

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370088

研究課題名(和文)小脳コネクトーム形成機構

研究課題名(英文)Establishment of cerebellar connectome

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) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：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特異的に転写活性化因子Gal4を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を単離し、ゼブラフィッシュ小脳神経回路の解剖学的・発生学的解析を行った。また、顆粒細胞の軸索走行に異常を示す変異体の責任遺伝子をcollagen4a6と同一し、IV型コラーゲンが基底膜の構造を保つことで軸索走行を制御していることを見出した。失調性遊泳異常を示すメダカ変異体roの原因遺伝子としてcontactin1bを同一した。小脳神経回路特異的Tg系統からFACSで小脳神経回路ニューロンを単離し、トランスクリプトーム解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We isolated transgenic zebrafish lines that express a modified version of Gal4 in the cerebellar neural circuits: granule, Purkinje, eurydendroid cells, Bergmann glia, and or the neurons in the inferior olive nuclei. Using these lines, we investigated the anatomy and developmental processes of the cerebellar neural circuitry. Identification of the locus of the zebrafish mutant shiomaneki, which displays aberrant axons of granule cells, revealed that type IV collagen controls the formation of granule cell axons by regulating the integrity of the basement membrane. Analysis of the medaka mutant ro, which shows abnormal swimming behavior, revealed that Contactin1 plays a conserved role in the formation and/or function of the neural network involved in motor coordination. We carried out transcriptome analysis of cerebellar neurons to identify molecules controlling the cerebellar neural circuit formation.

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 蛍光タンパク質 可視化 ライブイメージング 変異体 神経発生

1. 研究開始当初の背景

小脳は、円滑な運動を制御する中枢神経領域であるが、近年認識・感情・学習などの高度な神経活動に参与することが知られるようになった。小脳の異常は運動失調だけでなく、自閉症などの精神疾患にもつながることが報告されており、小脳神経回路形成の理解は、高次神経活動のメカニズムの解明につながると考えられる。

小脳の高次神経活動を制御するのが、脊椎動物で保存された小脳構造と神経回路である(図1)。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、苔状線維の情報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、脳幹部に位置する下オリーブ核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。この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(哺乳類では小脳核、魚類では eurydendroid 細胞)を介して小脳外へ出力されることで、複雑な神経活動を制御している。小脳神経回路の構造には以下のような解剖学的特徴がある。

(1) 特定の下オリーブ核ニューロンは、特定のプルキンエ細胞と一対一の関係で登上線維を投射する。

(2) プルキンエ細胞は、複雑な樹状突起を有しており、多数の顆粒細胞の軸索から信号を受け取る。

(3) 顆粒細胞の軸索は平行に走行し(平行線維)、一つの顆粒細胞の軸索が、多数のプルキンエ細胞樹状突起とシナプスを作り、信号を伝達する構造をとっている。

これらの特徴は小脳の神経活動に必要であると考えられているが、その神経回路形成過程および形成の分子機構は明らかでなかった。これまでの申請者らの研究から、ゼブラフィッシュ顆粒細胞の軸索異常を示す変異体 *shiomanekei* および小脳失調様の行動異常を示すメダカ変異体 *ro* の責任遺伝子の候補として、それぞれ基底膜構成要素 IV 型コラーゲンおよび膜タンパク質 Contactin1 の遺伝子が上がっているが、これら分子の小脳神経回路形成および機能における詳細な役割は明らかでなかった。

2. 研究の目的

(1) 小脳神経回路形成過程の解明

蛍光タンパク質を用いて小脳神経回路、特に登上線維、顆粒細胞軸索、プルキンエ細胞の樹状突起を可視化し、in vivo での回路形成過程を明らかにする。

(2) 小脳神経回路形成を制御する分子メカニズムの解明

基底膜依存性の顆粒細胞の軸索形成のメカニズムを明らかにする。

Contactin1 による神経回路形成機構およ

び神経回路機能における役割を解明する。

小脳神経回路を構成するニューロンに特異的に発現する遺伝子を探索し、小脳神経回路形成に参与する分子の候補を見出す。

3. 研究の方法

(1) 小脳神経回路形成過程の解析

小脳神経回路ニューロンに特異的に改変型 Gal4 を発現するトランスジェニック(Tg)ゼブラフィッシュ系統の確立: 酵母の転写因子 Gal4 の DNA 結合ドメインと単純ヘルペスウイルスの VP16 タンパク質の転写活性化コアダメインをつなげた融合タンパク質 Gal4FF をコードする遺伝子と Tol2 トランスポゾンを用いて、遺伝子・エンハンサートラップスクリーニングを行い、Gal4 依存性にレポーター遺伝子(UAS:GFP)が小脳神経回路に発現する Gal4 系統を単離した。また、プルキンエ細胞特異的遺伝子 *aldolase Ca* (*aldoca*) の上流 5 kbp のプロモーターを用いて Gal4FF または膜型蛍光タンパク質(GAP-Venus、GAP-mCherry)をプルキンエ細胞で発現する Tg 系統を確立した。

小脳神経回路の解剖学的解析: 上記の Gal4 系統と、レポーター系統(UAS:GFP、UAS:Kaede)と交配し作製した仔魚および成魚を用いて、神経回路の解剖学的解析を行った。さらに Gal4 依存性に神経トレーサーである WGA(経シナプス性に運搬される)を発現する UAS:AcGFP-P2A-WGA 系統と交配することで、小脳神経回路の構造を解析した。

小脳神経回路形成過程のライブイメージング解析: 顆粒細胞特異的 Gal4 系統とレポーター系統 UAS:GFP、UAS:Kaede を交配させ得られた仔魚を用いて、顆粒細胞の軸索形成過程のライブイメージングを行った。

(2) 小脳神経回路形成を制御する分子メカニズムの解析

基底膜依存性顆粒細胞軸索形成機構
顆粒細胞軸索形成に異常を示す変異体 *shiomanekei* の責任遺伝子および表現型の詳細な解析を行った。顆粒細胞軸索形成と基底膜との関係を免疫組織染色および電子顕微鏡により解析した。

Contactin1 を介した神経回路形成機構の解析: メダカ *ro* 変異体の責任遺伝子を確認するため、責任候補遺伝子 *contactin1b* を CRISPR/Cas9 法でノックアウトし、同じ表現型になること、*ro* の変異を相補できないことを確認した。さらに解析ツールがそろっているゼブラフィッシュの *contactin1a*、*1b* の遺伝子を、TALEN 法を用いてノックアウトし、変異体の表現型解析を行った。

小脳神経回路を構成するニューロンに特異的に発現する遺伝子の探索: (1) で単離・作製したゼブラフィッシュ Tg 系統から、蛍光タンパク質発現細胞を FACS (fluorescence activated cell sorting) で単離し、RNA を回収後、RNA sequencing を行った。

4. 研究成果

(1) 小脳神経回路形成過程の解明

小脳神経回路ニューロンに特異的に改変型 Gal4 を発現するゼブラフィッシュ Tg 系統の確立：顆粒細胞・プルキンエ細胞・投射ニューロン (eurydendroid 細胞)、下オリーブ核ニューロンおよび Bergmann グリア細胞に特異的に改変型 Gal4 を発現する系統を単離した。プルキンエ細胞に関しては、膜型 Venus および膜型 mCherry を発現する Tg 系統も合わせて作製した (図 1)。

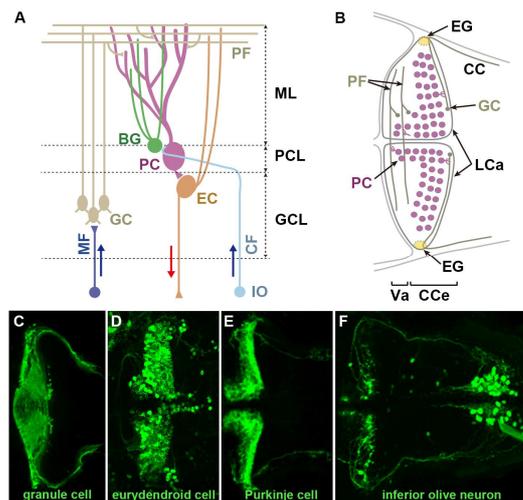


図 1 ゼブラフィッシュ小脳と小脳神経回路を標識するトランスジェニックフィッシュ。(A) ゼブラフィッシュ小脳神経回路の模式図。(B) ゼブラフィッシュ小脳領域の背側像模式図。顆粒細胞特異的 Gal4 系統 (C)、eurydendroid 細胞特異的 Gal4 系統 (D)、プルキンエ細胞特異的 GAP-Venus 系統 (E)、下オリーブ核特異的 Gal4 系統 (F)。

小脳神経回路の解剖学的解析：eurydendroid 細胞の軸索は、小脳を出た後腹側で交差し、少なくとも一部は反対側の中脳被蓋に投射することを見出した。下オリーブ核からの登上線維は、正中線で交差したのち、反対側の小脳のプルキンエ細胞に投射していることを見出した。顆粒細胞の WGA を発現させると、標的細胞であるプルキンエ細胞・eurydendroid 細胞、またプルキンエ細胞の入力細胞である下オリーブ核にも WGA が検出されたことから、顆粒細胞とプルキンエ細胞・eurydendroid 細胞・下オリーブ核ニューロンの直接的・間接的接続を確認することができた。

小脳神経回路形成過程のライブイメージング解析：小脳体の顆粒細胞の細胞体は、分化直後表層でランダムに動く。その後、顆粒細胞は軸索 (平行線維) を形成するとともに、細胞体を腹側に移動することを観察した。平行線維をレーザーで切断すると、腹側への細胞体の移動が阻害されたことから、軸索形成と細胞体の移動は連動していることが明らかとなった。また、顆粒細胞特異的 Gal4 系統に、モザイク UAS:Kaede レポーター系統と交配、または Toll トランスポゾンを用いてレ

ポーター遺伝子をモザイクに発現させることで、詳細な顆粒細胞の構造を解析できた。典型的なゼブラフィッシュの小脳体の顆粒細胞は、二本の樹状突起を有しており、T 字型の軸索 (平行線維) を形成しプルキンエ細胞に投射する (図 2)。一方、外側の顆粒細胞 (顆粒隆起) も T 字型の軸索を持つが、同側性と反対側の背側後脳に存在する Crest 細胞に投射する。尾側の顆粒細胞 (尾葉) の軸索は、同側の Crest 細胞にしか投射しないことが明らかとなった。外側および尾側の顆粒細胞は、小脳内ではプルキンエ細胞にも投射していることなど、顆粒細胞の細胞体と軸索形態の詳細な関係を明らかにした。

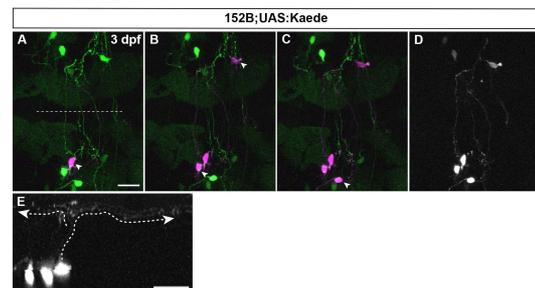


図 2 顆粒細胞特異的 Gal4 系統とモザイク UAS:Kaede レポーター系統交配による顆粒細胞軸索構造の解析。受精後 3 日目の仔魚の小脳領域背側像 (A-C)。顆粒細胞の細胞体にレーザーを照射し標識。1 細胞体 (A)、3 細胞体 (B)、4 細胞体 (C) を標識。変換した Kaede のイメージ：背側像 (D)、横断面像 (E)。

(2) 小脳神経回路形成を制御する分子メカニズムの解析：

基底膜依存性顆粒細胞軸索形成機構：shiomanekei 変異体においては、外側および尾側の顆粒細胞の、背側後脳の Crest 細胞への軸索投射に異常を示す (図 3)。ポジショナルクローニングにより、shiomanekei 変異体の責任遺伝子を IV 型コラーゲン遺伝子 collagen4a6 と同定した。

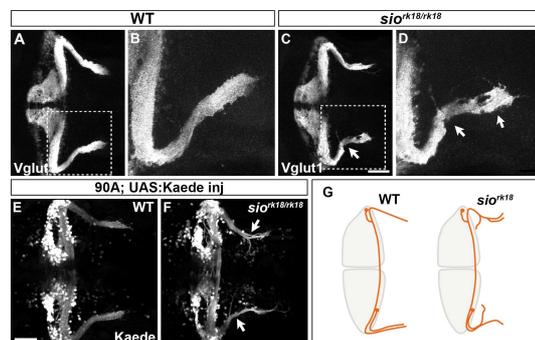


図 3 IV 型コラーゲン遺伝子 collagen4a6 は顆粒細胞軸索形成に必要である。(A-D) 野生型 (WT) と shiomanekei 変異体 (shiomanekei) の受精後 5 日目の仔魚を、顆粒細胞の軸索マーカーである Vglut1 抗体で染色したもの (小脳背側像)。 (E, F) 小脳顆粒細胞を顆粒細胞特異的 Gal4 系統で可視化した像。 (G) 野生型と shiomanekei 変異体の顆粒細胞軸索走行の模式図。

ヒトにおいては Collagen4a6 と Collagen4a5 は、三量体を形成し基底膜の重要な構成要素として機能することが知られている。ゼブラフィッシュの *collagen4a6* および *collagen4a5* 遺伝子は、脳を囲む上皮細胞に発現しており、Collagen4a6 と Collagen4a5 は脳を囲む基底膜に存在すると考えられた。これまで、ゼブラフィッシュの *collagen4a5* の変異体では、網膜神経節細胞の軸索走行に異常を示すことが報告されていたが、*collagen4a5* おおおよび *4a6* の変異体 (*shionameki* 変異体) は、網膜神経節細胞および小脳顆粒細胞の両方の軸索走行に異常を示すことから、Collagen4a5 と *4a6* の三量体が、2 種類のニューロンの軸索形成に関与していると考えられた。IV 型コラーゲンは、軸索ガイダンス分子 Slit と結合し、その濃度勾配を制御することで、軸索走行を制御していることが報告されていたが、Slit を過剰発現させても、小脳顆粒細胞の軸索走行に影響を与えなかった。さらに、IV 型コラーゲン変異体では顆粒細胞および網膜神経節細胞の軸索異常は、基底膜の異常と関連していることが見出された (図 4)。また、仔魚の顆粒細胞軸索は、レーザーの切断後に再生するが、*collagen4a6* 変異体は元の軸索と、再生軸索が類似の軸索走行異常を示した。以上の結果は、IV 型コラーゲンは、基底膜の構造を安定化させることで、顆粒細胞の軸索を制御しており、基底膜が標的への軸索の通り道を提供していると考えられた。

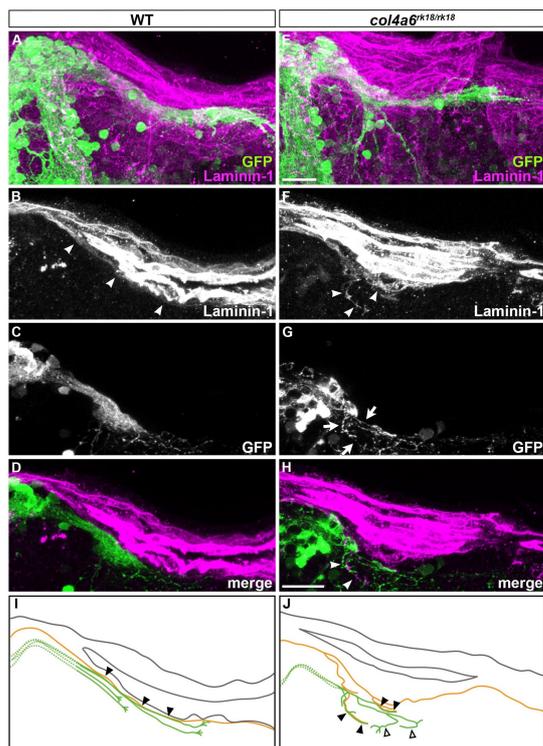


図 4 *collagen4a6* 変異体において基底膜異常と顆粒細胞軸索走行異常は連動している。(A-H) 野生型および *collagen4a6* 変異体の、基底膜を Laminin-1 抗体で、顆粒細胞軸索を顆粒細胞特異的 Gal4 系統を用いて可視化 (GFP) している。背側後脳の背側像。(I, J) 抗体染色の結果を模式図で示している。

Contactin1 を介した神経回路形成機構：ポジショナルクローニングにより、*ro* 変異体の遺伝子座は *contactin1b* 遺伝子を含む領域にマップされ、*ro* 変異体のゲノムにおいては *contactin1b* の exon15 内に 23 bp の欠失変異が確認できた。*contactin1b* は巨大遺伝子であり、野生型遺伝子導入による回復実験が困難であることから、CRISPR/Cas9 法による *contactin1b* 新規変異体アレルの作製を行った。exon3 と exon6 を独立に破壊した変異体においても *ro* の変異体と同様に失調様遊泳異常を示した。さらに、exon3 の変異は、*ro* 変異を相補しないことから、*contactin1b* が責任遺伝子であると確定した。Contactin1 の役割を詳細に検討するため、ゼブラフィッシュの *contactin1a* および *contactin1b* 遺伝子の変異体を TALEN 法も用いて作製した。ゼブラフィッシュの *contactin1b* 変異体も *ro* 変異体同様遊泳異常を示した。*contactin1a/1b* は小脳の顆粒細胞およびプルキンエ細胞に発現するが、メダカ *ro* 変異体成魚、ゼブラフィッシュ *contactin1a/1b* ダブル変異体仔魚において、小脳の大きな異常は認められなかった。マウスの *Contactin1* 変異体は小脳神経回路に異常を示すことが報告されており、メダカやゼブラフィッシュでは他の *contactin* 遺伝子が *contactin1* の機能を補っている可能性が考えられた。また、メダカ *contactin1b* 変異体 (*ro*) では、早い水流に対して定位を保つ能力が減弱していた。Contactin1 は前庭情報や視覚情報などの感覚情報を用いて運動制御を行う神経回路の形成・機能に関与するものと考えられた。

小脳神経回路を構成するニューロンに特異的に発現する遺伝子の探索：顆粒細胞、プルキンエ細胞、eurydendroid 細胞、下オリブ核ニューロン、Bergmann グリア細胞に GFP/Venus を発現する Tg 系統から、GFP/Venus 陽性細胞を FACS で単離し RNA sequencing を行った。これら細胞種の中、顆粒細胞とプルキンエ細胞のトランスクリプトームは、他の細胞種の混入が少なく、この 2 種類の細胞でトランスクリプトームの比較解析を行い、顆粒細胞およびプルキンエ細胞に特異的な遺伝子を多数同定し、in situ hybridization により発現の解析を行った。これらの遺伝子の中には、神経回路形成初期 (受精後 5 日) から発現しており、かつマウス等で解析されていない遺伝子が含まれていた。神経回路形成に関わる候補遺伝子を選択し、CRISPR/Cas9 法による変異体作製を開始した。

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 9 件)

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.
Takeuchi, M., Matsuda, K., Yamaguchi, S., Asakawa K, Miyasaka, N, Lal, P., Yoshihara, Y., Koga, A., Kawakami, K., Shimizu, T., Hibi, M. Establishment of Gal4 transgenic zebrafish lines for analysis of development of cerebellar neural circuitry. *Dev. Biol.* *397*, 1-17, 2015. 査読有
DOI:10.1016/j.ydbio.2014.09.030.
Kim, J.D., Park, K.E., 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 arbors and motor coordination. *Sci. Adv.* *1*, e1500615, 2015. 査読有
DOI:10.1126/sciadv.1500615.
Nagao, Y., Suzuki, T., Shimizu, A., Kimura, T., Seki, R., Adachi, T., Inoue, C., Omae, Y., Kamei, Y., Hara, I., Taniguchi, Y., Naruse, K., Wakamatsu, Y., Kelsh, R.N., Hibi, M., Hashimoto, H. Sox5 functions as a fate switch in medaka pigment cell development. *PLoS Genet.* *10*, e1004246, 2014. 査読有
DOI:10.1371/journal.pgen.1004246.
Kwon, H.B., Fukuhara, S., Asakawa, K., Ando, K., Kashiwada, T., Kawakami, K., Hibi, M., Kwon, Y.G., Kim, K.W., Alitalo, K., Mochizuki, N. The parallel growth of motoneuron axons with the dorsal aorta depends on Vegfc/Vegfr3 signaling in zebrafish. *Development* *140*, 408104090, 2013. 査読有 DOI: 10.1242/dev.091702.
Yaniscostas, C., Barbieri, E., Hibi, M., Brice, A., Stevanin, G., Soussi-Yaniscostas, N. Requirement for zebrafish ataxin-7 in differentiation of photoreceptors and cerebellar neurons. *PLoS One* *7*, e50705, 2012. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0050705.
Tran, L.D., Hino, H., Quach, H., Lim S., Shindo, A., Mimori-Kiyosue, Y., Mione, M., Ueno, N., Winkler, C., Hibi, M., Sampath, K. Dynamic microtubules at the vegetal cortex predict the embryonic axis in zebrafish. *Development* *139*, 3644-3652, 2012. 査読有
DOI: 10.1242/dev.082362.
Kuscha, V., Fraser, S.L., Dias, T.B., Hibi, M., Becker, T., Becker, C.G. Lesion-induced generation of interneuron cell types in specific dorso-ventral domains in the spinal cord of adult zebrafish. *J. Comp. Neurol.* *520*, 3604-3616, 2012. 査読有
DOI:10.1002/cne.23115.

Hashimoto, M., Hibi, M. Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Dev. Growth Differ.* *54*, 373-389, 2012. 査読有
DOI:10.1111/j.1440-169X.2012.01348.x.

[学会発表](計10件)

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)
Hibi, M., Takeuchi, M., Yamaguchi, S., Matsuda, K., Hayashi, T., Hara, Y., Hayashi, T., Sakakibara, Y., Yoshida, M., Kuraku, S., and 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)
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)
Hibi, M., Takeuchi, M., Yamaguchi, S.*, Matsuda, K.*, Yonemura, S., Asakawa, K., Kawakami, K., and Shimizu, T. Deciphering cerebellar neural circuitry using the zebrafish model. 高等研プロジェクト会議「ゲノム工学とイメージングサイエンスに基づく生命システム研究の新展開」2014.2 (京都)
Hibi, M., Takeuchi, M., Yamaguchi, S.*, Matsuda, K.*, Yonemura, S., Asakawa, K., Takada, S., Kawakami, K., and Shimizu, T. Development of functional cerebellar neural circuitry in zebrafish. 第36回日本分子生物学学会年会. 2013.12. (神戸)
Hibi, M. Development of cerebellar neural circuitry. Janelia Workshop on Zebrafish Genetics, Transgenesis, and Systems Biology. 2013.11 (Ashburn, VA, USA)
日比正彦 真骨魚類における小脳神経回路形成 総合研究大学院大学学融合「脳の進化」研究会. 2012.11.(湘南)(招待講演)
Hibi, M. Formation of cerebellar neural circuits in zebrafish. Swiss-Japanese Developmental Biology Meeting. 2012.11. (京都)(口頭発表)
Hibi, M., Takeuchi, M., Yonemura, S., Asakawa, K., Kawakami, K., and Shimizu, T. Role of basement membrane in axogenesis of cerebellar granule cells in zebrafish. Asia-Pacific Developmental Biology Conference 2012. 2012.10.(台北, 台湾)(ポスター発表)
Hibi, M., Takeuchi, M., Kusuda, R., Inoue, C., Shimizu, K., Asakawa, K., Kawakami, K., Yonemura, S., and Shimizu, T. Genetic control for neural circuit formation in

teleost cerebellum. 第 45 回日本発生生物学会合同大会 . 2012.5. (神戸)(招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

Hibi, M. and Shimizu, T. Deciphering Cerebellar Neural Circuitry Involved in Higher Order Functions Using the Zebrafish Model. in: Kondoh H and Kuroiwa (Eds.), New Principles in Developmental Processes. Springer, pp. 161-184, 2014. 査読有

〔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