

平成21年6月15日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590175  
 研究課題名（和文） セロトニン神経の可視化によるネットワーク形成の分子メカニズム  
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of neural network formation by the visualization of serotonin neurons  
 研究代表者  
 調 恒明（SHIRABE KOMEI）  
 山口大学・大学院医学系研究科・非常勤研究員  
 研究者番号：50179058

研究成果の概要：セロトニン神経細胞とその軸索を可視化し、詳細に観察する目的で、セロトニン神経細胞特異的に GFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作成した。これにより、セロトニン神経ネットワークの構築を発生過程でリアルタイムに観察する事が可能となった。観察の結果、大脳、嗅球、小脳、脊髄への投射がそれぞれ縫線核の異なる細胞群から起こっていることが観察された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：セロトニン神経、発生、ネットワーク形成

## 1. 研究開始当初の背景

セロトニン(5-hydroxytryptamine;5-HT)は、生体内ではトリプトファンより合成される神経伝達物質である。セロトニンは血管収縮作用を有する物質として発見され、消化管粘膜、血小板、中枢神経系に存在し、血液凝固・血管収縮、疼痛、睡眠、情緒、食欲及び性などの高次の神経機能を司ることが知られている。

最近の研究で、脊髄交連ニューロンなどを中心として軸索誘因因子 Netrin や、反発因子 Semaphorin Ephrin, Slit, Wnt によって神経回路の形成が行われることが明らかになってきた。セロトニン神経は、大脳、小脳、脊髄に軸索を投射することが知られているが、その複雑なネットワークが発生過程においてどのような分子メカニズムによって形

成されるかは明らかになっていない。

ドーパミン神経のネットワーク形成の異常が、統合失調症の原因の一つとして最近注目されている。このことは精神神経疾患の原因の一つとして神経ネットワーク形成の異常が重要である事を示唆している。したがって、セロトニン神経のネットワーク形成機構を明らかにする事は気分障害を来す疾患の原因解明、治療法の開発にも重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

セロトニン神経細胞とその軸索を可視化し、詳細に観察する目的で、セロトニン神経細胞特異的に GFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作成した。セロトニン神経細胞とその軸索を可視化し、生きたままの状態の詳細に観察できるようにする目的で、セロトニン神経細胞でのみ蛍光タンパク質が発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作成することを試みた。トランスジェニックゼブラフィッシュが作成できれば、セロトニン神経ネットワーク形成に関与する可能性のある分子の機能についての検討が初めて可能となる。

## 3. 研究の方法

(1) セロトニン神経で働くプロモーターの検索  
(2) tphR 遺伝子の発現制御領域のクローニングとトランスジェニック動物の作製  
実験に用いたゼブラフィッシュは、28.5°C の水温下で飼育した。受精卵は E3 培地にて 28.5°C で培養した。色素発現を抑制するためにチロシナーゼ阻害剤である 1-フェニル-2-チオウレア (PTU) を 30 mg/l となるよう培養液に添加した。膜に局在する蛍光タンパク質 mem-YFP をセロトニン合成の律速酵素である

トリプトファン水酸化酵素 (tphR) のプロモーター (7032 bp) の下流につないだ発現ベクターを作成した。トランスジェニックゼブラフィッシュの作成は、野生型のゼブラフィッシュの受精卵の一細胞期に DNA (50 ng/ml) を微量注入し、約 200 匹を 3 ヶ月間飼育した。そのうち 50 組のペアより採卵し、受精 2 日後に蛍光タンパク質 YFP の発現を指標としてトランスジェニックゼブラフィッシュをスクリーニングした。その結果、4 つの独立したトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を得ることができた。トランスジェニックゼブラフィッシュの観察には、スクリーニングで得られた F1 世代の稚魚 (受精後 5 日目) を用い、tricine による麻酔下で 0.9% の低融点アガロースゲルで固定し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

## 4. 研究成果

(1) セロトニン神経で特異的に働く強力なプロモーターを検索する目的で、セロトニン合成の初発酵素であるトリプトファン水酸化酵素 tphR、セロトニン神経の発生に関わる転写因子 Pet-1、セロトニントランスポーター *sert* の各 cDNA を単離し in situ hybridization を行った。その結果、tphR が、神経軸索が伸長する受精後 2 日目から縫線核に最も強く発現することが分かった。  
(2) セロトニン神経に蛍光たんぱく質を発現させるために、tphR プロモーターが最も適していると考えられた。そこで、発現制御領域ゲノム DNA のクローニングを行った。tphR 遺伝子上流約 7 kb を、蛍光たんぱく質を改変した YFP-mem 遺伝子上流につないだ発現ベクターを作製した。この DNA をゼブラフィッシュの受精卵に微量注入し、48 時間後に観察したところ、セロトニン神経細胞の一部に特異的に蛍光たんぱく質の発現が観察さ

れ、軸索の走行も観察することができた。次にトランスジェニックゼブラフィッシュの作製に成功し、以下のような知見を得た。まず、一過性発現系によりセロトニン神経の軸索伸長を観察した結果、大脳・嗅球・小脳・脊髄への投射を観察することができた。免疫染色によりトランスジェニックゼブラフィッシュのセロトニン神経のより詳しい軸索伸長を観察することができた。また、Lmx1b ノックダウン実験により、tphR の発現制御に Lmx1b が重要な役割を担っていることが示された。

受精5日目のトランスジェニックゼブラフィッシュを共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、縫線核の細胞にシグナルを認め、そこから多数軸索が伸長しているのが観察された(図1)。

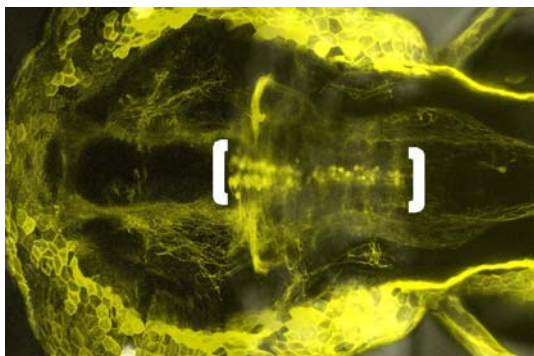
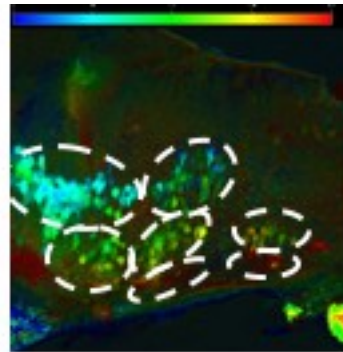


図1 トランスジェニックゼブラフィッシュの可視化されたセロトニン神経

抗 GFP 抗体、抗セロトニン抗体で二重免疫染色した結果、シグナルの重複が認められた。このことから、YFP によって可視化された神経細胞は確かにセロトニン神経細胞であることが証明された。また、抗セロトニン抗体で染色し観察し、縫線核の細胞をその位置により、7つのサブタイプに分類した(図2)。

嗅球、大脳への軸索投射を詳細に観察すると、嗅球への軸索伸長は約3ヶ所に投射している



ことが観察された(図3)。

図2 縫線核におけるサブタイプ

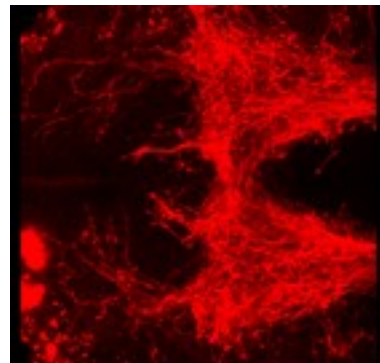


図3 嗅球における軸索投射

さらに、受精卵への DNA 微量注入による一過性発現下により、軸索伸長を観察した結果、大脳、嗅球、小脳、脊髄への投射が各々別のサブタイプの細胞から起こっていることが観察された。このことから、細胞体の位置によって分類されたセロトニン神経サブタイプの軸索は、共通のターゲットに向かって投射しており、機能的にも、またガイダンスの分子機構も共通であることが推測された。

## 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0件)

[学会発表] (計2件)

①藤井智美、吉岡秀克、調恒明、ゼブラフィ

ッシュ胚におけるセロトニン神経回路の可視化、日本分子生物学会年会、2008年12月10日、神戸ポートアイランド

②藤井智美、吉岡秀克、調恒明、ゼブラフィッシュ側線 primordial cell における kirre/duf 遺伝子の発現と機能、日本分子生物学会、2007年12月13日、横浜パシフィコ

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

調 恒明 (SHIRABE KOMEI)

山口大学・大学院医学系研究科・非常勤研究員

研究者番号：50179058

### (2) 研究分担者(2007年度)

吉岡 秀克 (YOSHIOKA HIDEKATU)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00222430

松尾 哲孝 (MATSUO NORITAKA)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：10284788

住吉 英明 (SUMIYOSHI HIDEAKI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60343357

### (3) 連携研究者(2008年度)

吉岡 秀克 (YOSHIOKA HIDEKATU)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00222430

松尾 哲孝 (MATSUO NORITAKA)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：10284788

住吉 英明 (SUMIYOSHI HIDEAKI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60343357