

機関番号：32202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790189

研究課題名（和文） 新規神経回路創出のための分子基盤の解明

研究課題名（英文） Molecular basis for acquisition of de novo sensory circuit

研究代表者

矢嶋 浩 (YAJIMA HIROSHI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10433583

研究成果の概要（和文）：*Six1/Six4* 二重欠損マウス神経管内には、本来存在しない知覚神経様の細胞が出現する。これは魚類や両生類の神経管内に生じる Rohon-Beard (RB) 細胞と呼ばれる一次知覚神経に極めて近い存在であった。アフリカツメガエルの発生過程では、RB 細胞から髄外の脊髄神経節へと切りかわるが、*Six1* はその時期に発現が開始し、切替を担っていることが明らかになった。羊膜類の脊髄神経節ではその発生の初期から *Six* 遺伝子が発現していることから、*Six* 遺伝子のヘテロクロニックな発現が脊索動物一次知覚神経進化の鍵となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the trunk of adult vertebrates, dorsal root ganglia (DRG) convey a variety of sensory modalities to the central nervous system. However, during fish and amphibian development, intramedullary sensory neurons, Rohon-Beard (RB) cells, are responsible for juvenile mechanosensation and functionally substituted by DRG. In *Xenopus* RB cells, *Six1* appears just before the switching. Forced expression of *Six1* in *Xenopus* early embryo reduced the number of RB cells but induced premature extramedullary sensory neurogenesis. Genetic elimination of both *Six1* and *Six4* in mouse caused the emergence of RB-like cells within spinal cord. Since *Six1* is expressed from the beginning of mouse DRG development, the heterochronic shift of the expressions of *Six1* might be a key step in the evolution of vertebrate primary sensory system in the trunk.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：発生、分化、神経堤細胞、脊髄神経節、感覚神経、一次知覚神経、*Six* 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

羊膜類の体幹部一次知覚神経細胞は脊髄の外で脊髄神経節を形成している。一方、魚類や両生類の Rohon-Beard 細胞（以下 RB 細胞）

と呼ばれる一次知覚神経細胞は、神経管の中に存在する。当研究室で作製された *Six1/Six4* 二重欠損マウスでは知覚神経様細胞が神経管内で観察され、RB 細胞に極めて近い存在であることが示唆された。予備的な観察から両生

類RB細胞の発生初期には*Six*遺伝子の発現が認められなかったことから、RB細胞における*Six*遺伝子発現の獲得がRB細胞から脊髄神経節へという一次知覚神経進化の鍵となっている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

RB細胞における*Six*遺伝子発現の獲得こそが、RB細胞から脊髄神経節へという一次知覚神経進化の鍵になっている可能性、さらに、一次知覚神経の由来をより可塑性があると思われる神経堤細胞に変換することで知覚多様化のプレイクルーがもたらされた可能性、を実験生物学的に検証することを本研究の目的とした。これによって、脊索動物の一次知覚神経進化への*Six*遺伝子の関与とその仕組みのみならず、脊索動物進化における新規神経回路創出機構の一端が解明できると期待した。

## 3. 研究の方法

### (1) *Six1/Six4*二重欠損マウスにおける神経管内知覚神経様細胞の解析

*Six1/Six4*二重欠損マウスの神経管内背側に異所的に生じる知覚神経様細胞の性質を明らかにする。魚類や両生類で観察されるRB細胞と相同なものなのか否かをマーカータンパク質に対する抗体、投射先を明らかにするためのトレーサー等を用い組織学的方法で明らかにする。またその由来をcre-loxシステムを用いた遺伝学的細胞系譜標識によって明らかにする。

### (2) *Six1/Six4*二重欠損マウスの表現型回復実験

マウス胚体幹部において、*Six*遺伝子は神経堤細胞のみならず間充織や筋肉にも発現が認められる。神経管内に異所的に生じた細胞が、神経堤細胞そのものに発現している*Six*遺伝子の欠損によるものなのか否かを明らかにするため、*Six1/Six4*二重欠損マウスにおいて神経堤細胞特異的に*Six1*を強制発現させ、表現型の回復を試みる。

### (3) 両生類一次知覚神経細胞における*Six*遺伝子発現の解析及び過剰発現の影響（基礎生物学研究所、上野直人教授・鈴木誠助教との共同研究）

両生類アフリカツメガエルのRB細胞における*Six*遺伝子の発現を詳細に観察する。予備的な観察では、アフリカツメガエルRB細胞の発生初期には*Six*遺伝子の発現が認められなかった。そこで*Six1*遺伝子をRB細胞で強制発現し、RB細胞の消失や脊髄神経節細胞への転換

が起きるかなど、羊膜類の体幹部一次知覚神経に近づくのかどうかを検討する。

### (4) 進化に関与していると考えられる*Six*遺伝子シス制御配列の探索（奈良先端科学技術大学院大学大学院、荻野肇准教授・越智陽城助教との共同研究）

予備的な観察では、アフリカツメガエルRB細胞の発生初期には*Six*遺伝子の発現が認められなかったことから、アフリカツメガエルとマウスの一次知覚神経では異なった*Six1*発現制御が行われている可能性が考えられる。そこで、当研究室佐藤滋講師によって同定された、マウス脊髄神経節での*Six1*発現を司ると考えられるシス配列とアフリカツメガエルの相同な配列が両生類胚ではどのような挙動を示すのかを検討する。

## 4. 研究成果

### (1) *Six1/Six4*二重欠損では神経管内にRB様細胞が出現する

*Six1/Six4*二重欠損マウス胚では、神経管内に異所的に知覚神経様の細胞が出現する。この細胞では、魚類や両生類のRB細胞のマーカーであるTlx3やKv1.1、細胞死のマーカーであるcleaved Casp3が陽性であった（図1、*Six1<sup>EGFP/EGFP</sup>Six4<sup>-/-</sup>*、矢頭）。また、逆行性トレーサーによる標識実験から、この細胞が神経管の中から外に神経突起を伸ばしていることが明らかとなった（図1、*Six1<sup>EGFP/EGFP</sup>Six4<sup>-/-</sup>*、矢頭）。これらのことは、RB細胞に極めて近い細胞が*Six1/Six4*二重欠損マウスで出現したことを示唆している。

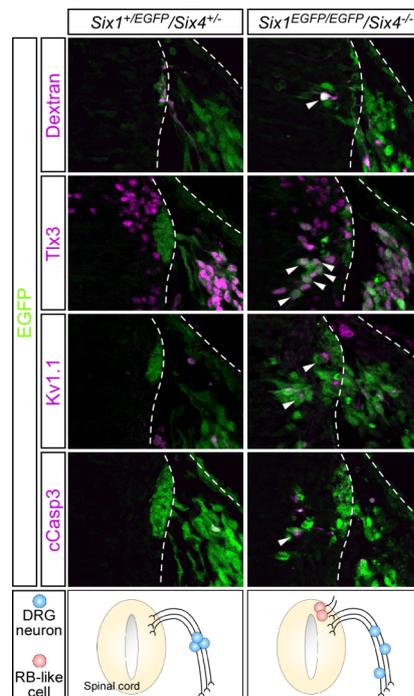


図 1

さらに、*P0-cre*マウス (Yamauchi *et al.*, 1999) と *CAG-lox-stop-lox-mRFP* 導入マウス (当研究室で作製) を用い、*Six1/Six4* 二重欠損マウスの神経堤細胞系譜を遺伝学的に標識した (図 2, RFP 陽性)。その結果、神経管内の知覚神経様の細胞は神経堤細胞由来であることが強く示唆された。神経堤細胞と RB 細胞は、共に神経性外胚葉と非神経性外胚葉の境界から生じるとされていることから、この細胞は起源も酷似していることが明らかになった。

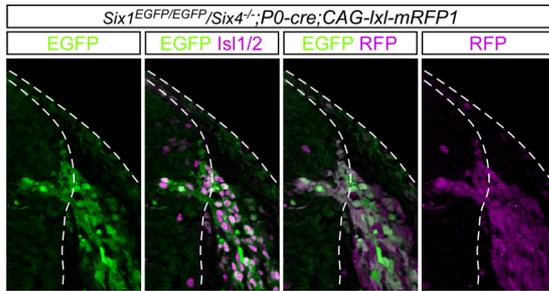


図 2

(2) *Six1* 遺伝子の神経堤細胞自律的な機能が RB 様細胞の出現を阻害している

*P0-cre*マウスと *CAG-lox-stop-lox-Six1* 導入マウス (当研究室で作製) を用い、*Six1/Six4* 二重欠損マウスにおいて神経堤細胞系譜特異的に *Six1* を強制発現させた。その結果、神経管内に異所的に生じた細胞が有意に減少した (図 3, *Six1*<sup>EGFP/EGFP</sup>*Six4*<sup>-/-</sup>; *P0-cre*; *CAG-lxl-Six1*) ことから、正常発生においては、神経堤細胞自身に発現している *Six1* が、神経管内に一次知覚神経が生じるのを阻害していることが示唆された。

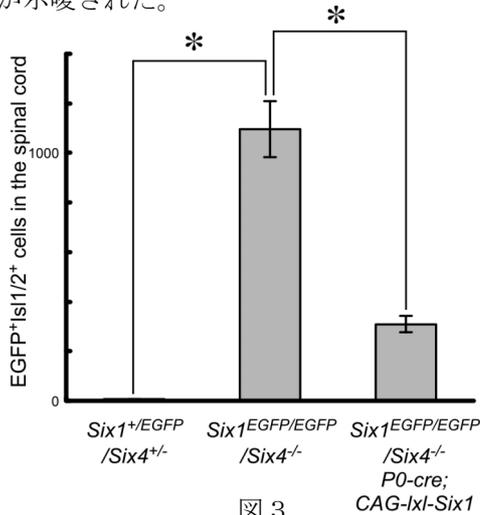


図 3

(3) 両生類の発生過程では *Six1* 遺伝子が RB 細胞から脊髄神経節への切換を担っている

両生類アフリカツメガエル胚の RB 細胞や脊髄神経節神経細胞における *Six* 遺伝子の発現を詳細に観察した (図 4, 上 4 段:mRNA、下

2 段:タンパク質)。RB 細胞ではその発生の後期、細胞死に先行して *Six1* が発現するが、脊髄神経節では哺乳類や鳥類と同様にその発生初期から *Six1* を発現していた。

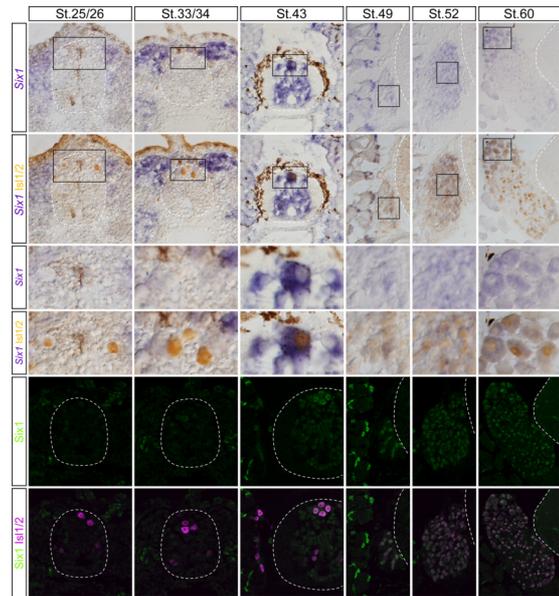


図 4

そこで、アフリカツメガエル胚の予定一次知覚神経領域に本来の発現開始時期よりも早く *Six1* を強制発現させたところ、RB 細胞の発生プログラムを阻害し、同時に脊髄神経節様の神経細胞を本来の発生よりも早期に生じさせた (図 5, +Dex)。これらのことから、アフリカツメガエルでは *Six1* 遺伝子が一次知覚神経の神経管内 (RB 細胞) から神経管外 (脊髄神経節) への切換を担っていることが示唆された。

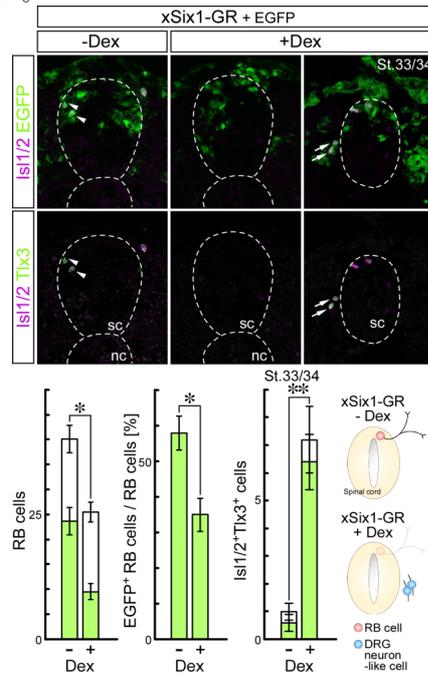


図 5

(4) 単一のエンハンサーの変化がヘテロクロニックな*Six1*遺伝子発現を説明しうる

*Six1* 遺伝子の発現開始時期がマウスとアフリカツメガエルで異なっていることの原因を明らかにするため、マウス脊髄神経節における *Six1* 遺伝子発現を司ると考えられるシス配列とアフリカツメガエルの相同配列の活性を比較した。どちらの配列も発生中のアフリカツメガエル胚脊髄神経節で活性を示したが、RB細胞の発生過程においてはマウスのシス配列のみに活性が観察された（図6、x*Six1*-8:EGFP:アフリカツメガエル、m*Six1*-8:EGFP:マウス）。これによって、単一のエンハンサーの変化によるヘテロクロニックな *Six1* 遺伝子発現の変化（早期発現の獲得）が一次知覚神経進化の鍵となった可能性が示唆された。

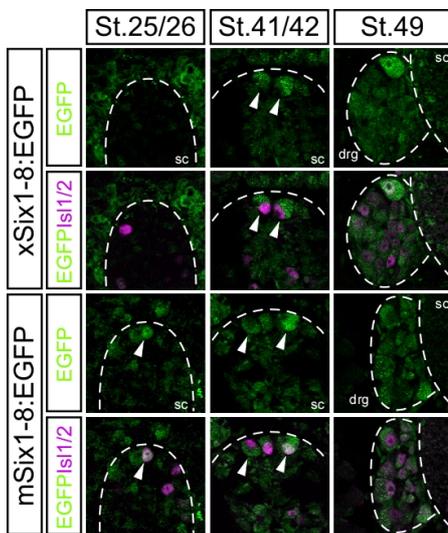


図6

## 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)

① Yajima H., Motohashi N., Ono Y., Sato S., Ikeda K., Masuda S., Yada E., Kanesaki H., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S. and Kawakami K.

Six family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells.

Experimental Cell Research 316(17): 2932-2944, 2010 査読有

② Sato S., Ikeda K., Shioi G., Ochi H., Ogino H., Yajima H. and Kawakami K.  
Conserved expression of mouse *Six1* in the pre-placodal region (PPR) and identification of an enhancer for the

rostral PPR.

Developmental Biology 344(1):158-171, 2010 査読有

[学会発表] (計5件)

① 矢嶋浩, 鈴木誠, 越智陽城, 池田啓子, 佐藤滋, 萩野肇, 上野直人, 川上潔  
脊索動物体幹部一次知覚神経発生・進化における *Six1* 遺伝子の役割  
第81回日本動物学会年会, 1E1500, 2010年9月25日, 東京大学教養学部

② 矢嶋浩, 鈴木誠, 越智陽城, 池田啓子, 佐藤滋, 萩野肇, 上野直人, 川上潔  
Developmental switch from Rohon-Beard cells to dorsal root ganglia in *Xenopus*  
日本発生物学会 第43回大会, P-089, 2010年6月21日, 国立京都国際会館

③ 矢嶋浩, 鈴木誠, 池田啓子, 佐藤滋, 上野直人, 川上潔  
Key regulator for the transition from intra- to extra-spinal sensory neurons in the craniates  
Neuroscience 2009, B93 225.18, 2009年10月18日, McCormick Place convention center (米国・シカゴ)

④ 矢嶋浩, 鈴木誠, 池田啓子, 佐藤滋, 上野直人, 川上潔  
Formation of the extraspinal sensory cells in the craniates  
日本発生物学会 第42回大会, P-003C, 2009年5月30日, 朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター

⑤ 矢嶋浩, 鈴木誠, 池田啓子, 佐藤滋, 上野直人, 川上潔  
The key regulator in the evolution of trunk primary sensory neurons  
The 18th CDB Meeting, Common Themes and New Concepts in Sensory Formation, P30, 2009年4月13-15日, 理化学研究所・発生再生科学総合研究センター

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢嶋 浩 (YAJIMA HIROSHI)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 10433583

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし