

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790234

研究課題名（和文） 脊索動物一次感覚神経の進化機構の解明

研究課題名（英文） Mechanisms underlying evolutionary architecture of primary sensory neurons in chordates

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）：アフリカツメガエル発生過程においては、*Six1* 遺伝子が一次感覚神経の髄内から髄外への切換を担っていることが明らかになった。マウス発生過程においてこの切換が観察されないのは、*Six1* が早期から発現しているためで、その発現のタイミングの違いは *Six1* 遺伝子の一次感覚神経エンハンサーの配列変化によるものであることが示唆された。高い配列保存性にもかかわらず、その活性には種特異性が観察され、種間の *Six1* 遺伝子発現の違いや一次感覚神経の種類や形態の違いとの相関が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found 1) *Six1* is a key regulator of transition from intramedullary primary sensory neurons to extramedullary sensory neurons during *Xenopus* development, 2) early expression of *Six1* prevents the appearance of intramedullary sensory neurons in mouse spinal cord and 3) the timing of *Six1* expression in primary sensory neurons could be altered by changing enhancer sequences. Species-specific activities of evolutionarily conserved enhancers allow us to investigate the relationship to diversity of sensory neurons and architectures in chordates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、進化、分化、一次感覚神経、脊髄神経節、神経堤細胞、エンハンサー、*Six* 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めた羊膜類の体幹部において、一次感覚を担う神経細胞は神経堤細胞由来であり、その細胞体は脊髄の外にある脊髄（後根）神経節に納められている。しかし、より古い体制とされる無羊膜類の魚類や両生類では、幼生期に Rohon-Beard 細胞（以下 RB 細胞）と呼ばれる一次感覚神経が神経管の中、髄内に存在し、髄外の脊髄神経節の発生に伴い細胞死によって消失することが知られている。研究開始までの我々の成果から、1) ア

フリカツメガエルでは *Six1* 遺伝子が一次感覚神経の髄内から髄外への切換を担っている、2) マウスでは *Six* 遺伝子が RB 細胞の出現を抑えている、3) 両種間の一次感覚神経の体制の違いは *Six* 遺伝子発現のタイミングの違いに起因する、4) 単一のエンハンサー配列の変化が両種間のヘテロクロニックな *Six* 遺伝子発現の基盤である、ことが示唆されていた。

2. 研究の目的

脊索動物における一次感覚神経進化機構を実験生物学的に解明することを最終目的として、『髄内から髄外へ切りかわる両生類一次感覚神経の発生機構の解明』、『一次感覚神経分化の鍵である *Six1* 遺伝子発現を司るエンハンサーの作用機序の解明』、『種々の脊索動物の一次知覚神経の体制、*Six1* 遺伝子の発現及びエンハンサー配列の連関の進化的検証』を遂行する。

3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエル一次感覚神経切換における *Six1* 遺伝子機能の解析

アフリカツメガエル RB 細胞では、その細胞死に先行して *Six1* が発現する。平成 21-22 年度若手研究 (B) 「新規神経回路創出のための分子基盤の解明」の成果として、*Six1* を本来の発現開始時期よりも早く強制発現すると RB 細胞の減少を早め、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ることが明らかになった。さらに検証を進めるため、エレクトロポレーション法を用いた発生後期アフリカツメガエル胚への siRNA 導入法を確立 (図 1)、RB 細胞に発現している *Six1* を siRNA でノックダウンしてその影響を観察した。

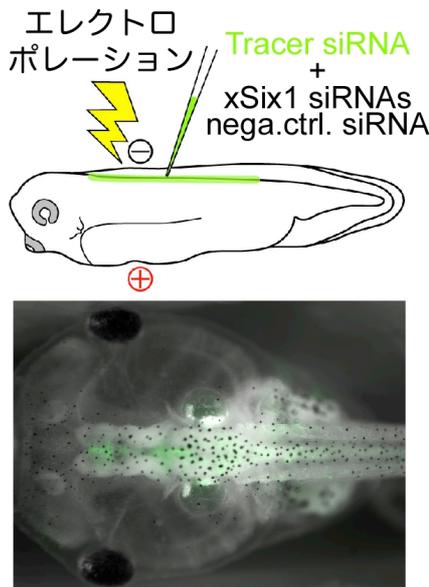


図 1

(2) ヘテロクロニックな *Six1* 遺伝子発現をもたらす機構の解明

エンハンサーのどの領域がツメガエル、マウス間の違いを生じさせるのかを明らかにするため、配列の一部を置換するなどしてエンハンサー活性の変化を観察した。検証には、マウスと同じく羊膜類で RB 細胞を持たず、マウスよりも簡便に遺伝子導入が可能なニワトリ胚を用いた。

(3) 様々な動物種での一次感覚神経の発生と *Six1* 遺伝子発現、エンハンサーの比較

メダカ、ツメガエル、ニワトリ、マウスの *Six1* 遺伝子一次感覚神経エンハンサーの活性の違いを検討するため、エレクトロポレーション法を用いてニワトリ胚脊髄神経節で検討を行った。

4. 研究成果

(1) RB細胞と脊髄神経節神経細胞の違いを生み出す発生機構の解明

エレクトロポレーション法で siRNA が導入される部位は限定的である (図 1、蛍光標識された siRNA を導入)。ノックダウンの効果を評価するため、最も効率的に siRNA 導入される領域 (体幹部、体節 1~9 番目、図 2 写真の赤線で挟まれた領域) の RB 細胞数の変化を正常胚で計測した。その結果、発生段階 42 以降に減少が開始、発生段階 46 ではピーク時の 20 分の 1 以下となっていた (図 2 グラフ)。

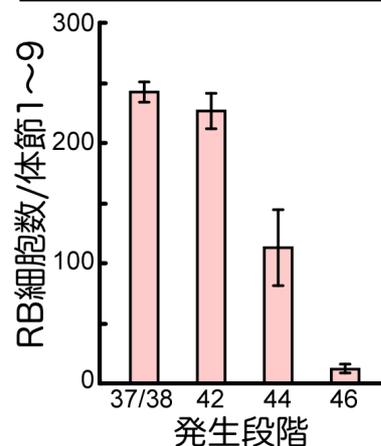


図 2

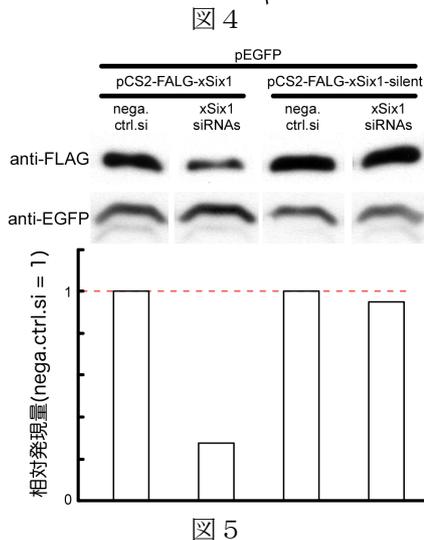
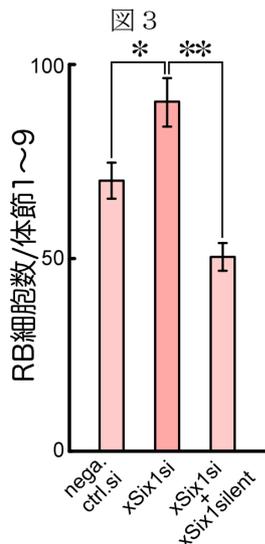
Six1 の発現開始前の発生段階 34/35 の胚に *Six1* を標的とした 3 種類の siRNA (図 3、si1~si3) の混合を導入、発生段階 45/46 で RB 細胞

胞数を計測したところ、*Six1*のノックダウンによって細胞数の減少が抑制されることが明らかになった(図4、nega. ctrl. siとxSix1siを比較)。siRNA認識配列にサイレント変異を持った*Six1*-silent mRNA(図3、変異導入部位が赤)は、siRNA耐性となり*Six1*の発現量を補完できる(図5、培養細胞によりタンパク質量を確認)。この共導入によってsiRNAの効果を打ち消すことが出来た(図4、xSix1si+xSix1silent)。*Six1*を本来の発現開始時期よりも早く強制発現すると、RB細胞の減少を早め、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ることと併せると、アフリカツメガエル一次感覚神経発生過程において、*Six1*はRB細胞から脊髄神経節神経細胞への切替を担っていることが明らかとなった。

si1 GGCAAGTACAGGGTCAGGAGGAAAT
mut GGCAAGTACAGAGCTCAGAGGAAAGT

si2 GAGAAGAGACCAGTTACTGCTTTAA
mut GTGAAGAACCAGCTACTGCTTTAA

si3 CCCAGGTCAGCAATTGGTTCAAGAA
mut CCCAGGTCAGTAATTGGTTTAAAA



(2) ヘテロクロニックな*Six1*遺伝子発現をもたらす機構の解明

ニワトリ胚では、ツメガエルとマウスの配列共に、脊髄神経節に加え神経管内部にもその活性が観察された(図6、カエル*Six1*-8:EGFPとマウス*Six1*-8:EGFP)。アフリカツメガエルでは、RB細胞で*Six1*の発現が開始する時期に、神経管内の他の細胞でも一過的に*Six1*が発現する。しかし、マウスでは神経管内の発現は観察されず、また、マウス胚においては、マウスのエンハンサー配列の活性は脊髄神経節に局限する(Sato *et. al.*, 2012)。これらの現象が、鳥類とほ乳類の一次感覚神経発生様式の違いに起因するものであるのか、あるいはマウスの配列の早期活性の性質によるものであるのか、等を検証することが必要であると考えられる。

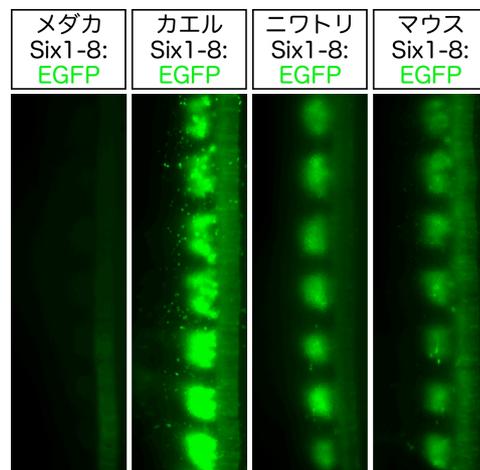


図6

エンハンサーのどの領域がより早い発現を担う部分なのかを明らかにするため、エンハンサーの中でも配列の保存性が高く、転写因子や核内受容体の結合部位が集中している領域(以下、コア配列)をツメガエル・マウス間で交換し、そのエンハンサー活性をニワトリ胚で検証した。その結果、マウスコア配列を持つツメガエルエンハンサーはマウスエンハンサーに近い活性を示した。これはコア配列に*Six1*遺伝子発現のタイミングを司る部分が存在することを示唆しており、コア配列の中の鍵となる部分とそこに結合する因子の探索を継続して行っている。

(3) 様々な動物種での一次感覚神経の発生と*Six1*遺伝子発現、エンハンサーの比較

メダカ、ツメガエル、ニワトリ、マウスの*Six1*遺伝子一次感覚神経エンハンサーの活性の違いをニワトリ胚脊髄神経節で検討した。その結果、ニワトリ発生における*Six1*本来の発現時期と発現場所を再現するのはニワトリの配列のみで、メダカの配列はその活性が観察されず、ツメガエルとマウスの配

列は神経細胞のみならずグリア細胞にもその活性が観察された(図6、図7、*Islet1/2*は神経細胞マーカー)。ツメガエルの配列もマウスの配列も、本来の環境であるツメガエル胚とマウス胚では、それぞれの *Six1* 遺伝子発現を再現できることから、高い配列保存性の中に種特異性が獲得されているものと考えられる。この差異が、種間の *Six1* 遺伝子発現の違いや一次感覚神経の種類や形態の違いと相関があるか否かを今後検証する必要がある。

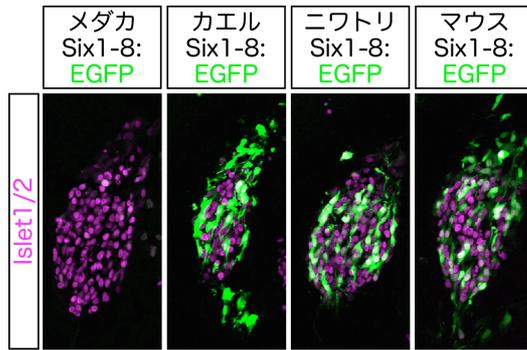


図7

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1件)

- (1) Sato S., Ikeda K., Shioi G., Nakao K., Yajima H. and Kawakami K.
Regulation of *Six1* expression by evolutionarily conserved enhancers in tetrapods.
Developmental Biology, 査読有, 368(1), 95-108, 2012
DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.05.023

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 矢嶋浩, 鈴木誠, 越智陽城, 池田啓子, 佐藤滋, 荻野肇, 上野直人, 川上潔
体幹部一次感覚神経の発生と進化の鍵因子
第24回 高遠・分子生物学シンポジウム, 演題番号11, 2012年8月23日, 高遠さくらホテル
- (2) 矢嶋浩, 鈴木誠, 越智陽城, 池田啓子, 佐藤滋, 荻野肇, 上野直人, 川上潔
Key regulator for developmental and evolutionary switch from Rohon-Beard cells to dorsal root ganglia
Society for Developmental Biology 71st Annual Meeting, 214B34, 2012年7月21日, Hilton Bonaventure Hotel (カナダ・モント

リオール)

- (3) 矢嶋浩, 鈴木誠, 越智陽城, 池田啓子, 佐藤滋, 荻野肇, 上野直人, 川上潔
Heterochronic shift of *Six1* expression drives evolutionary transition of vertebrate primary sensory neurons
第44回 日本発生生物学会年会, SW02-14(P-1019), 2011年5月19日, 沖縄コンベンションセンター

〔その他〕
ホームページ等

- (1) 自治医科大学・分子病態治療研究センター・細胞生物研究部
<http://www.jichi.ac.jp/biol/home.html>

- (2) 自治医科大学・研究シーズ集・研究者詳細
http://rseeds.jichi.ac.jp/research_seed/public/ResearchResultDetail.php?publicId=9f61yICrrIM78bNVyQCS3U8LQcN2RS&resultCd=1§ionCd=126

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