

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19300118
 研究課題名（和文）ゼブラフィッシュ脊髄運動系神経回路の形成機構および回路機能の解析
 研究課題名（英文）Analysis of the locomotor circuit formation in zebrafish spinal cord

研究代表者

東島 眞一（HIGASHIJIMA SHIN-ICHI）
 大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・
 岡崎統合バイオサイエンスセンター・准教授
 研究者番号：80270479

研究成果の概要（和文）：本研究では、ゼブラフィッシュを用いて脊椎動物脊髄の発生様式の解析を行った。とくに p2 とよばれる領域から生じる 2 種類のタイプのニューロンである、V2a、V2b ニューロンの発生様式に焦点を当てて解析を行った。継時観察により、p2 前駆体細胞の大部分は、一度だけ分裂し、V2a と V2b ニューロンを対で生むことが分かった。本研究は、脊椎動物の中樞神経系において、1 つの神経前駆体細胞から非対称分裂により 2 つの異なるタイプのニューロンが再現的に生じることを示す初めての例であり、脊椎動物中樞神経発生他の領域についても同様の様式の非対称分裂が生じている可能性を示唆する結果である。

研究成果の概要（英文）：The p2 progenitor domain in the ventral spinal cord gives rise to two interneuron subtypes, V2a and V2b. The mechanism as to how V2a and V2b neurons arise from a single progenitor domain was unknown. We showed in this study that p2 progenitors divide once to produce V2a/V2b neuron pairs, indicating that V2a and V2b neurons are generated by the asymmetric division of pair-producing progenitor cells. We also showed that Delta-Notch interactions between sister cells play a critical role in the final outcome of these asymmetric divisions. This mechanism for determining cell fate is similar to asymmetric divisions that occur during *Drosophila* neurogenesis, where ganglion mother cells divide once to produce distinct neurons. However, unlike in *Drosophila*, the divisional axes of p2 progenitors in zebrafish were not fixed. We report that the terminal division of pair-producing progenitor cells in vertebrate neurogenesis can reproducibly produce two distinct neurons through a mechanism that may not depend on the orientation of the division axis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：ゼブラフィッシュ、神経分化、神経回路、トランスジェニック、脊髄

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の脊髄発生においては、転写因子の発現により、まず背腹軸に沿って 11 のドメインが形成される。それに引き続いて、それぞれのドメインからさらに複数種類の神経細胞が生じることが知られていた。しかしながら、どのような発生機構により、単一のドメインから複数種類の神経細胞が生じるかについては不明であった。また、複数種類生じる神経細胞の詳しい性質についても、ほとんどのことは不明であった。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究では、単一ドメインから複数の神経細胞が生じる際の発生メカニズムの解明を目指した。また、生じる神経細胞の性質についての解明にも取り組んだ。背腹軸に沿って生じる 11 のドメインのうち、特に p2 とよばれる領域に焦点を当てて解析を進めた。P2 領域からは、V2a, V2b の 2 種類の神経細胞が生じることが知られており、V2a, V2b ニューロンの発生メカニズムの解明、および、それら神経細胞の機能解析が本研究の目的である。

3. 研究の方法

p2 領域の神経前駆体細胞、および、そこから生じる神経細胞を生きのまま観察するため、トランスジェニックゼブラフィッシュ Tg[vsx1:GFP]を作成した。そして、このトランスジェニックフィッシュを用いて、p2 神経前駆体細胞からニューロンが生じる際の細胞系譜を継時観察により解析した。継時観察後に、生成されたニューロンが V2a, V2b ニューロンのどちらに属するのかを、Chx10, Scl タンパク質に対する抗体反応で調べた。Chx10 は V2a ニューロンで発現し、Scl は V2b ニューロンで発現することが知られている。なお、ゼブラフィッシュの Chx10, Scl タンパク質に対する抗体は存在しなかったため、それぞれのタンパク質に対する抗体を本研究期間内に作成して、継時観察に臨んだ。

また、V2a, V2b ニューロンの神経細胞としての性質を調べるため、chx10、および scl プロモーターを単離して、それらの成魚のもとに GFP を発現するトランスジェニックフィッシュ (Tg[chx10:GFP, Tg[scl:GFP]) を作成した。作成したトランス時得ニックフィッシュを用いて、V2a ニューロン、V2b ニューロンの形態、神経伝達物質特性、神経回路中での機能を、解剖学的手法と電気生理学的手法を用いて解析した。電気生理学的記録に際しては、幼魚をまず神経筋弛緩剤であるブンガロトキシンで非動化し、その状態のもとで記録を行った。

4. 研究成果

まず Tg[vsx1:GFP]の最初期における GFP の発現を調べた結果、GFP は p2 神経前駆体細胞すべてで発現するのではなく、p2 神経前駆体細胞の一部で発現が上昇してくることが判明した。継時観察により、この GFP 発現細胞は一度だけ分裂し、2つのニューロンを産み出すことが分かった。さらに生じた2つのニューロンを Chx10, Scl 抗体で染色することにより、それらはつねに V2a と V2b ニューロンのペアーであることが明らかとなった。この結果は、V2a と V2b ニューロンが一对のニューロンを生じる分裂、かつ非対称な分裂によって生じることを示している。さらに、Delta-Notch シグナリングの相互作用が姉妹細胞間で起こることが、この分裂が結果として非対称になるために重要な役割を果たしていることを示唆する結果も得られた。この細胞運命決定のメカニズムはショウジョウバエの神経母細胞が、非対称分裂によって二つの異なるニューロンを生じる場合と良く似ている。しかし、ショウジョウバエの場合と異なり、ゼブラフィッシュの p2 前駆体細胞の分裂軸の方向は決まっていなかった。これらの結果は、脊椎動物の神経発生において、一对のニューロンを生じる神経前駆体細胞の最終分裂が、分裂軸の方向性に依存しないメカニズムを介して、二

つの異なるニューロンを生むことができることを示している。本研究は、脊椎動物の中樞神経系において、1つの神経前駆体細胞から非対称分裂により2つの異なるタイプのニューロンが再現的に生じることを示す初めての例である。哺乳類脳形成においても、1つの前駆体細胞によりニューロンペアを産生する例が知られている。そこにおいても、本研究で示されたように、**Delta-Notch** を介した姉妹細胞同士の相互作用により2つの異なるタイプのニューロンが生じる機構が存在するかもしれない。

また、V2a, V2b ニューロンの機能解析も行った。V2a ニューロンの研究に対する成果を、まず記す。V2a ニューロンの性質を調べるために、Tg[chx10:GFP]トランスジェニックフィッシュを作成し、GFP でラベルされた神経細胞の詳細な解剖学的解析を行った。その結果、すべての chx10 ニューロンについて、その軸索はまず腹側に向かい、ついで後方へターンして脊髄の同側を尾部方向へ向かう軌跡を取ることが明らかとなった。すなわち、chx10 ニューロンは同側下行性ニューロン (ipsilateral descending neuron) であることが示された。次に、神経伝達物質特性を、vglut2 (グルタミン酸作動性ニューロンのマーカー) および glyt2 (グリシン作動性ニューロンのマーカー) との二重 in situ hybridization を行うことにより調べた。その結果、chx10 ニューロンはすべて vglut2 陽性であることが分かった。これにより、chx10 ニューロンはグルタミン酸作動性、すなわち、興奮性であることが非常に強く示唆された。

V2a ニューロンの神経回路中での役割を調べるために、Tg[chx10:GFP]トランスジェニックフィッシュにおける GFP 陽性細胞から電気生理学的記録を行った。運動神経細胞の束である Ventral Root (VR) との同時記録を行った結果、V2a ニューロンは近傍の運動ニューロンとおおむね同期して発火することが分かった。また、V2a ニューロンと運動ニューロンとの2細胞記録を行い、V2a ニューロンから運動ニューロンへの直接の興奮性シナプス結合が頻繁に存在することを明らかにした。これらの結果は、V2a ニューロンが運動時に運動ニューロンの活動を直接ドライ

ブする神経細胞として機能していることを強く示唆する。

V2b ニューロンの性質の解析を次に記す。Tg[scl:GFP]を作成して、V2b ニューロンを可視化し、GFP でラベルされた神経細胞の解剖学的解析を行った。その結果、すべての scl ニューロンについて、その軸索はまず腹側に向かい、ついで後方へターンして脊髄の同側を尾部方向へ向かう軌跡を取ることが明らかとなった。すなわち、V2b ニューロンは V2a ニューロンと非常に似た形態をもつ同側下行性ニューロン (ipsilateral descending neuron) であることが示された。次に、神経伝達物質特性を in situ hybridization を行うことにより調べた。その結果、scl ニューロンの多くは glyt2 陽性であることが分かった。これにより、scl ニューロンはグリシン作動性、すなわち、抑制性であることが非常に強く示唆された。現在、scl ニューロンの機能解析を電気生理学的手法を用いて進めている。

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 11 件)

- ① Kani, S., Bae, Y-K, Shimizu T, Tanabe, K., Satou, C., Parsons, M., Scott, E., Baier, H., Higashijima, S., and Hibi, M. (2010). Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum. *Developmental Biology* in press. 査読有
- ② Wada, H., Ghysen, A., Satou, C., Higashijima, S., Kawakami, K., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (2010). Dermal morphogenesis controls lateral line patterning during postembryonic development of teleost fish. *Developmental Biology* 340, 583-594. 査読有
- ③ Sugiyama, M., Sakaue-Sawano, A., Iimura, T., Fukami, K., Kitaguchi, T., Kawakami, K., Okamoto, H., Higashijima, S., and Miyawaki, A. (2009). Illuminating Cell-Cycle Progression in the Developing Zebrafish Embryo.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 106, 20812-20817. 査読有

- ④ Satou, C., Kimura, Y., Kohashi, T., Horikawa, K., Takeda, H., Oda, Y., and Higashijima, S. (2009). Functional role of a specialized class of spinal commissural inhibitory neurons during fast escapes in zebrafish. *J. Neuroscience* 29, 6780-6793. 査読有
- ⑤ Bae, Y., Kani, S., Shimizu, T., Tanabe, K., Nojima, H., Kimura, Y., Higashijima, S., and Hibi, M. (2009). Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Developmental Biology* 300, 406-426. 査読有
- ⑥ Miyasaka, N., Morimoto, K., Tsubokawa, T., Higashijima, S., Okamoto, H., and Yoshihara, Y. (2009). From the Olfactory Bulb to Higher Brain Centers: Genetic Visualization of Secondary Olfactory Pathways in Zebrafish. *J. Neuroscience* 29, 4756-4767. 査読有
- ⑦ Vitorino, M., Jusf, P.R., Maurus, D., Kimura, Y., Higashijima, S., and Harris, W.A. (2009). Vsx2 in the zebrafish retina: restricted lineages through depression. *Neural Development* 4, 14. 査読有
- ⑧ Miyake, A., Higashijima, S., Kobayashi, D., Narita, T., Jindo, T., Setiamarga, D.H.E., Ohisa, S., Orihara, N., Hibiya, K., Konno, S., Sakaguchi, S., Hoie, K., Imai, Y., Naruse, K., Kudo, A., and Takeda, H. (2008). Mutation in the *abdb* gene causes abnormal iron and fatty acid metabolism in developing medaka fish. *Development, Growth & Differentiation* 50, 703-716. 査読有
- ⑨ Kimura, Y., Satou, C., and Higashijima, S. (2008). V2a and V2b neurons are generated by the final divisions of pair-producing progenitors in the zebrafish spinal cord. *Development* 135, 3001-3005. 査読有
- ⑩ Hossain, Md. I., Iwasaki, H., Okouchi, Y., Chahine, M., Higashijima, S., Nagayama, K., and Okamura, Y. (2008). Enzyme domain affects the movement of

the voltage sensor in ascidian and zebrafish VSPs. *J. Biol. Chem* 283, 18248-59. 査読有

- ⑪ McLean, D.L., Fan, J., Higashijima, S., Hale, M.E., and Fetcho, J.R. (2007). A topographic map of recruitment in spinal cord. *Nature* 446, 71-5. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 東島眞一 (2009.12.12) ゼブラフィッシュを用いた、in vivo イメージング: 第 32 回日本分子生物学会年会ワークショップ (横浜)
- ② S. Higashijima (2009.10.16) Development and function of spinal locomotor circuits in zebrafish: 3rd Viktor Hamburger Symposium (Chicago, USA)
- ③ S Higashijima, C Satou, Y Kimura (2009.9.16) Development and function of spinal locomotor circuits in zebrafish: The 32th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Nagoya, Japan)
- ④ S Higashijima, Y Kimura, C Satou (2009.7.31) Development and function of spinal locomotor circuits in zebrafish: IUPS2009 (Kyoto Japan)
- ⑤ Kimura Y, Satou C and Higashijima S (2008.11.18) V2a and V2b neurons are generated by the final divisions of pair-producing progenitors. Neuroscience 2008 (Washington DC, USA).
- ⑥ Satou C, Kimura Y and Higashijima S (2008.11.17) Analysis of spinal V0 neurons with transgenic fish. Neuroscience 2008 (Washington DC, USA).
- ⑦ 東島眞一, 木村有希子, 佐藤千恵 (2008.9.4) ゼブラフィッシュのロコモーションの成魚に関わる脊髄神経回路の分子的基盤。第 80 回日本遺伝学会ワークショップ (名古屋)
- ⑧ Satou C, Kimura Y and Higashijima S

(2008.7.9) Properties and functions of spinal V0 neurons in zebrafish. Neuro2008 (Tokyo).

- ⑨ 東島眞一, 木村有希子, 佐藤千恵 (2007.9.11) Development and function of spinal locomotor circuits in zebrafish 第30回日本神経科学大会シンポジウム (横浜)

〔図書〕 (計4件)

- ① 東島眞一 (2009) 1枚の写真館—光り輝く魚. 細胞工学、秀潤社、28, 107
- ② Higashijima, S. (2008). Transgenic zebrafish expressing fluorescent proteins in central nervous system neurons. *Development, Growth & Differentiation* 50, 407-413.
- ③ Fetcho, J.R., Higashijima, S., and McLean, D.L. (2008). Zebrafish and motor control over the last decade. *Brain Research Reviews* 57, 86-93.
- ④ 木村有希子、佐藤千恵、東島眞一 (2007) in vivo イメージングのためのプローブ～ゼブラフィッシュの蛍光イメージング 実験医学増刊号 蛍光・発光試薬の選び方と使い方、羊土社、125-130

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東島 眞一 (HIGASHIJIMA SHIN-ICHI)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイ
エンスセンター・准教授
研究者番号：80270479