

大脳皮質サブプレート領域の発現遺伝子プロファイリングとてんかん遺伝子の探索

●豊岡 和人

大阪市立大学・大学院医学研究科・細胞機能制御学

〈研究の目的と進め方〉

私はMiller-Dieker症候群の原因遺伝子の解明を試み、Nudelの結合分子として14-3-3eを発見した。14-3-3eノックアウトマウスの大脳皮質ではサブプレートと呼ばれる特殊な構造に異常が認められ、サブプレート領域が神経細胞の遊走に重要であることが示唆された。更に大脳皮質の形成異常を示すCdk5,p35などのノックアウトマウスでも同様な異常が見られる。以上のように発生過程において一過性に出現するサブプレート領域が脳の高度な機能を発揮するために重要であることが明らかになりつつある。そこで私はサブプレート領域で神経細胞の運命決定に重要な遺伝子の単離・解析を行うことを計画した。

〈研究開始時の研究計画〉

まず始めに神経細胞の運命の決定に重要な役割を担っている大脳皮質のサブプレート領域をブタの脳から単離する。そして得られた細胞からcDNAを作成してマイクロアレイ法等を用いて発現遺伝子の網羅的なプロファイリングを行う。またサブプレート領域の取得には高度な技術が必要であるが、マウスの大脳皮質サブプレート領域の採取も行う。正常マウスと神経細胞遊走に異常をきたすノックアウトマウスのサブプレート領域の細胞からmRNAを調整し、サブトラクション法によって発現様式に差がある遺伝子に関してcDNAを作製してマイクロアレイ解析を行う。この解析によって神経細胞遊走の運命決定に関与する遺伝子を効率よく同定できる。

得られた遺伝情報をマウスのcDNAのデータベースを活用して解析する。この作業によって既知の遺伝子、新規遺伝子、また興味深い配列やドメインを持つ遺伝子を整理する。そしてこの情報に基づいて今回得られた結果をデータベース化することで当該研究領域に成果を還元する。我々は20,000以上のcDNAを保有しておりこのcDNAを利用することによって遺伝子機能の解析を効率よく行うことができる。

〈研究期間の成果〉

データベース等の整備が進んでいることなど以後の解析を考慮して、まず始めにマウス脳を用いてサブプレート領域の切り出しを試みた。しかしマウスの脳は非常に小さく、大脳皮質の階層構造の境界が不明瞭であるので特異性の高いサブプレート領域の取得は困難であった。そこで当初の計画のとおりブタ脳を用いてサブプレート領域の切り出しを行った。現在、これらの細胞からcDNAの作成を行いつつあるところである。

〈国内外での成果の位置づけ〉

神経細胞の運命決定に関して現在行われている研究は如何なるシグナルを受けて神経細胞が決まった位置で停止するのかと言う観点から行われており、この考え方を裏付けるように停止シグナルをもたらすとされるいくつかの分子が同定されている。しかしながら、私はこれまでに我々が明らかにした結果をふまえ、神経細胞の遊走

開始地点に近い部分に形成され、かつ神経細胞の遊走が盛んな一時期のみに見られるサブプレートという特殊な構造体に着目した。すなわち神経細胞が遊走を開始してすぐにサブプレート領域において神経細胞が何らかの養育を受けているのではないかという考えである。この考えに着目した研究・報告はこれまでにほとんどなされていない。我々の研究計画を遂行すれば、大脳皮質における神経細胞の遊走に関与する遺伝子群を解明することができ、大脳皮質における神経細胞の遊走のメカニズム解明という重要な課題において大きな一歩を踏み出すことになる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

我々はマウス脳では大脳皮質の層構造が不明瞭であることからブタ脳を用いて解析することにした。しかしながら、すでに存在するマウスに関するデータベース等は今後の解析において非常に有用である。そこでまず始めにマウス脳を用いて解析することを試みた。しかしながら発生過程において一過性にしか出現しないサブプレート領域を切り出すことは非常に困難であった。一方、ブタ脳においてもサブプレート領域の特異的な切り出しは予想以上に困難であった。また、ブタの抗原に反応する抗体の情報も少なく、サブプレート領域を同定するためのマーカー分子に対する抗体の入手が予想外に困難であった。

今後は入手可能な抗体のブタ抗原に対する反応性の検討とブタ抗原を用いたマーカー分子に対する抗体の作成も検討して、さらに高度に精製された正確なサブプレート領域の採取を目指す。

〈今後の課題〉

今後は更に高度に精製されたサブプレート領域の採取完了をめざすと共に、cDNAを早期に作成しマイクロアレイ法を用いた大脳皮質サブプレート領域における網羅的な遺伝子発現プロファイリングを行う。そのためにいくつかのマーカー分子に対する抗体を用いて採取したサブプレート領域の染色を行うことによってその特異性を向上させる。一方、入手可能なサブプレート領域のマーカー分子に対する抗体についてブタ抗原に反応するのか否かの情報が乏しいため、これら抗体がブタ抗原に反応するのか否かの確認を引き続き行う。この情報を基に高度に精製されたサブプレート領域の採取を行い、得られる解析結果の精度及び特異性の向上をめざす。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

該当なし