

「生物の発生・分化・再生」  
平成12年度採択研究代表者

岡本 仁

(理化学研究所・脳科学総合研究センター・修復機構研究グループ ディレクター  
発生遺伝子制御研究チーム チームリーダー)

## 「Genetic dissectionによる神経回路網形成機構の解析」

### 1. 研究実施の概要

人を含めた多くの動物で全ゲノムの配列が明らかになりつつあり、遺伝子の転写部位に関してはおおそ予測がつく時代を迎えつつある。しかしながら、個々の遺伝子産物が複雑な生命現象のなかでどのような機能を担うのかという問題を解明するためには、生命現象との対応を調べる必要があり、ゲノム配列から予測される遺伝子とその機能を迅速に対応づけるシステムを確立することが急務となっている。脊椎動物の全遺伝子のうち大多数が脳で発現しているといわれるが、これまでに機能がわかっているものはむしろわずかにすぎない。申請者は、脳を構成する神経細胞が分化し神経回路を形成する過程に関与する遺伝子を系統的に同定するために、ゼブラフィッシュを用いて神経回路網（特に運動神経）の形成に異常を持つ突然変異体の大規模スクリーニングを開始している。

本研究では、そのスクリーニングの結果既に得られた突然変異と、将来得られる突然変異を用いて、それらの原因遺伝子をクローニングすることを第一の目的とする。更に申請者は最近、ゼブラフィッシュ胚において、任意の遺伝子を任意の時期と組織で発現誘導できる効率的な方法を開発した。この方法を用い、遺伝子の異所性発現を行うことによって、中脳から後脳の形成に関わる遺伝子の機能解析とスクリーニングを行うことを第二の目的とする。

### 2. 研究実施内容

#### 1：岡本グループ

我々は、脳の神経細胞の分化の重要なキープイントごとに働く遺伝子をどこまで包括的に同定することが可能かを、ゼブラフィッシュの突然変異体の系統的単離によって解析を試みてきた。後脳の三叉運動神経細胞と顔面運動神経細胞や側線神経節細胞に限れば、神経細胞が誕生し、軸索を伸展して、途中で伸展経路を変更し、標的の細胞と正しく結合するまでの各ステップに対して、特異的に影響をおよぼす突然変異を単離することに成功した。

### 1) 顔面神経細胞や三叉運動神経細胞の分化と移動に異常を示す系統

このうちで *landlocked* (*llk*) が *Scrb* の欠損によることを示した。さらに、*off-raod(ord)*, *off-limit (olt)* 変異体の原因遺伝子も同定し成功した。

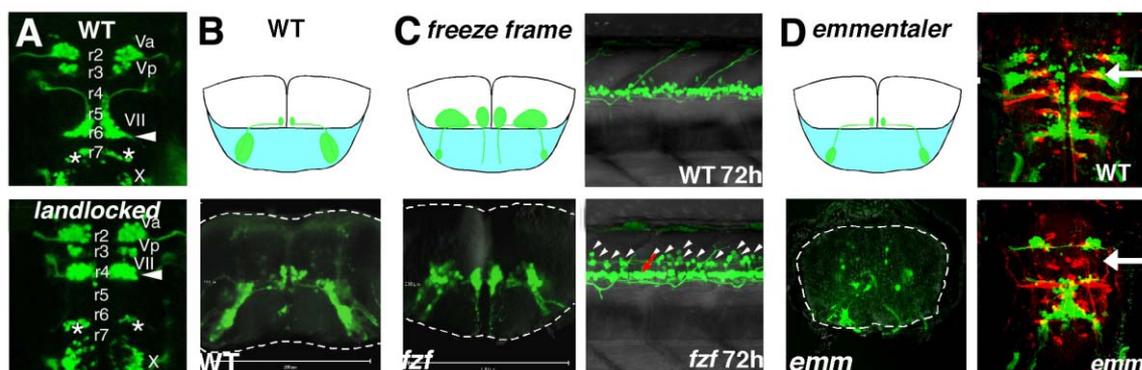


図1. 三叉運動神経細胞 (Va, Vp) と顔面運動神経細胞 (VII) の移動と分化に異常を示す突然変異群

### 2) 三叉運動神経後核の第3菱脳節内における分化および細胞移動に異常が認められる系統

このうちで *freeze frame (fzf)* では、第3菱脳節 (r3) 内側部に Islet-1 陽性のクラスターが異所的に形成され、Vp の白質内における運動神経核の形成が認められなかった。我々は、Time lapse recording による観察を新たに行い、*fzf* では野生型で観察される灰白質から白質への細胞移動が阻害されていることが明らかとなった (図2)。この遺伝子の同定にも成功した。

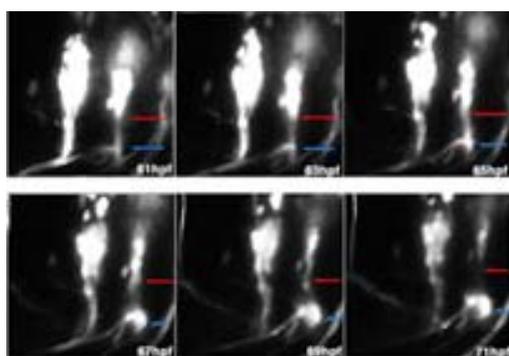


図2. 三叉運動神経後核の細胞移動：

受精後61時間目に灰白質と白質の境界 (赤矢印) より背側に存在するVpは、その後受精後72時間目までに白質腹側部 (青矢印) まで移動する。

### 3) 三叉運動神経の鰓弓内における軸索走行に異常が認められる系統

このうちで *faceless(fcl)*, *dead end (ded)* の原因遺伝子を同定した。

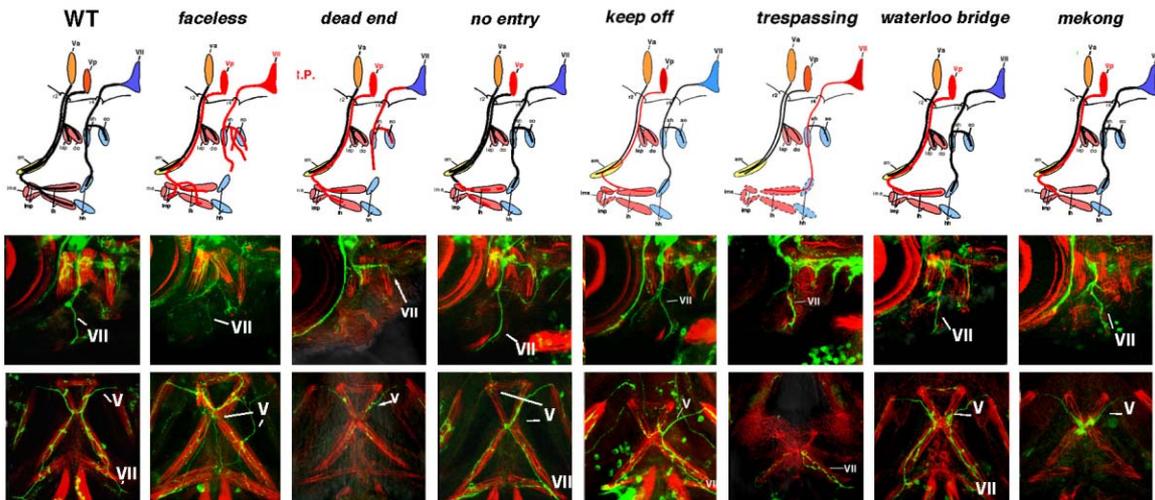


図3. 三叉運動神経細胞 (Va, Vp) と顔面運動神経細胞 (VII) 軸索の下顎筋支配異常突然変異群

(上から、模式図、側面図、腹側図、GFP蛍光とローダミンファロイジンの2重染色)

#### 4) ゼブラフィッシュ迷走神経核形成の突然変異解析

迷走神経は、鰓弓由来の横紋筋の運動支配と心臓を含む胸・腹部臓器の副交感性支配を行う混合性神経で、個体の生命維持に密接に関与する重要な脳神経である。よって、その発生異常は重篤な障害を引き起こすと考えられ、例えば、乳幼児突然死症候群の患者で迷走神経核の形成不全が報告されている。しかしながら現在、迷走神経の発生機構の詳細は明らかでない。そこで我々は *islet1-GFP* トランスジェニック系統のゼブラフィッシュを用いた飽和突然変異体スクリーニングにより、迷走神経の発生に異常を示す変異体を探索し、11系統を単離し、それぞれの原因遺伝子の同定を試みている。

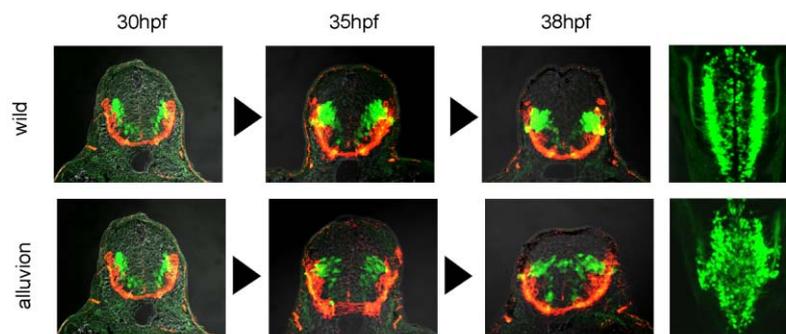


図4. *alluvion* 胚における迷走運動神経細胞の移動異常

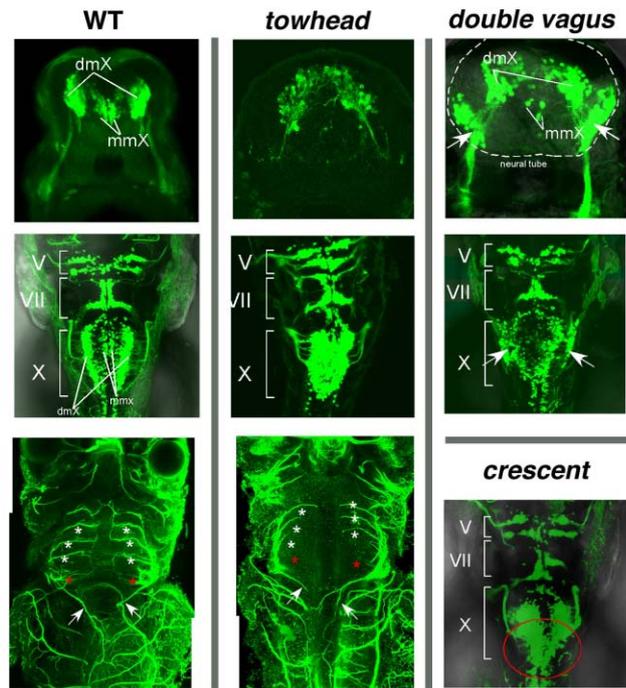


図5. その他の迷走運動神経細胞分化異常系統

#### 5) ケージドmRNA技術の確立と、これを使った終脳発生分化機構の解析

我々は、ケージドmRNA技術を使ってLIM-Homeodomain型転写因子Lhx2とSix3bの、終脳形成における関係を明らかにした。即ち、両者とも発生初期には予定前脳領域に発現する。six3bのアンチセンス・モルフォリノオリゴヌクレオチド注入による前脳発達の欠損は、前脳特異的にケージドLhx2 mRNAを活性化することによって回復するが、その逆はできないことから、前脳分化においてSix3がLhx2の上流として働き、予定前脳領域の細胞の増殖を制御していることを明らかにした。

#### 6) 中枢神経系の左右差の形成機構

突然変異スクリーニングの結果、ホモ接合体の半数で、心臓と臓器の位置が左右逆転する系統(*aboutface*)を同定した。さらに、視覚系から運動系までの神経回路網を可視化するためBrn3aのエンハンサーのもとでGFPを発現するトランスジェニック・フィッシュを作製したところ、手綱核(Habenula, Hb)から脚間核(Interpeduncular Nucleus, IPN)に投射する反屈束(Fasciculus Retrofluxus, FR)も可視化することができた(図6 A, B, C)。このトランスジェニック系統では、GFPが手綱核の内側垂核の神経細胞(右図B, C, lHb, rHb)に局限して発現しており、これらはすべて脚間核の腹側半分(腹側)に投射し、残りの外側垂核の神経細胞(右図E白星印)はすべて脚間核の背中側半分(背中側)に投射することを発見した(図6 D, E, F)。極めて特徴的なことに、正常胚では左の手綱核では外側垂核が、右の手綱核では内側垂核の方が圧倒的に大きいというふうに、左右の手綱核で内外側の垂核のサイズ比に著しい左右対称性が見られることが明らかになった。発生途上で、左の手綱核付近で一過性にTGF- $\beta$ シグナルの活性化がおこるが、*aboutface*など内蔵逆位がおこる突然

変異では、右で活性化がおこり、手綱核から脚間核への投射様式も左右が逆転することが明らかになった。この発見は、脊椎動物の脳で左右の神経回路網が異なることを明確に示した最初の例として、現在注目を集めている。また、手綱核は、辺縁系の一部として情動、依存、報酬等に深く関係していると考えられており、脳の高次機能と脳の機能的左右差を関連づけるための糸口になるのではないかと考え、更なる研究を進めている。

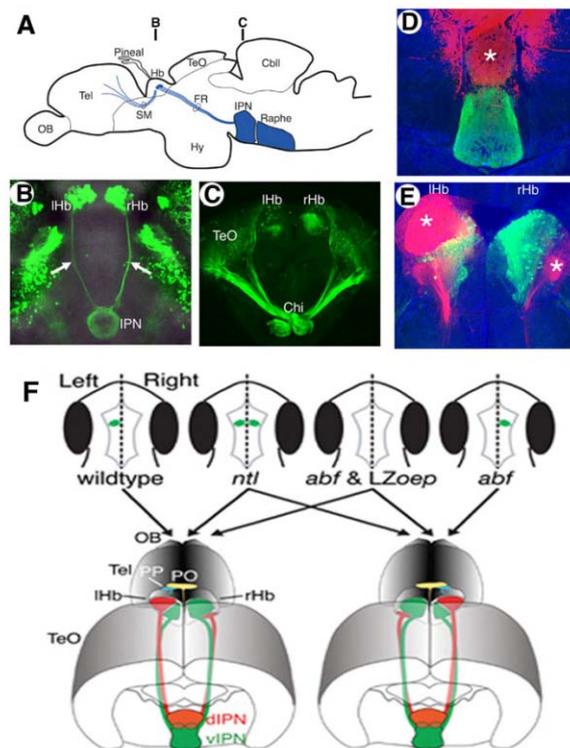


図6. 手綱核から脚間核への左右非対称な神経投射

## 2 : 佐藤グループ

### *epr*のマッピングとクローニング

我々は既に、すべての鰓弓神経の軸索伸長に異常を示し、色素細胞の欠如が観察されるゼブラフィッシュ変異体 *ephemeral* (*epr*) の単離を報告している。この変異体の詳細な連鎖解析の結果、原因遺伝子 *epr* は、全長3.8 kbp、アミノ酸1160残基から成る遺伝子であった。モルフォリノアンチセンスオリゴを用いたノックダウン実験を行い、この遺伝子が *epr* であることが確認された。

## 3 : 二階堂グループ

鰓弓神経節の比較的后期の分化、維持に関わっている可能性が高いと考えられる変異体 *non-epibranchial* (*nep*) について、*nep* 遺伝子をLG20上にマップし、その単離に向けて染色体歩行を行っている。

#### 4 : 政井グループ

当研究室では、ゼブラフィッシュの網膜をモデルに細胞分化のメカニズムを研究している。今年度は、昨年度までに表現型の解析を終えた突然変異体に関して、以下のように分子生物学的な解析を進めた。

##### 1) *scending and descending (add)*

この変異体では、網膜における神経細胞分化が起きず、前駆細胞が過剰に増殖する表現型を示す。*add*変異体の原因遺伝子をクローニングした結果、ヒストン脱アセチル化酵素1 (HDAC1) にナンセンス変異が起きていることが明らかになった。HDAC1は転写抑制因子と相互作用し、そのターゲット遺伝子のクロマチン状態を変化させることで、転写を抑制する酵素である。*add*変異体において、様々なシグナル経路を調べた結果、前駆細胞の増殖を促進するWntシグナル経路と神経細胞分化を抑制するNotchシグナル経路が抑制できず、異常亢進していることが明らかになった。

##### 2) *inball eye (piy)*

この変異体では、網膜神経細胞は分化できず細胞死を起こす。*piy*変異が存在するゲノム領域を絞り込んだ結果、複数の候補遺伝子を得ることができた。

##### 3) *twilight (tli), eclipse (els), corona (coa)*:

これらは視細胞変性を起こす変異体である。各変異体について、変異座を染色体上にマップし、系統間多型マーカーとゲノムデータベースを用いて、各変異が存在するゲノム領域を絞り込んだ。*els*変異体に関して、光受容に関わるcGMPホスホジエステラーゼのサブユニットのひとつにアミノ酸置換が起きていることが明らかになった。

#### 5 : 川上グループ

腹側の神経系の細胞形成には脊索および底板からのヘッジホッグ (Hh) シグナルが重要であることが明らかにされているが、このシグナルがいかにして多様な細胞を分化させるか未だ解明されていない。Hhシグナルによる多様な細胞タイプの形成調節機構を探るため、我々はゼブラフィッシュで多数単離されているHhシグナル異常変異体のひとつ*you*の解析を行った。この変異体は、海外における大規模変異体作製でも単離されていたが、理化学研究所における変異体スクリーニングで得られた側線神経軸索の伸張経路異常変異体*rw87*と同一の遺伝子変異であることが研究の途上で判明した。

豊田グループとの共同で、ポジショナルクローニング法によって遺伝子クローニングを行った。その結果、この原因遺伝子は背側神経管に局在して発現する細胞外マトリックス分子Scube2であることが判明した。変異体および遺伝子の解析から変異分子は機能喪失型であることなどがわかり、Scube2は背側から長距離に作用するHh阻害シグナルを抑制的に調節していると考えられた。我々はこの阻害シグナルがBmpであることを示し、Scube2機能は背側神経管や表皮に存在するBmpによるHh阻害作用を抑制することによって、腹側でのHhシグナルを長距離に制御していることを明らかにした (図7)。

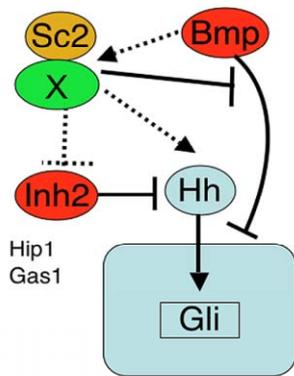


図6 You/Scube2分子の作用

背側神経管や表皮から長距離に作用するBmpシグナルはHhシグナル活性化に対して阻害的に作用する。細胞外マトリックスScube2 (Sc2)は未知のコファクターとともに働いてBmpの長距離シグナルを抑制する。いっぽうで、Hhリガンド自身の長距離作用もGas1, Hip1等の抑制因子によって調節される。Bmp, Hhをはじめ、これら細胞外因子の調節ネットワークの全体像は未だよくわかっていない。Gli: Gli転写因子。

## 6 : 東海林グループ

側線神経の伸展経路が大きく逸脱する変異系統 (*walk off*) の解析を行ない、軸索ガイダンスのメカニズムの理解を試みた。その結果、体節内でもっとも早く発生する単核の特殊な筋細胞 (muscle pioneer) が、近傍の筋および間葉系組織に作用することによって軸索ガイド分子の発現パターンを創出し、軸索の伸長経路を規定していることを見いだした。

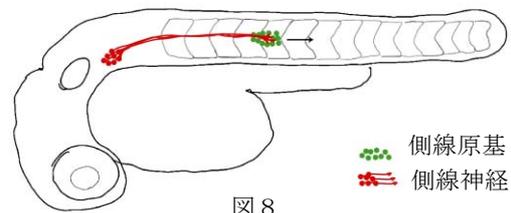


図8

また側線神経が消失する変異体 (*mujina*) の解析を行ない、神経系に加えて、心血管系および色素細胞系の発生に異常を見いだした。すなわち *mujina* 変異体の原因遺伝子は、これら3つの異なる組織・器官発生に共通して重要な因子をコードすることが予測される。現在、この遺伝子の同定作業を進めている。

## 7 : 舟橋グループ

内耳は、その機能と密接に結びついた三次元的な構造を持つことから、形態形成のメカニズムを研究するモデルとして適している。内耳原基 (耳胞) の背側から形成される三半規管の形態形成には、組織を構成する細胞の増殖や移動、さらに細胞死などが密接にかかわり合っていると考えられる。ゼブラフィッシュの半規管形成は、耳胞内部への上皮の突出に始まる。前方・側方・後方・腹側からの4ないし5の突出が中央で融合し、3つの柱状構造を作り、これらがやがて個々の半規管のドーナツ型の「芯」となる。この過程はニワトリやマウスとは見た目は異なるものの、耳胞の神経管側の壁とそれ以外の壁との間に通路 (穴) が出来るので、幾何学的には相同である。この形態形成過程で、細胞の動態などを規定する遺伝的要因を調べることで、内耳形態形成の仕組みを明らかにして行こうとしている。

三半規管の形態形成過程に異常を生ずるミュータントを昨年度に4系統分離し、解析を進めて来た。その内の一つは、上皮の突出が全く起こらず、半規管が形成されない。他の3系統は耳胞内部への突出形成が異常で、それぞれ表現型が異なるが、いずれも結果として三半規管の形態に異常が生ずる。これらのミュータントの耳胞で発現するマーカー遺伝

子に異常が無いか検討する一方、細胞を蛍光ラベルして、個々の細胞の動態を野生型のそれと比較しながら解析し、どのような原因で形態形成の異常が生ずるのかを解析中である。また、原因遺伝子の同定も同時に進行中である。

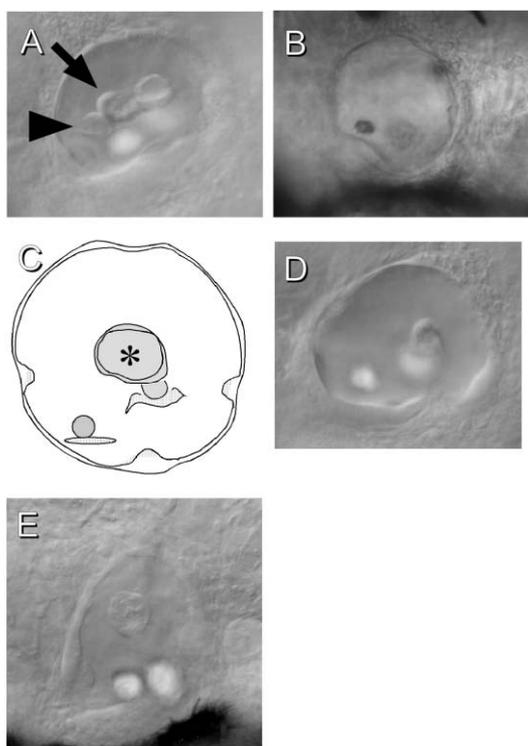


図9. 三半規管形成突然変異

*sand* (図B) (rw613) の内耳原基では、野生型ではすでに形成されている耳胞内部への突出 (矢印, 矢じり) がミュータントでは全く形成されない。*gallery* (rw616) では、野生型で見られる前方からの突出 (A 矢じり) や後方からの突出が形成されず、側方からの突出 (\*) のみ形成される。D, ミュータント *icicle* (rw686) では、突出の形成が遅れ、タイミングも正常とは異なり、結果として内耳の形態が異常になる。*cave* (rw636) では、突出が全く形成されない場合と、図示したように側方からの突出のみが形成される場合がある。

## 8 : 豊田グループ

ゼブラフィッシュYou変異体の原因遺伝子 (You遺伝子) を同定するために、候補領域をカバーするBAC/PACクローンの塩基配列を決定した。

(方法)

ショットガン法により配列決定を行う。ショットガン法とは、物理的剪断力を利用してランダムにDNAを断片化し、その両末端配列を決定後、決定した配列の相同性をもとに結合・編集作業 (アセンブル) を行うことにより配列決定を行う手法である。その後、完成データ (高精度配列) に向けて精度の低い領域やギャップ領域を種々の方法を用いて仕上げていく (Phred/Phrap/Consedプログラムを使用)。

(結論)

我々のチームでは、単離されたクローンのうちの1つであるDKEY-188F22クローンの高精度な塩基配列を決定した (Accession No. AP007256)。配列決定されたBACクローン上には、遺伝子予測プログラム (GenScan) により8個のタンパク (ORF) をコードしている遺伝子が検出された。これらの遺伝子について野生株とYou変異体で配列を比較した結果、*scube2*と呼ばれる遺伝子が原因遺伝子であることが明らかとなった。

### 3. 研究実施体制

#### \*岡本グループ

①研究分担グループ長：岡本仁

(理化学研究所・脳科学総合研究センター・発生遺伝子制御研究室 グループディレクター)

②研究実施項目：ゼブラフィッシュ神経回路網形成機構の解析

概要：1) 運動・感覚神経と中枢神経の分化異常突然変異の解析、2)ゼブラフィッシュ胚における異所性発現技術の開発と応用

#### \*政井グループ

①研究分担グループ長：政井一郎

(理化学研究所 政井独立主幹研究ユニット ユニットリーダー)

②研究実施項目：ゼブラフィッシュ網膜形成異常変異体の解析

概要：以下の突然変異の形質の解析と原因遺伝子の同定。

I. 網膜前駆細胞が過剰に増殖する変異体*ascending and descending (add)*

J. 網膜神経細胞が細胞死を起こす変異体*pinball eye (piy)*

K. 視細胞変性を示す変異体*twilight (tli)*, *eclipse (els)*, *corona (coa)*

L. 眼杯の形成異常を示す変異体*detached (det)*

#### \*豊田グループ

①研究分担グループ長：豊田敦

(独立行政法人理化学研究所、横浜研究所ゲノム科学総合研究センター、ゲノム基盤施設・シーケンス技術チーム 上級研究員)

②研究実施項目：ゼブラフィッシュ突然変異の原因遺伝子解析のためのDNA塩基配列解析による支援

概要：岡本グループのスクリーニングによって単離された突然変異体の原因遺伝子を解析するために、原因遺伝子の近傍の塩基配列の決定とその解析を行う。

#### \*東海林グループ

①研究分担グループ長：東海林互

(東北大学 加齢医学研究所 助手)

②研究実施項目：ゼブラフィッシュ側線神経系の分化異常の突然変異の解析

概要：岡本グループのスクリーニングによって単離された突然変異体のうちで、側線神経系の分化に異常を示す突然変異の解析を行う。

#### \*船橋グループ

①研究分担グループ長：船橋淳一

(東北大学 加齢医学研究所 助教授)

②研究実施項目：ゼブラフィッシュの耳の形成異常の突然変異の解析

概要：岡本グループのスクリーニングによって単離された突然変異体のうちで、耳の分化に異常を示す突然変異の解析を行う。

**\*二階堂グループ**

①研究分担グループ長：二階堂昌孝

(埼玉大学理学部生体制御学科 助手)

②研究実施項目：ゼブラフィッシュ感覚神経プラコード形成異常の突然変異体の解析

概要：岡本グループのスクリーニングによって単離された突然変異体のうちで、感覚神経プラコード形成異常を示す突然変異*non-epibranchial*の解析を行う。

**\*川上グループ**

①研究分担グループ長：川上厚志

(東京大学大学院理学系研究科 助手)

②研究実施項目：ゼブラフィッシュ神経系正中構造の形成異常を示す突然変異の解析

概要：岡本グループのスクリーニングによって単離された突然変異体のうちで、神経系正中構造の形成異常を示す突然変異の解析を行う。

**\*佐藤グループ**

①研究分担グループ長：佐藤淳

(東京工科大学バイオニクス学部 助教授)

②研究実施項目：ゼブラフィッシュ突然変異*ephemeral*の解析

概要：岡本グループのスクリーニングによって単離された突然変異体のうちで、運動神経細胞が後脳から伸び出ることができなくなった突然変異*ephemeral*の解析を行う。

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文 (原著論文) 発表

- **Okamoto H**, Hirate Y, Ando H. (2004) Systematic identification of factors in zebrafish regulating the early midbrain and cerebellar development by ordered differential display and caged mRNA technology. *Front Biosci.* 9:93-9.
- Miyashita T, Yeo SY, Hirate Y, Segawa H, Wada H, Little MH, Yamada T, Takahashi N, **Okamoto H**. (2004) PlexinA4 is necessary as a downstream target of Islet2 to mediate Slit signaling for promotion of sensory axon branching. *Development.* 131(15):3705-15.
- Yeo SY, Miyashita T, Fricke C, Little MH, Yamada T, Kuwada JY, Huh TL,

- Chien CB, **Okamoto H.** (2004) Involvement of Islet-2 in the Slit signaling for axonal branching and defasciculation of the sensory neurons in embryonic zebrafish. *Mechanisms of Development.* 121(4):315-24.
- Hanaoka, R., Ohmori, Y., Uyemura, K., Hosoya, T., Hotta, Y., Shirao, T., and **Okamoto H.** (2004) Zebrafish *gcm* is required for pharyngeal cartilage formation. *Mechanisms of Development.* 121: 1235-1247.
  - Ando H, Furuta T, **Okamoto H.** (2004) Photo-mediated gene activation by using caged mRNA in zebrafish embryos. *Methods in Cell Biology* 77:159-71.
  - Emoto, Y., Wada, H., **Okamoto, H.**, Kudo A., and Imai, Y. (2005) Retinoic acid-metabolizing enzyme Cyp26a1 is essential for determining territories of hindbrain and spinal cord in zebrafish, *Developmental Biology.* 278:415-427.
  - Uemura, O., Okada, Y., Ando, H., Guedj, M., Higashijima, S., Shimazaki, T., Chino, N., Okano, H., and **Okamoto, H.** (2005) Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression, *Developmental Biology* 278:567-606.
  - Aizawa, H., Bianco, I.H., Hamaoka, T., Miyashita, T., Uemura, O., Concha, M.L., Russell, C., Wilson, S.W., and **Okamoto, H.**, (2005) Laterotopic Representation of Left-Right Information onto the Dorsal-Ventral Axis of a Zebrafish Midbrain Target Nucleus, *Current Biology*, 15: 238-243, 11.91
  - Miyasaka, N., Sato, Y., Yeo, S-Y., Chien, C-B., **Okamoto, H.**, and Yoshihara, (2005) Y. Robo2 mediates the formation of an initial axon scaffold essential for establishment of precise glomerular map in the zebrafish olfactory system. *Development*, 132:1283-1293.
  - **Kawakami, A.**, Nojima, Y., Toyoda, A., Takahoko, M., Satoh, M., Tanaka, H., Wada, H., Masai., I., Terasaki, H., Sakaki, Y., Takeda, H., and **Okamoto, H.** (2004) The zebrafish-secreted matrix protein You/Scube2 is implicated in long-range regulation of Hedgehog signaling. *Current Biology*, 15:480-488.
  - **Masai, I.**, Yamaguchi, M., Tonou-Fujimori, N., Komori, A., **Okamoto, H.** (2005) Requirement of Hedgehog signalling for the cell-cycle exit of retinal progenitor cells in zebrafish. *Development* 132:1539-53.
  - Li Q., Shirabe, H., Thisse, C., Thisse, B., **Okamoto, H.**, Masai, I.,

Kuwada, J.Y. Chemokine signaling guides axons within the retina in zebrafish, *J. Neuroscience* 25:1711-1717.

- Wada, H., Iwasaki, M., Sato, T., Masai, I., Nishiwaki, Y., Hideomi, T., Sato, A., Nojima, Y., and **Okamoto H.** (2005) Dual roles of zygotic and maternal *Scribble1* in neural migration and convergent extension movements in zebrafish embryos. final revision in preparation to be submitted to *Development*, published on the Web.
- Liu, Y., Berndt, J., Su, F., Tawarayama, H., **Shoji, W.**, Kuwada, J. Y. and Halloran, M. C., (2004) Semaphorin3D guides retinal axons along the dorsal-ventral axis of the tectum., *J Neurosci.*, 24 p310-318
- Ober EA, Olofsson B, Makinen T, Jin SW, **Shoji W**, Koh GY, Alitalo K, Stainier DY., (2004) *Vegfc* is required for vascular development and endoderm morphogenesis in zebrafish., *EMBO Rep.* 1 p78-84
- Yoshida, M., Inoue, T., **Shoji, W.**, Ikawa, S., and Obinata, M., (2004) Reporter gene stimulation by MIDA1 through its DnaJ homology region, *Biochem Biophys Res Commun.*, 324 p326-332
- Wolman, M. A., Liu, Y., Tawarayama, H., **Shoji, W.**, and Halloran, M. C. (2004) Repulsion and Attraction of Axons by Sema3D are Mediated by Different Neuropilins in vivo, *J Neurosci*, 24 p8428-8435

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：1件）