

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：13901
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22570201
 研究課題名（和文）ゼブラフィッシュ変異体を用いた小脳発生機構の解析
 研究課題名（英文）The molecular analysis of the development of cerebellum by using zebrafish mutants

 研究代表者
 清水 貴史（SHIMIZU TAKASHI）
 名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授
 研究者番号：50324760

研究成果の概要（和文）：小脳神経形成過程を明らかにするために、ゼブラフィッシュ変異体の解析を行った。*cfdp1*遺伝子の機能欠損変異体では、顆粒細胞の形成が著しく阻害されていた。この変異体では前方組織において異常な細胞増殖と細胞死が起こっていた。*Cfdp1*は、神経細胞への増殖、分化過程で重要な役割をしていると考えられた。基底膜構造の乱れたIV型コラーゲンa6変異体では、顆粒細胞の軸索走行が乱れていた。基底膜と神経細胞の相互作用が、軸索の適切な走行に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To understand the genes that control the development of cerebellar neurons, we investigated the zebrafish mutants *gazami(gaz)* and *shiomaneke(sio)*. The *gaz* mutant larvae showed a strong reduction of granule cells. By the positional cloning, we mapped the *gaz* mutation to the gene encoding a nuclear protein, *cranio facial development protein1(cfdp1)*. In the anterior neuroectoderm, the number of apoptotic cells was increased in the mutant larvae. We also found that proliferating cells were increased in mutants at 4 dpf. Our findings suggest that *Cfdp1* function in the differentiation from the neural progenitors and/or proliferation of neural progenitor cells. The *sio* mutants displayed mistargeted axon of granule cells. The *sio* mutation mapped to the gene encodes type IV collagen a6 which serve as a component of basement membrane. The *sio* larvae showed the disruption of basement membrane structure. These results suggest that the interaction between neuron and basement membrane is important for the axogenesis of cerebellar granule cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・発生生物学

キーワード：細胞分化、神経分化、小脳、顆粒細胞

1. 研究開始当初の背景

小脳は、感覚情報と運動に連動した二つの入力情報を統合することにより、円滑な運動

の制御と運動学習を行うと考えられている。真骨魚類であるゼブラフィッシュの小脳は、前方から小脳弁、小脳体、後葉の3つの領域

に分かれている。小脳皮質は、分子層（顆粒細胞の平行線維とプルキンエ細胞の樹状突起）、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層の3層からなる。また、小脳の神経細胞は主に二つのグループに分けられる（図1）。（1）グルタミン酸作動性の興奮性神経である顆粒細胞と小脳核神経細胞（真骨魚類；eurydendroid細胞）、（2）GABA作動性の抑制性神経であるプルキンエ細胞と介在神経（ゴルジ細胞、星状細胞）である。小脳皮質の入力線維のうち登上線維は、脳幹部に位置する下オリブ核から起り、プルキンエ細胞の細胞体近辺に終わる。もう一方の苔状線維は、小脳前核からの線維が顆粒細胞の樹状突起にシナプスを形成する。苔状線維からの入力は、顆粒細胞の軸索である平行線維に伝えられ、平行線維は最終的にプルキンエ細胞の樹状突起末端にシナプスを形成する。プルキンエ細胞では登上線維と平行線維の信号が統合され、出力信号を興奮性投射神経である小脳核に送る。これらの小脳神経回路の構成とその機能については、マウスやニワトリの解剖学的知見や遺伝子改変動物の解析、電気生理学的実験によって解明されつつある（Review; Neuroscience 162, 723-731. 2009）。さらに長期抑制(LTD)などシナプスの可塑性の研究、シュミレーションによる解析から、運動学習の理論と分子機構が明らかになりつつある。しかしながら、その発生過程についての詳細な経時的観察と分子機構の研究は、まだ十分ではない。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュの発生過程において、顆粒細胞、プルキンエ細胞の前駆細胞は、哺乳類と同一のプロニューラル遺伝子(顆粒細胞:*atoh1a/b/c*, プルキンエ細胞:*ptfla*)を発現している。また、成熟した小脳神経細胞においても哺乳類と同様の分子マーカーの発現が見られ、発生過程において哺乳類と共通の分子基盤を持っていると考えられる。本研究では、顆粒細胞とプルキンエ細胞の産生とその軸索や樹状突起形成過程を明らかにする目的でゼブラフィッシュ変異体の解析を行う。申請者らは、これまでにゼブラフィッシュをモデル動物として小脳神経細胞の産生過程と小脳への入力線維、小脳からの出力線維の詳細を明らかとしてきた(Dev. Biol. 336, 406-426. 2009)。さらに顆粒細胞の平行線維とプルキンエ細胞を認識する抗体(抗Vglut1抗体、抗Parvalbumin7抗体)を用いて、小脳神経細胞の産生・神経回路形成(プルキンエ細胞樹状突起形成、平行線維形成)に異常を示すゼブラフィッシュENU誘発突然変異体のスクリーニングを行った。これまでに約800ゲノムのスクリーニングを行い、9系統単離している(Dev. Biol. 336,

406-426. 2009)。プルキンエ細胞、顆粒細胞形成過程ともに異常を生じる変異体を6系統単離し、そのうち *evanescence(eva)*、*drunken sailor(drs)* については責任遺伝子を同定した(未発表データ)。さらにより小脳特異的な表現型を示す変異体のポジショナルクローニングを行った。*gazami(gaz)* 変異体は、プルキンエ細胞層の形態は比較的正常だが、顆粒細胞が減少する。また、*shiomaneki(sio)* は、顆粒細胞の軸索の伸展不良や走行異常の表現型を示す。これら変異体や野生型幼魚の神経細胞の産生過程や樹状突起の生成、軸索の進展の経時的観察によって、小脳神経細胞の産生、成熟過程を明らかにする。また、変異体の責任遺伝子の機能解析を行い、神経発生過程における新規分子機能の解明を目指した。また、遺伝子プロファイリングによって、小脳神経回路形成の分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)小脳変異体の責任遺伝子のポジショナルクローニング

これまでに小脳変異体のスクリーニングを行い、9系統の変異体を単離した。ポジショナルクローニング法によって原因遺伝子を同定した。突然変異を導入した系統(AB)以外の系統(TL)と交配してF1個体を得た。F1個体同士を交配してF2胚を作成した。F2胚からDNAを抽出してSSLPマーカーを用いた多型解析を行い、原因遺伝子が存在する領域を決定した。その領域に存在する遺伝子をクローニングし、変異の有無を調べることによって責任遺伝子を同定した。

(2)遺伝子産物の解析

Whole mount in situ hybridization (WISH)法によって変異体の責任遺伝子のmRNAの発現領域を明らかにした。ゼブラフィッシュ初期胚や培養細胞を用いて、相互作用する分子やシグナル伝達経路を調べ、機能解析を行った。

(3)小脳変異体の解析

変異体におけるプルキンエ細胞や顆粒細胞の前駆細胞から成熟した細胞への分化過程を追跡した。

変異体をそれぞれの細胞特異的に蛍光タンパク質で可視化できるトランスジェニックフィッシュ(下記)と交配して、経時的に観察した。

プルキンエ細胞前駆細胞; *Tg(ptfla:EGFP)*
プルキンエ細胞;

Tg(aldolase ca:gap43-Venus)

顆粒細胞前駆細胞; *Tg(atoh1a:EGFP)*

顆粒細胞; *Tg(neurod:EGFP)*

eurydendroid細胞; *Tg(olig2:FGFP)*

小脳神経細胞マーカーの発現をWISH法と免疫染色法で調べた。

(3)細胞増殖と細胞死の検出

細胞死をアクリジンオレンジ染色あるいは抗活性化カスパーゼ3抗体で検出した。分裂期細胞の同定は、抗リン酸化ヒストンH3抗体による免疫染色により行った。また、BrdUの取り込みによって細胞増殖を調べた。

(4)遺伝子プロファイリングによる神経回路形成に関する遺伝子の解析

プルキンエ細胞あるいは顆粒細胞特異的に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックフィッシュから、Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)を用いてそれぞれの細胞を分離した。集めた細胞からRNAを抽出した。RNA-sequenceを行い、遺伝子発現プロファイルを作成する。

4. 研究成果

ゼブラフィッシュ変異体スクリーニングで得られた変異体のうち、小脳神経に顕著な異常を示し、他の組織にあまり異常がないもの2系統を解析した。

ゼブラフィッシュ *gaz* は、成熟した顆粒細胞の形成が著しく阻害される変異体である(図2)。ポジショナルクローニングにより、この変異体は *cfdp1* 遺伝子の機能欠損であることを明らかにした。*cfdp1* 遺伝子は、核内タンパク質をコードしており、SRCAP複合体の構成要素であることが知られている。SRCAP複合体は、ヒストンH2A.Zのクロマチン上への配置に関与し、クロマチン構造の変化を通して標的遺伝子の転写制御を行っていると考えられている。ゼブラフィッシュ *cfdp1* 遺伝子は、母性に発現を開始し、受精後1日目において小脳領域を含む前方神経系に強く発現していた。その後、発現は徐々に低下していった。*gaz* 変異体では、前方神経系での細胞増殖が高進していた。さらに同じ領域でアポトーシスを起こしている細胞が、有為に増加していた。このことは、神経前駆細胞が過剰な増殖をして、適切な分化方向に向かわないために細胞死を起こしたと考えられた。また、この変異体では受精後3日目までの顆粒細胞前駆細胞 (*atoh1*陽性)の形成は、ほぼ正常であった。これらのことから、*cfdp1*は、何らかの標的遺伝子の発現制御を介して、顆粒細胞への分化過程または増殖過程で重要な役割を果たしていると考えられた。現在、その標的遺伝子を探索中である。

顆粒細胞の後方への軸索伸長に異常がみられる変異体、*sio*の責任遺伝子としてIV型コラーゲンa6を同定した(図2)。IV型コラーゲンa6は、主に皮膚に発現していて、基底膜を形成している。インテグリンa5、フィブロネクチン変異体においても*sio*と同様に顆粒細胞の線維の異常が見られた。また、これまでに報告されている他のIV型コラーゲンの変異体

(a5; *dragnet*)においても同様の表現型が見られた。軸索走行の制御においても、IV型コラーゲンa5とa6が複合体を作って機能していることが示唆された。また、IV型コラーゲン変異体では、視神経の軸索が視蓋における適切な層に投射しない表現型が観察された。電子顕微鏡による微細構造の観察によって、コラーゲン変異体では基底膜の構造が乱れていた。これらのことから、基底膜と神経細胞の相互作用が、軸索の伸長とターゲティングに関与していることが示唆された。また、基底膜が軸索ガイダンス因子の局在を制御することによって、正確な軸索走行が制御されていることが報告されている。現在、ガイダンス因子(*robo-slit*, *DCC-netrin*など)についても検討中である。

これらの結果から、これまでに報告のない分子メカニズムが小脳神経発生と回路形成に関与していることが明らかとなった。今後、これらの変異体の解析を進めることによって小脳神経発生メカニズムに新たな知見が得られると考えられる。また、小脳神経細胞の遺伝子発現プロファイリングを行っており、さらに詳細な遺伝子発現の情報が得られると考えられる。

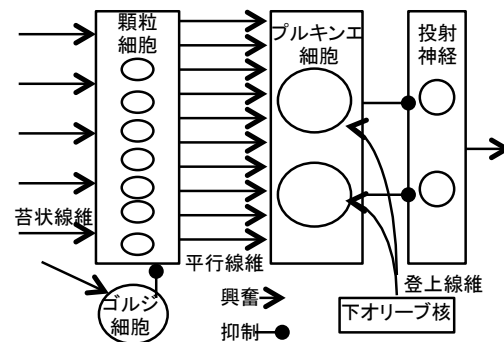
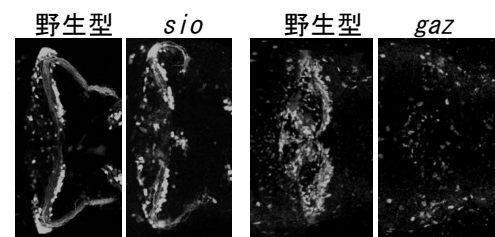


図1. 小脳神経回路



平行線維の走行異常 顆粒細胞の減少

図2. 小脳変異体

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5件)

- ① Hibi M. and Shimizu T. Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. 査読有 Dev. Neurobiol. 72(3):282-301. 2012.
- ② Tanabe K., Kani S., Shimizu T., Bae Y.-K., Abe T., and Hibi M. Atypical PKC regulates primary dendrite specification of cerebellar Purkinje cells by localizing Golgi apparatus. J Neurosci. 査読有, 30:16983-16992. 2010.
- ③ Kani S., Bae Y.-K., Shimizu T., Tanabe K., Satou C., Parsons P.J., Scott E., Higashijima S. and Hibi M. Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum. 査読有, Dev. Biol. 343, 1-17. 2010.
- ④ Shimizu, T., Nakazawa, M., Kani, S., Bae, Y.-K., Shimizu, T., Kageyama, R., and Hibi, M. Zinc finger genes *Fezf1* and *Fezf2* control neuronal differentiation by repressing *Hes5* expression in forebrain. Development 査読有, 137, 1875-1885, 2010.
- ⑤ Nojima, H., Rothhämel, S., Shimizu, T., Kim, C.H., Yonemura, S., Marlow, F.L., and Hibi, M. Syntabulin, a motor protein linker, controls dorsal determination. Development 査読有, 137, 923-933, 2010.

[学会発表] (計 20 件)

- ① 清水貴史 A nuclear protein Cfdpl is involved in differentiation of granule cells in cerebellum. 第 6 回神経発生討論会. 2013. 3. (和光)
- ② 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)
- ③ Takeuchi, M., Yamaguchi, S., Yonemura, S., Asakawa, K., Kawakami, K., Takeda, S., Shimizu, T., and Hibi, M. Role of basement membrane in axogenesis of cerebellar granule cells. 第 18 回小型魚類研究会. 2012. 9. (京都)
- ④ Takeuchi, M., Shimizu, T., Asakawa, K., Kawakami, K., Yonemura, S., and Hibi, M. Role of type IV collagen in axogenesis of cerebellar granule cells in zebrafish. 10th International Conference on Zebrafish Development and Genetics. 2012. 6. (Madison, USA)
- ⑤ 竹内未紀、清水貴史、浅川和秀、川上浩

- 一、米村重信、日比正彦 IV 型コラーゲンはゼブラフィッシュにおける小脳顆粒細胞の軸索伸長に必要である 第 35 回日本神経科学大会. 2012. 6. (名古屋)
- ⑥ Takeuchi, M., Shimizu, T., Asakawa, K., Kawakami, K., Yonemura, S., and Hibi, M. Role of type IV collagen in axogenesis of cerebellar granule cells in zebrafish. 第 45 回日本発生生物学会合同大会. 2012. 5. (神戸)
- ⑦ Takeuchi, M., Shimizu, T., Kani, S., Bae, Y.-K., Tanabe, K., Kusuda, R., Asakawa, K., Kawakami, K., and Hibi, M. Genetic control for development of cerebellar neurons and neural circuits in zebrafish. 第 17 回小型魚類研究会. 2011. 9. (三島)
- ⑧ Hibi, M. and Shimizu, T. Development of cerebellar neural circuits in zebrafish and medaka. 第 34 回日本神経科学大会. 2011. 9. (横浜)
- ⑨ Shimizu, T., Kani, S., Bae, Y.-K., Tanabe, K., Kusuda, R., and Hibi, M. Genetic control of development of cerebellar neurons and neural circuits in zebrafish. 第 44 回日本発生生物学会年会. 2011. 5. (沖縄)
- ⑩ 清水 貴史、可児 修一、Bae Young-Ki、田辺 光志、日比 正彦 Neurogenesis in Zebrafish Cerebellum. 第 15 回小型魚類研究会、2010. 9. (埼玉)
- ⑪ Shimizu, T., Kani, S., Bae, Y.-K., Tanabe, K., and Hibi, M. Neurogenesis in Zebrafish Cerebellum. 8th International Conference on Zebrafish Development and Genetics; 2010. 6. (Madison, USA)

[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/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 貴史 (SHIMIZU TAKASHI)
名古屋大学・生物機能機能開発利用研究センター・准教授
研究者番号：50324760

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：