

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300123

研究課題名(和文)細胞系譜のライブ追跡手法による、脊髄神経細胞分化機構の解析

研究課題名(英文)Lineage analysis of neuronal development in zebrafish spinal cord

研究代表者

東島 真一(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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄発生においては、背腹軸に沿って転写因子の発現によって複数のドメインが生じる。さらに、各ドメインから複数のサブタイプの神経細胞が誕生することが示唆されているが、その詳細はよくわかっていない。本研究では、p0ドメインから誕生する神経細胞の生成機序を、細胞系譜解析により解析した。その結果、p0ドメインからは、3種類のグルタミン酸作動性の興奮性細胞と2種類の抑制性細胞(グリシン作動性とGABA作動性の神経細胞)が誕生することを明らかにした。また、この多様性形成に、前駆体レベルでの多様性形成と、発生時期依存的に異なった神経細胞を産生する2つのメカニズムが関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The developing spinal cord is subdivided into distinct progenitor domains, each of which gives rise to different types of neurons. However, the developmental mechanisms responsible for generating neuronal diversity within a domain are not well understood. Here, we have studied zebrafish V0 neurons, those that derive from the p0 progenitor domain, in order to address this question. We find that all V0 neurons have commissural axons, but they can be divided into excitatory and inhibitory classes. V0 excitatory neurons (V0-e) can be further categorized into three groups based on their axonal trajectories; V0-eA (ascending), V0-eB (bifurcating), and V0-eD (descending) neurons. By using time-lapse imaging of p0 progenitors and their progeny, we show that inhibitory and excitatory neurons are produced from different progenitors. We also demonstrate that V0-eA neurons are produced from distinct progenitors, while V0-eB and V0-eD neurons are produced from common progenitors.

研究分野：神経科学、神経発生学

キーワード：ゼブラフィッシュ イメージング 細胞系譜 神経分化 脊髄

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の中樞神経系の大きな特徴は、莫大な数の多様性をもつ神経細胞群がその中に存在していることにある。脊髄においては、背腹軸に沿って転写因子の発現により神経前駆体細胞が 10 程度のドメインに分割されることにより、多様性形成の第一歩が作られる。しかしながら、脊髄神経細胞群の多様性は、背腹軸に沿った 10 程度の限られた数のドメインだけでは説明できない。それぞれのドメインからは、さらに複数のタイプの神経細胞が分化してくることが最近明らかとなってきている。この、各ドメイン内からの多様性形成機構については、まだほとんどのことが分かっていない。ドメイン内の多様性形成機構を調べるための研究手段として、各ドメインについて、神経前駆体細胞から神経細胞への細胞系譜をダイレクトに追跡することはきわめて重要である。これにより、細胞系譜がどれくらい深く関与するのかを調べることが可能になる。この直接的なアプローチである細胞系譜のライブ追跡は、脊椎動物では技術的困難さのためほとんど手つかずであった。それは、脊髄の非常に少数の細胞をラベルし、正常発生を進めさせつつそれらを生きたまま継時観察する、ということがきわめて困難であったためである。

2. 研究の目的

本研究では、上記の課題に答えるため、生きたまま蛍光タンパク質でラベルされた細胞を経時観察することが可能なモデル生物ゼブラフィッシュを用い、神経前駆体細胞から神経細胞までの細胞系譜をダイレクトに追跡し、各ドメインから複数の神経細胞が形成されるメカニズムを追求する。具体的には、転写因子 *dbx1* を発現するドメイン (p0 ドメイン) から生じる神経細胞 (V0 ニューロン) と、転写因子 *gsh1* を発現するドメイン (pd4-5 ドメイン) から生じる神経細胞 (dI4-5 ニューロン) の発生過程を上記手法により追跡し、各ドメインから複数のタイプの神経細胞が生じるメカニズムの解析を行う。

3. 研究の方法

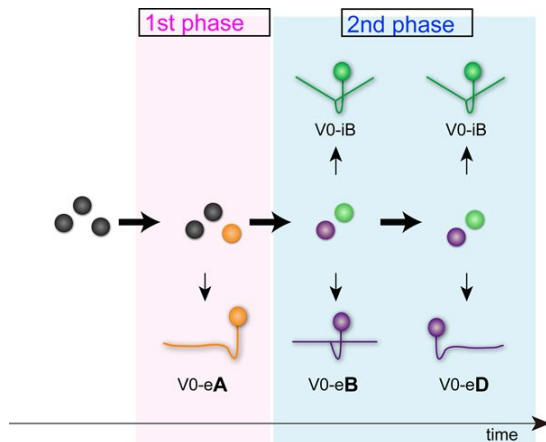
p0 ドメインの神経前駆体細胞をラベルするトランスジェニック系統として、*Tg[dbx1:GFP]* を、また、pd4-5 ドメインの神経前駆体細胞をラベルするトランスジェニック系統として、*Tg[gsh1:GFP]* を作製して研

究に供する。また、生じる神経細胞の神経伝達物質を調べるための系統として、*Tg[vglut2a:RFP]*、*Tg[glyt2:RFP]*、*Tg[gad1:RFP]* (それぞれ、グルタミン酸作動性ニューロン、グリシン作動性ニューロン、GABA 作動性ニューロンのマーカー系統) を作製して実験に供する。そのうえで神経前駆体の単一細胞を Cre-loxP システムを用いてラベリングし、ラベルされた細胞の分裂と分化をライブ追跡することにより、ドメイン内における多様性形成過程における細胞系譜の関与の度合いを明らかにする。同時に、前駆体レベルで多様性が存在するのか? ; 再現的な非対称分裂は存在するのか? ; 前駆体細胞は時期を追って異なる神経細胞を産み出していくのかどうか? ; 時期を追って異なる神経細胞を産み出す場合、その分子メカニズムはいったいどのようなものか?、という問いに答えを出す。

4. 研究成果

まず、p0 ドメインから誕生する神経細胞を、トランスジェニックフィッシュを用いて蛍光たんぱく質で可視化し、ドメイン内のサブタイプの全貌を明らかにした。その結果、3 種類のグルタミン酸作動性の興奮性細胞と 2 種類の抑制性細胞 (グリシン作動性と GABA 作動性の神経細胞) が誕生することを明らかにした。

次に、その多様性がどのような法則に基づいて作り出されるのかを明らかにするために、ひとつの神経前駆体細胞が生み出す神経細胞の全貌を明らかにするために、長期タイムラプスイメージングを行い、興奮性細胞と抑制性細胞は異なる前駆体細胞から誕生することを明らかにした。さらに、3 種類の興奮性細胞のうち、1 種類は特別な前駆体細胞から分裂を伴わず、他の細胞の分化するタイミングに先駆けて分化し、残りの 2 種類の興奮性細胞は同じ前駆体細胞が時間とともに異なる 2 種類の興奮性細胞を生み出すことを明らかにした。このように、p0 ドメイン内の神経細胞の多様性は、複数のメカニズムが複雑にからみあって多様性を作り出されていることが明らかとなった。この V0 ニューロンの発生機構に関する研究は、J. Neuroscience に論文発表を行った。(Satou et al., 2012)。



ついで、pd4-5 ドメインから生じる神経細胞についての解析を行った。pd4-5 ドメインから誕生する神経細胞を、gsh1 トランスジェニックフィッシュを用いて調べた。その結果、3種類のグルタミン酸作動性の興奮性細胞と2種類の抑制性細胞（グリシン作動性とGABA作動性の神経細胞）が誕生することを明らかにした。次に、その多様性がどのような法則に基づいて作り出されるのかを明らかにするため、タイムラプスイメージングを行った。その結果、興奮性細胞と抑制性細胞は異なる前駆体細胞から誕生することを明らかにした（論文投稿準備中）。

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 19 件)

Amo, R., Fredes, F., Kinoshita, M., Aoki, R., Aizawa, H., Agetsuma, M., Aoki, T., Shiraki, T., Kakinuma, H., Matsuda, M., Yamazaki, M., Takahoko, M., Tsuboi, T., Higashijima, S., Miyasaka, N., Koide, T., Yabuki, Y., Yoshihara, Y., Fukai, T., and Okamoto H. (2014). The habenulo-raphé serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. *Neuron* 84, 1034-1048. 査読有

Kimura, Y., Hisano, Y., Kawahara, A., and Higashijima, S. (2014). Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Scientific Reports* 4, 6545. 査読有

Okigawa, S., Mizoguchi, T., Okano, M., Tanaka, H., Isoda, M., Jiang, Y., Suster, M.,

Higashijima, S., Kawakami, K., and Itoh, M. (2014). Different combinations of Notch ligands and receptors regulate V2 interneuron progenitor proliferation and V2a/V2b cell fate determination. *Developmental Biology* 391, 196-206. 査読有

Satou, C., Kimura, Y., Hirata, H., Suster, M.L., Kawakami, K., and Higashijima, S. (2013). Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons. *Development* 140, 3927-3931. 査読有

Mizuno, H., Sassa, T., Higashijima, S., Okamoto, H., and Miyawaki, A. (2013). Transgenic zebrafish for ratiometric imaging of cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} response in teleost embryo. *Cell Calcium* 56, 236-245. 査読有

Hirabayashi, R., Hozumi, S., Higashijima, S., and Kikuchi, Y. (2013). Ddx46 Is Required for Multi-lineage differentiation of hematopoietic stem cells in zebrafish. *Stem Cells and Development* 22, 2532-2542. 査読有

Reimer, M.M., Norris, A., Ohnmacht, J., Patani, R., Zhong, Z., Dias, T.B., Kuscha, V., Scott, A.L., Chen, Y., Rozov, S., Frazer, S.L., Wyatt, C., Higashijima, S., Patton, E.E., Panula, P., Chandran, S., Becker, T., and Becker, C.G. (2013). Dopamine from the brain promotes spinal motor neuron generation during development and adult regeneration. *Developmental Cell* 25, 478-491. 査読有

Aoki, T., Kinoshita, M., Aoki, R., Agetsuma, M., Aizawa, H., Yamazaki, M., Takahoko, M., Amo, R., Arata, A., Higashijima, S., Tsuboi, T., and Okamoto, H. (2013). Imaging of Neural Ensemble for Retrieval of a Learned Behavioral Program. *Neuron* 78, 881-894. 査読有

Kimura, Y., Satou, C., Fujioka, S., Shoji, W., Umeda, K., Ishizuka, T., Yawo, H., and Higashijima, S. (2013). Hindbrain V2a neurons in the excitation of spinal locomotor circuits during zebrafish swimming. *Current Biology* 23, 843-849. 査読有

Shimozono, S., Imura, T., Kitaguchi, T., Higashijima, S., and Miyawaki, A. (2013). Visualization of an endogenous retinoic acid gradient across embryonic development. *Nature* 496, 363-366. 査読有

Jusuf, P.R., Albadri, S., Paolini, A., Currie, P., Argenton, F., Higashijima, S., Harris, W.A., and Poggi, L. (2012). Biasing amacrine subtypes in the Atoh7 lineage through expression of Barhl2. *J. Neuroscience* 32, 13929-13944. 査読有

Eklöf-Ljunggren, E., Haupt, S., Ausborn, J., Dehnisch, I., Uhlén, P., S. Higashijima, S., and El Manira, A. (2012). Origin of excitation underlying locomotion in the spinal circuit of zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 109, 5511-5516. 査読有

Behra, M., Gallardo, V.E., Bradsher, J., Torrado, A., Elkahoulou, A., Idol, J., Sheehy, J., Zonies, S., Xu, L., Shaw, K.M., Satou, C., Higashijima, S., Weinstein, B., and Burgess, S.M. (2012). Transcriptional signature of accessory cells in the lateral line, using the Tnk1bp1:EGFP transgenic zebrafish line. *BMC Dev. Biol.* 12, 6. 査読有

Satou, C., Kimura, Y., and Higashijima, S. (2012). Generation of multiple classes of V0 neurons in zebrafish spinal cord: progenitor heterogeneity and temporal control of neuronal diversity. *J. Neuroscience* 32, 1771-1783. 査読有

Asakawa, K., Higashijima, S., and Kawakami, K. (2012). An *mnr2b/hlxb9lb* enhancer trap line that labels spinal and abducens motor neurons in zebrafish. *Developmental Dynamics* 241, 327-332. 査読有

Muto, A., Ohkura, M., Kotani, T., Higashijima, S., Nakai, J., and Kawakami, K. (2011). Genetic visualization with an improved GCaMP reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 108, 5425-5430. 査読有

Wibowo, I., Pinto-Teixeira, F., Satou, C., Higashijima, S., and Lopez-Schier, H. (2011). Compartmentalized Notch signaling sustains epithelial mirror symmetry. *Development* 138, 1143-1152. 査読有

Koyama, M., Kinkhabwala, A., Satou, C., Higashijima, S., and Fetcho, J.R. (2011). Mapping a sensory-motor network onto a structural and functional ground plan in the hindbrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 108, 1170-1175. 査読有

Kinkhabwala, A., Riley, M., Koyama, M., Monen, J., Satou, C., Kimura, Y.,

Higashijima, S., and Fetcho, J.R. (2011). A structural and functional ground plan for neurons in the hindbrain of zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 108, 1164-1169. 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

Higashijima, S. (2014.7.30) Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish: International Society for Neuroethology (北海道、札幌市、札幌コンベンションセンター)

S. Higashijima, Kimura Y. and Satou, C. (2013.12.6) Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish: 第36回日本分子生物学会大会(兵庫県、神戸市、神戸国際会議場)

Higashijima, S. (2012.1.13) Development of V2 and V0 neurons in zebrafish spinal cord: 19th biennial meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN-2012), Mumbai (India)

S. Higashijima, (2011.9.15) Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish: 第34回日本神経学会大会(神奈川県、横浜市、パシフィコ横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東島 真一 (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