異なる役割を果たしている可能性を考えることはごく自然なことと考えられる。

また、このような分子の機能的な役割の有無とは関係なく、このような遺伝子発現パターンを決定する要因は、領野特有の皮質構造の構築機構についての議論をより明瞭にするかもしれない。これは、例えば先に述べた *RBP* や *occ1* の発現パターンは生後完成することについての考察とも関わってくる。すなわち、領野決定は、発生プログラムにくみこまれているのか（生まれながらに備わっているものなのか）（nature）、環境要因によるのか（nurture）という議論に関係してくる。皮質は胎生期に転写因子や軸索誘導因子の選択的な発現が観察され、領野の原基の形成はゲノムに含まれるプログラムにしたがって形成される可能性が示めされている（Donoghue and Rakic., 1999a, b; O'Leary and Nakagawa, 2002）。また、視床から皮質への投射を断たれた変異マウスや視床からの投射以前に、そのような皮質内で局在する遺伝子発現が保たれていることが報告されている（Miyashita-Lin *et al.*, 1999; Sestan *et al.*, 2001）。これらのことは少なくとも、発生初期においては皮質の分化は発生プログラムだけでまかなわれている可能性を支持している。これに対し、生後の 1 次視覚野での眼優位性カラム形成時には、視覚入力に関係した視床の神経活動に高い感受性を示す臨界期があることが知られている。また、1 次体性感覚野を 1 次視覚野の位置に移植した場合、その

組織は1次視覚野様の振る舞いを示すようになる(O'Leary and Stanfield, 1989)。フェレット(ケナガイタチ)では生後、眼から視覚に関連する外側膝上体や上丘といった皮質下領域へ投射が行われるが、生後すぐに上丘を破壊することによって、上丘への投射は行き場を失い聴覚入力の中継神経核である内側膝上体へ迷走し、眼から1次聴覚野へ視覚情報が入力されるようになる。このとき、視覚情報を処理するための構造が1次聴覚野に出現することが報告された(Sharma *et al.*, 2000)。さらに最近では、環境に依存した神経活動ではなく、皮質内で独自に発生する神経活動に依存して皮質構造が決定されるという自己組織化の概念も提唱され(Hensch and Stryker, 2004)、皮質構造分化に関する議論は複雑さを増してきている。しかしながら、これら一連の議論や研究は発生段階や対象とする皮質構造が異なっていて、互いに矛盾するものではなく、成体の脳が正常に働くには nature、nurture の要因それぞれが不可欠であることを強調しているように見える。成体で領野差を示し、RBP や *occ1* のように領野固有の構造に対応した遺伝子の発現決定が何に起因するのかを研究することは、皮質構造決定にかかわる重要な外的・内的要素を明らかにすることにつながると期待できる。また、そのような研究からは成体の皮質機能について解剖学的観点からだけでなく分子的な拘束条件を提示していくことが出来るかもしれない。そして、実体を捕らえにくい脳の働きを分子レベルで体系的に説明できるようになり、また脳再生医療に必要な知識を提供し、その技術が進歩することを期待している。

## 図 2-1 RLCS (Restriction Landmark cDNA scanning) の原理

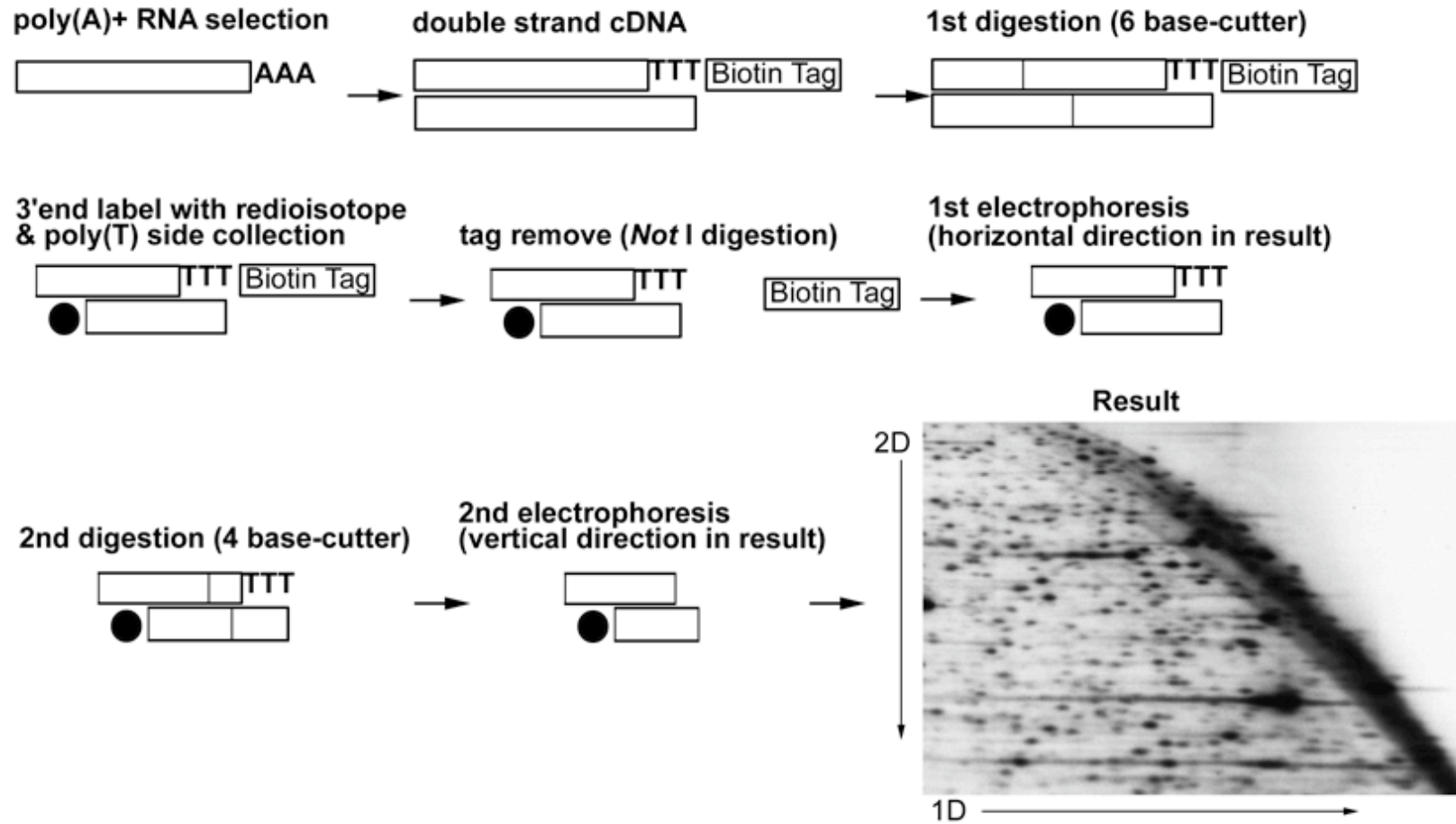
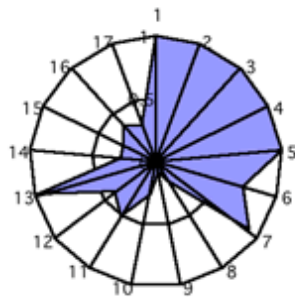


表2-1 spot cloningで用いたアダプター配列

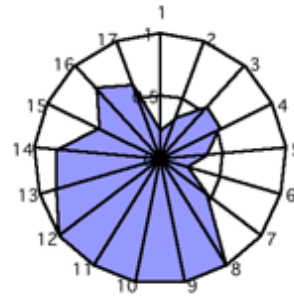
adaptor oligo for labeling side (short)	adaptor oligo for labeling side (long)	1st enzyme
5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGT3' (26)	5'ATCACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (29)	<i>Bcl</i> I
	5'ATGACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (29)	<i>Bsp</i> HI
	5'TACACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (29)	<i>Bsr</i> GI
5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGC3' (26)	5'ATTGCGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (29)	<i>Mun</i> I
5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3' (24)	5'CGGGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (27)	<i>Xma</i> I
	5'TAGGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (27)	<i>Bln</i> I
	5'GCGGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (27)	<i>Bss</i> HII
	5'GCGGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (27)	<i>Apa</i> LI
	5'ATGGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (27)	<i>Nco</i> I
5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGG3' (26)	5'GGACCGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (29)	<i>Bsp</i> EI
	5'TNACCCGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (30)	<i>Bst</i> EII
	5'GCGGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (27)	<i>Bss</i> HII
5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAG3' (24)	5'CGCCTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (27)	<i>Kas</i> I
adaptor oligo for <i>Hinf</i> I site (short)	adaptor oligo for <i>Hinf</i> I site (long)	
5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGGCGGCCGCG'	5'ANTCGCGGCCGCGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG3' (37)	

---

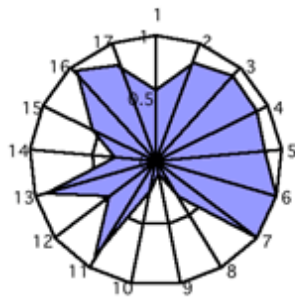
area 46



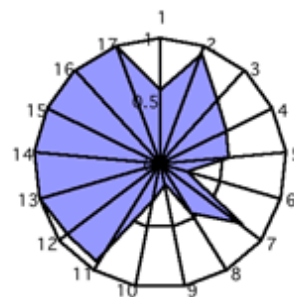
OC



TE



FA



---

図 2-2 領野ごとの遺伝子発現プロファイル

1. RC7:  $OC/46=0.21$  2. RC33:  $OC/46=0.34$  3. RC36:  $OC/46=0.55$  4. RC41:  $OC/46=0.53$   
5. RC42:  $OC/46=0.36$  6. RC16:  $OC/TE=0.21$  7. RC40:  $OC/TE=0.46$  8. RC13:  $46/OC=0.18$   
9. RC15:  $46/OC=0.08$  10. RC31:  $TE/OC=0.23$  11. RC43:  $46/OC=0.53$  12. RC66:  
 $46/OC=0.41$   
13. RC8:  $OC/FA=0.88$  14. RC14:  $46/FA=0.29$  15. RC24:  $46/FA=0.29$  16. RC35:  
 $46/FA=0.39$   
17. RC67:  $46/FA=0.29$

## 謝辞

本研究は多くの方のご指導、協力により行われました。RLCS法の技術取得には、野田昌晴教授、湯浅純一助手（基礎生物学研究所）、秋吉氏（癌研究所）にご指導賜りました。また、サルの脳の組織は小野文子博士（筑波霊長類センター）、橋爪壮先生、安部忍先生、堀江均博士、藤田氏（日本ポリオウイルス研究所）より提供して頂きました。視覚遮断実験を行ったサルの脳組織は栃谷史郎博士（NIH）より提供して頂きました。サルの脳組織を扱うにあたり、端川勉博士（理化学研究所チームリーダー）のご指導を賜りました。議論においては、Kathleen S. Rockland 博士（理化学研究所チームリーダー）に多大なる助言をいただきました。また、本研究を全体を通して、山森哲雄教授、渡我部昭哉助手の多大な助言・ご指導を賜りました。改めて深謝いたします。

## 参考文献

- Aldred AR, Brack CM, Schreiber G (1995) The cerebral expression of plasma protein genes in different species. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 111:1-15.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9:357-381.
- Applebury ML, Hargrave PA (1986) Molecular biology of the visual pigments. *Vision Res* 26:1881-1895.
- Arimatsu Y, Nihonmatsu I, Hirata K, Takiguchi-Hayashi K (1994) Cogeneration of neurons with a unique molecular phenotype in layers V and VI of widespread lateral neocortical areas in the rat. *J Neurosci* 14:2020-2031.
- Batardiere A, Barone P, Knoblauch K, Giroud P, Berland M, Dumas AM, Kennedy H (2002) Early specification of the hierarchical organization of visual cortical areas in the macaque monkey. *Cereb Cortex* 12:453-465.
- Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P, Strauss M (1993) Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res* 21:4272-4280.
- Berse B, Blusztajn JK (1995) Coordinated up-regulation of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter gene expression by the retinoic acid receptor alpha, cAMP, and leukemia inhibitory factor/ciliary neurotrophic factor signaling pathways in a murine septal cell



line. *J Biol Chem* 270:22101–22104.

Bertioli DJ, Schlichter UH, Adams MJ, Burrows PR, Steinbiss HH, Antoniow JF (1995) An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res* 23:4520–4523.

Bertram L, Blacker D, Mullin K, Keeney D, Jones J, Basu S, Yhu S, McInnis MG, Go RC, Vekrellis K, Selkoe DJ, Saunders AJ, Tanzi RE (2000) Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science* 290:2302–2303.

Blaner WS (1989) Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr Rev* 10:308–316.

Buchsbaum MS, Nenadic I, Hazlett EA, Spiegel-Cohen J, Fleischman MB, Akhavan A, Silverman JM, Siever LJ (2002) Differential metabolic rates in prefrontal and temporal Brodmann areas in schizophrenia and schizotypal personality disorder. *Schizophr Res* 54:141–150.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159.

Citver AS, Shields AM, Ciaccia LM, Schulingkamp RJ, Raffa RB (2002) Indirect modulation of dopamine D2 receptors as potential pharmacotherapy for schizophrenia: III. Retinoids. *J Clin Pharm Ther* 27:161–168.

Clagett-Dame M, Plum LA (1997) Retinoid-regulated gene expression in neural development. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 7:299–342.

Clark DA, Mitra PP, Wang SS (2001) Scalable architecture in mammalian brains.

Nature 411:189–193.

Clippingdale AB, Wade JD, Barrow CJ (2001) The amyloid-beta peptide and its role in Alzheimer's disease. J Pept Sci 7:227–249.

Cocco S, Diaz G, Stancampiano R, Diana A, Carta M, Curreli R, Sarais L, Fadda F (2002) Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. Neuroscience 115:475–482.

Connor MJ, Sidell N (1997) Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. Mol Chem Neuropathol 30:239–252.

Davidsson P, Sjogren M, Andreasen N, Lindbjer M, Nilsson CL, Westman-Brinkmalm A, Blennow K (2002a) Studies of the pathophysiological mechanisms in frontotemporal dementia by proteome analysis of CSF proteins. Brain Res Mol Brain Res 109:128–133.

Davidsson P, Westman-Brinkmalm A, Nilsson CL, Lindbjer M, Paulson L, Andreasen N, Sjogren M, Blennow K (2002b) Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients. Neuroreport 13:611–615.

De Lacalle S and Saper CB (1997) . In Handbook of chemical neuroanatomy vol. 13, The primate nervous system, part I (Bloom FE, Bjorklund A, Hokfelt T), pp. 217–262. Amsterdam–Lausanne–New York–Oxford–Shannon–Tokyo: Elsevier science.

Dickson DW (1997) The pathogenesis of senile plaques. J Neuropathol Exp Neurol 56:321–339.

Donoghue MJ, Rakic P (1999a) Molecular gradients and compartments in the embryonic primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 9:586–600.

Donoghue MJ, Rakic P (1999b) Molecular evidence for the early specification of presumptive functional domains in the embryonic primate cerebral cortex. *J Neurosci* 19:5967–5979.

Dorus S, Vallender EJ, Evans PD, Anderson JR, Gilbert SL, Mahowald M, Wyckoff GJ, Malcom CM, Lahn BT (2004) Accelerated evolution of nervous system genes in the origin of *Homo sapiens*. *Cell* 119:1027–1040.

Duan W, Schreiber G (1992) Expression of retinol-binding protein mRNA in mammalian choroid plexus. *Comp Biochem Physiol B* 101:399–406.

Duester G (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 267:4315–4324.

Duester G (2001) Genetic dissection of retinoid dehydrogenases. *Chem Biol Interact* 130–132:469–480.

Elston GN (2000) Pyramidal cells of the frontal lobe: all the more spinous to think with. *J Neurosci* 20:RC95.

Elston GN (2001) Interlaminar differences in the pyramidal cell phenotype in cortical areas 7 m and STP (the superior temporal polysensory area) of the macaque monkey. *Exp Brain Res* 138:141–152.

Elston GN, Benavides-Piccione R, DeFelipe J (2001) The pyramidal cell in cognition: a comparative study in human and monkey. *J Neurosci* 21:RC163.

Elston GN, Tweedale R, Rosa MG (1999) Cortical integration in the visual system of the macaque monkey: large-scale morphological differences in the pyramidal neurons in the occipital, parietal and temporal lobes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 266:1367–1374.

Emre M (2003) Dementia associated with Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2:229–237.

Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Pallet V, Higuieret P, Jaffard R (2003) Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav Brain Res* 145:37–49.

Felleman DJ, Van Essen DC (1991) Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 1:1–47.

Frahm HD, Stephan H, Stephan M (1982) Comparison of brain structure volumes in Insectivora and Primates. I. Neocortex. *J Hirnforsch* 23:375–389.

Fujita I, Fujita T (1996) Intrinsic Connections in the macaque inferior temporal cortex. *J Comp Neurol* 368:467–486.

Fujiyama F, Furuta T, Kaneko T (2001) Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 435:379–387.

Galter D, Carmine A, Buervenich S, Duester G, Olson L (2003) Distribution of class I, III and IV alcohol dehydrogenase mRNAs in the adult rat, mouse and human brain. *Eur J Biochem* 270:1316–1326.

Gavalas A (2002) ArRAnging the hindbrain. *Trends Neurosci* 25:61–64.

Goodman AB (1998) Three independent lines of evidence suggest retinoids as causal to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7240–7244.

Goodman AB, Pardee AB (2003) Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2901–2905.

Goodman DS (1980) Plasma retinol-binding protein. *Ann N Y Acad Sci* 348:378–390.

Goodman DS (1984) Vitamin A and retinoids in health and disease. *N Engl J Med* 310:1023–1031.

Gudas LJ, Sporn MB, Roberts AB (1994) Cellular biology and biochemistry of the retinoids In: *The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*, 2nd (Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS), pp.443–520. New York: Raven Press.

Guimaraes MJ, Lee F, Zlotnik A, McClanahan T (1995) Differential display by PCR: novel findings and applications. *Nucleic Acids Res* 23:1832–1833.

Haskell GT, Maynard TM, Shatzmiller, Lamantia A-S (2002) Retinoic acid signaling at sites of plasticity in the mature central nervous system. *J Comp Neurol* 452:228–241.

Hendry SH, Hockfield S, Jones EG, McKay R (1984) Monoclonal antibody that identifies subsets of neurones in the central visual system of monkey and cat. *Nature* 307:267–269.

Hensch TK, Stryker MP (2004) Columnar architecture sculpted by GABA circuits in developing cat visual cortex. *Science* 303:1678–1681.

Hofman MA (1989) On the evolution and geometry of the brain in mammals. *Progress in Neurobiol* 32:137–158.

Jones EG, Dell'Anna ME, Molinari M, Rausell E, Hashikawa T (1995) Subdivisions of macaque monkey auditory cortex revealed by calcium-binding protein immunoreactivity. *J Comp Neurol* 362:153–170.

Jones EG, Woods TM, Manger PR (2002) Adaptive responses of monkey somatosensory cortex to peripheral and central deafferentation. *Neuroscience* 111:775–797.

Kar S and Quirion R (2004) Amyloid  $\beta$  peptides and central cholinergic neurons: function and interrelationship and relevance to Alzheimer's disease pathology. In: *Progress in Brain Research* 145, Acetylcholine in the cerebral cortex (Descarries L, Krnjevic K, Steriade M, ed), pp.261–274. Amsterdam–Boston–Heidelberg: Elsevier B.V.

Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133–1138.

Kondo H, Tanaka K, Hashikawa T, Jones EG (1999) Neurochemical gradients along monkey sensory cortical pathways: calbindin-immunoreactive pyramidal neurons in layers II and III. *Eur J Neurosci* 11:4197–4203.

Krezel W, Kastner P, Chambon P (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience*

89:1291–1300.

Kurachi M (2003) Pathogenesis of schizophrenia: Part I. Symptomatology, cognitive characteristics and brain morphology. *Psychiatry Clin Neurosci* 57:3–8.

LaMantia AS, Colbert MC, Linney E (1993) Retinoic acid induction and regional differentiation prefigure olfactory pathway formation in the mammalian forebrain. *Neuron* 10:1035–1048.

Laurent A, Goaillard JM, Cases O, Lebrand C, Gaspar P, Ropert N (2002) Activity-dependent presynaptic effect of serotonin 1B receptors on the somatosensory thalamocortical transmission in neonatal mice. *J Neurosci* 22:886–900.

Levitt P (1984) A monoclonal antibody to limbic system neurons. *Science* 223:299–301.

Lewis ME, Mishkin M, Bragin E, Brown RM, Pert CB, Pert A (1981) Opiate receptor gradients in monkey cerebral cortex: correspondence with sensory processing hierarchies. *Science* 211:1166–1169.

Liang F, Hatanaka Y, Saito H, Yamamori T, Hashikawa T (2000) Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor-1a and -1b mRNA variants in GABA and non-GABAergic neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* 416:475–495.

Lund JS, Hendrickson AE, Ogren MP, Tobin EA (1981) Anatomical organization of primate visual cortex area VII. *J Comp Neurol* 202:19–45.

Malik MA, Blusztajn JK, Greenwood CE (2000a) Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid. *J Nutr Biochem* 11:2-13.

Malik MA, Greenwood CE, Blusztajn JK, Berse B (2000b) Cholinergic differentiation triggered by blocking cell proliferation and treatment with all-trans-retinoic acid. *Brain Res* 874:178-185.

Marillat V, Cases O, Nguyen-Ba-Charvet KT, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chedotal A (2002) Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol* 442:130-155.

Maury CP, Teppo AM (1987) Immunodetection of protein composition in cerebral amyloid extracts in Alzheimer's disease: enrichment of retinol-binding protein. *J Neurol Sci* 80:221-228.

Mayumi K, Yaoi T, Kawai J, Kojima S, Watanabe S, Suzuki H (1998) Improved restriction landmark cDNA scanning and its application to global analysis of genes regulated by nerve growth factor in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 1399:10-18.

Middleton FA, Mirnics K, Pierri JN, Lewis DA, Levitt P (2002) Gene expression profiling reveals alterations of specific metabolic pathways in schizophrenia. *J Neurosci* 22:2718-2729.

Misner DL, Jacobs S, Shimizu Y, de Urquiza AM, Solomin L, Perlmann T, De Luca LM, Stevens CF, Evans RM (2001) Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S*



A 98:11714–11719.

Morel A, Garraghty PE, Kaas JH (1993) Tonotopic organization, architectonic fields, and connections of auditory cortex in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 335:437–459.

Mourey MS, Quadro L, Panariello L, Colantuoni V (1994) Retinoids regulate expression of the retinol-binding protein gene in hepatoma cells in culture. *J Cell Physiol* 160:596–602.

Miyashita-Lin EM, Hevner R, Wassarman KM, Martinez S, Rubenstein JL (1999) Early neocortical regionalization in the absence of thalamic innervation. *Science* 285:906–909.

O'Leary DD, Stanfield BB (1989) Selective elimination of axons extended by developing cortical neurons is dependent on regional locale: experiments utilizing fetal cortical transplants. *J Neurosci* 9:2230–2246.

O'Leary DD (1989) Do cortical areas emerge from a protocortex? *Trends Neurosci* 12:400–406.

O'Leary DD, Nakagawa Y (2002) Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex. *Curr Opin Neurobiol* 12:14–25.

Ong DE (1994) Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr Rev* 52:S24–31.

Panariello L, Quadro L, Trematerra S, Colantuoni V (1996) Identification of a novel retinoic acid response element in the promoter region of the

retinol-binding protein gene. *J Biol Chem* 271:25524–25532.

Pasterkamp RJ, Peschon JJ, Spriggs MK, Kolodkin AL (2003) Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* 424:398–405.

Pedersen WA, Berse B, Schuler U, Wainer BH, Blusztajn JK (1995) All-trans- and 9-cis-retinoic acid enhance the cholinergic properties of a murine septal cell line: evidence that the effects are mediated by activation of retinoic acid receptor- $\alpha$ . *J Neurochem* 65:50–58.

Preuss TM, Caceres M, Oldham MC, Geschwind DH (2004) Human brain evolution: insights from microarrays. *Nat Rev Genet* 5:850–860.

Puchades M, Hansson SF, Nilsson CL, Andreasen N, Blennow K, Davidsson P (2003) Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 118:140–146.

Rakic P (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241:170–176.

Rockland KS, Pandya DN (1979) Laminar origins and terminations of cortical connections of the occipital lobe in the rhesus monkey. *Brain Res* 179:3–20.

Rockland KS, Saleem KS, Tanaka K (1994) Divergent feedback connections from areas V4 and TE0 in the macaque. *Vis Neurosci* 11:579–600.

Rusch J, Van Vactor D (2000) New Roundabouts send axons into the Fas lane. *Neuron* 28:637–640.

Sestan N, Rakic P, Donoghue MJ (2001) Independent parcellation of the embryonic visual cortex and thalamus revealed by combinatorial Eph/ephrin gene expression. *Curr Biol* 11:39–43.

Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741–766.

Sharma J, Angelucci A, Sur M (2000) Induction of visual orientation modules in auditory cortex. *Nature* 404:841–847.

Shintani T, Kato A, Yuasa-Kawada J, Sakuta H, Takahashi M, Suzuki R, Ohkawara T, Takahashi H, Noda M (2004) Large-scale identification and characterization of genes with asymmetric expression patterns in the developing chick retina. *J Neurobiol* 59:34–47.

Shipp S, Zeki S (2002) The functional organization of area V2, I: specialization across stripes and layers. *Vis Neurosci* 19:187–210.

Smith D, Wagner E, Koul O, McCaffery P, Drager UC (2001) Retinoic acid synthesis for the developing telencephalon. *Cereb Cortex* 11:894–905.

Simpson JH, Kidd T, Bland KS, Goodman CS (2000) Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* 28:753–766.

Stefanacci L, Amaral DG (2002) Some observations on cortical inputs to the macaque monkey amygdala: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol* 451:301–323.

Stephan H, Frahm H, Baron G (1981) New and revised data on volumes of brain structures in insectivores and primates. *Folia Primatol* 35:1–29.

Steriade M, Jones EG, McCormick DA (1997) *Thalamus, volume I*. Amsterdam–Lausanne–New York–Oxford–Shannon–Tokyo: Elsevier Science.

Tochitani S, Hashikawa T, Yamamori T (2003) Expression of *occ1* mRNA in the visual cortex during postnatal development in macaques. *Neurosci Lett* 337:114–116.

Tochitani S, Liang F, Watakabe A, Hashikawa T, Yamamori T (2001) The *occ1* gene is preferentially expressed in the primary visual cortex in an activity-dependent manner: a pattern of gene expression related to the cytoarchitectonic area in adult macaque neocortex. *Eur J Neurosci* 13:297–307.

Von Bonin G, Bailey P (1947) The neocortex of *Macaca mulatta*. In: Illinois monographs in the medial sciences (Allen RB, Kampmeier OF, Schour I, Serles ER, eds), pp 1–163. Urbana, IL: The University of Illinois Press.

Wagner E, Luo T, Drager UC (2002) Retinoic acid synthesis in the postnatal mouse brain marks distinct developmental stages and functional systems. *Cereb Cortex* 12:1244–1253.

Watakabe A, Fujita H, Hayashi M, Yamamori T (2001) Growth/differentiation factor 7 is preferentially expressed in the primary motor area of the monkey neocortex. *J Neurochem* 76:1455–1464.

Webster MJ, Bachevalier J, Ungerleider LG (1993) Subcortical connections of inferior temporal areas TE and TEO in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 335:73–91.

Weiberger DR and Berman KF (1998) Prefrontal function in schizophrenia: confounds and controversies. In: *The prefrontal cortex* (Roberts AC, Robbins TW, Weiskrantz L, ed), pp. 165–180. Oxford–New York: Oxford University Press.

Wisniewski T, Ghiso J, Frangione B (1997) Biology of A beta amyloid in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 4:313-328.

Wong-Riley M (1979) Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res* 171:11-28.

Wong-Riley MT (1989) Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12:94-101.

Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y (1999) Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400:331-336.

Yeterian EH, Pandya DN (1994) Laminar origin of striatal and thalamic projections of the prefrontal cortex in rhesus monkeys. *Exp Brain Res* 99:383-398.

Yoshikawa Y, Mukai H, Asada K, Hino F, Kato I (1998) Differential display with carboxy-X-rhodamine-labeled primers and the selection of differentially amplified cDNA fragments without cloning. *Anal Biochem* 256:82-91.

Yoshioka T, Levitt JB, Lund JS (1992) Intrinsic lattice connections of macaque monkey visual cortical area V4. *J Neurosci* 12:2785-2802.

Zetterstrom RH, Lindqvist E, Mata de Urquiza A, Tomac A, Eriksson U, Perlmann T, Olson L (1999) Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci* 11:407-416.