

共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：大学共同利用機関法人

情報・システム研究機構

国立遺伝学研究所

職名：教授

氏名：川上 浩一

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：神経・グリア相互作用に基づく神経回路形成とその維持機構の解明

2. 再生医科学研究所共同研究者：瀬原 淳子

3. 研究期間：短期研究課題・長期研究課題
(平成24年4月1日～平成25年3月31日)

4. 研究経過及び研究成果：

神経ネットワークの構築は、神経細胞だけによって行われるのではなく、オリゴデンドロサイトやアストロサイトなどのグリア細胞や血管・ミクログリアなどの細胞が形成や維持機構に関与する。申請者は、世界に先駆けてゼブラフィッシュを用いた遺伝子トラップ法・エンハンサートラップ法による神経回路網の可視化、及びその形成に関与する遺伝子の大規模スクリーニングと解析を行ってきた。本研究においては、この系を利用して、共同研究者瀬原のグループと、増殖因子やプロテアーゼの働きを中心に、脳形成に関わる細胞・遺伝子、分子機構の解明をめざし、そのひとつとして、次のような研究結果を得た。この研究結果は、現在投稿中である。

神経細胞の産生は、発生過程において、高次脳機能を獲得する上で必須な最初の段階である。神経細胞は、基本的に2つの段階を経て産生されると考えられる。第1に、神経幹細胞から神経前駆細胞が産生される段階、第2に、神経前駆細胞が分裂して非増殖性の神経細胞

を産生する段階である。神経発生においては、様々な細胞内や細胞外の分子機構が明らかにされているが、第2段階である、神経前駆細胞から分裂後の神経細胞を産生する過程については、ほとんど明らかにされていない。

そこで瀬原と共同して、ゼブラフィッシュの視蓋を脊椎動物の脳のモデル系として、まず、神経細胞がどのように時間的空間的に分化してくるかを検討した。神経特異的転写因子プロモーターの下流に GFP を発現させたトランスジェニックゼブラフィッシュ、Tg (*brn3a-hsp70:GFP*) あるいは Tg (*neurod : GFP*)、Tg (*huC : Kaede*) を用いて神経発生を観察した結果、神経細胞の分化は、時間的にも空間的にも極めて緻密に制御されたプロセスであることがわかった。神経前駆細胞から神経細胞の産生は、stochastic に起こるのではなく、basal 側から始まり、apical 側へと進行する。このような進行の規則性の機構を解明する手がかりとして、我々は、ErbB シグナリングに着目した。

ErbB シグナルは、増殖、分化、移動など、細胞の挙動を制御する多能な制御因子である。ErbB4 やそのリガンドのひとつニューレグリン1は、成人の高次脳機能の精神疾患である統合失調症の感受性遺伝子でもある。本研究では、1) ErbB4 およびそのリガンドのひとつニューレグリン1のアイソフォームのひとつが、転写因子 *neurogenin 1* を発現する神経前駆細胞から *neurod* を発現する神経細胞の産生・神経分化に関与すること、2) このニューレグリン1のアイソフォームは、主に、radial glial cell で発現するが、その細胞外ドメインの分布は神経細胞が産生される時期になると、basal 側を含め、脳内に広く分布する、そして3) subventricular 領域で、神経前駆細胞の ErbB4 のリン酸化を介して、神経細胞を産生する細胞分裂に関与することを見いだした。

このことをさらに確かめるため、ErbB インヒビターを用いて、その神経産生を阻害し、インヒビター除去により神経再生を再開させたときの3次元の神経発生を、タイムラプスにより、時間を追って4次元で解析した。これを行うために、radial glia で活性化される Gal4 発現型のトラップライン SAGFF(LF)81C を用いた。これに Tg (*brn3a-hsp70:GFP*) を掛け合せ、そこに *UAS:membGFP/UAS :cyto RFP* : UAS でドライブされる 膜-GFP/細胞質 RFP を活性化するプラスミドをインジェクトし、それでラベルされる前駆細胞の挙動を観察した。その結果、インヒビター助教により、確かに SV 領域における細胞分裂が活性化され、新しく産生された細胞は、より早く分化した神経細胞の apical 側に追加されることが見いだされた。このように、これまで分かっていなかった、神経前駆細胞から神経細胞が産生されるためには、細胞間シグナリングとして ErbB シグナルが重要な役割を果たすという、新たな知見を得ることができた。(Sato T. et al., 投稿中)。

また、別の2系統に関してトランスポゾン挿入部位の遺伝子を同定した。その結果、一つ目は、増殖因子のレセプター遺伝子内に Gal4 が挿入され、そのホモ個体は、内耳神経のモデルとされる側線神経系を含む、神経系構築の異常を示した。もうひとつは、側線神経のターゲットである有毛細胞を含めた感覚受容器(側線)で発現している。これらについても現在検討中である。

5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表等

- (1) An *mnr2b/hlxb9lb* enhancer trap line that labels spinal and abducens motor neurons in zebrafish. Asakawa, K., Higashijima, S.-i., and Kawakami, K. **Developmental Dynamics** 241, 327-332 (2012).
- (2) Connexin 39.9 protein is necessary for coordinated activation of slow-twitch muscle and normal behavior in zebrafish. Hirata, H., Wen, H., Kawakami, Y., Naganawa, Y., Ogino, K., Yamada, K., Saint-Amant, L., Low, S.E., Cui, W.W., Zhou, W., Sprague, S.M., Asakawa, K., Muto, A., Kawakami, K., and Kuwada, J.Y. **Journal of Biological Chemistry** 287(2), 1080-1089 (2012).
- (3) Neuronal birth order identifies a dimorphic sensorineural map. Pujol-Martí, J., Zecca, A., Baudoin, J.P., Faucherre, A., Asakawa, K., Kawakami, K., and López-Schier, H. **The Journal of Neuroscience** 32(9), 2976-2987 (2012).
- (4) Transgenic line with *gal4* insertion useful to study morphogenesis of craniofacial perichondrium, vascular endothelium-associated cells, floor plate, and dorsal midline radial glia during zebrafish development. Nakayama, S., Ikenaga, T., Kawakami, K., Ono, F., and Hatta, K. **Development, Growth and Differentiation** 54(2), 202-215 (2012).
- (5) The ciliary protein *Nek8/Nphp9* acts downstream of *Inv/Nphp2* during pronephros morphogenesis and left-right establishment in zebrafish. Fukui, H., Shiba, D., Asakawa, K., Kawakami, K., and Yokoyama, T. **FEBS Letter** 586, 2273-2279 (2012).
- (6) A zebrafish model of intrahepatic cholangiocarcinoma by dual expression of hepatitis B virus X and hepatitis C virus core protein in liver. Liu, W., Chen, J.R., Hsu, C.H., Li, Y.H., Chen, Y.M., Lin, C.Y., Huang, S.J., Chang, Z.K., Chen, Y.C., Lin, C.H., Gong, H.Y., Lin, C.C., Kawakami, K., and Wu, J.L. **Hepatology** 56, 2268-2276 (2012).
- (7) Mechanism of pectoral fin outgrowth in zebrafish development. Yano, T., Abe, G., Yokoyama, H., Kawakami, K., and Tamura, K. **Development** 139, 2916-2925 (2012).
- (8) Visualization and exploration of *Tcf/Lef* function using a highly responsive *Wnt/β-catenin* signaling-reporter transgenic zebrafish. Shimizu, N., Kawakami, K., and Ishitani, T. **Developmental Biology** 370, 71-85 (2012).
- (9) Targeted expression of a chimeric channelrhodopsin in zebrafish under regulation of *Gal4-UAS* system. Umeda, K., Shoji, W., Sakai, S., Muto, A., Kawakami, K., Ishizuka, T., and Yawo, H. **Neuroscience Research** (2012).
- (10) Functional assessment of human coding mutations affecting skin pigmentation using zebrafish. Tsetschladze, Z.R., Canfield, V.A., Ang, K.C., Wentzel, S.M., Reid, K.P., Berg, A.S., Johnson, S.L., Kawakami, K., and Cheng, K.C. **PLoS ONE** 7, e47398 (2012).
- (11) Glycinergic transmission and postsynaptic activation of *CaMKII* are required for glycine receptor clustering in vivo. Yamanaka, I., Miki, M., Asakawa, K., Kawakami, K., Oda, Y., and Hirata, H. **Genes to Cells** (2013).

(12) Real-time visualization of neuronal activity during perception. Muto, A., Ohkura, M., Abe, G., Nakai, J., and Kawakami, K. **Current Biology** 23, 307–311 (2013).

(13) Innervation is required for sense organ development in the lateral line system of adult zebrafish. Wada, H., Dambly-Chaudière, C., Kawakami, K., and Ghysen, A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** (2013).

• 学会発表（全て口頭発表）

(9) Kawakami, K., Pradeep, L., and Hiratani, M. Genetic dissection of the adult zebrafish brain by the Gal4-UAS method. “Imaging Structure and Function in the Zebrafish Brain”, UK (2012).

(10) Kawakami, K. The transposon-mediated genetic methods in zebrafish and their application to the study of functional neural circuits. “Asia-Pacific Developmental Biology Conference 2012”, Taiwan (2012).

(11) Kawakami, K. Tol2-mediated transgenesis, gene trapping, enhancer trapping and Gal4-UAS methods. “Janelia workshop on zebrafish genetics, transgenesis, and systems biology”, USA (2012).

(12) Muto, A., Ohkura, M., Abe, G., Nakai, J., and Kawakami, K. Real-time visualization of the neuronal activity in the brain during visual perception of a natural object. “10th International Conference Zebrafish Development and Genetics”, USA (2012).

(13) Kawakami, K. The transposon-mediated genetic methods in zebrafish and their application to the study of functional neural circuits: transgenic tools for calcium imaging. “The 2012 Cold Spring Harbor Asia Conference Zebrafish Disease Models”, China (2012).