

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04376

研究課題名(和文)脊椎動物に普遍的な小脳神経回路形成機構の解析

研究課題名(英文)General mechanisms controlling development of cerebellar neural circuits in vertebrates

研究代表者

日比 正彦(HIBI, MASAHIKO)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：40273627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュを用いて(1)RNA-seq解析により小脳顆粒細胞およびプルキンエ細胞に発現する遺伝子を同定した。(2)Contactin1bが運動学習及び運動制御の神経回路形成に関与すること、(3)Reelinシグナルがプルキンエ細胞と中脳視蓋I型ニューロンの細胞移動を制御し、Reelinタンパク質は軸索輸送されること、(4)転写因子PtflaとGsx2が下オリブ核ニューロン分化に関与し、gsx2遺伝子発現がレチノイン酸シグナルにより制御されること、(5)転写因子Foxp1bとFoxp4及び転写共抑制因子Skor1bとSkor2がプルキンエ細胞分化のマスター制御因子であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Using zebrafish as a main model system, (1) we isolated granule cell- and Purkinje cell-specific genes by RNA-seq. We found that (2) Contactin1b is involved in neural circuit formation for motor learning and motor coordination; (3) Reelin signaling is involved in migration of Purkinje cells in the cerebellum and type I neurons in the optic tectum, Reelin is transported through granule cell axons; (4) the transcription factors Ptfla and Gsx2 are required for differentiation of neurons in the inferior olive nuclei, the expression of gsx2 is regulated by retinoic acid signaling; (5) the transcription factors Fop1b/4 and the transcriptional co-repressors Skor1b/2 function as master regulators in differentiation of Purkinje cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：小脳 神経回路形成 ゼブラフィッシュ 神経発生 神経分化 層形成 転写因子 可視化

1. 研究開始当初の背景

高度な情報処理を行う脊椎動物の神経回路では、ニューロンの軸索と樹状突起が複雑に接続し、入力情報を統合し出力情報を生み出すことで機能を発揮している。中でも、円滑な運動制御や学習に関わる小脳神経回路は典型的な例であり、神経回路構造が明瞭で分かりやすいことから、多くの研究者に興味を持たれてきた。

その小脳神経回路は脊椎動物で比較的保存されている(図1)。

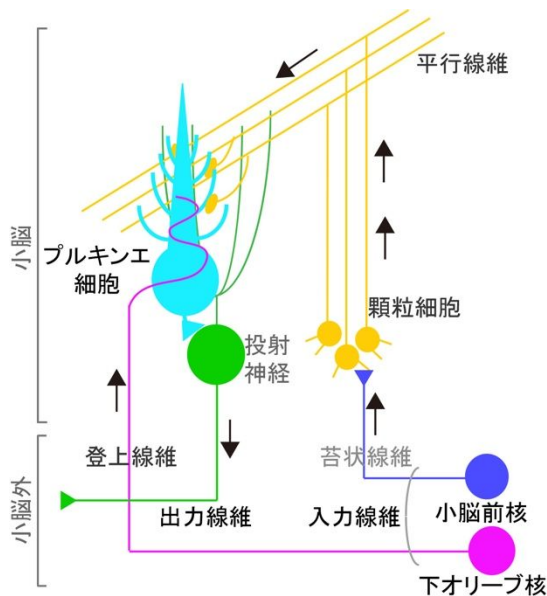


図1 脊椎動物の小脳神経回路
矢印は信号伝達方向を示す。

小脳ニューロンである顆粒細胞とプルキンエ細胞は、小脳外から二種類の入力信号を受ける。一つは、中枢神経の様々な領域に存在する小脳前核から顆粒細胞への入力線維(苔状線維)であり、その信号は顆粒細胞軸索を介してプルキンエ細胞の樹状突起に伝えられる。もう一つの入力線維は、後脳腹側に位置する下オリーブ核ニューロンからの登上線維であり、直接プルキンエ細胞に信号が伝えられる。二つの入力情報は、プルキンエ細胞で統合され、投射ニューロン(真骨魚類では eurydendroid 細胞)を介して小脳外へ出力されることで情報を処理している。

私達のこれまでのゼブラフィッシュを用いた解析から、哺乳類と同様に、顆粒細胞は菱脳唇に位置しプロニューラル遺伝子 *atoh1* を発現する神経前駆細胞から、プルキンエ細胞と下オリーブ核ニューロンは脳室帯に位置しプロニューラル遺伝子 *ptfla* を発現する神経前駆細胞から産生されることが分かってきた。しかし、ニューロン分化および小脳神経回路形成の分子メカニズムは未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュとメダカを用いて、
(1) 顆粒細胞・プルキンエ細胞・下オリー

ブ核ニューロンが神経前駆細胞から分化するメカニズム

(2) これらニューロンが神経突起を伸ばし、神経回路を形成するメカニズム

(3) 機能的な小脳神経回路形成のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

私達はこれまで、ゼブラフィッシュの小脳神経回路形成異常の変異体、メダカの失調様行動異常(小脳の機能異常に付随する)を示す変異体の単離・解析を行ってきた。また、エンハンサー・ジーントラップ法および個々のニューロン特異的な遺伝子発現制御領域を用いて、顆粒細胞・プルキンエ細胞・下オリーブ核ニューロン・バグマンガリア細胞に転写因子 Gal4 または蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック(Tg)システムを多数単離した。さらに、これら Tg システムを用いて、神経回路形成期の顆粒細胞・プルキンエ細胞・下オリーブ核ニューロン・バグマンガリア細胞を単離し、RNA sequencing (RNA-seq) を行い、個々の小脳神経回路素子に発現する遺伝子の探索を行ってきた。本研究においては、(a)失調様行動異常を示すメダカ変異体 *ro* のポジショナルクローニング・表現型の解析を行った。さらに、(b)RNA-seq で見出した遺伝子の CRISPR/Cas9 法を用いた変異体作製を行い、その解析から脊椎動物に普遍的な小脳神経回路形成機構の解明を試みた。

4. 研究成果

(1) RNA-seq によるゼブラフィッシュ小脳の顆粒細胞およびプルキンエ細胞特異的に発現する遺伝子の同定

小脳神経回路を構成する顆粒細胞、プルキンエ細胞、投射神経、下オリーブ核ニューロン、バグマンガリア細胞に Gal4 あるいは蛍光タンパク質を発現する Tg システムを用いて、各々の細胞系列を FACS により単離し、RNA-seq を行った。この結果をもとに、細胞系列間で遺伝子発現量を比較検討し、各々の細胞特異的に発現する遺伝子を同定した(図2)。

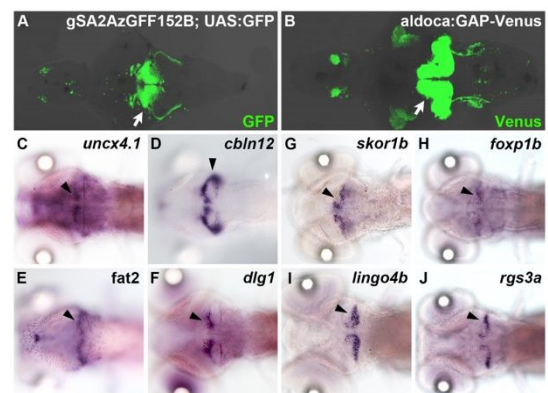


図2 小脳ニューロンの遺伝子プロファイリング解析
小脳神経回路に蛍光タンパク質を発現する Tg(A,B)を用

いて、FACS により各々の系列の細胞を単離した。細胞から RNA を抽出し、RNA-seq を行い、顆粒細胞・プルキンエ細胞に特異的に発現する遺伝子を同定した。同定した遺伝子について in situ hybridization により発現解析を行った。その例を示す。(C-F) 顆粒細胞、(G-J) プルキンエ細胞特異的に発現する遺伝子群。

顆粒細胞に高く発現する遺伝子群について性質を調べると、細胞の発生に関わるものが多く、プルキンエ細胞においては、神経細胞の機能に関わる遺伝子が多く存在していた。また、顆粒細胞やプルキンエ細胞に特異的に発現する遺伝子のうち、いくつかは小脳類似の細胞・回路を持つ小脳様構造にも発現していたことから、小脳様構造においても共通の分子機構があることが示唆された。

(2) 免疫グロブリンファミリースーパーファミリードメインを有する Contactin1 の解析
メダカ *ro* は、遊泳中にふらつき、回転する運動異常を示す突然変異体である。ポジショナルクローニングにより、*ro* 遺伝子座は免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質 Contactin1b (Cntn1b) をコードすると予想された。私達は、CRISPR/Cas9 法によりメダカ *cntn1b* 変異体を作製した。*cntn1b* 変異体および *cntn1b* と *ro* のトランスヘテロ変異体は *ro* と同様の遊泳異常を示したことから、*ro* の責任遺伝子は *cntn1b* と同定した。また、TALEN 法によりゼブラフィッシュ *cntn1* ファミリー遺伝子変異体を作製した。*cntn1a* 変異体では異常は見られないが、*cntn1b* 変異体において遊泳異常が観察された。このことから、Cntn1b は、真骨魚類において、遊泳運動に関して保存された役割をもつことが示された。Cntn1 ノックアウトマウスは小脳神経回路に異常を示すが、メダカ・ゼブラフィッシュ *cntn1b* 変異体においては小脳回路の形態異常は見出せなかった。しかし、メダカ *ro* 変異体では、視運動性反応 (OKR) の学習が低下し、水流に対する走性が不安定であった (図 3)。

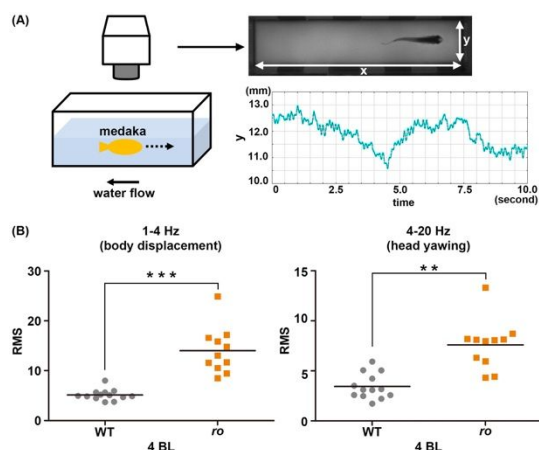


図 3 Cntn1b は走流性に必要である
(A) メダカは水流に逆って泳ぐ性質をもつ。水流に対する遊泳行動をビデオ撮影し、頭部の y 軸方向の動きをプロットして数値化し、x 軸を時間としてグラフとして

示した (右下)。 (B) y 軸の値について、Lab Chart software を用いて、low-frequency (1-4 Hz, body displacement: 体の移動を表す) と high-frequency (4-20 Hz, head yawing: 頭部のブレを表す) の動きとして分離し、二乗平均平方根 (RMS) を計算した。野生型 (WT) に対して変異体 (*ro*) では値が上昇した結果から、*cntn1b* 変異体の遊泳が不安定であることが示された。

これらの結果は、Cntn1b が小脳神経回路を含む運動協調に関与する神経回路形成に関与することを示唆しており、メダカ・ゼブラフィッシュ *cntn1b* 変異体は運動学習や運動制御について理解する良いモデルと考えられた。

(3) 小脳および中脳視蓋ニューロンの移動および層形成における Reelin シグナルの役割の解析

RNA-seq の解析からゼブラフィッシュ小脳顆粒細胞に細胞間シグナル分子 Reelin の遺伝子が強く発現していることを見出し、CRISPR/Cas9 法による *reelin* 変異体の作製を行った。さらに、Reelin の受容体 VLDLR およびシグナル伝達分子 Dab1a の遺伝子変異体に関して解析を行った。これらの変異体では、異所的なプルキンエ細胞に加えて異所的な eurydendroid 細胞やパーグマンガリア細胞が認められた。また、中脳視蓋に存在する小脳様構造においても、プルキンエ細胞様細胞である I 型ニューロンの異所的局在が観察された。異所的なプルキンエ細胞と I 型ニューロンに対して入力線維 (顆粒細胞や下オリブ核ニューロンからの軸索投射) が認められた。Reelin タンパク質は、小脳および中脳視蓋の表層 (分子層) に観察されるが、mRNA は深層の顆粒細胞の細胞体に認められる。私達は、軸索切除や、軸索輸送に関与する Kif5aa と Kif5ba (Kinesin I 構成分子) の遺伝子二重変異体では、顆粒細胞の軸索形成と Reelin タンパク質の局在異常を引き起こすことを見出した。以上の結果は、小脳および小脳様構造の層・神経回路形成において、Reelin タンパク質が顆粒細胞の軸索を通して深層の顆粒細胞層から表層に運搬され分泌される、Reelin は化学誘引物質として、脳室帯で産生されるニューロンやグリア細胞の移動を制御する、移動したプルキンエ細胞や I 型ニューロンは、細胞非自律的に入力線維を誘引することで、神経回路が形成されると考えられた。

(4) 下オリブ核ニューロンの分化機構の解析

私達は Tg 系統を用いた解析から、下オリブ核ニューロンの神経前駆細胞にプロニユール遺伝子 *ptfla* に加えてホメオボックス遺伝子 *gsx2* を発現することを見出し、これら遺伝子の CRISPR/Cas9 法による変異体作製を行った。どちらの変異体においても、下オリブ核ニューロンの減弱または消失が

認められた。*ptfla* の発現は *gsx2* 変異体では影響を受けず、*gsx2* の発現も *ptfla* 変異体では影響を受けていなかったことから、*ptfla* と *gsx2* は独立して下オリブ核ニューロンの分化に関わっていることが示された。下オリブ核が位置する後方の後脳のパターンニングには、体節で産生されるレチノイン酸 (RA) のシグナルが重要であることが示されている。RA 合成酵素阻害剤やアンチセンスモルフォリンを用いて、RA の産生を阻害した仔魚では、*gsx2* の発現が减弱し、下オリブ核ニューロンの分化が抑制された。このことから、*ptfla* 発現神経前駆細胞からプルキンエ細胞や下オリブ核ニューロンなど多様なニューロンが産生されるが、後方の後脳では RA シグナルの下流で発現する *gsx2* が下オリブ核ニューロンの運命決定に関わっていると考えられた。

(5) プルキンエ細胞の分化機構の解析

私達は、RNA-seq 解析を通じて、分化段階の早い時期からプルキンエ細胞特異的に、フォークヘッド型転写因子 *Foxp1b* と *Foxp4* および転写共抑制因子 *Skor1b* と *Skor2* の遺伝子が発現していることを見出した。これら遺伝子の CRISPR/Cas9 法による変異体作製および解析を行った。それぞれの遺伝子の単独変異体ではプルキンエ細胞の分化に異常を認められなかったが、*foxp1b*; *foxp4* の二重変異体ではプルキンエ細胞が非常に減少しており、*skor1b*; *skor2* の二重変異体においてはプルキンエ細胞が完全に欠損していた。これらの結果から、転写因子 *Foxp1b* と *Foxp4*、転写共抑制因子 *Skor1b* と *Skor2* が、重複的にプルキンエ細胞の分化を制御するマスター転写制御因子として機能すると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

Kidwell CU, Su CY, Hibi M, Moens CB. Multiple zebrafish *atoh* genes specify a diversity of neuronal types in the zebrafish cerebellum. *Dev Biol.* 438, 44-56, 2018. 査読有

DOI: 10.1016/j.ydbio.2018.03.004.

Hino H, Nakanishi A, Seki R, Aoki T, Yamaha E, Kawahara A, Shimizu T, Hibi M. Roles of maternal *wnt8a* transcripts in axis formation in zebrafish. *Dev Biol.* 434, 96-107, 2018. 査読有

DOI: 10.1016/j.ydbio.2017.11.016.

Matsuda K, Yoshida M, Kawakami K, Hibi M, Shimizu T. Granule cells control recovery from classical conditioned fear responses in the zebrafish cerebellum. *Sci Rep.* 7, 11865, 2017. 査読有

DOI: 10.1038/s41598-017-10794-0.

Takeuchi M, Inoue C, Goshima A, Nagao Y, Shimizu K, Miyamoto H, Shimizu T, Hashimoto H, Yonemura S, Kawahara A, Hirata Y, Yoshida M, and Hibi M. Medaka and zebrafish *contactin1* mutants as a model for understanding neural circuits for motor coordination. *Genes Cells.* 22, 723-741, 2017. 査読有

DOI: 10.1111/gtc.12509.

Hibi M, Matsuda K, Takeuchi M, Shimizu T, Murakami Y. Evolutionary mechanisms that generate morphology and neural-circuit diversity of the cerebellum. *Dev Growth Differ.* 59, 228-243, 2017. 査読有

DOI: 10.1111/dgd.12349.

Yun UJ, Sung JY, Park SY, Ye SK, Shim J, Lee JS, Hibi M, Bae YK, Kim, YN. Oncogenic role of rab escort protein 1 through EGFR and STAT3 pathway. *Cell Death Dis.* 8, e2621, 2017. 査読有

DOI: 10.1038/cddis.2017.50.

Song KH, Woo SR, Chung JY, Lee HJ, Oh SJ, Hong SO, Shim J, Kim YN, Rho SB, Hong SM, Cho H, Hibi M, Bae DJ, Kim SY, Kim MG, Kim TW, Bae YK. REP1 inhibits FOXO3-mediated apoptosis to promote cancer cell survival. *Cell Death Dis.* 5, e2536, 2017. 査読有

DOI: 10.1038/cddis.2016.462.

Chiba A, Watanabe-Takano H, Terai K, Fukui H, Miyazaki T, Uemura M, Hashimoto H, Hibi M, Fukuhara S, and Mochizuki, N. Osteocrin, a peptide secreted from the heart and other tissues, contributes to cranial osteogenesis and chondrogenesis in zebrafish. *Development* 144, 334-344, 2017. 査読有

DOI: 10.1242/dev.143354.

Takeuchi M, Yamaguchi S, Sakakibara Y, Hayashi T, Matsuda K, Hara Y, Tanegashima C, Shimizu T, Kuraku S, Hibi M. Gene expression profiling of granule cells and Purkinje cells in the zebrafish cerebellum. *J Comp Neurol.* 525, 1558-1585, 2017. 査読有

DOI: 10.1002/cne.24114.

Scalice K, Shimizu T, Hibi M, Sawtell NB. Responses of cerebellar Purkinje cells during fictive optomotor behavior in larval zebrafish. *J Neurophysiol.* 116, 2067-2080, 2016. 査読有

DOI: 10.1152/jn.00042.2016.

Kim JD, Park KE, Ishida J, Kako K, Hamada J, Kani S, Takeuchi M, Namiki K, Fukui H, Fukuhara S, Hibi M, Kobayashi M, Kanaho Y, Kasuya Y, Mochizuki N, Fukamizu A. PRMT8 as a phospholipase regulates Purkinje cell dendritic arborization and motor coordination. *Sci Adv.* 1, e1500615, 2015. 査読有

DOI: 10.1126/sciadv.1500615.

Takeuchi M, Yamaguchi S, Yonemura S, Kakiguchi K, Sato Y, Higashiyama T, Shimizu T, Hibi M. Type IV Collagen Controls the Axogenesis of Cerebellar Granule Cells by Regulating Basement Membrane Integrity in Zebrafish. PLoS Genet. 11, e1005587, 2015. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pgen.1005587.

[学会発表](計12件)

Hibi M, Matsuda K, Yoshida M, Kawakami K, Shimizu T. Roles of cerebellar neural circuits in classical fear conditioning. International Workshop on Zebrafish Neural Circuits and Behavior. 2017.11 (Rockville, USA)(口頭発表)

Hibi M, Takeuchi M, Matsuda K, Ito T, Nimura T, Hara Y, Kuraku S, Kawakami K, Yoshida M, Shimizu T. Formation and function of cerebellar neural circuits in zebrafish. 第23回小型魚類研究会 2017.8 (甲府)(招待講演)

Takeuchi M, Yamaguchi S, Sakakibara Y, Hayashi T, Matsuda K, Hara Y, Hayashi T, Kuraku S, Shimizu T, Hibi M. Transcriptome and functional analyses of genes expressed in cerebellar granule cells in zebrafish. 第23回小型魚類研究会 2017.8 (甲府)(ポスター発表)

Takeuchi M, Yamaguchi S, Sakakibara Y, Hayashi T, Matsuda K, Hara Y, Hayashi T, Kuraku S, Shimizu T, Hibi M. Gene expression profiling of zebrafish cerebellar neurons reveals possible mechanisms controlling neural circuit formation. 第50回日本発生生物学会大会 2017.5. (東京)(ポスター発表)

日比正彦、竹内未紀、松田光司、原雄一郎、榊原考将、種子島千春、山口信悟、吉田将之、工樂樹洋、清水貴史 真骨魚類から見た小脳の進化と発生 日本進化学会第18回大会 2016.8(東京工大、東京)(招待講演)

Takeuchi M, Yamaguchi S, Sakakibara Y, Hayashi T, Matsuda K, Hara Y, Hayashi T, Kuraku S, Shimizu T, Hibi M. Gene expression profiling of granule cells and Purkinje cells in zebrafish cerebellum. 第22回小型魚類研究会 2016.8 (岡崎)(ポスター発表)

Takeuchi M, Goshima A, Inoue C, Shimizu, K, Kawahara A, Yoshida M, Hibi M. Role of Contactin1 in neural network formation for motor coordination in medaka and zebrafish. 第39回日本神経科学大会 2016.7 (横浜)(ポスター発表)

日比正彦、竹内未紀、山口信悟、松田光司、原雄一郎、榊原考将、工樂樹洋、吉田将之、清水貴史 真骨魚類に見る小脳の進化と発生 第121回日本解剖学会総会

2016.3 (郡山市、福島)(招待講演)

Takeuchi M, Yamaguchi S, Hayashi T, Sakakibara Y, Matsuda K, Hara Y, Hayashi T, Kuraku S, Shimizu T, Hibi M. Basement membrane stability is important for the axogenesis of cerebellar granule cells in zebrafish. 第21回小型魚類研究会. 2015.9. (吹田)(ポスター発表)

Hibi M, Takeuchi M, Yamaguchi S, Matsuda K, Hayashi T, Hara Y, Hayashi T, Sakakibara Y, Yoshida M, Kuraku S, Shimizu M. Evolution and development of cerebellar neural circuitry in teleosts. 第48回日本発生生物学会大会 2015.6(つくば)(口頭発表)

Takeuchi M, Yamaguchi S, Hayashi T, Yonemura S, Hara Y, Hayashi T, Kuraku S, Shimizu T, Hibi M. Integrity of basement membrane is important for axogenesis of cerebellar granule cells. 第48回日本発生生物学会大会 2015.6.(つくば)(ポスター発表)

Hibi M. Formation and function of cerebellar neural circuitry. Zebrafish Systems Biology Workshop, Janelia Research Campus. 2015.4 (Ashburn, Virginia, USA)(招待講演)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://bbc.agr.nagoya-u.ac.jp/~junkei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比 正彦 (HIBI MASAHIKO)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：40273627

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

竹内 未紀 (TAKEUCHI MIKI)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・研究員

研究者番号：60625127

(4)研究協力者

清水 貴史 (SHIMIZU TAKASHI)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：50324760