

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18548

研究課題名(和文) 下オリーブ核ニューロンの運命決定と神経回路形成の分子メカニズム

研究課題名(英文) The molecular mechanism for cell fate determination and neural circuit formation of inferior olive nucleus neurons.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：下オリーブ核ニューロン前駆細胞に発現するGsx2、Ptf1aに着目し、ゼブラフィッシュ変異体を用いて、軸索投射を制御する分子機構の解明を目指した。Gsx2、Ptf1a各々の変異体では、下オリーブ核ニューロンの数が減少することがわかった。その際、Ptf1aは、下オリーブ核ニューロン、プルキンエ細胞、crest細胞のような後脳ニューロンの分化に共通に必要な因子として働く一方で、Gsx2は、下オリーブ核が分化する第7菱脳節のパターン形成にかかわるレチノイン酸シグナルによって誘導され、下オリーブ核ニューロンの細胞運命を方向づけることで、下オリーブ核ニューロンの分化を制御することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Purkinje cells in the cerebellum receive climbing fibers which originate from inferior olive nuclei (IOs) nuclei. The formation and patterning of the caudal rhombomeres (r) are controlled by gradients of fibroblast growth factor (Fgf) and retinoic acid (RA) signals: Fgf high at r4 vs. RA high at r7. The proneural gene ptf1a and the homeobox gene gsx2 are expressed in the ventricular zone of r7. The IO neurons are derived from the ptf1a+ gsx2+ progenitors in zebrafish. We established mutants for ptf1a and gsx2. Both mutant larvae showed reduction or loss of the IO neurons. The expression of ptf1a and gsx2 wasn't affected in gsx2 and ptf1a mutants, respectively. Inhibition of the RA signal resulted in reduction of the gsx2 expression and the formation of the IO neurons. Our results indicate that (1) the RA signal controls expression of gsx2 that is involved in the formation of the IO neurons, (2) Ptf1a and Gsx2 cooperatively but independently regulate the formation of the IO neurons.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経発生 神経分化 神経回路形成 転写因子 下オリーブ核 ゼブラフィッシュ 変異体

### 1. 研究開始当初の背景

神経回路は、ニューロンどうしが軸索と樹状突起を介して正確に結合することで成立する。あるニューロンの集団が軸索を伸ばして標的ニューロンへ投射する際に、元のニューロンと標的ニューロンに明確な位置関係が存在する場合があります、これを topographic map と呼ぶ。網膜視蓋投射や嗅覚受容細胞から嗅球への投射が、その代表的な例である。

しかし、topographic map が形成される(正確な軸索投射の)メカニズムは、神経回路それぞれによって異なり、普遍的なメカニズムの提唱に至っていない。

円滑な運動制御や運動学習に関わる小脳は、小脳外から異なる二つの入力情報を受け、その情報を統合することで機能を発揮している。入力線維の一つである登上線維は、後脳腹側に位置する下オリブ核ニューロンから小脳プルキンエ細胞へ軸索投射する。この下オリブ核ニューロンと投射先プルキンエ細胞の間には明確な topographic map の関係が存在する。

本研究では、topographic map を示す小脳入力線維 = 登上線維に焦点を当て、登上線維ニューロンすなわち下オリブ核ニューロンが分化し正確な軸索投射を行うメカニズムの解明を目指した。

### 2. 研究の目的

(1) Gsx2 および Ptf1a を介したオリブ核ニューロンの分化・細胞移動のメカニズム

(2) 登上線維の topographic map を示す軸索投射の分子メカニズム

について、ゼブラフィッシュの系を用いて解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 下オリブ核ニューロンの分化・細胞移動の分子メカニズムの解析を行う

：下オリブ核ニューロン神経前駆細胞に発現する Gsx2、Ptf1a の細胞分化・細胞移動に関する役割について、ゼブラフィッシュ変異体、トランスジェニックゼブラフィッシュを用いて解析する。さらに、*gsx2*、*ptf1a* 陽性細胞の遺伝子プロファイリングを行い、Gsx2/Ptf1a の下流因子を探索する。

(2) 登上線維の軸索投射、topographic map 形成の分子メカニズムの解析

：登上線維特異的 Gal4 系統を用いたモザイク解析により、ゼブラフィッシュにおける topographic map を明らかにする。さらに遺伝子プロファイリングにより、下オリブ核ニューロンに特異的に発現する軸索形成制御因子を同定し、その遺伝子発現と後脳前後軸位置情報と関連を調べる。

### 4. 研究成果

(1) Ptf1a と Gsx2 は、独立に下オリブ核ニューロンの形成に関わる。

*gsx2*<sup>-/-</sup> 個体、*ptf1a*<sup>-/-</sup> 個体を作製し、それぞれについて下オリブ核ニューロンの数を観察したところ、いずれの個体でも減少していた(図 1, 2)。また、*gsx2*<sup>-/-</sup> 個体で *ptf1a* の発現を、*ptf1a*<sup>-/-</sup> 個体で *gsx2* の発現を検索した結果、これらに変化は見られなかった。このことから、両遺伝子は、下オリブ核ニューロンの分化に必須だが、この分化には各々が独立に関わることが示された。また、*ptf1a*<sup>-/-</sup> 個体では下オリブ核ニューロンだけでなく、プルキンエ細胞、crest 細胞の分化にも影響が見られた。

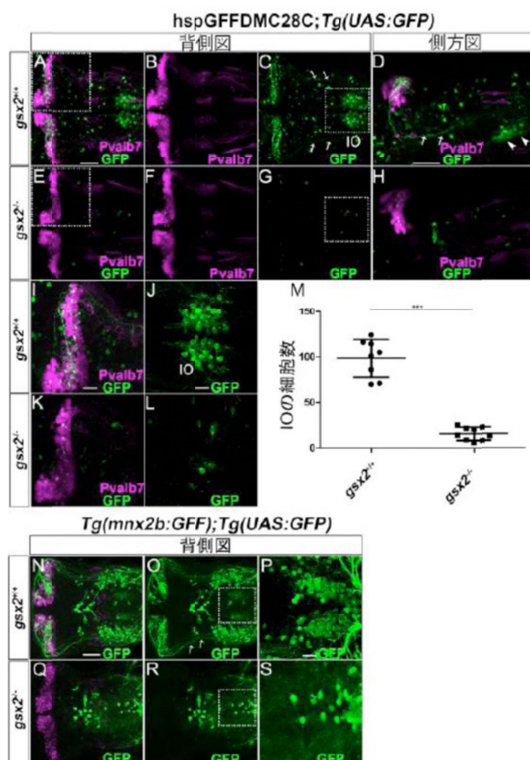


図 1 *gsx2*<sup>-/-</sup> における下オリブ核ニューロンの減少

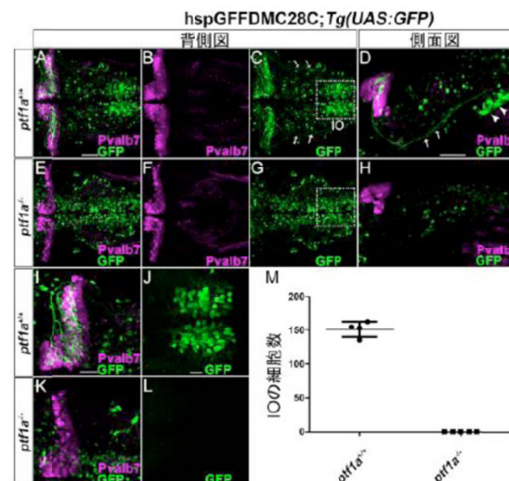


図 2 *ptf1a*<sup>-/-</sup> における下オリブ核ニューロンの減少

(2) レチノイン酸シグナルが Gsx2 を介して下オリブ核ニューロンの形成に関わる。下オリブ核ニューロンは、菱脳節 6-8 番の神経前駆細胞から由来するが、その位置情報はレチノイン酸の濃度勾配、その下流で機能する転写因子 Mafb や Hox によって制御される。そこで、第 5-6 菱脳節で発現する転写因子 Mafba のホモ変異体を解析したところ、gsx2 の発現領域が拡大した。一方、下オリブ核が分化する第 7 菱脳節のパターン形成にかかわるレチノイン酸シグナルを合成酵素 Raldh2 のノックダウンにより阻害した結果、gsx2 の発現領域が縮小した(図 3)。このことから、gsx2 の発現に対して、レチノイン酸シグナルが促進的に働き、下オリブ核ニューロンの分化を制御することが示された。

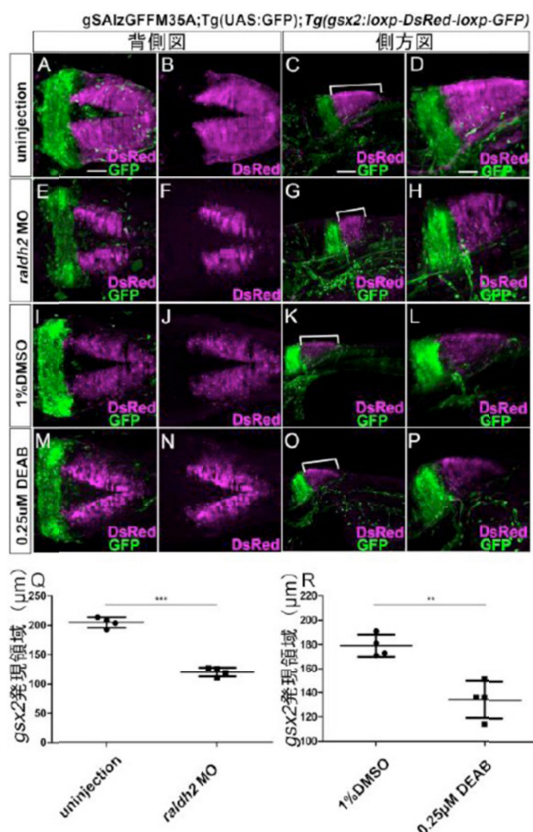


図 3 レチノイン酸シグナルは下オリブ核ニューロンの分化を促進的に制御する

(1)(2) から、Ptf1a が、後脳ニューロンの分化に共通に必要な因子として働き、これに加えて、レチノイン酸シグナルによって誘導された Gsx2 が下オリブ核ニューロンの細胞運命の方向づけに関わると予想された(図 4)。

(3) 下オリブ核ニューロンと投射先のプルキンエ細胞の位置関係を明らかにし、登上線維の topographic map の存在とその様式を解析するために、カルボシアニン蛍光色素 Dil を注入し、逆行性に登上線維を染色することを試みたが、技術的な問題でこの実験系の確立には至っていない。

(4)(3) の投射様式の解析系が成立した際には、蛍光陽性細胞を FACS で単離し、RNA-seq を行うことを視野に入れている。その予備実験として、登上線維 Gal4 系統と、Gal4 依存性のレポーター-Tg 系統 UAS:GFP を交配した、仔魚または成魚の蛍光陽性細胞の FACS 解析を試みている。しかし、採取される細胞が少なく、RNA-seq 解析において十分な RNA の抽出にはさらに条件検討が必要である。

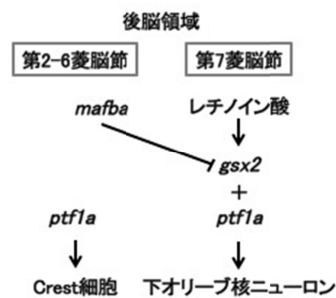


図 4 モデル

## 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 2件)

Takeuchi M, Inoue C, Goshima A, Nagao Y, Shimizu K, Miyamoto H, Shimizu T, Hashimoto H, Yonemura S, Kawahara A, Hirata Y, Yoshida M, Hibi M. (2017) Medaka and zebrafish *contactin1* mutants as a model for understanding neural circuits for motor coordination. *Genes to Cells*. 査読有 doi:10.1111/gtc.12509.

Takeuchi M, Yamaguchi S, Sakakibara M, Hayashi T, Matsuda K, Hara Y, Tanegashima C, Shimizu T, Kuraku S, Hibi M. (2016) Gene expression of granule cells and Purkinje cells in the zebrafish cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 査読有 525 (7): 1558-1585.

[学会発表](計 7件)

Takeuchi M, Transcriptome and functional analysis of genes expressed in cerebellar granule cells in zebrafish. 第 23 回小型魚類研究会, 2017 年

Takeuchi 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, 2017 年

Ito T, Takeuchi M, Roles of Ptf1a and Gsx2 in development of inferior olive nucleus neurons in zebrafish. 第 50 回日本発生生物学会, 2017 年

Takeuchi M, ゼブラフィッシュ小脳における顆粒細胞・プルキンエ細胞の遺伝子プロファイリング解析 日本発生生物学会 秋季シンポジウム 2016, 2016 年

Takeuchi M, Gene profiling of granule and Purkinje cells in the zebrafish cerebellum. 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年

Takeuchi M, Gene expression profiling of granule cells and Purkinje cells in zebrafish cerebellum. 第 22 回小型魚類研究会, 2016 年

Takeuchi M, Role of Contactin1 in neural network formation for motor coordination in medaka and zebrafish. 日本神経科学学会, 2016 年

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

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・博士研究員  
研究者番号：60625127

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

伊藤 翼 (ITO, Tsubasa )  
名古屋大学・博士課程前期課程学生