

## 脊椎動物中枢神経系ニューロン後期発生機構の包括的解析

●東島 眞一

自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター

### <研究の目的と進め方>

脊椎動物の脊髄神経細胞の多様性形成は、転写因子の発現の違いによってもたらされると考えられている。マウスなどの研究により脊髄を色分けするかのように様々な転写因子が発現する事が明らかにされてきているが、各転写因子で規定される神経細胞の形態、特性、および回路網に関しては、極めて知見が乏しい。本研究では、このような状況の突破口となるべく、ゼブラフィッシュを用いて脊髄神経細胞後期発生の包括的な理解を目指す。魚を使う利点として、胚が透明であり、回路網が単純である事に加え、迅速にトランスジェニックフィッシュが作製できるようになった事が挙げられる。というのも、ゲノム環境が整備され、それに伴い申請者によって手法が確立されてきた事に因るところが大きい。脊髄で発現する多くの転写因子を取り上げ、その陽性細胞をトランスジェニックの手法により蛍光タンパクで可視化する。加えてCre-loxPのシステムを利用し、細胞系譜特異的なラベリングを進める事で、後期過程の全容の解明を目指す。また、魚ではモルフォリノによる機能破壊の実験が容易に行えるという利点を活かし、各転写因子の機能阻害胚の観察により遺伝子の機能にも迫る。本研究は、モデル生物小型魚類を用い、ゲノム情報とそれに付随するリソースをフル活用して、これまで逐次的にのみ解析されてきた課題に対して、体系的解析の1つの方法論を提示するものである。

### <2008年度の研究の当初計画>

発生期の脊髄において、神経前駆体細胞、および神経細胞の一部で発現する転写因子に関して、その陽性細胞で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックフィッシュを作製する。GFPだけでなく、DsRedを組み込んだものも作製する。また、転写因子の発現は一過的なので、より長期にわたるGFPの発現を促すため、組み換え酵素Creを発現するラインも作製して、細胞系譜特異的に後期まで蛍光タンパクでラベルすることができるようにする。そのシステムについてはすでに確立している。各トランスジェニックフィッシュについて、GFP陽性の神経細胞の形態を解析する。ゼブラフィッシュ幼魚は透明であるため、共焦点顕微鏡を用いることにより高精度の解析が可能である。軸索の走行だけでなく、神経伝達物質特性も解析する。すでに、グリシン作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロンでGFPを発現するトランスジェニックフィッシュを作製している。これにより、掛け合わせで神経伝達物質特性を明らかにすることができる。つぎに、2種の転写因子で、お互いの関係はどうなっているのか（オーバーラップがあるのか、含まれるのか、排他的か）を、色の異なる2つのトランスジェニックフィッシュラインを掛け合わせることで調べる。本研究により、転写因子による、脊椎動物の脊髄神経細胞多様性形成機構、および、脊髄神経の後期発生に関する

理解レベルは、今までとは次元の違うレベルにまで引き上げられるものと期待できる。

### <2008年度の成果>

BACトランスジェニック法により、すでに複数のトランスジェニックフィッシュを作製し、脊髄神経発生の解剖学的記載をシステムティックに進めつつある。すでに作製済みのトランスジェニックフィッシュに関して、それに対応する遺伝子は以下の通り。atoh1a, barh1, gsh1, gsh2, dbx1, pax6, alx, vsx1, gata3, scl, nkx2.1, glyt2, vglut2a。また、Cre-loxPシステムにより、2つのプロモーターの活性の重なる細胞群でのみ神経細胞をラベルできるシステムを導入済みで、より詳細な解析を進めつつある。

また、vsx1を発現する神経細胞に対して、発生機構に関する研究を行い、vsx1陽性細胞はその最終分裂で2つの異なるタイプの神経細胞を生み出すことを明らかにした。本研究は、脊椎動物の中枢神経系において、1つの神経前駆体細胞から非対称分裂により2つの異なるタイプのニューロンが再現的に生じることを示す初めての例である。哺乳類脳形成においても、1つの前駆体細胞によりニューロンペアを産生する例が知られている。そこにおいても、本研究で示されたように、2つの異なるタイプのニューロンが生じる機構が存在するかもしれない。本研究は、本年度に論文発表された（成果公表リスト1）

### <国内外での成果の位置づけ>

ゼブラフィッシュを用いた脊髄神経細胞の分化機構の解析、神経回路網の機能解析については、国内外で第一人者としての地位を築いている。より研究者人口の多いマウスを用いた研究とは相補的な関係にあり、我々の研究成果が、マウスを用いた研究を進める上でいろいろな面で指針となっている。

### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

予定よりも研究の進展のスピードが若干遅い。そのもっとも大きな理由は、研究所に所属している関係上、施設は充実しているが、マンパワーが不足している点が挙げられる。人材をリクルートして、よりスピーディーに解析を進める必要を感じている。

### <今後の課題>

腹側の神経細胞の分化についてはかなりの部分明らかになってきている。今後は、背中側の神経細胞の分化に関しても研究を順次進めていく。また、解剖学的知見は順調に増加しているものの、遺伝子産物の機能を問う実験はまだあまり進んでいないので、今後は、モルフォリノを用いた機能阻害の実験も順次進めていく予定である。

<成果公表リスト>

1) 論文／プロシーディング

1. 0812191432

Kimura, Y., Satou, C., and Higashijima, S. (2008). V2a and V2b neurons are generated by the final divisions of pair-producing progenitors in the zebrafish spinal cord. *Development* 135, 3001-3005. [PMID: 18684740](#)

2. 0805061052

McLean, D.L., Fan, J., Higashijima, S., Hale, M.E., and \*Fetcho, J.R. A topographic map of recruitment in spinal cord. *Nature*. 2007, 446:71-5 [PMID: 17330042](#)

3. 0805061101

Kimura, Y., Okamura, Y., and \*Higashijima, S. *alx*, a zebrafish homolog of *Chx10*, marks ipsilateral descending excitatory interneurons that participate in the regulation of spinal locomotor circuits. *J. Neuroscience*. 2006, 26:5684-5697 [PMID: 16723525](#)