

論文内容の要旨

論文題名 Visualization of Visual Pathways in Zebrafish
(ゼブラフィッシュにおける視覚系神経回路の可視化)

浜岡崇憲

序論

哺乳類、霊長類以外の脊椎動物に見られる中脳の視蓋領域は、網膜の主な投射先であり、視覚情報を処理・伝搬する重要な器官である。また視蓋の各層には様々な形態の細胞が存在し、視覚に限らず、側線や各種体性感覚器を起源とする神経線維が異なる層構造に入力することが知られている。視蓋における細胞を、生きた胚の中で、一細胞のレベルで標識することができれば、視覚情報回路における個々の神経細胞の機能を調べる事が可能になる。

近年、緑色蛍光蛋白質(GFP)をレポーターとし、組織特異的なエンハンサーを利用したトランスジェニック系統による細胞の可視化が遺伝学的に可能になり、時空間的な細胞の挙動を生きた個体で観察することが可能になった。著者は、視覚系に特異的に発現する転写因子の発現制御領域を使って、脳の視覚情報処理に関わる神経細胞群で GFP を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュを作ることに成功した。

Cajal による Golgi 染色の例を挙げるまでもなく、神経科学においては、一細胞レベルで神経細胞を生きたまま観察できることは、個々の神経細胞の形態を識別したり、それら神経細胞の詳細なシナプス結合や投射様式を調べるうえで重要である。DiI などの脂溶性色素や rhodamine-dextran などの細胞内標識試薬の微量注入による蛍光標識は、この問題に対する一つの解決策であるが、複雑な神経回路網で個々の細胞の標識を行うことは必ずしも容易ではない。またゼブラフィッシュ胚のように急速に発生が進む胚では、発生の限られた時期に、一度に標識できる神経細胞の数は限られてしまう。

そこで著者は、先に述べた視覚系特異的に GFP を発現するためのトランスジェニック・ベクターにさらに加えて、エンハンサーと標識蛍光タンパクの遺伝子との間に *loxP* によって挟まれた遺

伝子断片を挿入し、これを持つ新たなトランスジェニック・ゼブラフィッシュを作製した。このトランスジェニック系統の胚に、*loxP* を特異的に認識する組換え促進酵素 Cre をモザイク状に発現させることによって、視覚系の1個の神経細胞のみで標識タンパクを発現することに成功した。このトランスジェニック系統を応用することで、視蓋領域における神経細胞を一細胞レベルで観察することが可能になった。

1. ゼブラフィッシュ *brn-3a* 遺伝子の単離および発現解析

著者は、研究の対象となる視蓋の細胞に発現する遺伝子の単離を行った。まず感覚神経の発生に関与し、鳥類や両生類で視蓋および入力元である網膜の網膜神経節細胞に強く発現していることが知られている POU (Pit-Oct-Unc) ドメイン型のホメオボックス遺伝子 *brn-3* 遺伝子を候補とした。

brn-3 遺伝子ファミリー間および種間で保存されている POU-ホメオドメイン領域を degenerate PCR 法により単離し、cDNA ライブラリースクリーニングを行い、哺乳類における *brn-3a* に相同な配列を単離した。ゼブラフィッシュにおける *brn-3a* の発現を、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法により発生の段階をおって確認を行った。その結果ゼブラフィッシュ *brn-3a* は、著者が目的とする中脳の視蓋領域、またその視蓋領域へと入力する視神経を投射する網膜神経節細胞などに、受精後 30 時間前後から発現することを確認した。視蓋領域、網膜の網膜神経節細胞での発現は次第に発現が強くなり、双方の領域に、成魚まで一貫して発現していることに着目し、この *Bm-3a* の発現制御領域を単離することを目指した。

2. *brn-3a* 遺伝子の発現制御領域の単離と GFP コンストラクトの作成

ゼブラフィッシュのゲノムライブラリーのスクリーニングを行い、*brn-3a* 遺伝子コード領域を含むクローンを得た。ここから *brn-3a* 遺伝子の翻訳開始点上流と下流をふくむ隣接配列を得た。上流領域を利用し、GFP をレポーターとしたコンストラクトを作成した。このコンストラクトをゼブラフィッシュ胚に微量注入を行い、GFP の発現を解析したところ、転写開始点上流約 4.9kb と第一イントロンとが、ゼブラフィッシュ heatshock70 promoter (*hsp70*):GFP 遺伝子のの上流に接続されたコンストラクト (*brn3a-hsp70:GFP*) を微量注入した際にのみ、*Bm-3a* の発現を反映する GFP の発現が見られた。そこで、*brn3a-hsp70:GFP* を用いて、一過性発現の解析およびトランスジェニック系統の作成に用いた。

3. *brn3a-hsp70:GFP* からの一過性 GFP 発現の解析とトランスジェニック系統の作成

受精後 1~2 細胞期に *brn3a-hsp70:GFP* を微量注入したところ、*Bm-3a* の発現を反映する GFP の発現が見られた。共焦点レーザー顕微鏡で蛍光観察を行ったところ、受精後 40 時間頃から視蓋領域、網膜神経節細胞、さらに視蓋よりも腹側部の神経核細胞群などにおいて GFP の発現が確認された。中脳の視蓋領域、網膜の網膜神経節細胞での発現はすべて受精後 50 時間頃から実体蛍光顕微鏡下でも発現を確認することができるようになり、GFP の発現が強いものに関しては受精後 7 日目においてもこれらの領域に発現が継続していることが確認された。そこで発生段階における視蓋、網膜神経節細胞の観察が可能になることが期待され、*brn3a-hsp70:GFP* コンストラクトを含

むトランスジェニック系統の作成を行った。結果として、子孫としてトランスジェニック胚を産む 2 種類のファウンダー魚が単離され、これらからトランスジェニック系統を確立することに成功した。GFP 発現を経時観察すると、GFP の発現は受精後 32-34 時間から網膜神経節細胞や視蓋領域に発現が始まり、視神経軸索が視蓋領域へ投射していく様子や、視蓋領域からの出力系線維が投射していく様子が発生段階を追って観察することができた。発生段階から成魚を通して、GFP によって可視化された一連の神経回路は、網膜の網膜神経節細胞から視蓋領域へと入力し、視蓋からその腹側の神経核を中継して後脳へと投射している様子が観察された。

4. *brn3a-hsp70:XDRedX-Venus* トランスジェニック系統の作成

トランスジェニック系統においては、視蓋領域の発生の様子が GFP によって生きたまま観察できる。しかしながら、個々の細胞の形態や詳細な軸索の伸張の様子を観察するには、GFP を発現する神経細胞が隣接しているため、個々の神経細胞の樹状突起の様子や軸索の投射様式を同定するのは困難である。

そこで、一細胞レベルでの細胞の観察を目標として *brn3a-hsp70:GFP* コンストラクトの微量注入によるモザイク胚作成と、細胞移植によるモザイク胚作成の 2 つの方法を検討してみた。*brn3a-hsp70:GFP* コンストラクトの微量注入の場合、トランスジェニック胚作成時の注入濃度では奇形個体が増えてしまった。濃度を低くした場合には GFP の発現が弱く継続的な GFP の発現が効率よく観察できない。そこで *brn3a-hsp70:GFP* トランスジェニック系統胚から野生型胚へ少数の細胞の移植を行ってモザイク胚を作成したが、隣接する細胞群もドナー（トランスジェニック胚）由来となる場合が多く、近隣の複数の細胞で GFP の発現がおこり、一細胞レベルでの観察が困難であった。

P1 バクテリオファージ由来の組換え促進酵素 Cre は、ゲノムで同じ向きに並んだ 2 つの 34bp からなる *loxP* 配列 (*loxP*, X 記号で略記) を特異的に認識し、その間で組換えを促進することにより、*loxP* に挟まれた遺伝子断片をゲノムから切り出す。筆者は、細胞標識にこの原理を応用するために、Cre によって *loxP* の間の蛍光蛋白質が切り出されると別の蛍光蛋白質を発現させるコンストラクトを作製した (*brn3a-hsp70:XDRedX-Venus*)。さらに、このコンストラクトを持つトランスジェニック系統を作成し、Cre を異所的に発現させる DNA コンストラクトをトランスジェニック系統の胚に一過的にモザイク発現させた。Cre が発現しない場合、*brn-3a* のエンハンサーの制御下で *DsRed* が発現するので、この胚では視覚系の神経回路網が赤い蛍光を発する。その中で、Cre が発現する細胞でのみ、*DsRed* 遺伝子が切り出され、かわりに黄緑色の強い蛍光を発する *Venus* を発現することになる。その結果、*Venus* を発現するごく少数の細胞を個別に観察できるようになると期待された。現在までに、ゼブラフィッシュにおいては *Cre/loxP* の系の有効性は報告されていない。そこで *brn3a-hsp70:XDRedX-Venus* コンストラクトと CMV プロモーターの下流で Cre を発現するコンストラクト (*pCS2:Cre*) を同時に微量注入し、一過性の発現を観察したところ、*DsRed* と *Venus* がモザイク状に発現するのが観察された。*DsRed* が Cre によって切り出されていることを確認するために、微量注入を行った胚からゲノム DNA を抽出し PCR により切り出しが行われていることを確認した。この結果をもとに、筆者はさらに、*brn3a-hsp70:XDRedX-Venus* を持つトランスジェニック系統の作成に成功し、このトランスジェニック系統では、*brn3a-hsp70:GFP* を持つ

トランスジェニック系統と同様なパターンで DsRed が発現していることを確認した。

5. *brn3a-hsp70:XDdsRedX-Venus* トランスジェニック系統を利用した一細胞レベルでの神経細胞の可視化の検討

一細胞レベルでの可視化の有効性を確認するために、*brn3a-hsp70:XDdsRedX-Venus* トランスジェニック系統に *pCS2:Cre* を一過的に微量注入し検討した。*pCS2:Cre* の濃度を低くして微量注入することにより、DsRed と Venus がモザイク状に発現している個体が観察された。周囲に Venus を発現していない細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察することで、一細胞レベルで標識された網膜神経節細胞の視蓋表層における樹上突起の分岐の様子や視蓋における神経細胞の形態や投射様式を調べられることが示唆された。

結論

著者はゼブラフィッシュにおける *brn-3a* およびその発現調節領域を単離し、この発現制御領域を利用することで、ゼブラフィッシュにおける網膜から視蓋への入力、視蓋から後脳への入力の様子を顕微鏡下で生きたまま容易に観察することを可能にした。そして現在まで報告されていなかったゼブラフィッシュにおける *Cre/loxP* の系の有効性を DNA コンストラクトの微量注入による蛍光蛋白質の発現の変化と PCR により証明した。さらに *Cre/loxP* の系とゼブラフィッシュのトランスジェニック系統を利用することで、一細胞レベルでの神経細胞の可視化の可能性を示唆した。

これらの実験系の確立により、Cre 酵素を異所的に発現させることで視蓋領域における個々の神経細胞の詳細な分布の様子、形態学的記載、発生学的記載、さらに投射様式が生きた細胞で可能になると期待できる。一細胞レベルでの細胞可視化技術を利用することで、近年、特に集中的に研究されている視蓋領域をモデル系とした、神経活動依存的なシナプス形成の研究などが容易になると考えられる。

ゼブラフィッシュでは近年大規模な突然変異体のスクリーニングが行われ、特に初期発生に関わる遺伝子を中心に、重要な遺伝子が次々と単離されつつある。筆者が確立したトランスジェニック系統は、特に視覚系の行動を司る神経回路の成立機構の究明に大きく貢献すると考えられる。