

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14523

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ遺伝学とウイルスベクターを用いた神経回路トレーシング法の確立

研究課題名(英文) Establishment of recombinant rabies virus-mediated retrograde tracing of neural circuits in zebrafish

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：レトロウイルスのエンベロープタンパク質EnvAを発現する組換え狂犬病ウイルス(RV)を感染させるため、EnvA受容体TVAの融合蛍光タンパク質とRV外被糖タンパク質Gを、プルキンエ細胞と顆粒細胞に発現するゼブラフィッシュ系統を樹立した。RVをプルキンエ細胞に感染させた結果、RV由来のGFPの発現が顆粒細胞と下オリーブ核ニューロンに検出された。RVを顆粒細胞に感染させた結果、視覚・前庭感覚・側線感覚を受ける領域、終脳から投射を受ける領域のニューロンにGFPの発現を認めた。これらは、ゼブラフィッシュでの逆行性トレーシングの確立を示しており、さらにゼブラフィッシュ顆粒細胞の入力細胞を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Rabies virus (RV) infects neurons through its glycoprotein (G). Recombinant RV that contains the GFP gene instead of the G gene and is pseudotyped with the retroviral envelope protein (EnvA) was developed for neural circuit tracing. The pseudotyped RV can infect neurons that express TVA (the EnvA receptor)-mCherry. If the G is provided in the same cells, the RV particles are generated and transmitted mono-synaptically to input neurons. We generated transgenic lines that express TVA-mCherry and G in Purkinje cells (PCs) or granule cells (GCs). When PCs were infected with the pseudotyped RV, GFP was detected in GCs and neurons in the inferior olive nuclei. When GCs were infected with the virus, GFP was detected in neurons in various brain regions that receive inputs from the visual, vestibular, lateral line sensory systems, or telencephalon. Our findings validated the RV-mediated retrograde tracing in zebrafish and identified input neurons for GCs in zebrafish.

研究分野：発生生物学

キーワード：逆行性トレーシング 狂犬病ウイルス 神経回路 神経解剖学 小脳 苔状線維 登上線維 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

これまでの神経回路形成および機能解析は、哺乳類を用いて主に行われてきた。しかし、哺乳類の中枢神経回路は複雑であり、神経回路の形成過程や機能を可視化することは難しい。一方、ゼブラフィッシュ等の小型魚類は、脊椎動物の神経回路を理解する良いモデルとして、近年多くの研究者に用いられるようになってきた。小型魚類の神経回路形成過程は脊椎動物共通の発生原理で制御されていると考えられ、構造的にも小型魚類と哺乳類で多くの類似点がある。また、種々の蛍光タンパク質を発現させることにより、少なくとも仔魚において、中枢神経全体の発生過程および機能を可視化することが可能になってきた。しかし、神経回路の解剖学的知見に関しては、絶対量が不足している。

近年、狂犬病ウイルスや水疱性口内炎症ウイルスを用いた哺乳類の神経回路標識法が確立されつつある。これらのウイルスは感染したニューロンから順行性・逆行性にウイルス粒子が軸索内を運搬され、シナプスを介して入力・出力ニューロンに感染することを利用しており、ウイルスに蛍光タンパク質等を組み込むことにより、神経回路を標識するものである。しかし、これらのウイルスはゼブラフィッシュに感染することが示されているものの、ゼブラフィッシュの神経回路標識には殆んど用いられていなかった。

2. 研究の目的

私達はこれまで、ゼブラフィッシュを用いて神経誘導、中枢神経領域形成の分子機構の解析を行ってきた。さらに、ゼブラフィッシュの小脳神経回路の解剖学・発生生物学の解析を行い、ゼブラフィッシュの小脳は、哺乳類に比較して単純であるが、基本的な層構造・神経回路構造は保存されていること、小脳形成は非常に早く、登上線維・平行線維などの簡単な小脳神経回路は受精後5日までに観察されることを明らかとした。また、小脳神経回路ニューロンの細胞分化、回路形成過程を制御する分子メカニズムの解明を行ってきた。さらに、小脳神経回路ニューロン特異的に転写因子 Gal4 を発現するトランスジェニック (Tg) 系統を多数樹立し、それらを用いて小脳神経回路ニューロンに特異的に発現する遺伝子を多数単離した。

これらの解析からゼブラフィッシュの小脳神経回路の大まかな構造は分かりつつあるものの、シナプスを介した神経回路の接続に関しては、不明な点が多い。本研究では、ゼブラフィッシュの遺伝学を用いて、狂犬病ウイルスの感染性を特定のニューロンに限定することにより、特定のゼブラフィッシュ神経回路を標識する手法を確立すること、この手法を用いて小脳顆粒細胞の

入力(苔状線維)細胞を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

狂犬病ウイルスは RNA ウイルスであり、ニューロンに感染後、ウイルス粒子は軸索を逆行性に輸送され、シナプスを介して入力線維に感染が拡大する(図1)。狂犬病ウイルスの外被糖タンパク質(G)は、ウイルスのパッケージングおよび経シナプス感染に必要なが、ウイルス遺伝子の発現やウイルスの複製には必須ではない。狂犬病ウイルスのG遺伝子を欠損させ、蛍光タンパク質 GFP 遺伝子を組み込む。さらに、細胞株を用いたウイルスのパッケージング過程で、AALV のエンベロープタンパク質 EnvA と狂犬病ウイルスの G を融合させたタンパク質 (EnvA-G) を表面にもった pseudotype の狂犬病ウイルスを作製することができる (EnvA-RvΔG-GFP; 連携研究者小坂田文隆により作製・供給)。

特定の小脳ニューロンに EnvA の受容体 TVA(実際は、蛍光タンパク質 mCherry との融合タンパク質 TVA-mCherry を用いた)と狂犬病ウイルス G タンパク質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作製し、pseudotype 化した狂犬病ウイルスを感染させる。TVA-mCherry と G を発現したニューロンのみウイルスに感染する。感染したニューロンでは狂犬病ウイルス G タンパク質が発現しているため、ウイルス粒子に G が組み込まれ、軸索を逆行性に輸送され、さらに入力線維へと経シナプス的にウイルスが感染する。組換え狂犬病ウイルスは GFP 遺伝子が組み込まれているので、入力ニューロンが GFP で標識される。

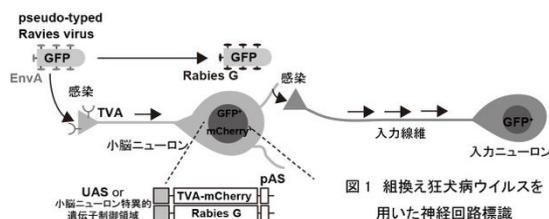


図1 組換え狂犬病ウイルスを用いた神経回路標識

4. 研究成果

(1) 小脳ニューロン特異的に TVA-mCherry と狂犬病ウイルス G を発現する Tg 系統の樹立

ブルキンエ細胞特異的遺伝子 aldolase Ca (aldoca) および顆粒細胞特異的遺伝子 cerebellin12 (cbln12) の遺伝子制御領域 (エンハンサー・プロモーター) を用いて、TVA-mCherry または G をブルキンエ細胞または顆粒細胞に発現する Tg 系統を樹立した。G 発現 Tg 系統に関しては、Tg の確認のため、心臓に特異的に mCherry を発現する遺伝子を発現プラスミドに組み込んだものを使用した。cbln12 遺伝子制御領域は、本研究において新たに単離したものである。

(2) 神経回路トレーシング法の確立

プルキンエ細胞特異的にTVA-mCherryとGを発現するTg系統の成魚小脳にpsuedotype化した狂犬病ウイルス(EnvA-RvΔG-GFP)液を注入した。34°Cで5日間飼育した後、脳を固定し切片を作製した結果、プルキンエ細胞にmCherry(TVA-mCherry)とGFPの発現を認めた。さらに、プルキンエ細胞の入力細胞である顆粒細胞(平行線維)および下オリブ核ニューロン(登上線維)においてGFPの発現が観察された。これらの結果は、狂犬病ウイルスがプルキンエ細胞に一次感染し、逆行性に入力細胞に二次感染し標識する経シナプスの神経回路トレーシング法を確立できたことを示している。

(3) 苔状線維ニューロンの同定

顆粒細胞の入力(苔状線維)細胞は、脊椎動物の動物種により多様性があり、ゼブラフィッシュの苔状線維は未だ詳細が不明である。顆粒細胞にTVA-mCherryとGを発現させたTg系統の成魚小脳に、(2)と同様に狂犬病ウイルス液を注入し、10日間飼育後、切片を作製し観察を行った。その結果、顆粒細胞の入力細胞(GFP陽性細胞)として、以下の領域のニューロンを見出した。

- i) 視覚情報の入力を受ける ventral optic nucleus (VAO)、 paracommissural nucleus (PCN)、 torus longitudinalis (TL)腹側領域
- ii) 終脳からの投射を受ける nucleus lateralis valvula (NLV)
- iii) central gray (GC)
- iv) 前庭感覚情報を受ける medial octavolateral nucleus (MON)
- v) 側線感覚情報を受ける descending octaval nucleus (DON)

小脳は感覚情報と運動コマンド情報を統合する重要な神経組織であり、これらの入力情報は、小脳が関与する円滑な運動制御や運動学習、さらに高次な脳機能に關与するものと考えられる。データの収集・再現性の確認を行っており、近い将来に論文として発表する予定である。今後は、これらの神経回路情報を用いて、ゼブラフィッシュを用いた小脳神経回路機能解析を行う。

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6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)

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)

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, Shimizu M. Evolution and development of cerebellar neural circuitry in teleosts. 第48回日本発生物学会大会 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)

〔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

小坂田 文隆 (OSAKADA FUMITAKA)
名古屋大学・創薬科学研究科・准教授
研究者番号：60455334

(4) 研究協力者

道白 隆志 (DOHAKU RYUJI)
名古屋大学・理学研究科・博士課程前期課程学生