

平成 26 年 05 月 05 日

平成 25 年度共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：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

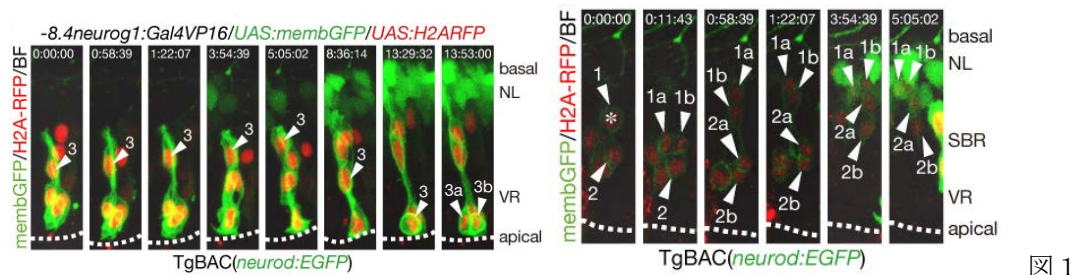
1. 研究課題：神経・グリア細胞のライブイメージングによる神経回路形成とその維持機構の解明
2. 再生医科学研究所共同研究者：瀬原 淳子 教授
3. 研究期間： 短期研究課題 ・ 長期研究課題
(平成 25 年 4 月 1 日～平成 26 年 3 月 31 日)
4. 研究経過及び研究成果：
神経ネットワークの構築や維持には、神経細胞だけでなく、グリア細胞や血管・ミクログリアなどが関与する。しかしながら、それらの細胞の実体・動態や相互作用の分子基盤は、未だ未解明なところが多い。本研究において申請者はゼブラフィッシュを用いた遺伝子トラップ法・エンハンサートラップ法により、様々なパターンで蛍光蛋白質 GFP あるいは Gal4 を発現するゼブラフィッシュを作製してきた。その中で本研究では神経系を構築する多様な細胞集団を可視化し、新規の神経系支持細胞の同定・支持機構の解明を目指してきた。共同研究を行う瀬原グループは、同定細胞の性質を増殖因子やプロテアーゼの働きと関連づけて明らかにすることとし、共同研究を実施した。

これまでに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、これらが同じファミリーに属する転写因子で、神経組織の形成だけでなく血管形成に必須の役割を果たすことを見いだした。瀬原と共同で、そのうちの1遺伝子のノックアウトマウスを作成し、その結果、胎生致死をもたらすことがわかり、現在のその表現型の解析を進めている。(未発表)。また、別の1系統は、ErbB2遺伝子のトラップラインで、脳神経系のグリア細胞を特異的にモニターできる。これに関しても、神経軸索とグリア細胞の相互作用に関する研究を進めている(未発表)。ここでは、脳の特異的領域でGal4を発現することにより領域特異的に蛍光タンパク質を発現できる系統を用いて、中脳の神経前駆細胞を可視化しその動態を調べることによって、増殖因子ニューレグリンの、脳形成におけるあらたな役割を見いだしたので、その研究について述べる(近日中に投稿予定)。

脊椎動物において3次元の脳組織が形成される際、神経幹細胞から神経前駆細胞が生じ、さらに分裂を終えた神経細胞が生ずるが、分裂を終えた神経細胞が産生・蓄積する仕組みの研究は、意外にも遅れている。加齢や疾病との関わりにおいても、その仕組みの理解は極めて重要であるが、特に細胞外環境・細胞間相互作用の関与については、神経幹細胞から神経前駆細胞産生にWnt, FGF, Notchシグナル等の関与が知られているに対し、そのあとの神経前駆細胞の増殖や神経細胞の分化にどのような分子機構が関わるのか、殆ど解明されていないのが現状であった。その理由には神経幹細胞から前駆細胞産生に多くの注目が集まっていることだけでなく、マウスやラットなどの哺乳類モデルでは、脳形成初期を生きた状態で可視化するのが困難であることが挙げられる。小型魚類を用いた研究の面白さ・強みは、脳形成の初期過程を生きたままイメージングできること、そしてそれを用いて新たな形態形成機構を解明できることにある。本研究において我々は、脊椎動物の脳形成機構を探るため、ゼブラフィッシュ中脳視覚統合領域である視蓋の形成をモデルとして、この問題に取り組んだ。

神経前駆細胞特異的なプロモーター下でGal4VP16を発現するトランスジェニックラインTg(-8.4neurog:Gal4VP16)の受精卵にプラスミドUAS:membGFP/H2A-RFPをインジェクトすると、これはGal4特異的に膜型GFPと核RFPを可視化できるので、このプラスミドが少ない割合の細胞内でstochasticに発現する結果、ひとつの神経前駆細胞由来の細胞集団を膜GFP/核RFPでラベルすることができる。このやや複雑な系を用いることによって、中脳前駆細胞には、二つの分裂パターンがあることがわかった。ひとつは、脳室内のinterkinetic migrationのあと、脳室のapical側で分裂するパターン(図1左)、および脳室のsubbasal領域で分裂す

るパターン(図1右)である。それらの分裂には連続性があり、神経細胞は、後者の分裂を経て生ずることが明らかとなった。



我々は、これらの分裂が、増殖因子ニューレグリン1のアイソフォームに依存することを見いだした。このニューレグリンのアイソフォームに対するアンチセンスモルフォリーノで卵を処理すると、apical側の分裂は不完全に抑制され、subbasal側の分裂はほぼ完全に抑制された(図2)。

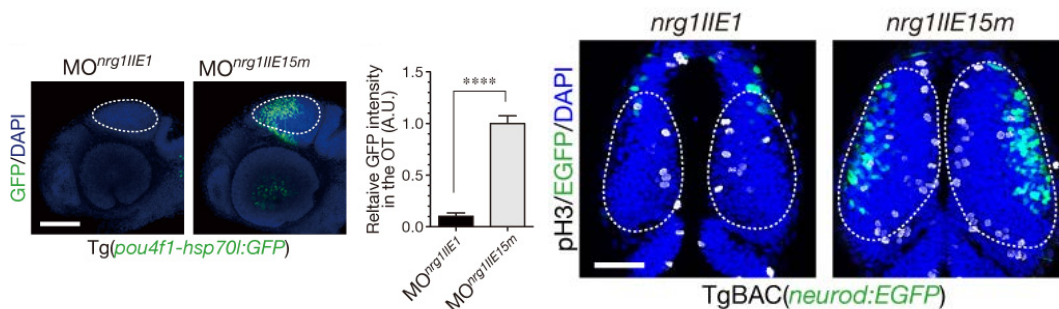


図2(左図:神経細胞産生抑制の表現型発生率と個体数...アンチセンスモルフォリーノ *nrg1IIE1* 0.57 ± 0.1, n = 94; missense オリゴ *nrg1IIE15m* 0.02 ± 0.023, n = 36; 別のアンチセンス 0.79 ± 0.036, n = 104、ミスセンスオリゴ 0.05 ± 0.047。右図は、リン酸化ヒストンに対する抗体による染色結果を示す。)

問題は、後半の subbasal 領域での分裂が抑制されているのは、この分裂に対するモルフォリーノの直接的な効果なのか、それとも前半の apical 側での分裂が抑制された結果2次的に起こるものなのか、ということである。この問題を解決すべく、胚を一過的に ErbB インヒビターAG1478 に浸し、apical 側での分裂には殆ど影響を与えにくい条件を確立した。すなわち、apical 側の分裂には影響を与えずに subbasal 側の分裂を抑制することができ、その胚から、AG1478 を乗り除くと、再び apical 側の分裂が回復する、という条件である(図3)。図3では、受精後26時間からAG1478に浸した胚を45時間胚の段階で洗い、発生させ、apical側のpH3陽性細胞数(白いバー)とsubbasal側の陽性細胞数(赤いバー)を48時間胚(AG1478を除いて

から3時間後)と54時間胚(9時間後)とで調べたもので、subbasal側での細胞分裂がAG1478を取り除いてから数時間後に回復することを示している。またこのとき、apical側での細胞分裂には殆ど影響を与えていないことがわかる。つまり、apical側の細胞分裂において、AG1478に感受性をもつ発生時間は、約26時間(あるいは若干のタイムラグあったとしても約30時間)以前であることを意味する。

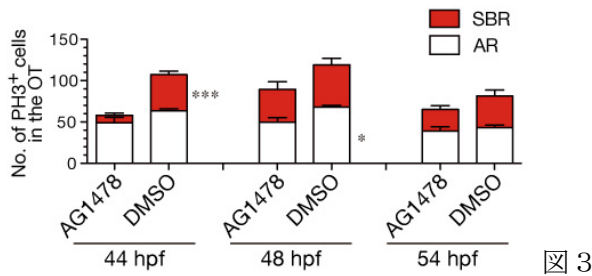


図3

次に、このような条件下で回復するsubbasal側の分裂に、apical側の分裂が先行するのか、あるいはapical側の分裂を経ずにsubbasal側の分裂が起こるのかどうかを検討した。その目的で、中脳幹細胞で特異的にGal4を発現するトラップラインSAGFF(LF)81Cを用いた。最終分化した神経が可視化されるTg(*pou4f1-hsp70l:GFP*)とSAGFF(LF)81Cをかけ合わせたトランスジェニックフィッシュTg(*pou4f1-hsp70l:GFP;SAGFF(LF)81C*)の受精卵に、プラスミドUAS:membGFP/UAS:mcherryをインジェクトし、上述のように一過的にAG1478で処理し、そしてそれを洗浄した。洗浄後のライブイメージングの結果、apical側での細胞分裂を経ることなしに、subbasal側の細胞分裂が再開することがわかり、このことから、神経を産み出す分裂自体がErbBシグナリングに依存していることが示唆された。

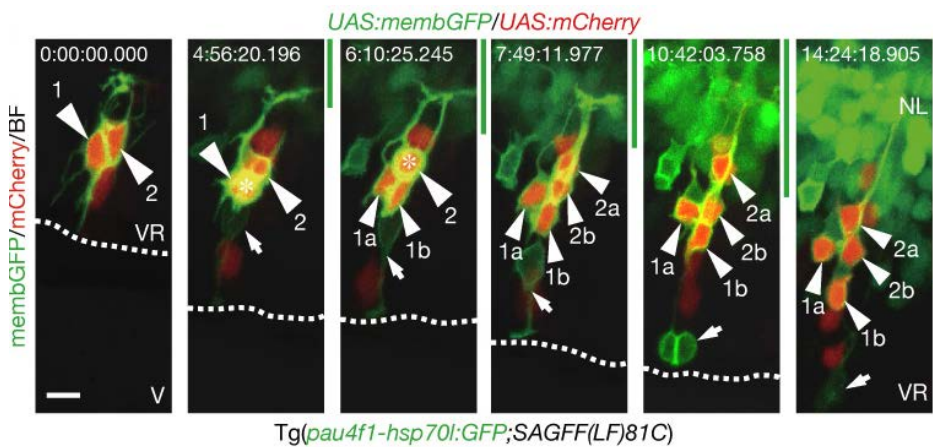


図4 (神経前駆細胞1、2は、それぞれ分裂して神経細胞となる。)

これらの結果から、神経分化、特に神経前駆細胞から神経細胞が産生されるプロセスには、ErbB シグナリングが必要であることを明らかにした。

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

Nakayama Y, Kikuta H, Kanai M, Yoshikawa K, Kawamura A, Kobayashi K, Wang Z, Khan A, Kawakami K, Yamasu K. (2013) Gbx2 functions as a transcriptional repressor to regulate the specification and morphogenesis of the mid-hindbrain junction in a dosage- and stage-dependent manner. **Mech Dev.** 130(11-12), 532-52

Sittaramane V, Pan X, Glasco DM, Huang P, Gurung S, Bock A, Li S, Wang H, Kawakami K, Matisse MP, Chandrasekhar A. (2013) The PCP protein Vangl2 regulates migration of hindbrain motor neurons by acting in floor plate cells, and independently of cilia function. **Dev Biol.** 382(2), 400-12.

Kwon HB, Fukuhara S, Asakawa K, Ando K, Kashiwada T, Kawakami K, Hibi M, Kwon YG, Kim KW, Alitalo K, Mochizuki N. (2013) The parallel growth of motoneuron axons with the dorsal aorta depends on Vegfc/Vegfr3 signaling in zebrafish. **Development** 140(19), 4081-90.

Satou C, Kimura Y, Hirata H, Suster ML, Kawakami K, Higashijima S. (2013) Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons. **Development** 140(18), 3927-31.

Wada H, Ghysen A, Asakawa K, Abe G, Ishitani T, Kawakami K. (2013) Wnt/Dkk negative feedback regulates sensory organ size in zebrafish. **Curr. Biol.** 23(16), 1559-65

Kishimoto N, Asakawa K, Madelaine R, Blader P, Kawakami K, Sawamoto K. (2013) Interhemispheric asymmetry of olfactory input-dependent neuronal specification in the adult brain. **Nat Neurosci.** 16(7), 884-8.

Wada H, Dambly-Chaudière C, Kawakami K, Ghysen A. (2013) Innervation is required for sense organ development in the lateral line system of adult zebrafish. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 110(14), 5659-64.

- Yamanaka I, Miki M, Asakawa K, [Kawakami K](#), Oda Y, Hirata H. (2013) Glycinergic transmission and postsynaptic activation of CaMKII are required for glycine receptor clustering in vivo. **Genes Cells**. 18(3), 211-24.
- Muto A, Ohkura M, Abe G, Nakai J, [Kawakami K](#). (2013) Real-time visualization of neuronal activity during perception. **Curr Biol**. 23(4), 307-11.
- Muto A, [Kawakami K](#). (2013) Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions. **Front Neural Circuits**. 7, 110.
- Asakawa K, Abe G, [Kawakami K](#). (2013) Cellular dissection of the spinal cord motor column by BAC transgenesis and gene trapping in zebrafish. **Front Neural Circuits**. 7, 100.
- Banjo T, Grajcarek J, Yoshino D, Osada H, Miyasaka KY, Kida YS, Ueki Y, Nagayama K, [Kawakami K](#), Matsumoto T, Sato M, Ogura T. (2013) Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21. **Nat Commun**. 4, 1978.
- Umeda K, Shoji W, Sakai S, Muto A, [Kawakami K](#), Ishizuka T, Yawo H. (2013) Targeted expression of a chimeric channelrhodopsin in zebrafish under regulation of Gal4-UAS system. **Neurosci Res**. 75(1), 69-75.