

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に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、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機構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、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。

<研究開始時の研究計画>

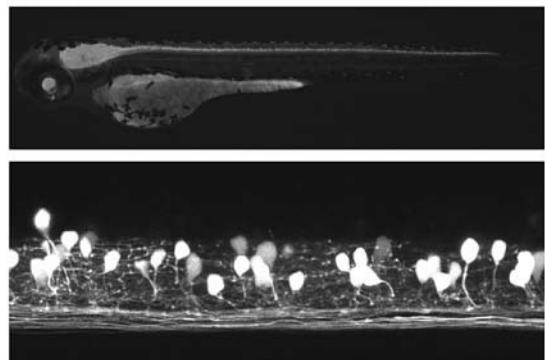
発生期の脊髄において、神経前駆体細胞、および神経細胞の一部で発現する転写因子に関して、その陽性細胞で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックフィッシュを作製する。GFPだけでなく、DsRedを組み込んだものも作製する。また、転写因子の発現は一過的なもので、より長期にわたる GFP の発現を促すため、組み換え酵素 Cre を発現するラインも作製して、細胞系譜特異的に後期まで蛍光タンパクでラベルすることができるようにする。そのシステムについてはすでに確立している。各トランスジェニックフィッシュについて、GFP 陽性の神経細胞の形態を解析する。ゼブラフィッシュ幼魚は透明であるため、共焦点顕微鏡を用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。

<研究期間の成果>

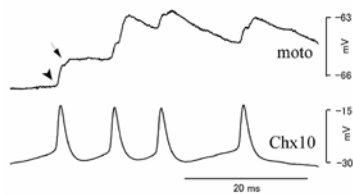
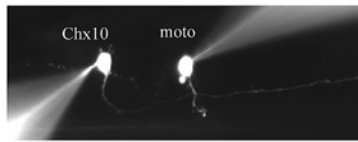
BAC トランスジェニック法により、多くのトランスジェニックフィッシュを作製し、脊髄神経発生機構の解剖学的記載をシステムティックに進めた。作製したトランスジェニックフィッシュに関して、それに対応する遺伝子は以下の通り。atoh1a, barh1, gsh1, gsh2, ngn1, dbx1, pax6, alx, vsx1, gata3, scl, nkx2.2, glyt2, vglut2。上記の遺伝子のうち半数程度については、GFP ラインだけでなく、DsRed ライン、および Cre ラインにも作製した。

glyt2, vglut2a の両遺伝子の発現は、神経細胞の神経伝達物質特性に関係する（それぞれ、グリシン作動性ニューロンとグルタミン酸作動性ニューロンに対応する）。これにより、他のトランスジェニックフィッシュとの、掛け合わせのみで神経細胞の神経伝達物質特性を調べることが可能な系を構築することに成功した。また、glyt2, vglut2 両遺伝子とも、DsRed ラインは DsRed が2つの loxP サイトでサンドイッチされていて、その下流に GFP が配置されている。したがって、Cre を作用させることにより、特定の遺伝子を発現する細胞から由来する神経細胞を後期にまでラベルすることが可能になった。たとえば、glyt2:loxP-DsRed-loxP-GFP ラインと dbx1:Cre ラインを掛け合わせることで、dbx1 発現細胞から由来するグリシン作動性ニューロンをラベルすることができる。

上記の多くのトランスジェニックフィッシュを利用して、脊髄神経細胞の発生機構、回路網形成機構をシステムティックに進めた。その中でも、解剖学的、および神経回路網としての詳しい解析は Chx10 を中心に行った。その結果、Chx10 陽性細胞はすべて同側下行性神経細胞であり、またグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞であることを明らかにした。他の転写因子との関係では Chx10 陽性細胞はすべて Vsx1 陽性細胞に含まれることが明らかとなった。

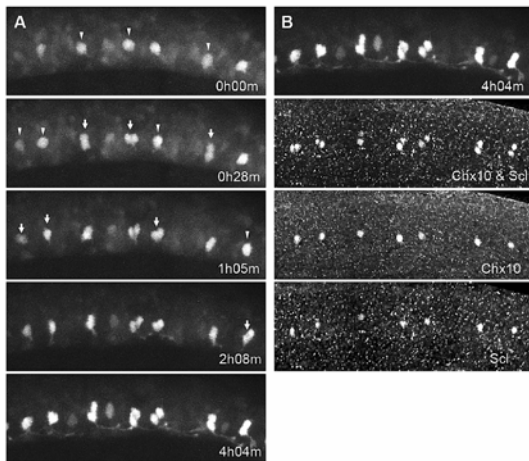


Chx10陽性細胞でGFPを発現するトランスジェニックフィッシュ
下図は、共焦点顕微鏡による、脊髄の拡大写真

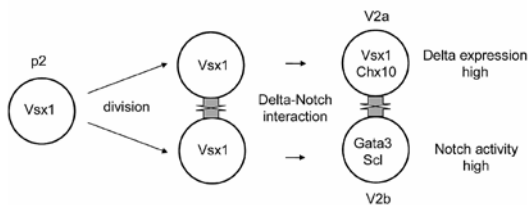


Chx10陽性細胞と運動神経細胞との二細胞同時記録。Chx10陽性細胞は運動神経細胞に興奮性のシナプス結合をしている。

また、発生機構に関する研究は、*vsx1* 発現する神経細胞に対して詳しい解析を行った。その結果、*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、脊椎動物の中樞神経系において、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。



Vsx1-GFP細胞のタイムラプス解析
 A) タイムラプス解析。矢頭は最終分裂前の*Vsx1*-GFP細胞、矢印は最終分裂後の*Vsx1*-GFP細胞のペア(姉妹細胞)。最終的に、どの*Vsx1*-GFP細胞も、ペア産生前駆体細胞の分裂により生じることが分かる。B) タイムラプス解析後のサンプルの、抗*Chx10*抗体、抗*Scf*抗体染色。最上段の写真は、固定直前のGFP像(Aの最下段と同じ写真)。次段は、抗*Chx10*抗体と抗*Scf*抗体の両者の染色像。下から2段目は、抗*Chx10*抗体染色、最下段は抗*Scf*抗体染色。ペアで存在する*Vsx1*-GFP姉妹細胞のうち、片方は*Chx10*陽性で、もう片方は*Scf*陽性であることが分かる。



V2ニューロン分化の模式図
 この模式図は、ニューロンペア産生p2前駆体細胞からの1つの細胞系譜を示す。*Vsx1*を発現するp2前駆体細胞は最終分裂を行う。子孫の姉妹細胞間でDelta-Notchを介した細胞間相互作用が起こり、片方の細胞で高い*delta*の発現が起こり、もう片方の細胞ではNotchの活性が強くなる。最終的に、前者はV2aニューロンへ分化し、後者はV2bニューロンへ分化する。

<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る。発生期の転写因子の発現パターンは、脊椎動物全般で強く保存されており、ゼブラフィッシュで得られる成果

は、哺乳類にも多くの場合適用できる。よりシンプルな系で得られる我々の研究成果は、マウスを用いた研究に対して、いろいろな面で指針となっていくであろう。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本研究では、BAC相同組み換え法により、多くのコンストラクトを作製し、それらを用いて多くのトランスジェニックフィッシュを作製した。コンストラクトを作製する段階ではまったく困難はなかったが、当初解析を予定していたいくつかの遺伝子(たとえば、*Evx2*, *Sim1b* 遺伝子)に関してはGFPの発現が見られない現象がみられた。これは、所用したBACにその遺伝子の制御領域が含まれていなかったためと考えられる。これを克服するには、より広い領域を含んだBACを探して研究を進めていく必要があるが、かならずしも非常に長いBACが得られるとは限らない。5'側3'側にどんどん解析対象を広げていったとしてもどこまでいけばたどり着けるのかわからないため、将来的に難しい問題点として残る可能性がある。

本研究で多くのトランスジェニックフィッシュを作製することに成功したが、解剖学的な解析については、当初の目論見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、展望>

腹側の神経細胞の分化については、神経細胞の多様性機構、および回路の構築機構の双方とも、かなりの部分を明らかにすることができた。今後は、研究の進展が遅れている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、解剖学的知見に比べて、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。今後、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。

本研究で多くのトランスジェニックフィッシュを作製することに成功した。これらは、研究代表者の今後の研究のみならず、ゼブラフィッシュを用いて神経発生、神経回路機能を研究する研究者にとってきわめて有用なツールである。今後、多くの研究者に使われ、研究の進展に貢献していくことが期待される。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 未登録

Sugiyama, M., Sakaue-Sawano, A., Iimura, T., Fukami, K., Kitaguchi, T., Kawakami, K., Okamoto, H., Higashijima, S., and Miyawaki, A. (2009). Illuminating Cell-Cycle Progression in the Developing Zebrafish Embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* in press

2. 0911081755

Satou, C., Kimura, Y., Kohashi, T., Horikawa, K., Takeda, H., Oda, Y., and Higashijima, S. (2009). Functional role of a specialized class of spinal commissural inhibitory neurons during fast escapes in zebrafish. *J. Neuroscience* 29, 6780-6793.

3. 0911081805

- Miyasaka, N., Morimoto, K., Tsubokawa, T., Higashijima, S., Okamoto, H., and Yoshihara, Y. (2009). From the Olfactory Bulb to Higher Brain Centers: Genetic Visualization of Secondary Olfactory Pathways in Zebrafish. *J. Neuroscience* 29, 4756-4767.
4. 0911081845
Vitorino, M., Jusf, P.R., Maurus, D., Kimura, Y., Higashijima, S., and Harris, W.A. (2009). *Vsx2* in the zebrafish retina: restricted lineages through depression. *Neural Development* 4, Article#14.
5. 0911081852
Bae, Y., Kani, S., Shimizu, T., Tanabe, K., Nojima, H., Kimura, Y., Higashijima, S., and Hibi, M. (2009). Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Developmental Biology* 300, 406-426.
6. 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.
7. 0911081815
Higashijima, S. (2008). Transgenic zebrafish expressing fluorescent proteins in central nervous system neurons. *Development, Growth & Differentiation* 50, 407-413.
8. 0911090937
Hossain, Md. I., Iwasaki, H., Okouchi, Y., Chahine, M., Higashijima, S., Nagayama, K., and Okamura, Y. (2008). Enzyme domain affects the movement of the voltage sensor in ascidian and zebrafish VSPs. *J. Biol. Chem* 283, 18248-59.
9. 0911091000
Miyake, A., Higashijima, S., Kobayashi, D., Narita, T., Jindo, T., Setiamarga, D.H.E., Ohisa, S., Orihara, N., Hibiya, K., Konno, S., Sakaguchi, S., Hoie, K., Imai, Y., Naruse, K., Kudo, A., and Takeda, H. (2008). Mutation in the *abdb* gene causes abnormal iron and fatty acid metabolism in developing medaka fish. *Development, Growth & Differentiation* 50, 703-716.
10. 0911081831
Fetcho, J.R., Higashijima, S., and McLean, D.L. (2008). Zebrafish and motor control over the last decade. *Brain Research Reviews* 57, 86-93.
11. 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
12. 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
- 2) 学会発表
Satou, C., Kimura, Y., and Higashijima, S. "Analysis of spinal V0 neurons with transgenic fish" *Neuroscience* 2008, Washington DC (USA), November 2008.
- Kimura, Y., Satou, C., and Higashijima, S. "V2a and V2b neurons are generated by the final divisions of pair-producing progenitors" *Neuroscience* 2008, Washington DC (USA), November 2008.
- 東島眞一、木村有希子、佐藤千恵 "ゼブラフィッシュのロコモーションの制御に関わる脊髄神経回路の分子的基盤" 第80回日本遺伝学会ワークショップ (名古屋) September 2008
- Higashijima, S., Kimura, Y., and Satou, C. "Development and function of spinal locomotor circuits in zebrafish" 第30回日本神経科学大会シンポジウム (横浜) 2007年9月
- 木村有希子、佐藤千恵、東島眞一 "ゼブラフィッシュ脊髄の2種のV2ニューロンは神経前駆体細胞の最終分裂により生じる" 第78回日本動物学会年会 (弘前) 2007年.9月
- Satou, C., Sato, Y., Horikawa, K., Takeda, H. and Higashijima, S. "A group of commissural inhibitory interneurons inhibits a motor activities of contralateral side during escape behaviors." 8th international Society for Neuroethology Vancouver, Canada July, 2007.
- Satou, C., Kimura, Y., and Higashijima, S. "Development and function of spinal interneurons in zebrafish." 第40回日本発生物学会 (福岡) 2007年.5月
- 佐藤千恵、木村有希子、小谷素子、東島眞一 "ゼブラフィッシュ交叉型脊髄神経の解析" 日本分子生物学会 2006 フォーラム、(名古屋) 2006年12月
- Kimura, Y., Satou, C., and Higashijima, S. "*alx*, a zebrafish homolog of *Chx10*, marks ipsilateral descending excitatory interneurons that participate in the regulation of spinal locomotor circuits" The Wenner-Gren Foundations International Symposium, "Networks in Motion", Stockholm (Sweden). September, 2006.
- 木村有希子、佐藤千恵、東島眞一 "ゼブラフィッシュ脊髄介在神経の運動系神経回路における機能解析" 第77回日本動物学会年会、松江、2006年9月
- 木村有希子、佐藤千恵、東島眞一 "ゼブラフィッシュ脊髄運動系神経回路形成機構の解析" 第39回日本発生物学会年会、広島、2006年6月
- Higashijima, S. "Development of spinal interneurons in zebrafish" 1st Italy-Japan Meeting on "Vertebrate Organogenesis", Ischia (Italy), April 2006.

佐藤千恵、木村有希子、東島眞一 "ゼブラフィッシュ脊髄神経細胞多様性形成機構の包括的解析" 第28回日本分子生物学会年会、福岡、2005年12月

木村有希子、岡村康司、東島眞一 "ゼブラフィッシュ脊髄介在神経の発生と回路における機能解析" 第76回日本動物学会年会、つくば、2005年10月

木村有希子、東島眞一 "ゼブラフィッシュ脊髄運動系神経回路形成機構の解析" 第38回日本発生生物学会年会、仙台、2005年6月