

研究報告書

「脳の左右非対称性形成機構とその生理学的意義の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 竹林 浩秀

1. 研究のねらい

脳の機能に左右差（ラテラルティイー）があることが知られている。例えば、ほとんどのヒトの利き手は右手であり、さらに、言語を司る領域（ブローカ野やウエルニッケ野）が脳の左半球に存在する。脳の左右非対称性について、最も詳細に調べられているのは、ゼブラフィッシュを用いた間脳背側の手綱核の非対称性の形成機構である。しかし、ほ乳動物における脳左右非対称性とその形成メカニズムについては、あまり良く知られていない。本研究は、新規の脳左右差を可視化する遺伝子改変マウスや、マウス利き手テストなどの脳左右差検出法を用いて、脳左右差形成メカニズムや、その意義について明らかにする事を目指している。

2. 研究成果

研究の具体的成果について、概要と詳細に分けて2～3ページ程度でまとめてください。図、表、写真等を含めても構いません。「5. 主な研究成果リスト」を参照してください。公開項目です。

(1) 概要

本研究では、我々が作製した新規の脳左右差を可視化する遺伝子改変マウス（Tg144 トランスジェニックマウス）とマウス利き手テストを用いて、脳の左右非対称性の形成機構について研究を行った。まず、脳左右差可視化マウスの組織学的、そして、挿入遺伝子座の解析を行った。これらの解析により、トランスジーンの左右非対称性発現が左右ランダムに起こる事、挿入遺伝子座の近傍配列の同定、トランスジーン発現制御において DNA メチル化がプロモーター活性の抑制に関わることを明らかにした。また、マウスの掛け合わせによる遺伝学的な実験やマウス利き手テストにより、体の左右軸形成やマウス利き手と Tg144 マウスのトランスジーン脳左右非対称性発現は、異なるメカニズムによるものであることが明らかとなった。Tg144 トランスジーン発現は、これまで知られている海馬シナプスにおける脳左右差とも異なり、新たな脳左右差を可視化していると考えられる。

(2) 詳細

1) 脳の左右差を検出する新たな Tg144 トランスジェニックマウス

我々は、Cre 組換え酵素による DNA 組換えを検出するレポーターマウスを作製する過程で、トランスジーンより *lacZ* 遺伝子を脳の左右非対称に発現するマウス (Tg144 マウス) を見出した。Tg144 マウスの脳における左右非対称性発現は、海馬を始め、大脳皮質、視床など、脳のさまざまな部位で左右差発現が観察される (図 1)。Tg144 のトランスジーン発現は、X-gal 染色で簡便に検出することが可能である。この Tg144 トランスジーンは、本来、全身の細胞で発現するプロモーターを使用しており、挿入された遺伝子座のポジショナル効果により、この左右非対称性発現が起こっていることが考えられる。興味深いことに、この Tg144 マウスでは、左脳に強い発現の見られる左脳優位型個体と右脳に強い発現の見られる右脳優位型個体がおよそ 1 対 1 の確率で出現した。この左右非対称性発現は、同じ親由来のトランスジーンをもつマウスにおいて調べてみると、やはり、左脳優位マウス、右脳優位マウスが観察された。この結果より、トランスジーン発現が、エピジェネティックな影響を受けていることが考えられる。実際、脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) を妊娠マウスに投与して、出生直後のマウスで X-gal 陽性細胞を組織学的に観察すると、脱メチル化剤投与により出現する X-gal 強陽性の細胞が脳内に散在することが確認され、メチル化によりトランスジーン発現が抑制されていることが示唆された。トランスジーン挿入部位を FISH 法により調べると、マウス 17 番染色体に挿入されていることがわかった。さらに、inverse PCR 法によりトランスジーン挿入部位の 5' -, 3' -flanking 領域の DNA 配列を同定し、正確な挿入ゲノム遺伝子座の同定を行うことができた。

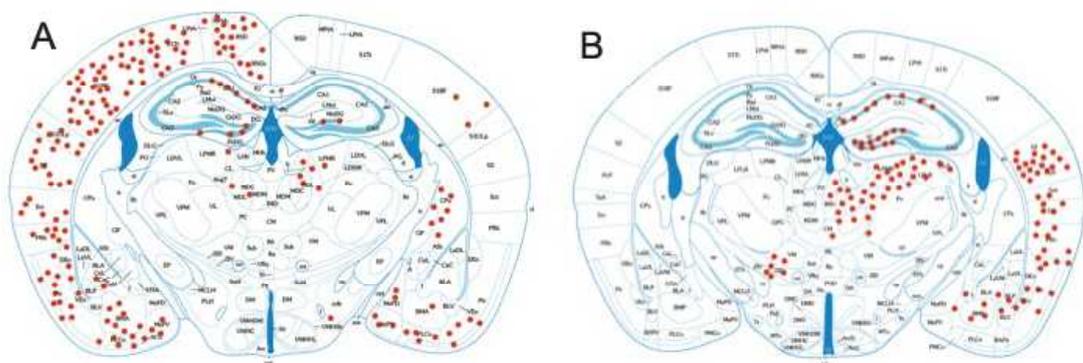


図1 Tg144トランスジェニックマウス脳の前額断切片における X-gal 染色像
右脳優位タイプ(A)、左脳優位タイプ(B)のトランスジーン発現パターンを示す個体例。海馬、大脳皮質などで左右非対称な X-gal 染色(赤いドットで表示)が見られる。

2) マウスの利き手と脳左右非対称性

マウスには、利き手があり、右利きマウスと左利きマウスがおよそ 1 対 1 の確率で出現することが知られている。マウスの利き手テストである Collins test にて、利き手と Tg144 トランスジーン発現を比較した。現在までに、Tg144 トランスジーン発現の左右非対称性発現とマウス利き手の間には、明らかな相関がみられていない。大脳の交連線

維（脳梁、前交連）に異常のある *Draxin* ノックアウトマウスで利き手テストを行ったところ、*Draxin* ノックアウトマウスは、右利きマウスの割合が増加していることがわかった。本実験結果は、脳梁や前交連などの大脳の交連線維が、利き手形成に関わることを示唆する。

3) 神経活動を検出する活動依存性 *in situ* hybridization プローブの作製

Tg144 マウスのトランスジーン発現と神経活動の関連を調べるために、神経活動を組織学的に検出する *in situ* hybridization プローブ・セットを作製した。匂い刺激により神経活動依存性に一過性に発現誘導され、コントロールとの差を検出できる約 10 個の遺伝子プローブを同定することができた。これらの中には、*c-fos*, *Arc*, *Npas4* などの最初期遺伝子群 (immediate early genes) が含まれており、刺激終了後 1 時間経過するとベースラインレベルまで発現量が減少する。光遺伝学 (オプトジェネティクス) の手法を用いて、線条体の中型有棘神経細胞 (Medium Spiny Neuron) を光刺激し神経活動を検出する場合には、*Npas4* が最も優れているプローブであることも見いだした。活動した神経細胞を組織学的に検出するために適したプローブ・セットを作製できた。これらの神経活動依存性 *in situ* hybridization プローブを用いて、利き手テストの際に、左右非対称的に活動している部位を検索し、その候補部位を同定することができた。

4) 体の左右軸と脳の非対称性

iv マウスは、モータータンパクをコードするダイニン遺伝子 (*Dnah5*) の遺伝子変異をもつミュータントマウスで、iv ホモマウスでは繊毛の異常があり、体の左右軸がランダム化して約半数の個体で内臓逆位が起こることが知られている。しかも、iv ホモマウスの脳では、海馬 CA1 錐体細胞シナプスにおける NMDA 受容体サブユニット NR2B の左右非対称分布が両方とも右脳タイプになることが報告されている。そこで、iv マウスと Tg144 マウス掛け合わせてトランスジーンの左右差発現の解析を行った。その結果、iv ホモマウスにおいても Tg144 トランスジーンの左右差発現は観察された。つまり、海馬シナプスの左右非対称性の結果と比べると、脳には複数のタイプの左右差が存在すること、そして、Tg144 トランスジーンの左右非対称発現は内臓の正位、逆位に関わらないことが判明した。

3. 今後の展開

Tg144 トランスジェニックマウスの発見と確立により、脳の左右非対称性を組織学的に簡便に検出することが可能となった。さらに、これまで報告されていたマウス脳における海馬 CA1 錐体細胞シナプスの左右非対称に加えて、個体によって左右のばらつきのある、新たな左右非対称性があること明らかとなった。最近では、ゼブラフィッシュ嗅覚系の神経回路の左右非対称性についても報告されており、本プロジェクトと同様に遺伝子発現をマーカーとして脳の左右差を調べるアプローチが用いられている。Tg144 マウスの解析を追究することでこの新たな脳左右差の形成機構と存在の意義が明らかになると考えられる。脳左右差の異常は、自閉症や統合失調症などの精神疾患に関わる可能性があることが示唆されており、さまざまなアプローチによる脳左右差研究を通じて、

脳の動作原理の理解とその異常による病態の理解と治療法開発へとつなげたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)さきがけ研究期間で得られた研究成果が、研究のねらいに対してどのように位置づけられるか、研究者自身の評価を簡潔にまとめてください。公開項目です。

本研究課題を進めるに従って、Tg144 マウスのトランスジーン発現の脳非対称発現は、体の左右軸形成や利き手とは独立の現象であり、当初想定していたよりは、複雑なものであることが明らかとなった。脳の左右差の機能的な意義を理解するためには、マウスに加えて他の動物種の脳も対象として調べる必要があり、本研究プロジェクトは現在も発展段階にある。本研究課題の研究期間内に、熊本大学から新潟大学に異動して新たな環境で研究を推進する事になったが、マウス脳の左右差の解析に必要な研究ツールを開発し、多くの研究シーズを得る事ができたと考えている。

(2) 研究総括評価

本研究は竹林研究者が先に偶然発見した左右非対称にトランスジーンを発現する Tg144 トランスジェニックマウスを解析することにより、脳左右差の未知の側面を抉り出そうとしたものである。脳組織学的解析ではトランスジーン発現が左右ランダムに起こり脱メチル化剤の影響を受けることなどを示した。さらに挿入遺伝子座の解析を完成させ、また利き手テストによる行動解析ならびに体左右軸に関わる iv 変異との関係解析も行い、Tg144 左右非対称発現はこれらとは独立の現象であることを明らかにした。本研究で開発した活動依存性ハイブリプロープにより今後この発現左右差の機能的意義に手掛かりが得られることが望まれる。長期的な視点でこの不思議な現象に取り組み、その意義が急転解明される時が来ると期待されるが、そのためにもこれまでの知見を記載報告し、またリソースを公共化することが望ましい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Bepari AK, Watanabe K, Yamaguchi M, Tamamaki N, Takebayashi H. Visualization of odor-induced neuronal activity by immediate early gene expression. *BMC Neuroscience* 13: 140, 2012.
2. Bepari AK, Sano H, Tamamaki N, Nambu A, Tanaka KF, Takebayashi H. Identification of optogenetically activated striatal medium spiny neurons by Npas4 expression. *PLoS ONE* 7: e52783, 2012.
3. Watanabe K, Takebayashi H, Bepari AK, Esumi S, Yanagawa Y, Tamamaki N. Dpy19l1, a multi-transmembrane protein, regulates radial migration of glutamatergic neurons in the developing cerebral cortex. *Development* 138: 4979-4990, 2011.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な学会発表

活動依存的遺伝子群の in situ hybridization プローブの作製と脳の左右非対称性研究への応用

竹林浩秀

第89回日本生理学会大会 2012年3月31日

胎児期脳発生と生後脳発達について

竹林浩秀

第42回 新潟神経科学 夏期セミナー 2012年8月3-5日

Npas4 mRNA expression can trace photoactivation of striatal medium spiny neurons at the cellular level

竹林浩秀、ベパリ アシム、佐野裕美、玉巻伸章、南部篤、田中謙二

第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 香川 2013年3月30日

受賞

平成23年2月21日 熊本医学会奨励賞

平成23年5月30日 熊本大学 研究活動表彰