

主論文

博士学位論文

ゼブラフィッシュにおける下オリーブ核ニューロン  
分化の分子機構の解明

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

伊藤 翼

## 目次

要約.....	1
第 1 章 研究概要.....	3
1.1 序論.....	3
1.2 本研究の目的.....	10
1.3 材料と方法.....	11
第 2 章 後脳後方で発現する <b>Gsx2</b> の役割.....	19
2.1 結果.....	19
2.2 考察.....	44
第 3 章 後脳における <b>gsx2</b> の発現メカニズム.....	50
3.1 結果.....	51
3.2 考察.....	66
第 4 章 本研究のまとめと将来の展望.....	70
謝辞.....	73
引用文献.....	74

## 副論文

## 参考論文

## 要約

小脳は運動制御や運動学習に関わっており、その神経回路は哺乳類から真骨魚類まで広く保存されている。小脳神経回路は、小脳前核から伸びる苔状線維と下オリーブ核から伸びる登上線維の 2 つの入力線維を受けている。苔状線維は顆粒細胞を介してプルキンエ細胞に入力情報を伝達し、登上線維はプルキンエ細胞に直接情報を伝達している。また、真骨魚類では小脳顆粒細胞の一部は、小脳の後側に存在するプルキンエ様細胞 (crest 細胞) に軸索を投射している。

これら小脳神経回路を構成するニューロンは、発生初期の段階で後脳領域から形成される。後脳領域は、吻側から尾側にかけて第 1-7 菱脳節に分けることができ、各菱脳節から様々なニューロンが産み出される。マウスでは、プロニューラル遺伝子である *Ptf1a* (ゼブラフィッシュの場合は *ptf1a*) が第 1-7 菱脳節の背側の神経前駆細胞で発現している。この *ptf1a* 陽性神経前駆細胞の内、第 1 菱脳節からプルキンエ細胞、第 2-5 菱脳節からは蝸牛神経核ニューロン、第 6-7 菱脳節からは下オリーブ核ニューロンが分化することが知られている。また、ゼブラフィッシュにおいても、*ptf1a* 陽性神経前駆細胞からはプルキンエ細胞と下オリーブ核ニューロンが分化すると示唆されている。しかし、*ptf1a* 陽性神経前駆細胞から多様なニューロンが産み出されるメカニズムに関しては未だ不明な点が多い。

本研究では、第 7 菱脳節の下オリーブ核ニューロンの前駆細胞で *ptf1a* と共発現している遺伝子として、ホメオボックス遺伝子である *gsx2* を見出した。そこで下オリーブ核ニューロン形成における *gsx2* と *ptf1a* の役割を明らかにするために、*gsx2* や *ptf1a* の変異体を作製し解析を行った。その結果 *gsx2* と *ptf1a* が下オリーブ核ニューロンの形成に関与していることが明らかとなった。さらに *gsx2*、*ptf1a* 変異体を用いた発現解析、および細胞死マーカーを用いた解析から、*ptf1a* と *gsx2* が遺伝子のカスケードの上

下関係がなく、*ptf1a* は神経分化に関与し、*gsx2* は下オリブ核ニューロンの運命決定に関与していることが明らかとなった。

*gsx2* は第 7 菱脳節特異的に発現していたことから、前後軸の位置情報にしたがって *gsx2* の発現が制御されていることが考えられた。後脳後方 (第 4-7 菱脳節) のパターン形成には、第 4 菱脳節で産生される FGF3/8a と体節から産生されるレチノイン酸の濃度勾配が関与している。そこでレチノイン酸や *fgf3/8a* シグナルを阻害することにより、*gsx2* の発現メカニズムについて解析した。その結果、レチノイン酸が *gsx2* の発現を正に制御し、Fgf3/8a が *gsx2* の発現を負に制御することが明らかとなった。さらに詳細に調べた結果、Fgf シグナルの下流で発現する *Mafba* が *gsx2* の発現を負に制御し、レチノイン酸シグナルの下流で発現する Hox タンパク質が *gsx2* の発現を正に制御していることが明らかとなった。本研究から、神経組織の前後軸の位置情報により発現が制御される *gsx2* が、*ptf1a* 陽性神経前駆細胞から下オリブ核ニューロンへの運命決定を行うことが明らかとなった。

# 第 1 章 研究概要

## 1.1 序論

神経回路を構成する個々のニューロンは、発生段階において、神経前駆細胞から分化する。ニューロンの運命決定は、前駆細胞がその位置に応じてシグナル伝達を受けることにより決定されると考えられている。このシグナル伝達の働きにより、前駆細胞は **basic helix-loop-helix (bHLH)** ドメインを持つプロニューラル転写因子や、ホメオボックス型転写因子を発現し、ニューロンへ分化していく。これらの転写因子の存在や制御機構を明らかにすることは、神経回路形成機構のメカニズムを理解するために重要である。小脳神経回路は、この位置情報に応じたシグナル伝達による神経形成機構を明らかにするための良いモデルであると考えられる。

### 小脳神経回路

小脳は運動制御や運動学習に関与し、近年では感情や認知、恐怖学習にも関与しているなど、高度な精神活動にも関わっている。さらには小脳神経回路の異常と自閉症スペクトラムが関連することが報告されている[1-3]。小脳は表層から順に分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層とよばれる 3 層構造で構成されている。哺乳類やゼブラフィッシュのような真骨魚類では、小脳神経回路はプルキンエ細胞や顆粒細胞、下オリーブ核ニューロンなど数種類のニューロンから形成されている (図 1)。小脳神経回路において、小脳は小脳外から 2 種類の入力を受けている。1 つは小脳前核から伸びる苔状線維からの入力で、この入力情報は顆粒細胞の平行線維を介してプルキンエ細胞に送られる。もう 1 つは下オリーブ核ニューロンの軸索である登上線維からの入力情報で、登上線維は直接、プルキンエ細胞に入力情報を送っている。プルキンエ細胞はこれらの入力情報

を統合し、哺乳類の場合は深部小脳核、真骨魚類の場合は **eurydendroid** 細胞 (広樹状突起細胞) を介して小脳外へ出力することで、小脳神経回路は機能を発揮している (図 1、図 2A)。また、これらの小脳の神経回路は哺乳類から真骨魚類まで広く保存されている [4]。ゼブラフィッシュでは、顆粒細胞の一部は小脳後方へ同側または反対側に伸ばし、内側聴側線系核に存在するプルキンエ細胞様の細胞 (**crest** 細胞) に投射している [5-7]。また、ゼブラフィッシュの場合、小脳の基本構造は受精後 5 日目で形成されることが明らかとなっている [5, 8] (図 2A)。

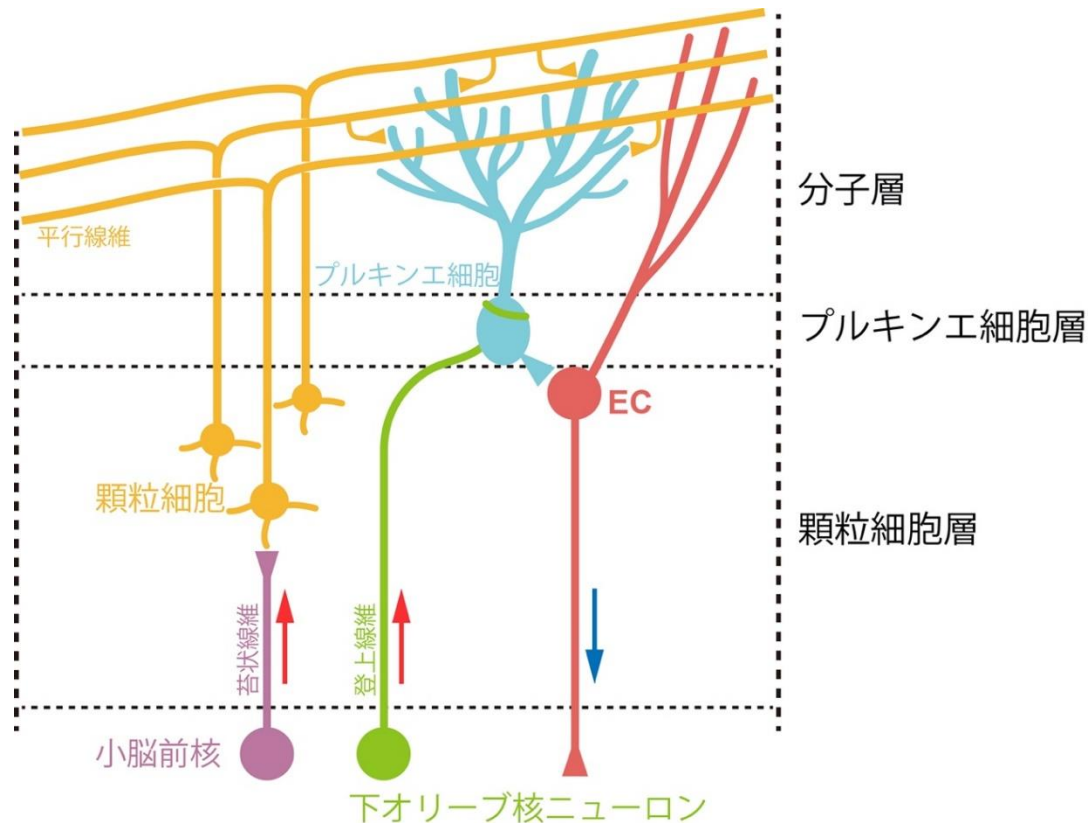


図1 ゼブラフィッシュの小脳神経回路図

小脳神経回路の模式図。小脳は3層の層構造を形成している。各層は表層から順に、顆粒細胞の軸索である平行線維とプルキンエ細胞の樹状突起からなる分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層と呼ばれる。ゼブラフィッシュ小脳は、小脳外に存在する2種類の求心性神経から興奮性の入力を受ける。ひとつは、後脳後方に存在する下オリーブ核から伸びる登上線維であり、プルキンエ細胞に投射している。もうひとつは小脳前核から伸びる苔状線維であり、顆粒細胞の樹状突起へ投射している。苔状線維からの情報は、平行線維を介してプルキンエ細胞へ伝達される。これら2つの経路を介して伝達された情報がプルキンエ細胞で統合された後、eurydendroid細胞（広樹状突起細胞）(EC)を介して小脳外へと出力される。

## 小脳神経回路を構成するニューロンの発生

小脳神経回路を構成するニューロンは発生の初期段階において、後脳領域から形成される。この後脳領域は吻側から尾側に向かって、菱脳節 (r) と呼ばれる 7 つの分節構造に分けることができる。この第 1-7 までの各菱脳節からは様々なニューロンが形成されるが、特に第 1 菱脳節からはプルキンエ細胞や顆粒細胞などの小脳に存在するニューロンが形成される。第 1-7 菱脳節の脳室帯ではプロニューラル遺伝子である *Ptf1a* (ゼブラフィッシュの場合は *ptf1a*) が発現しており、プルキンエ細胞は第 1 菱脳節 (小脳脳室帯) の *Ptf1a* 陽性細胞から形成される[4, 9-12]。また、マウスにおいて、小脳脳室帯では、*Ptf1a* 以外にもプロニューラル遺伝子である *Ascl1*、*Neurogenin1* (*Neurog1*)、*Neurogenin2* (*Neurog2*) が発現しており、プルキンエ細胞やその他の GABA 作動性ニューロンの形成に関与していると考えられている[13-15]。

このように第 1 菱脳節の *Ptf1a* 陽性神経前駆細胞からはプルキンエ細胞が分化する。さらに、マウス *Ptf1a* 変異体やトランスジェニック系統 (Tg 系統) を用いた細胞系譜の解析から、第 2-5 菱脳節と第 6-7 菱脳節の *Ptf1a* 陽性神経前駆細胞からは、蝸牛神経背側核の抑制性ニューロンと下オリーブ核ニューロンがそれぞれ分化することが分かっている[16, 17]。ゼブラフィッシュにおいても、Tg 系統を用いた細胞系譜の解析から、第 1 菱脳節の *ptf1a* 陽性神経前駆細胞は腹側から背側に移動しながらプルキンエ細胞に分化することが示されている (図 2A,C)。また、後脳後方の *ptf1a* 陽性神経前駆細胞は背側から腹側に移動し、下オリーブ核ニューロンに分化することが示されている(図 2A,B) [8]。

このように、各菱脳節で発現している *ptf1a* 神経前駆細胞は、個々の菱脳節で異なるニューロンに分化する。このことは、個々の菱脳節で、ニューロンの運命決定を担う遺伝子が別に存在することを示唆している。しかしながら、このような遺伝子の存在や発現制御がどのような分子機構で行われ、これらのニューロンの分化や運命決定を制御し



ているのか、いまだよく分かっていない。

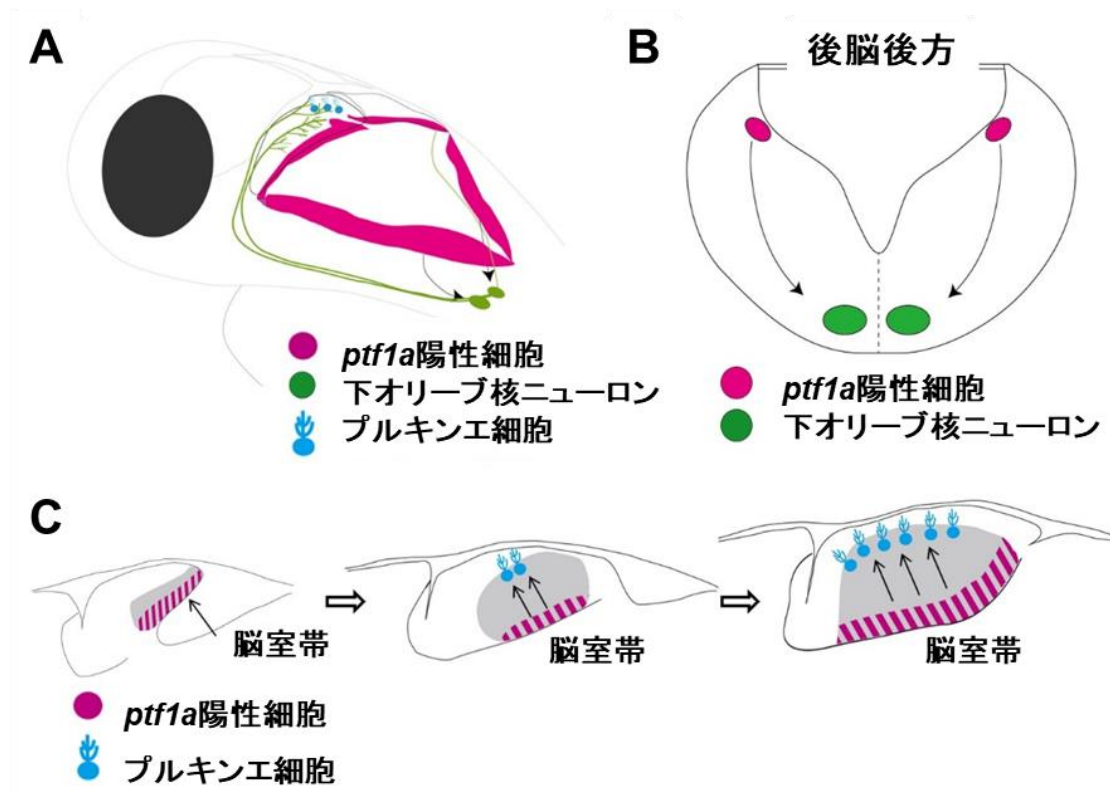


図2 *ptf1a* 陽性細胞からプルキンエ細胞、下オリーブ核ニューロンへの分化

(A) ゼブラフィッシュ仔魚における *ptf1a* 発現領域 (マゼンタ)、下オリーブ核ニューロン (緑) およびプルキンエ細胞 (水色) の位置。後脳後方の腹側領域にある下オリーブ核ニューロンは軸索である登上線維を吻側に伸ばし、プルキンエ細胞に直接投射している。(B) 後脳後方領域において、背側に位置する *ptf1a* 陽性神経前駆細胞 (マゼンタ) は腹側へと移動し、下オリーブ核ニューロン (緑) に分化する。(C) 第1菱脳節では脳室帯の *ptf1a* 陽性神経前駆細胞 (マゼンタ) が腹側から背側へ移動しながらプルキンエ細胞 (水色) に分化する。

## 後脳後脳のパターン形成

後脳領域の中でも、後脳後方 (第 4-7 菱脳節) のパターン形成には位置特異的なシグナル伝達として fibroblast growth factors 3/8a (Fgf3/8a) シグナルやレチノイン酸 (retinoic acid : RA) シグナルが関与している[18-22] (図 3)。ゼブラフィッシュの初期神経形成段階においては、初めに第 4 菱脳節で *fgf3/8a* が発現し、第 5-6 菱脳節の形成に関わる。また、形成中の体節では *aldehyde dehydrogenase 1 family, the A2 (aldh1a2)* (RA 産生に必要な酵素をコードしている遺伝子) が発現し、第 5-7 菱脳節や吻側の脊髄の形成に関与する[23-26]。Fgf3/8a は第 4 菱脳節から尾側へ濃度勾配を形成し、RA は後脳尾側から吻側への濃度勾配を形成する。この濃度勾配に応じて、下流での遺伝子の発現が調節され、後脳後方における多様なニューロンの分化に関与している。



図 3 後脳後方のパターン形成、後脳領域における *ptf1a* 陽性神経細胞の分化

*fgf3/8a* は第 4 菱脳節で発現し、第 5-6 菱脳節の形成に関与している。レチノイン酸 (RA) は体節で産生され、第 5-7 菱脳節や脊髄の形成に関与している。Fgf3/8a は第 4 菱脳節から尾側へ濃度勾配を形成し、RA は後脳尾側から吻側への濃度勾配を形成する。この濃度勾配に応じて、下流での遺伝子の発現が調節される。

## ホメオボックス遺伝子 **gsx2** に関して

本研究では、ホメオボックス遺伝子である *genetic screened homeobox 2 (gsx2)* (以前は *gsh2* と呼ばれていた) の下オリーブ核ニューロン分化における役割を解析している。マウスの **Gsx2** 遺伝子は、脊髄や後脳の神経前駆細胞で発現することが知られており、一部の後脳のニューロンや脊髄にある背側介在ニューロンの形成に関与する[27-29]。また、**Gsx2** は終脳腹側でも発現し、線条体ニューロンや嗅球介在ニューロンとなる外側基底核原基 (*lateral ganglionic eminence : LGE*) の前駆細胞の運命決定に関与する[30-34]。ゼブラフィッシュにおいても、Tg 系統を用いた解析から、*gsx2* が後脳後方で発現していることが明らかとなっている[29]。しかし、*gsx2* の後脳後方における細胞運命決定における役割は、ほとんど分かっていない。

## 1.2 本研究の目的

神経前駆細胞からニューロンが形成される運命決定や細胞分化の分子機構は、神経発生生物学の大きな課題の一つである。小脳神経回路を構成するニューロンのいくつかは、発生の初期の段階において、*ptf1a* 陽性神経前駆細胞から分化することが示されてきた。しかしながら、どのような分子機構で運命決定や分化が行われているのかは不明である。そこで本研究では、この小脳神経回路を構成するニューロンに着目し、*ptf1a* 陽性神経前駆細胞から様々なニューロンが形成される分子機構を解明することで、ニューロンの運命決定や分化の分子機構の一端を明らかにすることを目的とした。

まず、第 2 章では、後脳後方で発現する **Gsx2** の役割について述べる。ゼブラフィッシュの **Tg** 系統を用いた解析により、*gsx2* が後脳後方で発現し、下オリーブ核ニューロンの形成に関与している可能性が考えられたため、遺伝学的な手法を用い、**Gsx2** の役割について解析した。

そして、第 3 章では後脳領域における *gsx2* 遺伝子の発現メカニズムについて述べる。後脳後方の前後軸形成に関与する **Fgf** や **RA** シグナルと *gsx2* との関係性について解析を行った。さらに、**Fgf** と **RA** シグナルの下流で働く転写制御因子と *gsx2* の発現との関係性についても詳細な解析を行った。

## 1.3 材料と方法

### ゼブラフィッシュ系統

本研究による動物を用いた実験は名古屋大学動物実験委員会による認証を受け、名古屋大学の動物実験等に関する取扱い規定に基づき行われた。

野生型として Oregon AB 系統のゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いた。免疫染色や *in situ* hybridization での解析のために、受精後すぐに、0.003%の 1-phenyl-2-thiourea を含む embryo medium (EM)を用いて、仔魚の色素沈着を阻害した。*Tg(UAS:EGFP)* は、Gal4 結合配列を 5 個連結した UAS (upstream activator sequence) の下流に enhanced GFP (EGFP) をつなげたコンストラクトを、ゼブラフィッシュ染色体へ挿入して得られた Tg 系統であり、Gal4 依存性に GFP を発現する[35]。*Tg(ptf1a:EGFP)* は、*ptf1a* の制御領域の下流に EGFP をつないだ遺伝子を有する Tg 系統である。*Tg(mnx2b:GFP)* は、*mnx2b* 遺伝子の発現領域で改変型 Gal4-VP16 (GFP) を発現する系統である。*TgBAC(ptf1a:Gal4-VP16)* は *ptf1a* 遺伝子の発現領域で Gal4-VP16 を発現する系統である。*TgBAC(gsx2:loxP-DsRed-loxP-GFP)* は *gsx2* の制御領域の下流に loxP-DsRed-loxP-GFP をつなげた遺伝子を有する Tg 系統である[29, 35-38]。hspGFFDMC28C は Gal4 エンハンサー・ジーントラップラインの 1 つであり、この系統は下オリーブ核ニューロンを標識する[39]。gSAIzGFFM35A は、*mafba* の exon に Gal4 遺伝子発現ユニットが挿入された変異体である[40]。*Tg(UAS-hsp70l:gsx2BLRP-P2A-BirA-P2A-mCherry)* は *gsx2*、ビオチンリガーゼ認識ペプチド、2A ペプチド、mcherry の遺伝子を持つ、UAS 系統である。*mafba*<sup>b337</sup> 変異体はコーディング領域で点変異 (C→T) を有し、異所的に終止コドンが生じており、*valentino* として知られている[41]。*fgf8a*<sup>t282a</sup> 変異体は *acerebellar* として知られている変異体で、この変異体では exon2 の次にある intron の 5' スプライシングサイトの G が A に変化しているため、スプライシングの際に exon2 がスキップされてしまう[42]。

ゼブラフィッシュ成魚は明 14 時間、暗 10 時間のサイクルで、28°Cの温度で飼育した。胚や仔魚は EM で維持した[43]。

#### CRISPR/Cas9 法による *gsx2*、*ptf1a* 変異体の作製

gRNA の標的配列は ZiFit Targeter 4.2 (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>) [44, 45]を用いて設計した。gRNA を作成するために 2 つのオリゴヌクレオチドを用いた(表 1)。

この 2 つのオリゴヌクレオチドを 1x NEBuffer 3 (New England Biolabs) 中で 95 °C, 5 分間 →0.1 °C /sec で温度低下→ 50 °C, 10 分間→1 °C /sec で温度低下→ 4 °C でインキュベートし、アニールさせた。pT7-sgRNA ベクター切断のために、*SaI*、*Bgl*II、*Bsm*BI で処理した。アニールした産物と切断したベクターはライゲーション反応を行い、Competent Quick DH5α (TOYOBO) に形質転換、培養し、プラスミド DNA を回収した。回収したプラスミド DNA は、シーケンス解析を行い、挿入配列を確認した。挿入配列が確認されたプラスミド DNA は *Bam*HI で処理し、T7 RNA ポリメラーゼを用いて、gRNA を合成した[46]。25 ng/μL gRNA と 100 ng/μL Cas9 mRNA を含む溶液、あるいは 25 ng/μL gRNA と 1000 ng/μL Cas9 プロテイン (Toolgen) を含む溶液を 1 細胞期の胚にピコポンプ (PV830, WPI) を用いて、1 nL インジェクションを行った。挿入や欠失の確認を heteroduplex mobility assay (HMA) 法を用いて行った[47]。変異の配列は、変異体のゲノム配列を pTAC-2 に挿入し、サブクローニング後、シーケンスにより解析した。

表 1 gRNA 作製用のプライマー

gene	Primer 1(5'-3')	Primer 2(5'-3')
<i>ptf1a</i> <sup>Δ4</sup>	TAGGAAGAGGCGGAGGCGCATG	AAACCATGCGCCTCCGCCTCTT
<i>ptf1a</i> <sup>+11</sup>	TAGGCGTCAAGCTGCCAACGTC	AAACGACGTTGGCAGCTTGACG
<i>gsx2</i> <sup>Δ5</sup>	TAGGCGGAATTCCAAGTCTCAA	AAACTTGAGCAGTGGAATTCC
<i>gsx2</i> <sup>Δ8</sup>	TAGGTCTTCCGGGACGGGCAGA	AAACTCTGCCCCGTCCCGGAAG

## Genotyping

*ptf1a*<sup>Δ4</sup>、*ptf1a*<sup>+11</sup>、*gsx2*<sup>Δ5</sup>、*gsx2*<sup>Δ8</sup> の変異の確認には表 2 に記載のプライマーを用い、PCR 後、12%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。*gSAIzGFFM35A* の同定には表 2 のプライマーを用いて、PCR を行い、200bp の PCR 産物が増幅されるものを野生型、増幅されないものを *gSAIzGFFM35A* と判別した。*Tg(gsx2:loxp-DsRed-loxp-GFP)* は *gsx2* の exon1 を含んでいるため、*gsx2*<sup>Δ5</sup> と *Tg(gsx2:loxp-DsRed-loxp-GFP)* を交配した系統では 12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動による HMA 法でホモ変異体の判定ができなかった。そこで新たにプライマーを設計した (表 2)。PCR 後、*XhoI* で制限酵素処理し、野生型では 257bp と 21bp、ホモ変異体では 273bp のバンドが検出されるようにした。*fgf8a*<sup>ti282a</sup> 変異体は表 2 のプライマーを用いて PCR を行い、*XbaI* で制限酵素処理した。その後、12%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、130bp と 20bp にバンドがあるものを *fgf8a*<sup>ti282a</sup> 変異体と判定した。

表 2 Genotyping に用いたプライマー

Target gene	Primer 1(5'-3')	Primer 2(5'-3')
<i>ptf1a</i> <sup>Δ4</sup>	ACCTCAGAGCTGTCCCCTCACAGA	GGCAGCTTGACGCAACTGTT
<i>ptf1a</i> <sup>+11</sup>	GGAGGCGCATGAGGTCTGAAGT	GCAGTCCCTCGAAAGCATCG
<i>gsx2</i> <sup>Δ5</sup>	GTGCGTATCCTCACACATCCACTCT	TGCCATCCTCTGGCAGAACG
<i>gsx2</i> <sup>Δ8</sup>	ACCTCAGAGCTGTCCCCTCACAGA	GCAGCTTGACGCAACTGTT
<i>gSAIzGFFM35A</i>	CGAGGTAGGAGAAGGGCTGT	CTGGAGCGTTTGATGGATACAG
<i>gsx2</i> <sup>Δ5</sup> ; <i>Tg(gsx2:loxp-DsRed-loxp-GFP)</i>	CCATCAGCATCTCGCTCAG	CAGTGAAGCCTTGTCCTCG
<i>fgf8a</i> <sup>ti282a</sup>	CAGGAGGGGGAACTGATTGTCTAG	CCCTTTCTAGGTGGGATTCTTCTC

## アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド (MO) のインジェクション

*fgf3*、*aldh1a2*、*pbx2*、*pbx4* MO は、すでに報告されている、翻訳抑制する MO を用いた[23, 48, 49]。0.3 mM *fgf3*MO、 0.1 mM *aldh1a2* MO、 0.03 mM *pbx2* MO2、 0.06 mM *pbx2* MO3、 0.06 mM *pbx4* MO1 or 0.06 mM *pbx4* MO2 を光学実体顕微鏡下でピコ

ポンプ (PV830 WPI) を用いて、それぞれ 1 nL を 1 細胞期の胚にインジェクションした。コントロールとして standard control MO : 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAA-TTTATA-3'を用いた。これらの MO は Gene Tool より入手した。

#### 化学阻害剤による処理

DEAB (Wako) および SU5402 (Calbiochem) は DMSO で 100 mM と 20 mM となるようにそれぞれ溶かし、-30 °C で保存した。DEAB は 0.25  $\mu$ M、SU5402 は 1.0、2.5、5.0、200  $\mu$ M となるように 0.003% 1-phenyl-2-thiourea /EM で希釈した。これらの溶液を受精後 6 時間から 22 時間の間、処理した。

#### cDNA クローニング

Total RNA は TRI Reagent (Molecular Research Center) を用いて、受精後 5 日目、12 時間のゼブラフィッシュの仔魚から単離した。cDNA は ReverTra Ace (Toyobo) を用いて作製した。*gsx2* と *foxp2* の DNA 断片は受精後 5 日目の cDNA ライブラリーから、表 3 のプライマーを用いて作製した。*gsx2*、*foxp2* の DNA 断片は pGEMT-easy (Promega) と pTA2 (Toyobo) にそれぞれ導入し、クローニングした (pGEMTe-*gsx2*、pTA2-*foxp2*)。 *grm5a* の 3 つの DNA 断片 (*grm5a*-A、B、C) はゼブラフィッシュのゲノム DNA を使い、表 3 のプライマーを用いて増幅した。これらの DNA 断片はそれぞれ pTA2 に導入し、クローニングした (pTAC2-*grm5a*-A/B/C)。 *pou4f1* の 3 つの DNA 断片 (*pou4f1*-A、B、C) はゼブラフィッシュのゲノム DNA を使い、表 3 のプライマーを用いて増幅した。これらの DNA 断片もそれぞれ pTA2 に導入し、クローニングした (pTAC2-*pou4f1*-A/B/C)。 *hoxb4a* の cDNA 全長は表 3 のプライマーを用いて、受精後 12 hpf の仔魚から取った cDNA ライブラリーを用いて増幅した。DNA 断片は *EcoRI*、*XbaI* で処理し、pCS2+MT にサブクローニングした (pCS2+MT-*hoxb4a*)。



表 3 *in situ* hybridization プローブ、mRNA 作製のプライマー

gene	Primer 1(5'-3')	Primer 2(5'-3')
<i>gsx2</i>	GACTCTTTGATTATCAAGGATCCCG	CGTCTTCTGAGCGCGGATAAT
<i>foxp2</i>	CCATGGAGGATAATGGGATG	TGAGGTAAATTTGGGGGTGA
<i>grm5a-A</i>	CACTTTTCTCCGTCCACCAT	GCGATCTGGGGAATATTGAA
<i>grm5a-B</i>	ACCTTCAGTGGGGAGATCCT	GATGAAGAGTGCCACGATGA
<i>grm5a-C</i>	CGGCCATTATCAAACCATTC	TGACGGTAGGATGGTGAACA
<i>pou4f1-A</i>	GCGATGAGCTGAGATGAGAG	AGCTCGAGTGACAGATTGTG
<i>pou4f1-B</i>	GGGTAAGAGTCACCCGTTCA	AGTCCGTTGTTGACGAGTCC
<i>pou4f1-C</i>	CAATTAACGACTCGGACACG	TCAGCTATAGCCGCGATTTT
<i>hoxb4a</i>	GGAATTCATGGCCATGAGTTCCTATTT	GCTCTAGACTATAGACTTGCGGAGGTCC

### *in situ* hybridization

whole mount *in situ* hybridization は以前の報告の通り行った[5]。 *ptf1a* と *pou4f1* のリボプローブは以前、報告されていたものを用いた[5, 8]。 pTAC2-*grm5a-A/B/C*、 pTA2-*foxp2*、 pGEMTe-*gsx2*、 pTAC2-*pou4f1-A/B/C* は制限酵素で処理後、 SP6、 T3、 T7 の RNA ポリメラーゼを用いて、 digoxigenin (DIG) で標識したリボプローブを合成した。 *grm5a* と *pou4f1* のリボプローブに関しては 3 種類 (A、 B、 C) のリボプローブの混合液を用いた。受精後 5 日目の仔魚の下オリーブ核ニューロンでの発現を見るために、頭部を切断し、 hybridization と anti-DIG AP Fab fragment (Roche) による抗体反応を 3 晩反応させた。その後、 BM-purple (Roche) により、発色させた。その後、 4% paraformaldehyde (PFA) /PBS で固定した後、 PBS (0.3% tween20) で洗浄し、必要に応じて、 genotyping を KOD-FX Neo (Toyobo) を用いて行った。観察するために 20%グリセロール/PBS に置換し、 1 時間ごとに 20%ずつグリセロールの濃度を上げていき 80%で一晩置いた。 100%グリセロールに置換後、 CCD カメラ (AxioCam HRc、 Zeiss) を付属された正立顕微鏡 (Axioplan 2 imaging、 Zeiss) 下で撮影した。

## 免疫染色

免疫染色には 1 次抗体として、anti-parvalbumin7 (1/1000, マウスモノクローナル, 腹水)[5]、 anti-GFP (1/1000, ラット, Nacalai Tesque, Cat# 04404-84)、 anti-DsRed (1/1000, ラビット, Clontech Laboratories, 632496)、 anti-cleaved caspase 3 (1/500, ラビット, Cell Signaling Technology, 9661) を用いた。また、2 次抗体として、Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG (H+L, Thermo Fisher Scientific, A-11006)、 CF488A goat anti-rat IgG (H+L, Biotium, 20023)、 CF488A goat anti-mouse IgG (H+L, Biotium, 20018-1)、 CF568 goat anti-mouse IgG (H+L, Biotium, 20301-1)、 CF568 goat anti-rabbit IgG (H+L, Biotium, 20103) を用いた。

受精後 3、5 日目の仔魚を 4% PFA/PBS で 4 °C で 1 時間固定後、PBST (PBS [NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, KCl 2.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM], 1 % TritonX-100) で 3 回洗い、-30 °C に冷やしておいたアセトンを加え、-30 °C で 12 分置いた。その後、PBST で 3 回、PBS-DT (PBS, 1 % BSA [bovine serum albumin], 1 % DMSO, 1 % TritonX-100) で 2 回洗い、5%ヤギ血清入り PBS-DT を加え、1 時間室温でブロッキングした。その後、5%ヤギ血清入り PBS-DT に上記の 1 次抗体を入れた液に換えて、4 °C で一晩反応させた。反応後、PBS-DT で 15 分を 6 回室温で洗った。5%ヤギ血清入り PBS-DT に二次抗体を 1/400 の濃度で混ぜた液に換えて、一晩反応させた。その後、PBS-DT で 15 分を 6 回室温で洗った。genotyping は GoTaq DNA Polymerase (Prom ega) を用いて行った。必要に応じて、組織を透明化する SeeDB (下記、SeeDB による透明化を参照) を行った後、共焦点レーザー倒立顕微鏡 LSM700 (Zeiss) で観察した。下オリーブ核ニューロンの細胞数を計測するために、免疫染色後の hspGFFDMC 28C; *Tg(5xUAS:EGFP)* の仔魚のサンプルの 3D 画像を用いて、後脳後側の腹側領域 (120 μm×120 μm×52 μm) にある下オリーブ核ニューロンの細胞数を測定した。この領域内で吻側に軸索を伸ばしている GFP 陽性の細胞を下オリーブ核ニューロンとした。

### SeeDB による透明化

20% D (-) フルクトース (w/v) (PBS, 0.5%  $\alpha$ -チオグリセロール) に置換し、室温で 4 時間浸透、40% D (-) フルクトース (w/v) (PBS, 0.5%  $\alpha$ -チオグリセロール) に置換し、室温で 4 時間浸透、60% D (-) フルクトース (w/v) (PBS, 0.5%  $\alpha$ -チオグリセロール) に置換し、室温で 4 時間浸透し、80% D (-) フルクトース (w/v) (PBS, 0.5%  $\alpha$ -チオグリセロール) に置換し、室温で 12 時間浸透し、100% D (-) フルクトース (w/v) (PBS, 0.5%  $\alpha$ -チオグリセロール) に置換し、室温で 12 時間浸透し、最後に SeeDB (80.2% フルクトース w/w, PBS, 0.5%  $\alpha$ -チオグリセロール) に置換し、室温で 24 時間浸透した[5, 50, 51]。

### mRNA のインジェクション

*hoxb4a* mRNA を合成するために、pCS2+MT-*hoxb4a* を *NotI* で処理した後、SP6 RNA ポリメラーゼを用いて mRNA 合成を行った。*TgBAC(gsx2:loxP-DsRed-loxP-GFP);gSAIzGFFM35A; Tg(5xUAS:EGFP)*、*hspGFFDMC28C; Tg(5xUAS:EGFP)* 系統の 1 細胞期の受精卵に光学実体顕微鏡下でピコポンプ (PV830 WPI) 用いて、25 pg インジェクションを行った。

### 統計解析

統計処理は Graphpad PRISM (ver. 5.1)を用いて、Student's *t*-test、Welch's *t*-test、one-way ANOVA で行った。

表 4 本研究でマーカーとして用いた Tg 系統、抗体、*in situ* hybridization プローブ情報のまとめ

ゼブラフィッシュ系統	参考文献	詳細な情報
<i>ptf1a</i> <sup>Δ4</sup>	本論文	<i>ptf1a</i> exon1 で4塩基欠失
<i>ptf1a</i> <sup>+11</sup>	"	<i>ptf1a</i> exon1 で11塩基挿入
<i>gsx2</i> <sup>Δ5</sup>	"	<i>gsx2</i> exon1 で5塩基欠失
<i>gsx2</i> <sup>Δ8</sup>	"	<i>gsx2</i> exon1 で8塩基欠失
<i>mafba</i> <sup>b337</sup>	Moens et al., 1998	コーディング領域で点変異
<i>fgf8a</i> <sup>t282a</sup>	Reifers et al., 1998	スプライシングサイトで点変異
gSalzGFFM35A; Tg(UAS:EGFP)	Kawakami et al., 2010	<i>mafba</i> 変異体かつ <i>mafba</i> 発現領域 (第5-6菱脳節) でGFPを発現
Tg( <i>ptf1a</i> :EGFP)	Pisharath et al., 2007	<i>ptf1a</i> 発現領域でGFPを発現
Tg( <i>gsx2</i> : <i>loxp</i> -DsRed- <i>loxp</i> -GFP)	Satou et al., 2013	<i>gsx2</i> 発現領域でDsRed (RFP) を発現
hspGFFDMC28C; Tg(UAS:EGFP)	Kawakami et al., 2010	下オリーブ核ニューロンでGFPを発現
Tg( <i>mnx2b</i> :GFP); Tg(UAS:EGFP)	Asakawa et al., 2012	下オリーブ核ニューロンおよび運動ニューロンでGFPを発現
Tg( <i>ptf1a</i> :Gal4-VP16);	Persons et al., 2009	<i>ptf1a</i> 発現領域でGal4-VP16を発現
Tg(UAS- <i>hsp70l</i> : <i>gsx2</i> BLRP-P2A-BirA-P2A- <i>mCherry</i> )	本論文	Gal4依存的に <i>gsx2</i> を発現
マーカーとして用いた抗体	参考文献、入手先	標識する細胞
anti-Pvalb7 (parvalbumin7)	Bae et al., 2009	ブルキンエ細胞、crest細胞
anti-cleaved caspase 3	Cell Signaling Technology	細胞死マーカー
<i>in situ</i> hybridizationに用いたプローブ	参考文献	発現領域
<i>gsx2</i>	本論文	後脳後方の脳室帯領域、終脳
<i>ptf1a</i>	Kani et al., 2010	後脳全体の脳室帯領域
<i>pou4f1</i>	本論文	下オリーブ核ニューロン
<i>grm5a</i>	"	下オリーブ核ニューロン
<i>foxp2</i>	"	下オリーブ核ニューロン

## 第2章 後脳後方で発現する **Gsx2** の役割

*ptf1a* 陽性神経細胞から様々なニューロンが形成されるが、それらのニューロンの運命決定や分化の分子機構は明らかとなっていない。そこで、この分子機構の解明のために、後脳の背側領域で発現している遺伝子の探索を行った。以前の研究で、*gsx2* の発現領域で RFP を発現するゼブラフィッシュ Tg 系統の *TgBAC(gsx2:loxp-DsRed-loxp - GFP)* (以下、*gsx2:RFP* と表記) を用いた解析から、後脳後方で *gsx2* が発現していることが明らかとなっていた[29]。このことから *gsx2* が下オリーブ核ニューロンの形成に関与する可能性が考えられた。本研究では、この *gsx2* 遺伝子と、マウスで下オリーブ核ニューロン形成に関わることが報告されている *ptf1a* 遺伝子の 2 つの遺伝子に着目し、解析を行った[17]。

### 2.1 結果

***gsx2* は *ptf1a* 陽性の下オリーブ核ニューロン前駆細胞と共発現している**

最初に *gsx2* の発現領域を確認するために、*gsx2* プローブを用いて *in situ* hybridization を行った。その結果、受精後 2、3 日目の仔魚において、*gsx2* は後脳前方の脳室帯領域で弱く、後脳後方の脳室帯領域と終脳の腹側領域で強く発現していた (図 4A,B,E,F)。また、*ptf1a* の発現に関しても確認したが、以前に報告されている通り、後脳全体の背側の脳室帯領域で発現していた[8] (図 4C,D,G,H)。次に、*gsx2* の発現領域を詳細に解析するために、*gsx2:RFP* 系統の RFP の発現と *gSAIzGFFM35A;Tg(5xUAS:EGFP)* の GFP の発現を比較した (図 4I-L)。*gSAIzGFFM35A* は *mafba* (以前は *valentino* や *kreisler* と呼ばれていた) の exon に Gal4 遺伝子発現ユニットが挿入された Gal4 トラップ系統であり、*Tg(5xUAS:EGFP)* と交配することで、第 5-6 菱脳節で GFP を発現する[40] (以

降、*mafba*<sup>GFF</sup>;UAS:GFP と表記、図 4I,K)。これら *gsx2*:RFP 系統と *mafba*<sup>GFF</sup>;UAS:GFP 系統を交配し、受精後 3 日目の仔魚において、免疫染色を行った。その結果、*mafba*<sup>GFF</sup>;UAS:GFP の発現は第 5-6 菱脳節で確認されたが、*gsx2*:RFP の発現は第 5-6 菱脳節では確認されず、第 7 菱脳節とその後方で確認された。

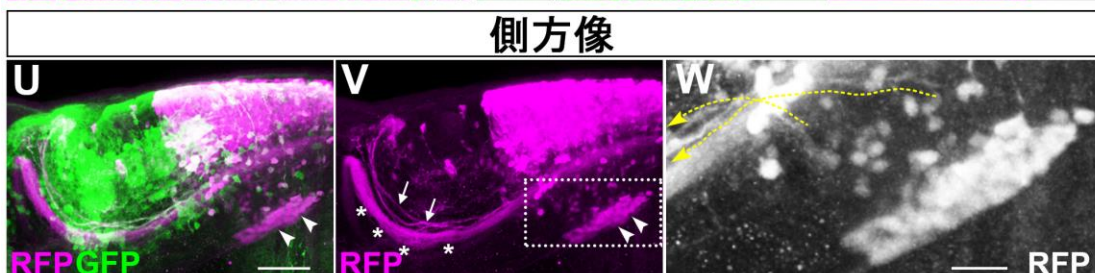
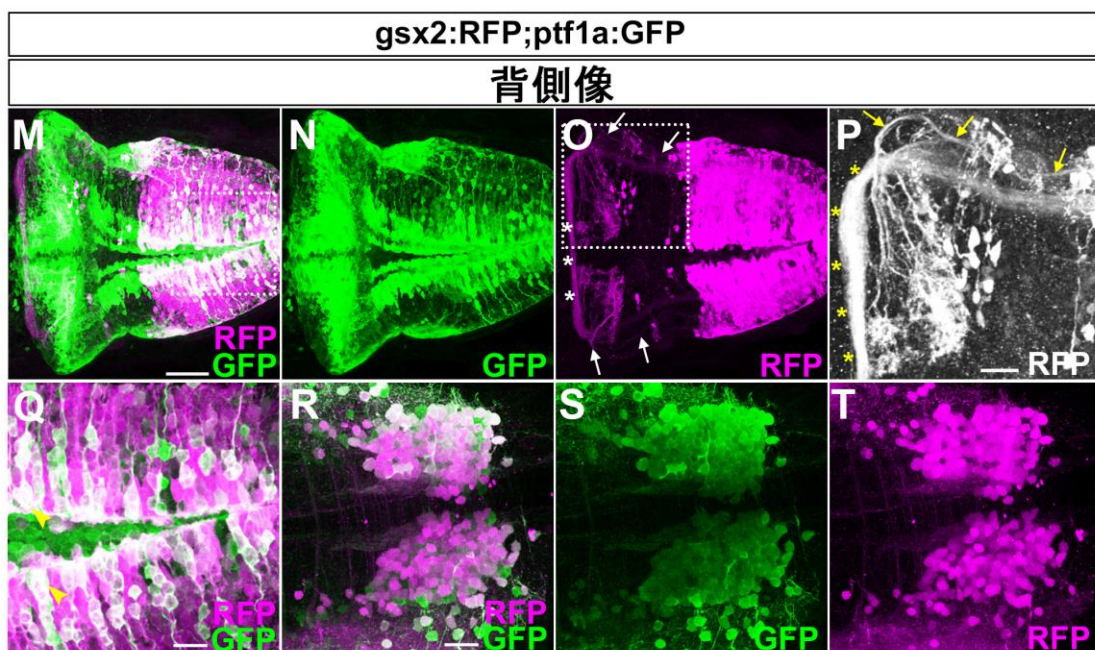
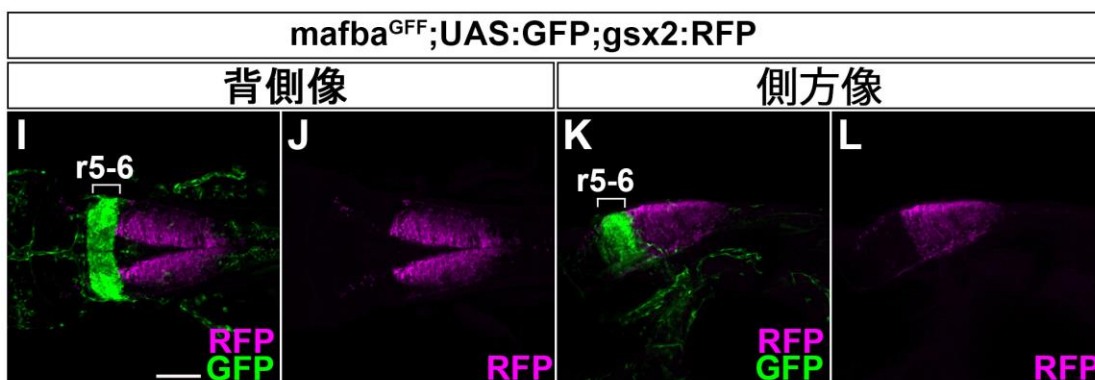
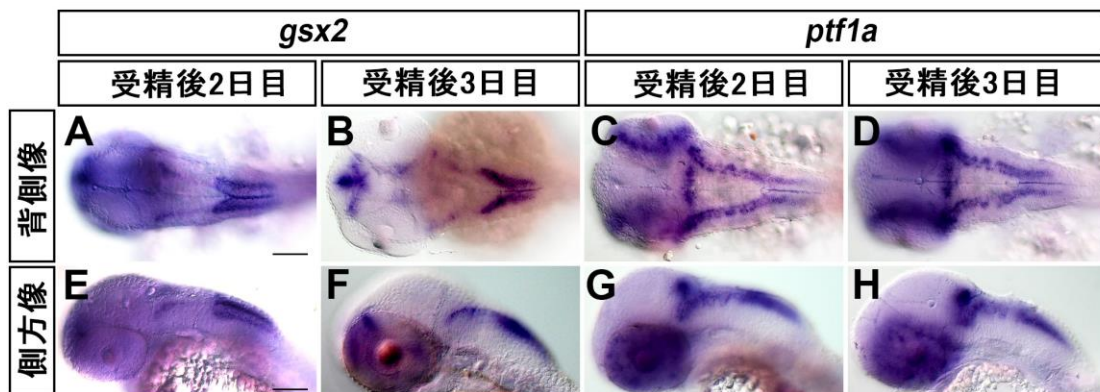
次に、*gsx2* と *ptf1a* の発現領域を比較するために、*gsx2*:RFP 系統と *ptf1a*:GFP 系統を交配し、受精後 5 日目の仔魚を用いて免疫染色による解析を行った。これらの系統では蛍光タンパク質の安定性が高いため、*gsx2* 陽性細胞、*ptf1a* 陽性細胞の細胞系譜を追跡することができる。その結果、以前報告されていたように、受精後 5 日目で、*ptf1a*:GFP の発現は、後脳全体の背側領域の神経前駆細胞で見られた (図 4M,N,Q)。また、*gsx2*:RFP と *ptf1a*:GFP の発現を確認してみると、後脳後方の背側と腹側の両方の領域で共発現する細胞が認められた (図 4Q-T)。さらに *gsx2*:RFP 系統では、後脳後方の腹側領域に存在する細胞が線維を伸ばし、小脳に投射している様子が観察された (図 4O,P,V,W、矢印で表記)。このことから、後脳の背側領域に位置する *gsx2*:RFP 陽性細胞が下オリーブ核ニューロンの神経前駆細胞であり、腹側領域にある *gsx2*:RFP 陽性の細胞が分化した下オリーブ核ニューロンであると考えられた。

そこで、後脳の腹側領域にある *gsx2*:RFP 陽性の細胞が下オリーブ核ニューロンであるのか調べるために、下オリーブ核ニューロンで GFP を発現することが知られている、Gal4/UAS 系統の *hspGFFDMC28C;Tg(5xUAS:EGFP)* 系統 (以下、28C;UAS:GFP 系統と表記) を用いた。この 28C;UAS:GFP 系統と *gsx2*:RFP 系統を交配することにより、GFP と RFP の発現を比較した[39]。その結果、*gsx2*:RFP の発現と 28C;UAS:GFP の発現は後脳後方の腹側領域のニューロン、つまり下オリーブ核ニューロンで共発現していることが分かった (図 5A-D)。しかし、この領域では *gsx2*:RFP 陽性だが 28C;UAS:GFP 陰性である細胞が見られた。Gal4/UAS 系統では、UAS 系統での DNA のメチル化により、レポーター遺伝子の発現がモザイクになること (サイレンシング) が報告されてい

る。今回用いた **28C;UAS:GFP** の系統においても、サイレンシングによって **GFP** の発現がモザイクになり、**GFP** の発現が確認できなかった可能性が考えられる[52]。この可能性については今後検証していく必要があるが、実験結果は腹側領域に位置する **gsx2:RFP** 陽性細胞が下オリーブ核ニューロンであることを示している。

また、**gsx2:RFP** 系統では下オリーブ核ニューロンやその前駆細胞の他に、後脳後方の腹側外側領域から軸索が伸び、小脳の腹側方面に位置する領域に投射している様子が観察された (図 4O,P、\*で表記)。この軸索は Wallenberg 交連核 (the nucleus of commissure of Wallenberg) から伸びている軸索であると考えられる。この軸索は真骨魚類において、苔状線維として顆粒細胞に投射していることが知られている[53]。

以上の結果から、**gsx2:RFP** 系統は下オリーブ核ニューロン前駆細胞および下オリーブ核ニューロンを標識しており、この細胞の多くは **ptf1a:GFP** と共発現していることが明らかとなった。このことから、下オリーブ核ニューロンが **ptf1a/gsx2** 陽性細胞から分化することが示された。





**図 4 *gsx2* は *ptf1a* 陽性の下オリーブ核ニューロン前駆細胞と共発現している**

(A,B,E,F) 受精後 2、3 日目の仔魚における *gsx2* の発現。

(C,D,G,H) 受精後 2、3 日目の仔魚における *ptf1a* の発現。

(I-L) 受精後 3 日目の *mafba*<sup>GFF</sup>;*gsx2*:RFP の仔魚で、抗 DsRed 抗体と抗 GFP 抗体で免疫染色した結果。r5-6: 第 5,6 菱脳節。

(M-W) 受精後 5 日目の *gsx2*:RFP;*ptf1a*:GFP の仔魚を抗 DsRed 抗体、抗 GFP 抗体で免疫染色した結果。

(P) O の破線枠内の拡大図。

(Q) M の破線枠内の拡大図。

(R-T) 下オリーブ核ニューロンの領域における、GFP や RFP の発現。W,V の破線枠内の拡大図。黄色や白色の矢印は登上線維、白色の矢尻は下オリーブ核ニューロンを示している。黄色の矢尻は GFP と RFP が共発現している細胞を示している。アスタリスク (\*) は *gsx2*:RFP 陽性である Wallenberg 交連核ニューロンの軸索を示している。W の破線の矢印は、下オリーブ核ニューロンから伸びている軸索を示している。

スケールバー: 100  $\mu$ m (A, E, I)、50  $\mu$ m (M, U)、20  $\mu$ m (P-R, W)

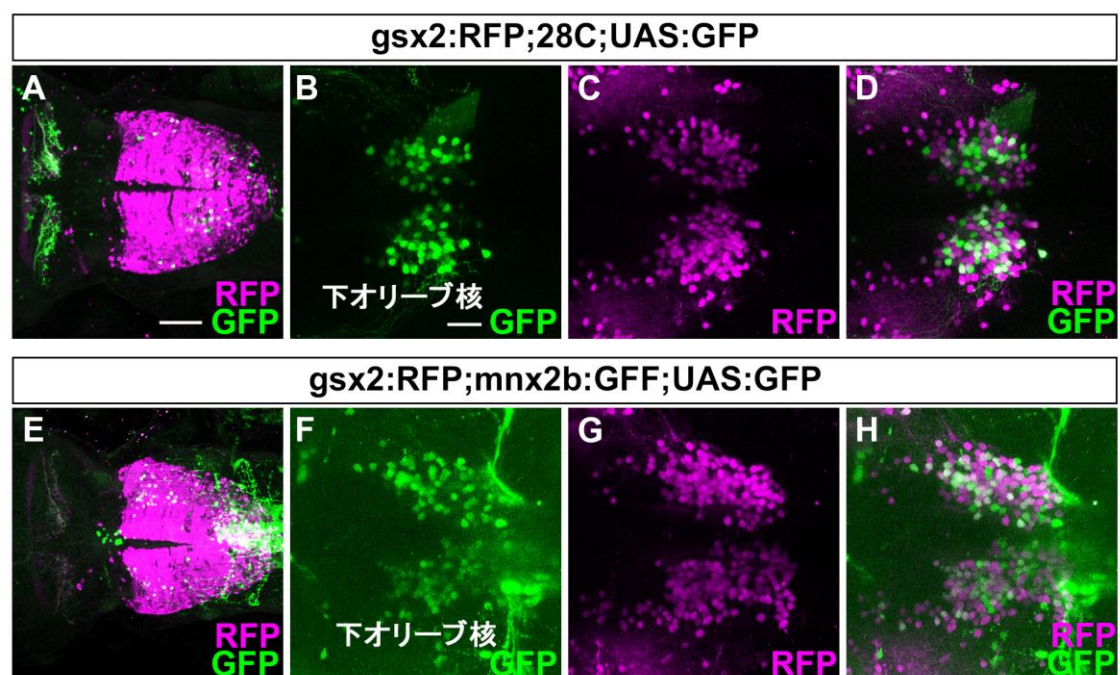


図5 下オリーブ核ニューロンで **gsx2:RFP** は **28C;UAS:GFP** と **mnx2b:GFF;UAS:GFP** と共発現している。

(A-D) 受精後 5 日目の **gsx2:RFP;28C;UAS:GFP** ( $n=3$ ) の仔魚に対して、抗 DsRed 抗体と抗 GFP 抗体で免疫染色した結果。

(B-D) A の後脳後方領域の腹側での拡大図。

(E-H) 受精後 5 日目の **gsx2:RFP; mnx2b:GFF;UAS:GFP** ( $n=2$ ) の仔魚に対して、抗 DsRed 抗体と抗 GFP 抗体で免疫染色した結果。

(F-H) E の後脳後方領域の腹側での拡大図。 **gsx2:RFP** は後脳後方の腹側領域で **28C;UAS:GFP** あるいは **mnx2b:GFF;UAS:GFP** と共発現している。

スケールバー: 50  $\mu\text{m}$  (A)、20  $\mu\text{m}$  (B)。

### **gsx2 変異体では下オリブ核ニューロンが著しく減少する**

*gsx2* が下オリブ核ニューロンの前駆細胞で発現していることから、*gsx2* が下オリブ核ニューロンの形成に関与する可能性が示唆された (図 4、図 5)。次に下オリブ核ニューロンの分化における *gsx2* の役割を明らかにするために、CRISPR/Cas9 法により、*gsx2* 変異体を作製した。今回作製した変異体は、*gsx2* 遺伝子の exon1 に 5 塩基または 8 塩基欠失の変異を有している (図 6A)。これらの変異体では、*gsx2* mRNA は存在しているが(図 7A-D)、変異によりフレームシフトが生じて遺伝子の途中で終止コードが入っているため、どちらの変異体でもホメオドメインは消失している。そのため、Gsx2 の機能は完全に失われていると考えられる。

作製した *gsx2* 変異体で、下オリブ核ニューロンの形態を観察するために、前述の下オリブ核ニューロン特異的 GFP 系統である、28C;UAS:GFP 系統と *gsx2* 変異体を交配し、免疫染色による表現型解析を行った。その結果、野生型では、受精後 5 日目の仔魚において GFP 陽性の下オリブ核ニューロンが、登上線維を吻側へ伸ばし、parvalbumin7 (Pvalb7) 陽性のプルキンエ細胞に投射している様子が見られた (図 8A-D、図 9E)。一方、*gsx2* 変異体では、GFP 陽性の下オリブ核ニューロンが著しく減少していた (図 8E-H、図 9F)。また、28C;UAS:GFP 系統の他に、TgBAC(*mnx2b*:GFF);Tg(5xUAS:EGFP) (以下、*mnx2b*:GFF;UAS:GFP と表記) 系統が運動ニューロンに加えて[36]、下オリブ核ニューロンで GFP を発現していることを見出した (図 8I,J)。さらに *mnx2b*:GFF;UAS:GFP と *gsx2*:RFP を交配した系統では下オリブ核ニューロンで GFP と RFP が共発現していた (図 5E-H)。この *mnx2b*:GFF;UAS:GFP 系統を用いて、*gsx2* 変異体での下オリブ核ニューロンの形態を観察したところ、この系統でも、*gsx2* 変異体では野生型に比べ、*mnx2b*:GFF;UAS:GFP 陽性の下オリブ核ニューロンが著しく減少していた (図 8K,L)。さらに、後脳後方領域の腹側外側に位置している *mnx2b*:GFF;UAS:GFP 陽性のニュー

ロンも *gsx2* 変異体では減少、または消失していた (図 8I,K 黄色の点線の枠内)。これから Tg 系統を用いた解析から、*gsx2* が下オリーブ核ニューロンおよび後脳後方の腹側外側にあるニューロンの形成に関わることが示唆された。

次に、*gsx2* 変異体における、内在性の下オリーブ核ニューロンマーカーの発現を調べた。ゼブラフィッシュにおいて、*pou4f1* (以前は *brn3a* と呼ばれていた) と *glutamate receptor, metabotropic 5a (grm5a)* は下オリーブ核ニューロンで発現することが知られている[5, 54] (図 8N,P)。また、*grm5a* に関しては受精後 5 日目の仔魚においても、下オリーブ核ニューロンでの発現が報告されている[54]。 *Foxp2* はマウスにおいて下オリーブ核ニューロンで発現していることが報告されている[55, 56] (図 8R)。これら 3 つの遺伝子 (*pou4f1*、*grm5a*、*foxp2*) の発現を受精後 5 日目の仔魚で確認したところ、すべて後脳腹側領域で発現が見られた (図 8N-R)。そのため、受精後 5 日目の時点で、下オリーブ核ニューロンでこれらの遺伝子は発現していると考えられた。野生型と異なり、*gsx2* 変異体ではこれらの遺伝子の発現は下オリーブ核ニューロンで見られなかった (図 8N-S、図 9A-B)。マーカーの発現解析の結果からも、*gsx2* 変異体では下オリーブ核ニューロンが著しく減少、または消失していることが示された。Tg 系統やマーカーを用いた結果から、*gsx2* が下オリーブ核ニューロンの形成に必要な遺伝子であることが示された。

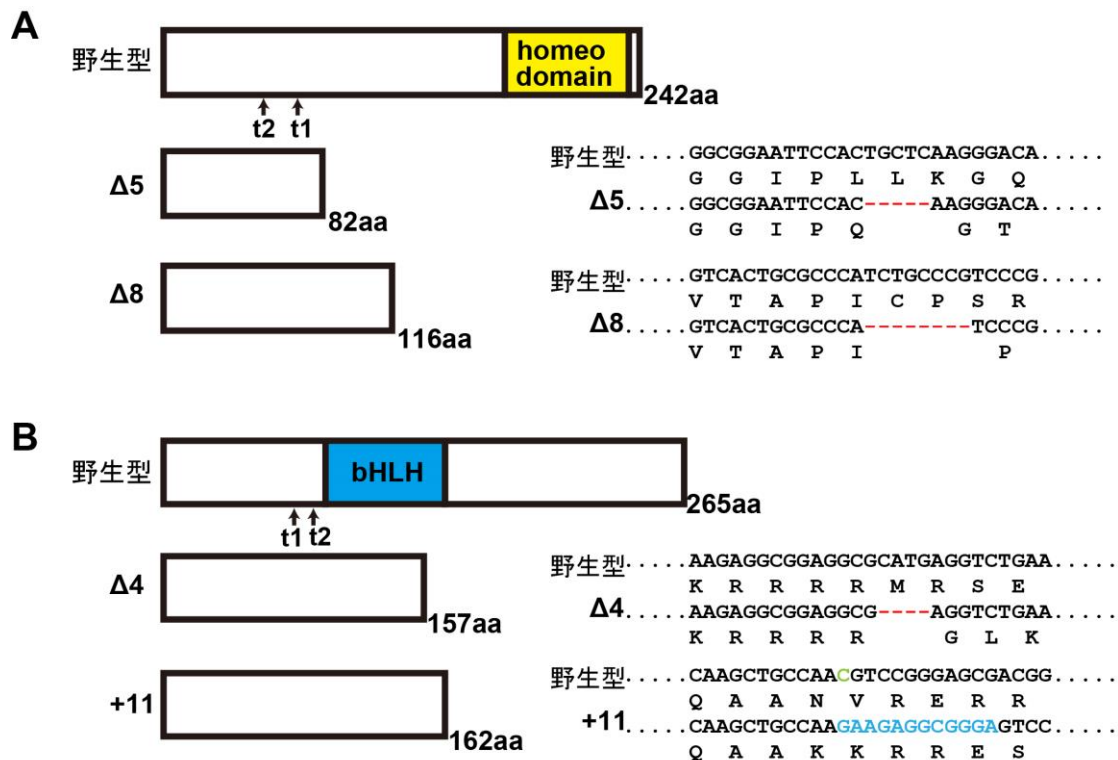


図 6 WT、*gsx2* 変異体、*ptf1a* 変異体における変異箇所およびタンパク質のドメイン

(A) *Gsx2* のドメイン構造と CRISPR/Cas9 法によって作製された変異体 (5bp 欠失、8bp 欠失) における *Gsx2* の構造。*Gsx2* はホメオドメインを有し (黄色)、*gsx2* 変異体では 5 塩基欠失 (赤)、8 塩基欠失 (赤) によってフレームシフトが起き、標的配列のすぐ直後にストップコドンが挿入されている。

(B) *Ptf1a* のドメイン構造と変異体 (4bp 欠失、11bp 挿入) における *Ptf1a* の構造。*Ptf1a* は bHLH ドメインを有し (青)、*ptf1a* 変異体では 4 塩基欠失 (赤)、11 塩基挿入 (1 塩基欠失[緑]、12 塩基挿入[水色]) によってフレームシフトが起き、途中にストップコドンが挿入されている。t1,t2 : target site 1,2。

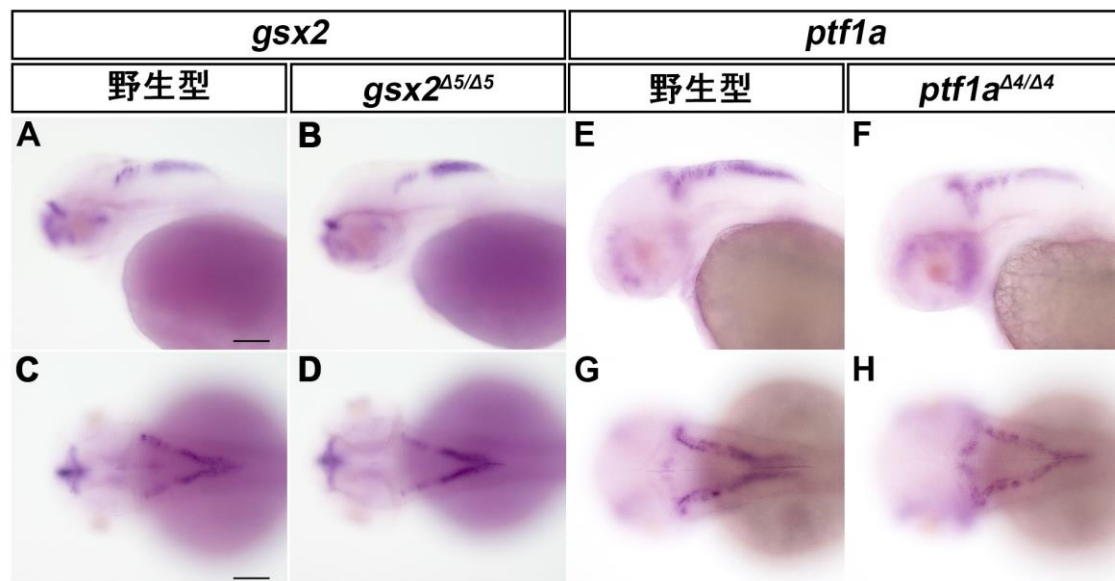


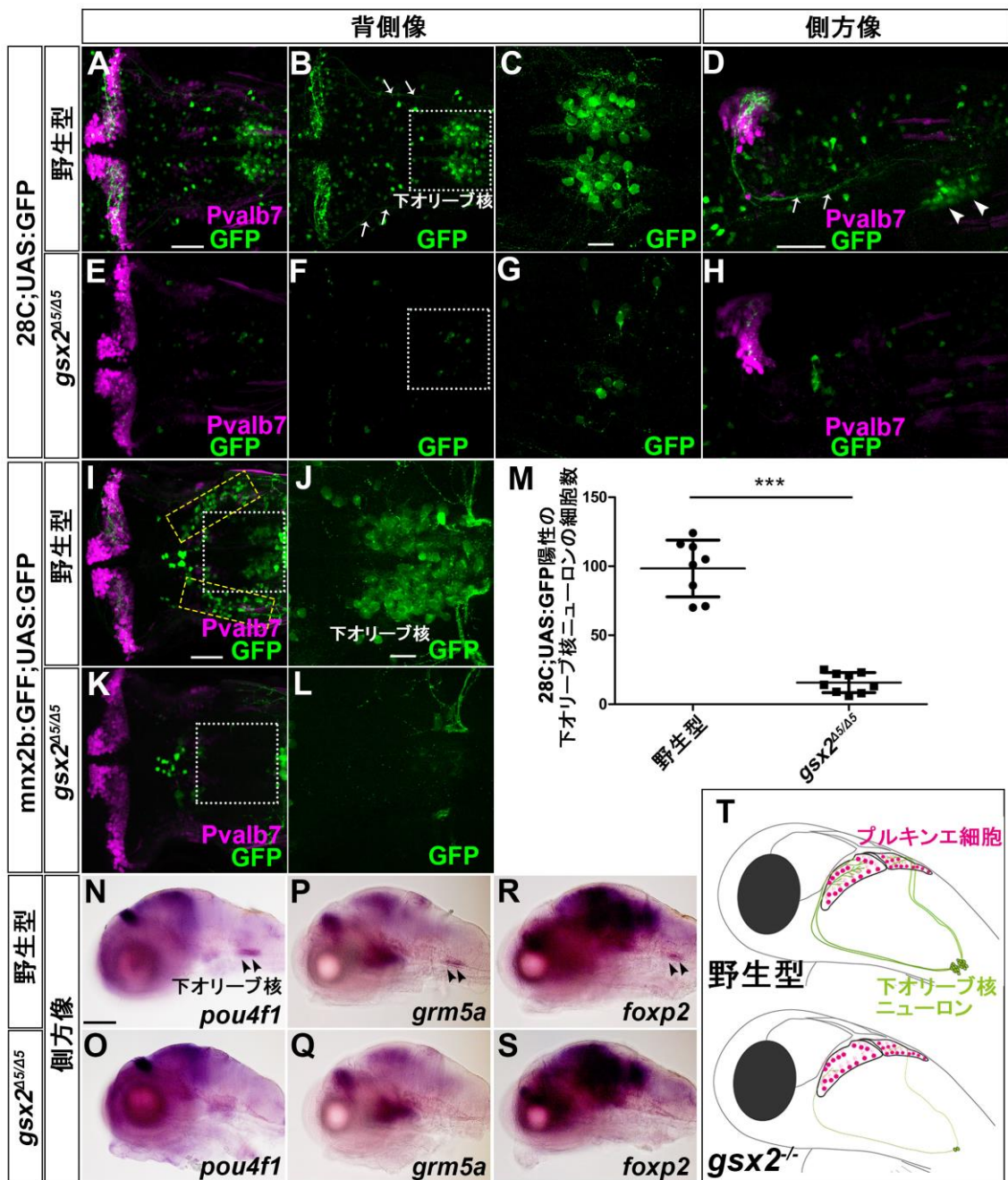
図7 *gsx2* 変異体、*ptf1a* 変異体において *gsx2*、*ptf1a* の発現は変化しない。

(A-D) 受精後2日目における野生型 (A, C,  $n=2$ ) と *gsx2* 変異体 (B, D,  $n=3$ ) での *gsx2* の発現。

(E-H) 受精後2日目における野生型 (E, G,  $n=2$ ) と *ptf1a* 変異体 (F, H,  $n=3$ ) での *ptf1a* の発現。

スケールバー: 100  $\mu\text{m}$  (A, C)。





**図 8** *gsx2* 変異体では下オリブ核ニューロンが著しく減少する。

(A-H) 野生型 (A-D,  $n=10$ ) および *gsx2* <sup>$\Delta 5/\Delta 5$</sup>  (E-H,  $n=10$ ) と hspGFFDMC28C;UAS:GFP (28C;UAS:GFP) を交配した受精後 5 日目の仔魚において抗 Pvalb7 抗体と抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行った結果。

(C,G) B と F の白枠内の拡大図。(I-L) 野生型 (I, J,  $n=6$ ) および *gsx2* <sup>$\Delta 5/\Delta 5$</sup>  (K, L,  $n=7$ ) と *mnx2b*:GFF;UAS:GFP を交配した受精後 5 日目の仔魚において抗 Pvalb7 抗体と抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行った結果。

(J-L) I と K の枠内の拡大図。黄色枠内の GFP 陽性の細胞が *gsx2* <sup>$\Delta 5/\Delta 5$</sup>  では減少または消失している。

(M) 野生型と *gsx2* <sup>$\Delta 5/\Delta 5$</sup>  での 28C;UAS:GFP 陽性の下オリブ核ニューロンの細胞数。野生型に比べ、*gsx2* <sup>$\Delta 5/\Delta 5$</sup>  では下オリブ核ニューロンが有意に減少している。

\*\*\* $P<0.001$  (Student's *t*-test)。

(N-S) 野生型と *gsx2* <sup>$\Delta 5/\Delta 5$</sup>  における内在性の下オリブ核ニューロンマーカーの発現。

(N,O) 野生型 ( $n=4$ ) と *gsx2* <sup>$\Delta 5/\Delta 5$</sup>  ( $n=4$ ) における *pou4f1* の発現。

(P,Q) 野生型 ( $n=3$ ) と *gsx2* <sup>$\Delta 5/\Delta 5$</sup>  ( $n=2$ ) における *grm5a* の発現。

(R,S) 野生型 ( $n=5$ ) と *gsx2* <sup>$\Delta 5/\Delta 5$</sup>  ( $n=5$ ) における *foxp2* の発現。

(T) 野生型と *gsx2* <sup>$\Delta 5/\Delta 5$</sup>  の仔魚におけるプルキンエ細胞と下オリブ核ニューロンの図。

スケールバー: 100  $\mu\text{m}$  (N)、 50  $\mu\text{m}$  (A,D,I)、 20  $\mu\text{m}$  (C,J)。



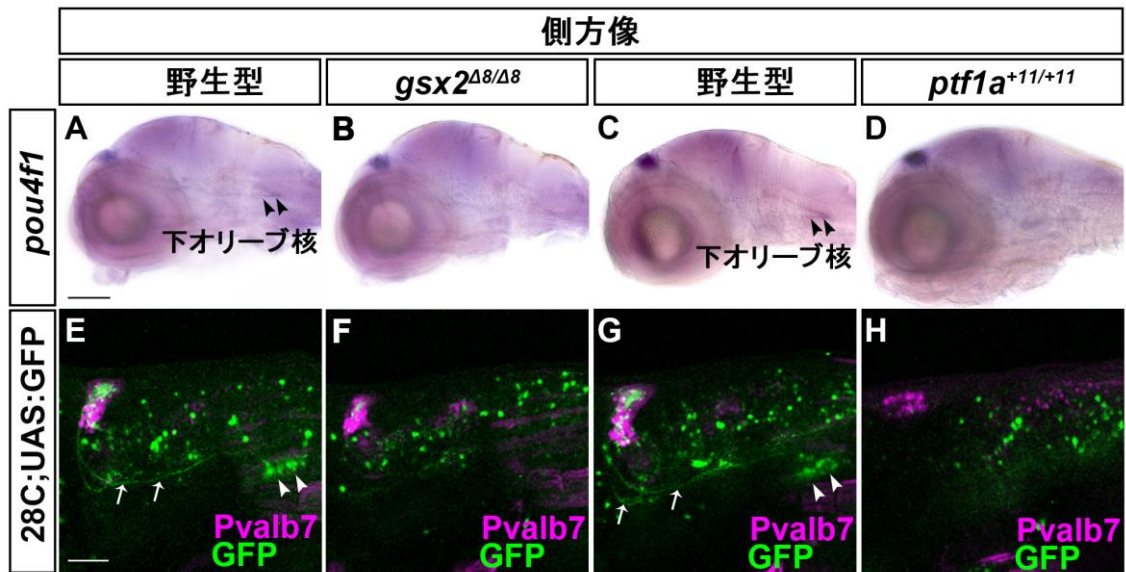


図 9 *gsx2*<sup>Δ8</sup> と *ptf1a*<sup>+11</sup> 変異体において下オリーブ核ニューロンは著しく減少、または消失する。

(A-D) 受精後 5 日目の野生型 (A, C, *n*=3)、*gsx2*<sup>Δ8/Δ8</sup> (B, *n*=3)、*ptf1a*<sup>+11/+11</sup> (D, *n*=3) における下オリーブ核ニューロンマーカー *pou4f1* の発現。

(E-H) 受精後 5 日目の野生型 (E, G, *n*=5)、*gsx2*<sup>Δ8/Δ8</sup> (F, *n*=5)、*ptf1a*<sup>+11/+11</sup> (H, *n*=5) での 28C;UAS:GFP に対して、抗 Pvalb7 抗体と抗 GFP 抗体で免疫染色を行った結果。矢印と矢尻はそれぞれ登上線維と下オリーブ核ニューロンを示している。

スケールバー: 100 μm (A)、50 μm (E)。

### ***ptf1a* 変異体では下オリーブ核ニューロンが消失する**

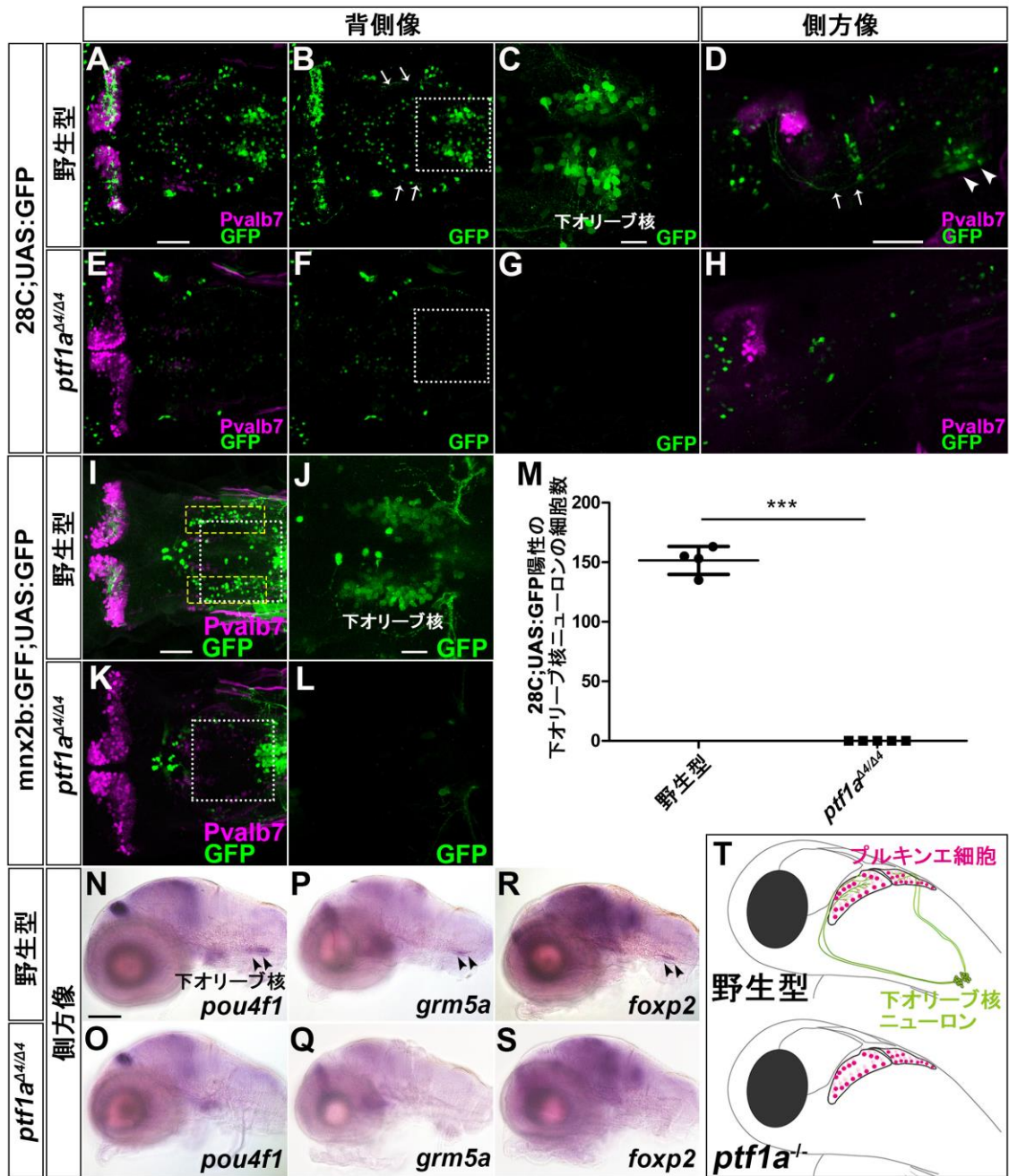
マウス *Ptf1a* 変異体ではプルキンエ細胞と下オリーブ核ニューロンが消失することが報告されている[17]。そこで、ゼブラフィッシュ *ptf1a* 遺伝子も、プルキンエ細胞や下オリーブ核ニューロンの形成に関与しているのか調べるために、*ptf1a* 変異体を CRISPR/Cas9 法を用いて作製した。今回、作製された *ptf1a* の変異体は *ptf1a* の exon1 に 4 塩基の欠失、11 塩基の挿入の変異を有している (図 6B)。これらの変異体では、*ptf1a* mRNA の発現は、減少していなかった(図 7E-H)。しかし、変異が bHLH ドメインより前で生じているため、*ptf1a* の bHLH ドメインは失われており、Ptf1a の機能は完全に消失していると考えられる。

*gsx2* 変異体と同様に、*ptf1a* 変異体での下オリーブ核ニューロンの形態を見るために、28C;UAS:GFP 系統や *mnx2b*:GFF;UAS:GFP 系統と *ptf1a* 変異体を交配し、下オリーブ核ニューロンの形態を観察した。受精後 5 日目の仔魚での免疫染色の結果、*ptf1a* 変異体では、28C;UAS:GFP 陽性、または *mnx2b*:GFF;UAS:GFP 陽性の下オリーブ核ニューロンが完全に消失していた (図 9G,H、図 10E-H,K-M)。また、*ptf1a* 変異体においても、後脳後方の腹側外側に位置する *mnx2b*:GFF;UAS:GFP 陽性の細胞が減少していた (図 10I-L、黄色の点線枠内)。現在のところ、この細胞は、どのような細胞か同定できていないが *ptf1a* 陽性、*gsx2* 陽性の前駆細胞から分化すると考えられる。

さらに、下オリーブ核ニューロンのマーカーである *pou4f1*、*grm5a*、*foxp2* の発現解析を行ったところ、*ptf1a* 変異体では、これらの遺伝子の発現が下オリーブ核ニューロンで消失していた (図 9C,D、図 10N-S)。今回の結果からマウス、ゼブラフィッシュの両種において、*Ptf1a* (*ptf1a*) は下オリーブ核ニューロンの形成に必要な遺伝子であることが明らかとなった。

次に、*ptf1a* 変異体でのプルキンエ細胞の形態について観察を行った。プルキンエ細胞のマーカーとして抗 Pvalb7 抗体を用いて免疫染色を行うと、*ptf1a* 変異体では Pvalb7

陽性であるプルキンエ細胞は減少していることが明らかとなった(図 10E、図 11B,F,M)。  
Pvalb7 はプルキンエ細胞に加えて、crest 細胞のマーカーでもあり、受精後 5 日目でその形態を見ることができる[5]。ptf1a 変異体では Pvalb7 陽性の crest 細胞も減少していることが明らかとなった(図 10E、図 11J,L,N)。これらの結果から、ptf1a 陽性神経前駆細胞からはプルキンエ細胞、crest 細胞、下オリーブ核ニューロンの 3 つニューロンが分化することが明らかとなった。また、ptf1a 変異体ではプルキンエ細胞と crest 細胞は減少していたものの、それらの細胞の多くは形成されていたことから、他のプロニューラル遺伝子が ptf1a の機能を補っている可能性がある。一方、下オリーブ核ニューロンは ptf1a 変異体では完全に消失していたため、下オリーブ核ニューロンの分化には ptf1a 遺伝子が必須であると考えられる (図 10T)。



**図 10 *ptf1a* 変異体では下オリブ核ニューロンが消失する**

(A-H) 野生型 (A-D,  $n=5$ ) および *ptf1a* <sup>$\Delta 4/\Delta 4$</sup>  (E-H,  $n=5$ ) と hspGFFDMC28C;UAS:GFP (28C;UAS:GFP) を交配した受精後 5 日目の仔魚における抗 Pvalb7 抗体 (マゼンタ) と抗 GFP 抗体(緑) を用いて免疫染色を行った結果。

(C,G) B と F の枠内の拡大図。

(I-L) 野生型 (I-J  $n=2$ ) および *ptf1a* <sup>$\Delta 4/\Delta 4$</sup>  (K-L  $n=4$ ) と mnx2b:GFF;UAS:GFP を交配した受精後 5 日目の仔魚において、抗 Pvalb7 抗体 (マゼンタ) と抗 GFP 抗体 (緑) を用いて免疫染色を行った結果。黄色枠内の GFP 陽性の細胞が *ptf1a* <sup>$\Delta 4/\Delta 4$</sup>  では減少または消失している。

(J,L) I と K での枠内の拡大図。(M) 野生型と *ptf1a* <sup>$\Delta 4/\Delta 4$</sup>  での 28C;UAS:GFP 陽性の下オリブ核ニューロンの細胞数。野生型に比べ、*ptf1a* <sup>$\Delta 4/\Delta 4$</sup>  では下オリブ核ニューロンが有意に減少している。\*\*\* $P<0.001$  (Student's *t*-test)。

(N-S) 野生型と *ptf1a* <sup>$\Delta 4/\Delta 4$</sup>  における内在性の下オリブ核ニューロンマーカーの発現。

(N,O) 野生型 ( $n=4$ ) と *ptf1a* <sup>$\Delta 4/\Delta 4$</sup>  ( $n=4$ ) の仔魚における *pou4f1* の発現。

(P,Q) 野生型 ( $n=4$ ) と *ptf1a* <sup>$\Delta 4/\Delta 4$</sup>  ( $n=3$ ) の仔魚における *grm5a* の発現。

(R,S) 野生型 ( $n=5$ ) と *ptf1a* <sup>$\Delta 4/\Delta 4$</sup>  ( $n=5$ ) の仔魚における *foxp2* の発現。

(T) 野生型と *ptf1a* <sup>$\Delta 4/\Delta 4$</sup>  の仔魚におけるプルキンエ細胞と下オリブ核ニューロンの図。

スケールバー: 100  $\mu\text{m}$  (N)、 50  $\mu\text{m}$  (A,D,I)、 20  $\mu\text{m}$  (C,J)。

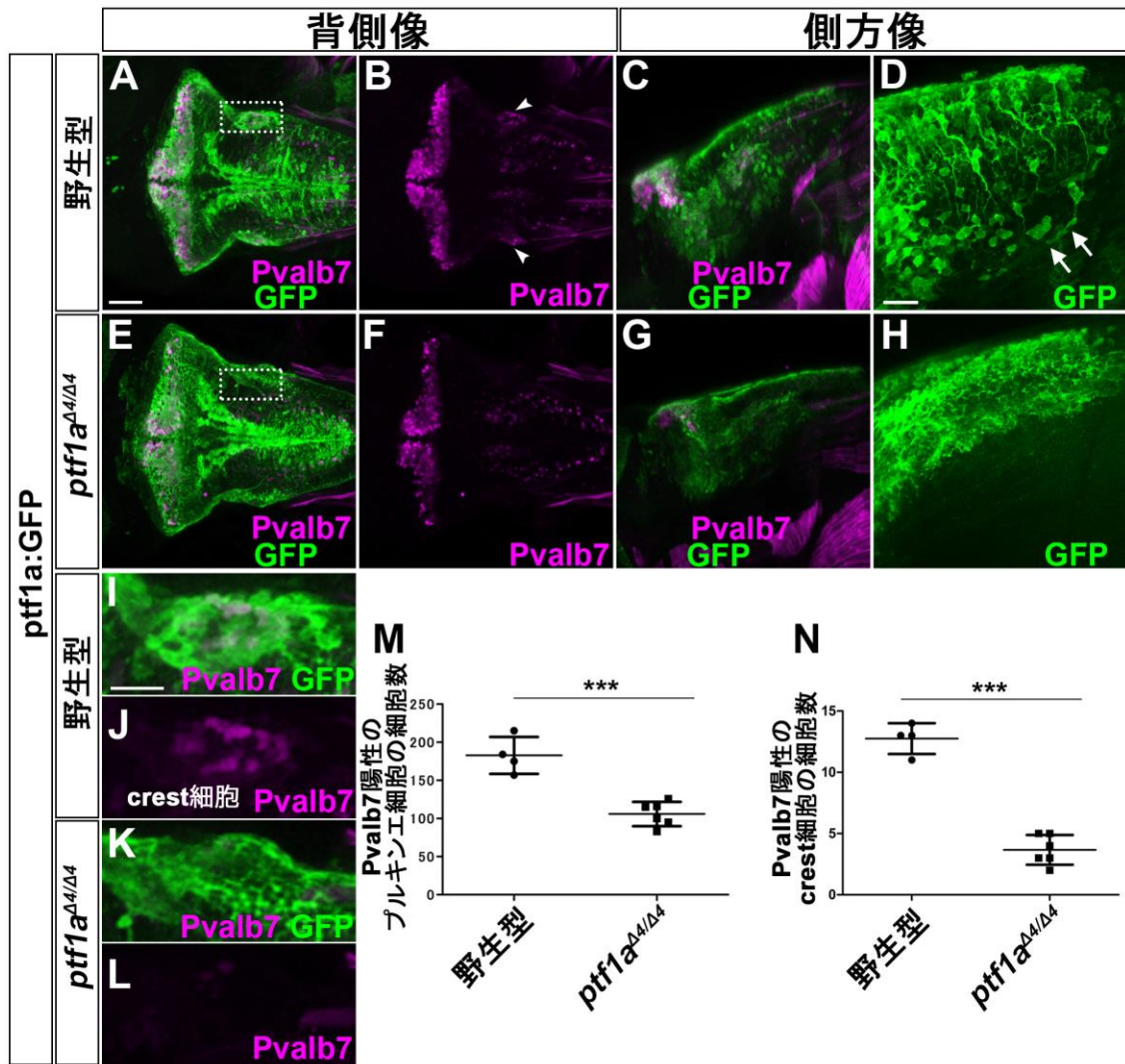


図 11 *ptf1a* 変異体において、プルキンエ細胞と **crest** 細胞は減少する

(A-L) 受精後 5 日目の野生型 (A-D, I-J,  $n=4$ )、 $ptf1a^{\Delta4/\Delta4}$  (E-H, K-L,  $n=6$ ) の *Tg(ptf1a:GFP)*

の仔魚に対して、抗 Pvalb7 抗体 (マゼンタ) や抗 GFP 抗体 (緑) で免疫染色した結果。

(I-L) A と E の枠内の拡大図。矢尻は **crest** 細胞、矢印は *ptf1a* 陽性前駆細胞に由来する移動中の GFP 陽性の細胞を示している。

(M) Pvalb7 陽性のプルキンエ細胞の細胞数。

(N) Pvalb7 陽性の **crest** 細胞の細胞数。

\*\*\* $p < 0.001$  (Student's *t*-test)。スケールバー: 50  $\mu\text{m}$  (A)、20  $\mu\text{m}$  (D, I)。

## Gsx2 と Ptf1a はそれぞれ独立して下オリブ核ニューロンの形成に関与する

これまでの結果から、*ptf1a* と *gsx2* が下オリブ核ニューロンの形成に必要な遺伝子であることが示された。次に下オリブ核ニューロンの形成において、*ptf1a* と *gsx2* がどのように関わっているのか調べた。まず、*Gsx2* が *ptf1a* の発現を制御する、あるいは *Ptf1a* が *gsx2* の発現を制御する可能性が考えられたため、*gsx2* 変異体と *ptf1a* 変異体を用いて発現解析を行った。受精後 2 日目において、*gsx2* 変異体で *ptf1a* の発現を、*ptf1a* 変異体で *gsx2* の発現を調べた。その結果、*gsx2* 変異体および *ptf1a* 変異体において、*ptf1a* と *gsx2* の発現に変化は見られなかった (図 12)。このことは *ptf1a* と *gsx2* が遺伝子カスケードの上下関係になく、協調して下オリブ核ニューロンの形成に関与することを示唆している。

マウスの *Ptf1a* 変異体では、後脳後方領域で細胞死マーカーである cleaved-caspase3 陽性の細胞が増加しており、*Ptf1a* 変異体では細胞死により下オリブ核ニューロンが消失することが報告されている[17]。ゼブラフィッシュにおいても同様のことが起きている可能性を考え、ゼブラフィッシュの *ptf1a* 変異体で、抗 cleaved-caspase3 抗体を用いて、免疫染色を行い、cleaved-caspase3 陽性の細胞数を計測した。その結果、マウスと同様に、ゼブラフィッシュにおいても *ptf1a* 変異体では後脳後方領域において、cleaved-caspase3 陽性の細胞数が増加していることが明らかとなった (図 13A-H,Q)。

同様の解析を *gsx2* 変異体に対して行った。その結果、*gsx2* 変異体においては、cleaved-caspase3 陽性の細胞数に変化は認められなかった (図 13I-P,R)。このことから、*gsx2* 変異体での下オリブ核ニューロンの著しい減少は、細胞死によるものではなく、前駆細胞が未分化な状態あるいは運命転化を起こしたことによるものであると考えられた。そこで、*gsx2* 変異体と *gsx2*:RFP 系統を交配した仔魚を用いて *gsx2* 由来の細胞の細胞系譜を追ったところ、*gsx2*:RFP 陽性の細胞は、背側の前駆細胞領域から腹側へ移動している様子が観察された (図 14H)。今回 *gsx2* 変異体で *gsx2*:RFP 陽性細胞



がどのように変化しているのかは特定できなかったものの、これまでの結果から下オリーブ核ニューロンの形成に *ptf1a* と *gsx2* が異なる役割を果たしており、*gsx2* に関しては下オリーブ核ニューロンの運命決定に関わることが示唆された。

*ptf1a* と *gsx2* が協調して下オリーブ核ニューロンの形成に関与することが示唆されたため、次に *ptf1a* と *gsx2* を共発現させることによって下オリーブ核ニューロン形成を誘導することができるのか調べた。具体的には、ゼブラフィッシュの *ptf1a* 発現領域で *gsx2* を異所的に発現させることで検証した。*gsx2* 異所的発現には、*ptf1a:Gal4-VP16* と *UAS:gsx2* を交配した Tg 系統を用いた (図 15B,C,E,G)。この系統の受精後 3 日目の仔魚では、後脳の吻側 (第 1-6 菱脳節) の *ptf1a* 陽性細胞で *gsx2* の異所的発現が誘導された (図 15B,E)。しかし、受精後 5 日目のこの系統では、異所的に下オリーブ核ニューロンは誘導されなかった (図 15G)。これらの結果から *ptf1a* と *gsx2* だけでは、神経前駆細胞から下オリーブ核ニューロンへ分化させるのに十分でないことが明らかとなった。



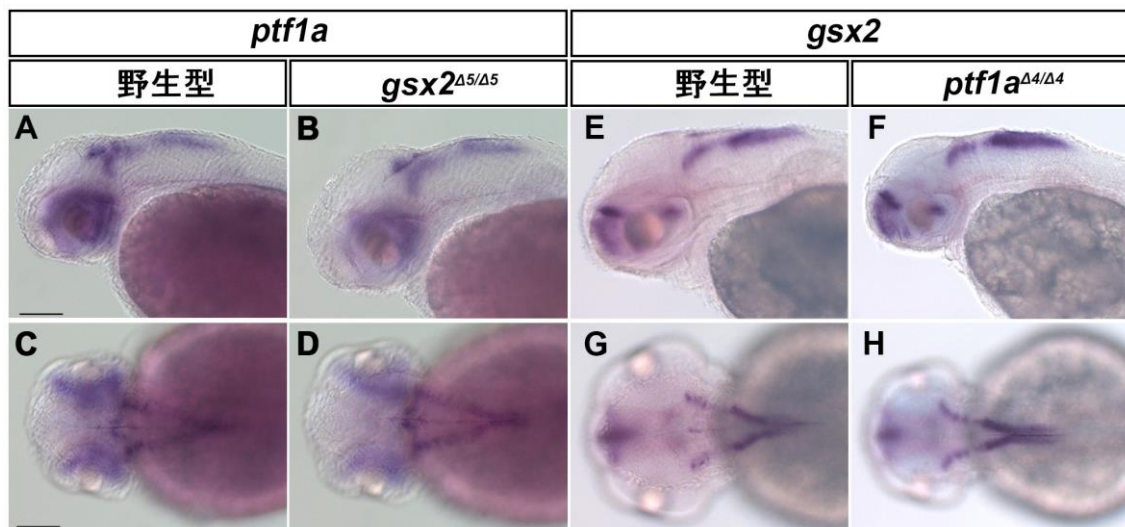
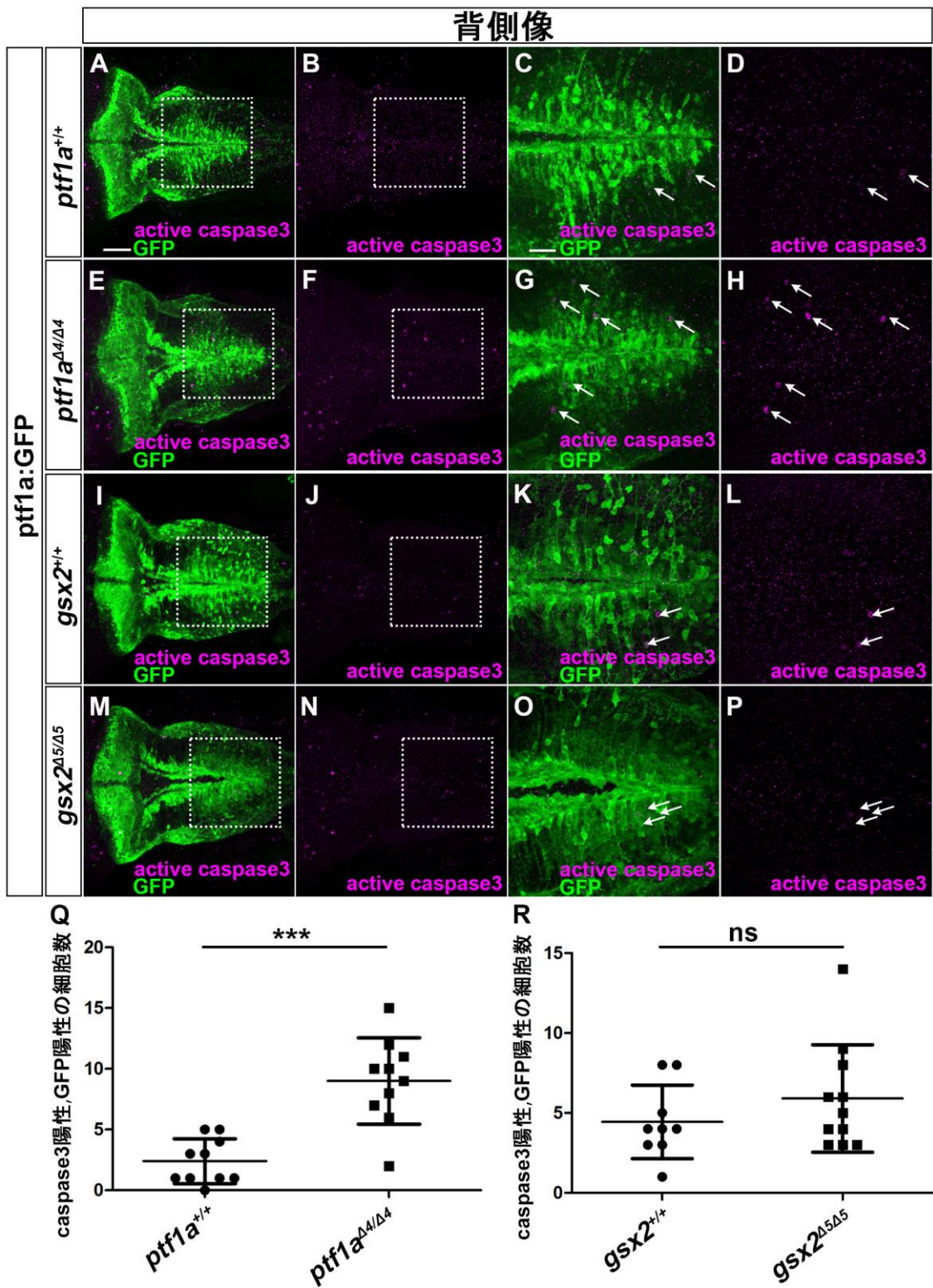


図 12 *gsx2* 変異体と *ptf1a* 変異体において *gsx2* および *ptf1a* の発現には影響を与えない

(A-D) 受精後 2 日目の野生型 (A, C,  $n=2$ ) と *gsx2* 変異体 (B, D,  $n=4$ ) の仔魚での *ptf1a* の発現。

(E-H) 受精後 2 日目の野生型 (E, G,  $n=2$ ) と *ptf1a* 変異体 (F, H,  $n=3$ ) の仔魚での *gsx2* の発現。

スケールバー: 100  $\mu\text{m}$  (A,C)。



**図 13 *ptf1a* 変異体では細胞死を起こすが *gsx2* 変異体では細胞死を起こさない**

(A-P) 受精後 5 日目における *ptf1a*<sup>+/+</sup> (A-D, *n*=10)、*ptf1a*<sup>Δ4/Δ4</sup> (E-H, *n*=10)、*gsx2*<sup>+/+</sup> (I-L, *n*=9)、*gsx2*<sup>Δ5/Δ5</sup> (M-P, *n*=11) と *ptf1a*:GFP を交配させた系統で、抗 GFP 抗体 (緑) と抗 cleaved caspase3 抗体 (マゼンタ) を用いて免疫染色を行った結果。

(C,G,K,O) A,E,I,M での枠内の拡大図。(D,H,L,P) B,F,J,N での枠内の拡大図。矢印は GFP 陽性、cleaved caspase3 陽性の細胞を示している。

(Q,R) 野生型、*ptf1a*<sup>Δ4/Δ4</sup>、*gsx2*<sup>Δ5/Δ5</sup> における後側後脳領域での GFP 陽性、cleaved caspase3 陽性の細胞数。

ns: not significant; \*\*\**P*<0.001 (Student's *t*-test)。

スケールバー: 50μm (A)、20μm (C)。

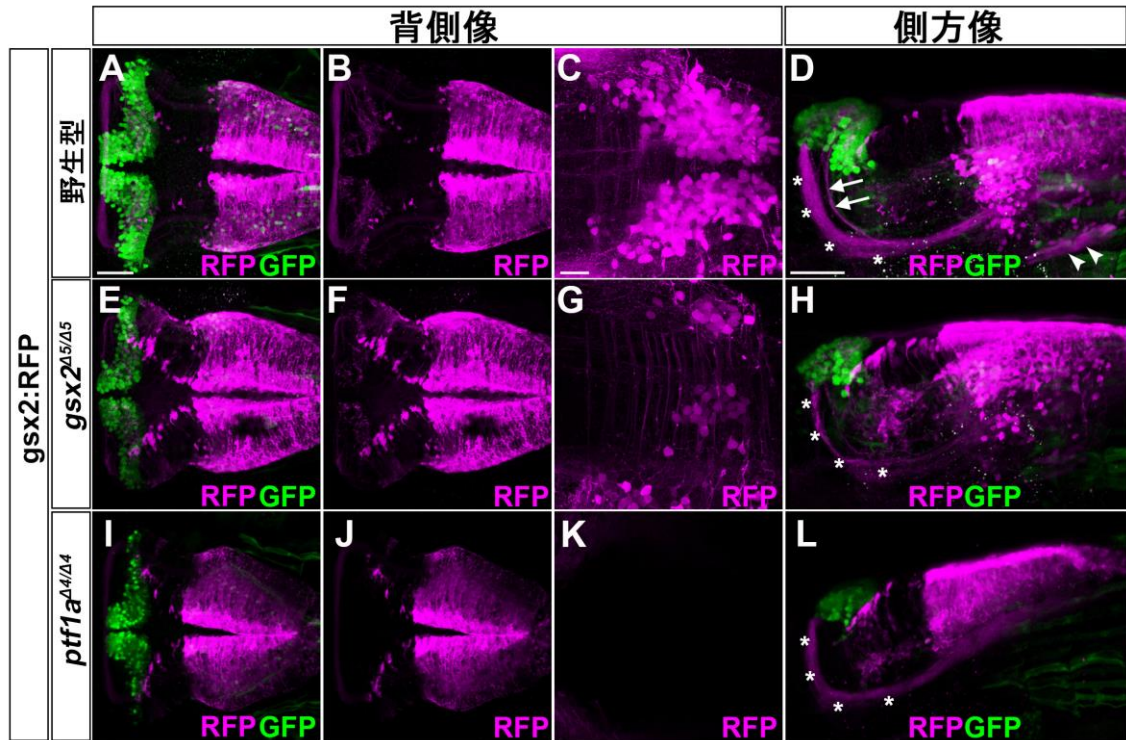


図 14 *gsx2* 変異体における *gsx2* 陽性細胞の細胞系譜の解析結果

(A-L) 受精後 5 日目の仔魚における野生型 (A-D,  $n=13$ )、*gsx2*<sup>Δ5/Δ5</sup> (E-H,  $n=8$ )、*ptf1a*<sup>Δ4/Δ4</sup> (I-L,  $n=3$ ) と *gsx2*:RFP を交配させた系統において抗 Pvalb7 抗体 (緑) および抗 RFP 抗体 (マゼンタ) で免疫染色を行った結果。矢印と矢尻はそれぞれ登上線維と下オリーブ核ニューロンを示している。

(C,G,K) B,F,G の後脳後方背側領域の拡大図。アスタリスク(\*)は *gsx2*:RFP 陽性の Wallenberg 交連核のニューロンから伸びる軸索を示している。

スケールバー: 50  $\mu\text{m}$  (A,D)、20  $\mu\text{m}$  (C)。



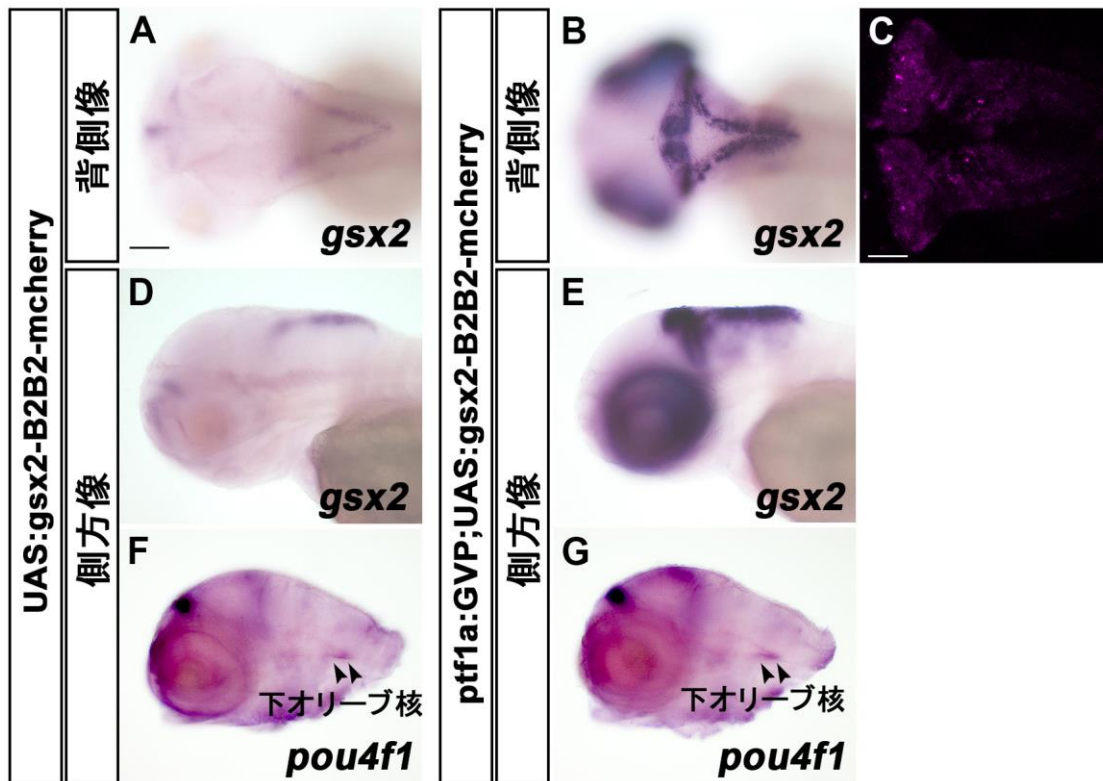


図 15 異所的な *gsx2* の発現は下オリーブ核ニューロンの形成を誘導しない

(A,B,D,E) 受精後 3 日目の *Tg(UAS:gsx2BLRP-P2A-BirA-P2A-mCherry)* (A,D,  $n=5$ ) と *TgBAC(ptf1a:Gal4-VP16);Tg(UAS:gsx2BLRP-P2A-BirA-P2A-mCherry)* (B,E,  $n=5$ ) の仔魚における *gsx2* の発現。*Tg(UAS:gsx2BLRP-P2A-BirA-P2A-mCherry)* の Tg 系統は *gsx2* の open reading frame、ビオチンリガーゼ認識ペプチド、porcine teschovirus-1 の 2A ペプチド、ビオチンリガーゼ、mcherry の遺伝子を持っている。

(C) mCherry の発現が *ptf1a* の領域に誘導されている。

(F,G) 受精後 3 日目の control (F,  $n=3$ ) と *Tg(ptf1a:Gal4-VP16);Tg(UAS:gsx2BLRP-P2A-BirA-P2A-mCherry)* (G,  $n=3$ ) の仔魚における *pou4f1* の発現。*gsx2* は *ptf1a* 発現領域で異所的に発現しているが、*pou4f1* の発現は異所的には見られなかった。

スケールバー: 100  $\mu$ m (A)、50  $\mu$ m (C)。

## 2.2 考察

***gsx2* と *ptf1a* は第 7 菱脳節の下オリーブ核ニューロン前駆細胞で発現している**

第 7 菱脳節の背側領域では *gsx2* と *ptf1a* を共発現している細胞が見られた(図 4)。さらに、single-cell RNA-seq を用いた解析から、*gsx2* と *ptf1a* が後脳の背側の正中線領域において、共発現していることが報告されている[57]。また、Tg 系統 (*gsx2*:RFP と *ptf1a*:GFP) を用いた細胞系譜の解析から、第 7 菱脳節の *gsx2/ptf1a* 陽性細胞からは下オリーブ核ニューロンが形成されることが分かった (図 4)。本研究ではさらに、*Gsx2* や *Ptf1a* の機能を欠損させると下オリーブ核ニューロンの形成不全が起きることが明らかとなった(図 8、9、10)。これらのデータは、第 7 菱脳節の脳室帯領域における *gsx2/ptf1a* 発現細胞が下オリーブ核ニューロンの前駆細胞であることを示している。過去にマウスの Tg 系統を用いた細胞系譜の解析から、下オリーブ核ニューロンは *ptf1a* 陽性神経前駆細胞に由来することが分かっている[17]。また、鳥類を用いた研究から、下オリーブ核ニューロンの前駆細胞は第 6-8 菱脳節に存在することが示唆されている[58-60]。本研究の実験結果から、少なくともゼブラフィッシュにおいては、下オリーブ核ニューロンは第 7 菱脳節の *gsx2/ptf1a* 陽性神経前駆細胞に由来することが示された。

**後脳ニューロンの発生における *Ptf1a* の役割**

マウスやゼブラフィッシュにおいて、*ptf1a* (マウスの場合は *Ptf1a*) は後脳全体の背側領域 (神経前駆細胞) で発現している[8, 9, 16, 17]。ゼブラフィッシュ *ptf1a* 変異体では、プルキンエ細胞や *crest* 細胞が著しく減少し、下オリーブ核ニューロンが消失していた (図 10、11)。マウスの *Ptf1a* 変異体では、プルキンエ細胞 (やその他の小脳の GABA 作動性の介在ニューロン) 、蝸牛神経背側核の抑制性ニューロン、下オリーブ核ニューロンは完全に消失する[9, 16, 17]。表現型には少し違いはあるものの、マウスとゼブラフィッシュの両方の種において、*ptf1a* がプルキンエ細胞や下オリーブ核ニューロンの

形成に関与することが示唆された。さらに、マウスでは蝸牛神経背側核の抑制性ニューロンが *Ptf1a* 陽性細胞から形成されることが報告されているが、ゼブラフィッシュでは *crest* 細胞が *ptf1a* 陽性細胞から形成されることが示唆された (図 16)。

ゼブラフィッシュ *ptf1a* 変異体では、プルキンエ細胞は減少していたものの、完全に消失しておらず、一部は正常に形成されていた。このことは他の遺伝子が *ptf1a* の機能を補っていることを示唆している。マウスでは、*Ptf1a* と同じ bHLH 型のプロニューラル遺伝子の *Neurog1* と *Neurog2* や *Ascl1* が後脳の背側領域で発現している[15, 61-63]。さらにマウスでは、*Neurog2* 変異体はプルキンエ細胞の減少や樹状突起の欠損を示す[13]。また、*Ascl1* の変異により、小脳の GABA 作動性介在ニューロンやオリゴデンドロサイトが減少する[14, 64]。これらの報告は、*Ptf1a* 以外のプロニューラル遺伝子が小脳のプルキンエ細胞の形成に関与する可能性を示唆している。ゼブラフィッシュには *neurog1*、*ascl1a*、*ascl1b* は存在するが、*neurog2* は存在しない (ZFIN, <https://zfin.org>)。そのため、ゼブラフィッシュのプルキンエ細胞の形成には、*ptf1a* の他に *neurog1*、*ascl1a*、*ascl1b* が関与している可能性がある。また、*ptf1a* 変異体において、プルキンエ細胞や *crest* 細胞とは異なり、下オリーブ核ニューロンは完全に欠失していた (図 10)。このことは、マウスとゼブラフィッシュの両種で、*Ptf1a* が下オリーブ核ニューロンの形成に不可欠であることを示している。

プルキンエ細胞に加えて、*ptf1a* の変異体では、内側聴側線系核に存在する *crest* 細胞が減少していた (図 11)。マウスでは蝸牛神経核の抑制性ニューロンが第 2-5 菱脳節の *Ptf1a* 陽性神経前駆細胞に由来することが分かっている[16]。ゼブラフィッシュは蝸牛神経核を持っていないが、蝸牛神経背側核と内側聴側線系核には類似性があり、蝸牛神経核は内耳蝸牛の有毛細胞から、*crest* 細胞は側線および前庭器官の有毛細胞からの入力を受けている[65]。また、蝸牛神経背側核と内側聴側線系核は小脳と同様な神経回路を構築するため、小脳様構造 (cerebellum-like structure) と呼ばれる[66, 67]。今回のデ

ータから、**crest** 細胞 (興奮性のニューロン)と蝸牛神経背側核の抑制ニューロンは、興奮性と抑制性というタイプに違いはあるが、どちらも **ptf1a** 陽性前駆細胞に由来することが示された。このことから、蝸牛神経背側核と内側聴側線系核は共通起源をもち、進化の過程で、哺乳類では蝸牛神経背側核を、真骨魚類では内側聴側線系核を分化させた可能性も考えられる。

### 下オリーブ核ニューロンの形成における **Gsx2** の役割

**gsx2** 変異体は下オリーブ核ニューロンの著しい減少を示したことから (図 8)、**Gsx2** は下オリーブ核ニューロンの形成に必要であることが示された。過去にマウスを用いた研究から、**Gsx2** は腹側終脳、後脳、脊髄の脳室帯で発現している。さらに **Gsx2** は終脳の線条体ニューロン、嗅球介在ニューロンや脊髄の背側の介在ニューロンの形成に必要であることが分かっている[27, 30, 32]。以上のことを踏まえると、**Gsx2 (gsx2)**は、異なる脳領域で発現しているが、前駆細胞からニューロンの運命決定という共通の役割を担っていると考えられる。

**gsx2** 変異体では、わずかに下オリーブ核ニューロンが形成されていた (図 8)。このことは **gsx2** の機能を補っている遺伝子が存在していることを示唆している。その遺伝子の候補として **gsx1** が挙げられる。**gsx1** は **gsx2** と同様にホメオボックスを持つ遺伝子であり、ゼブラフィッシュにおいては後脳領域や脊髄に発現していることが知られている[23]。マウスでは、**Gsx1** と **Gsx2** は LGE のパターンニングや脊髄の背側の介在ニューロンの運命決定に冗長的に機能することが分かっている[28, 34]。ゼブラフィッシュでは脊髄において **gsx1** と **gsx2** の発現領域は異なっていることが報告されている[29]。しかし、後脳領域において **gsx1** がどの領域で発現しているのかは詳細に分かっていないが、後脳領域で **gsx1** と **gsx2** が共発現しており、下オリーブ核ニューロンの形成に協調的に働いている可能性が考えられる。以前行われたマウスの研究から、**Gsx2** の変



異体において下オリブ核ニューロンが形成されていることが示されていた。しかし、下オリブ核ニューロンの細胞数に変化があるかどうかという、明確な報告はされていない[32]。このことから、マウス **Gsx2** はゼブラフィッシュの **gsx2** ほど、下オリブ核ニューロン形成に強く関与していない可能性が考えられる。マウスの **LGE** の発生段階において、**Gsx2** が欠損すると **Gsx1** の発現領域が拡大することが報告されている[68]。今回、ゼブラフィッシュ **gsx2** 変異体では下オリブ核ニューロンが著しく減少していたことから、ゼブラフィッシュでは **gsx1** が **gsx2** の機能を補っていたとしても、わずかなと考えられる。今後、**gsx1** の発現領域の詳細に調べることに加え、**gsx1** 変異体を作製し解析することでこの問題を明らかにすることができるかもしれない。

#### 下オリブ核ニューロン発生における **Ptf1a** と **Gsx2** の役割は異なっている

**gsx2** と **ptf1a** を用いた発現解析から、発生の初期段階において、後脳後方領域における **ptf1a** や **gsx2** の発現は互いに依存していないことが明らかとなった (図 12)。また、**ptf1a** 変異体は、後脳後方領域において、アポトーシスを引き起こす細胞が上昇していたが、**gsx2** 変異体ではコントロールと比べ、変化は見られなかった (図 13)。このことは下オリブ核ニューロンの発生において **ptf1a** と **gsx2** は異なる役割を担っていることを示唆している。ゼブラフィッシュの **ptf1a** 変異体では、マウスの **Ptf1a** 変異体と同様に、アポトーシスを起こす細胞が増加していた[17]。この結果から、**ptf1a** 変異体では、下オリブ核ニューロンの前駆細胞集団は分化できなくなり、アポトーシスを起こすことで消失していると考えられる。しかし、マウスの **Ptf1a** 変異体では、**Ptf1a** 陽性前駆細胞に由来するいくつかの細胞は細胞死を起こさず、苔状線維を伸ばす小脳前ニューロンに運命転化していることが分かっている[17]。今回、ゼブラフィッシュの **ptf1a** 変異体では、後脳後方の背側領域に存在する **gsx2:RFP** 陽性あるいは **ptf1a:GFP** 陽性細胞が、苔状線維を伸ばすニューロンに運命転化している様子は確認できなかった (図 11、

14)。このことから、ゼブラフィッシュの *ptf1a* 変異体において、仮に下オリーブ核ニューロン前駆細胞が運命転化を起こしていたとしても、わずかであると予想される。

*gsx2* 陽性細胞は後脳後方の背側から腹側に移動し、登上線維とは異なる線維を小脳領域に伸ばしていた (図 14)。これらの細胞は Wallenberg 交連核のニューロンであると考えられる。*gsx2* 変異体ではこれらのニューロンの神経線維が減少していた (図 14)。また、*ptf1a* と *gsx2* 変異体の両方で、下オリーブ核ニューロンより外側に存在する、*mnx2b*:GFF;*UAS*:GFP 陽性のニューロンが減少していた (図 8、10)。これらのデータは、Wallenberg 交連核のニューロンや *mnx2b*:GFF;*UAS*:GFP 陽性のニューロンの発生も *gsx2* に依存していることを示唆している。

また今回の研究から、異なる機能を持った *ptf1a* と *gsx2* が協調的に働き、下オリーブ核ニューロンの形成に関与することが明らかとなった。マウスにおいて、プロニューラル遺伝子の *Ascl1* と *Gsx1/2* が背側グルタミン酸作動性の感覚ニューロンの運命決定に関与していることが明らかとなっている[28]。これらを考え合わせると、プロニューラル遺伝子と *gsx* ファミリーの遺伝子が協調的に働くことは、前駆細胞からニューロンが分化、運命決定をコントロールする際の 1 つの共通のメカニズムなのかもしれない。

*gsx2* の異所的な発現の実験結果から、下オリーブ核ニューロンの形成を誘導するのに *ptf1a* と *gsx2* だけでは十分でないことが明らかとなった (図 15)。そのため、他の因子が *Ptf1a* と *Gsx2* と一緒に働く可能性が考えられる。その候補の 1 つとして、bHLH 型の転写因子である *Olig3* が考えられる。この *Olig3* はマウスにおいて、下オリーブ核ニューロンの形成に *Ptf1a* と協調して働くことが報告されている[69]。今後の研究で下オリーブ核ニューロンの分化の遺伝子的プログラムを開始するのに必要な因子の存在が明らかになるかもしれない。

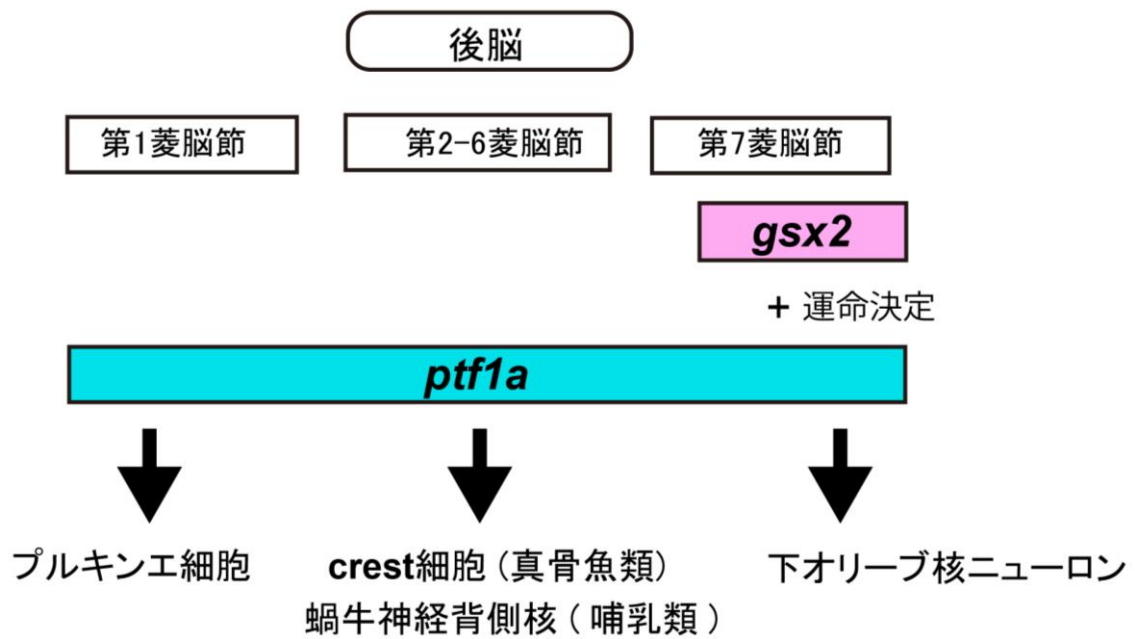


図 16 後脳における **ptf1a** 陽性神経前駆細胞からニューロンへの分化

### 第3章 後脳における *gsx2* の発現メカニズム

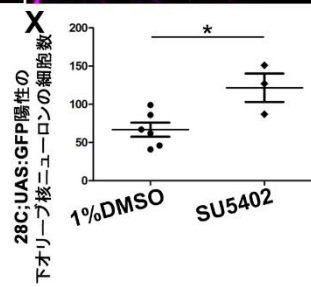
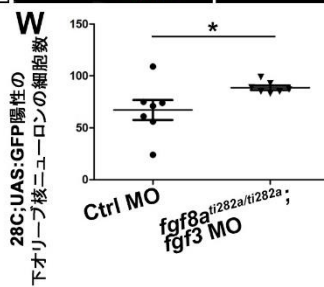
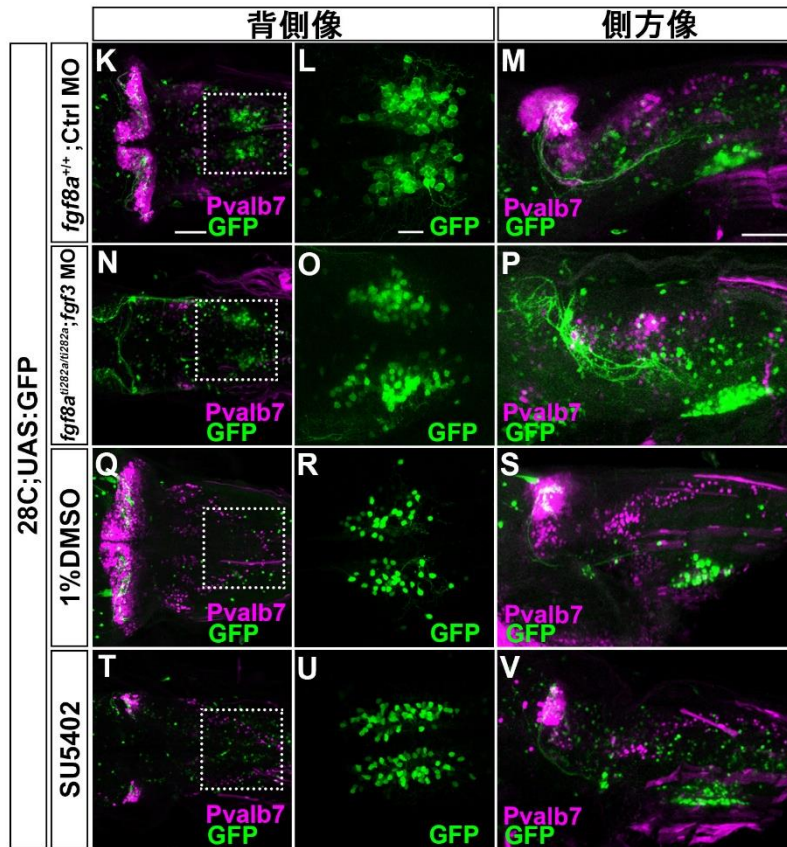
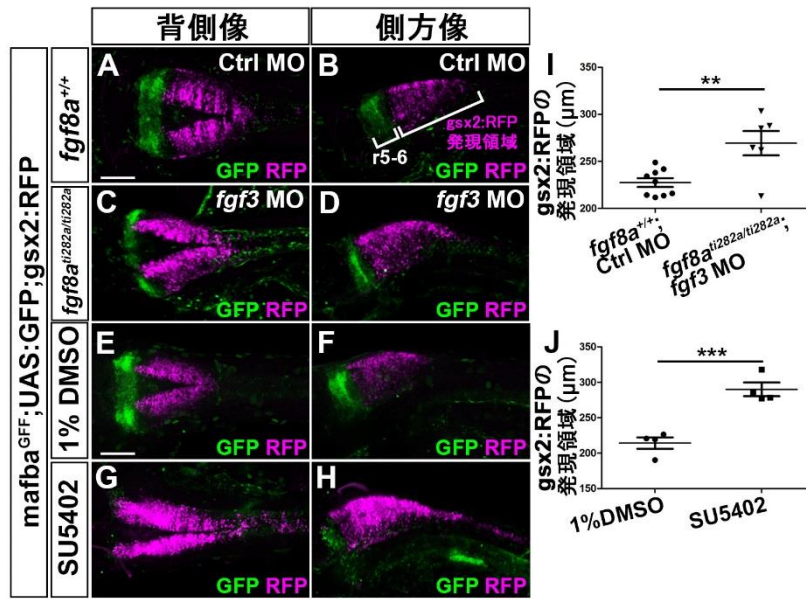
第2章で述べたように、*gsx2* が第7菱脳節で発現し、下オリーブ核ニューロンの運命決定に関与することが明らかとなった (図16)。しかし、第7菱脳節における *gsx2* の発現メカニズムに関しては不明である。*gsx2* は第7菱脳節とその後方で特異的に発現していたことから、前後軸にしたがった位置情報によるシグナルが *gsx2* の発現に関与している可能性が考えられる。

第1章で述べたように、後脳領域の中でも、後脳後方 (第4-7菱脳節) のパターン形成には位置特異的なシグナル伝達として *Fgf3/8a* やレチノイン酸シグナルが関与している[18-22] (図3)。ゼブラフィッシュの初期神経形成段階においては、初めに第4菱脳節で *fgf3/8a* が発現し、第5-6菱脳節の形成に関わる。また、形成中の体節では *aldh1a2* が発現し、第5-7菱脳節や吻側の脊髄の形成に関与する[23-26]。*Fgf3/8a* は第4菱脳節から尾側へ濃度勾配を形成し、*RA* は後脳尾側から吻側への濃度勾配を形成する。この濃度勾配に応じて、下流での遺伝子の発現が調整される。そこで、これらのシグナルが *gsx2* 発現メカニズムに関与している可能性を考え、これらのシグナルの阻害実験を行い、発現メカニズムの解明を試みた。

### 3.1 結果

#### Fgf シグナルによって *gsx2* の発現は負に制御される

Fgf や RA シグナルを阻害するために、変異体や化学阻害剤、アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド (MO) を用い、解析を行った。まず、Fgf3/8a シグナルと *gsx2* の発現との関係性、下オリーブ核ニューロン形成との関与について解析した。Fgf3/8a シグナルを阻害するために、*fgf8a* 変異体と *fgf3* MO を用い、*gsx2*:RFP 系統の発現や 28C;UAS:GFP 陽性の下オリーブ核ニューロンの形態を解析した。今回用いた *fgf3* MO は、すでにその効果については報告されており、*fgf3* 変異体と同じ表現型を示す[49]。*fgf8a* 変異体と *fgf3* MO で Fgf3/8a シグナルを阻害した仔魚では、コントロールに比べ、*gsx2*:RFP の発現領域が拡大し、下オリーブ核ニューロンの細胞数も増加した(図 17A-D,I,K-P,W)。次に、化学阻害剤である SU5402 ( Fgf 受容体のチロシンキナーゼの働きを阻害する) [70]を用いて Fgf シグナルを阻害した。この場合でも、Fgf シグナルを阻害した仔魚では *gsx2*:RFP の発現領域が拡大し、下オリーブ核ニューロンの細胞数も増加していた (図 17E-H,J,Q-V,X)。また、*gsx2*:RFP の後脳での発現領域の変化と下オリーブ核ニューロンの細胞数との関係性について調べた。その結果 SU5402 の濃度を高くし、Fgf シグナルの抑制を強くするほど、*gsx2*:RFP の発現領域は拡大し、下オリーブ核ニューロンの細胞数は増加した (図 18A,B)。この結果は、*gsx2*:RFP の発現領域の変化と下オリーブ核ニューロンの細胞数の変化には相関関係があることを示唆している。以上の結果から Fgf シグナルは、*gsx2* の発現を負に制御することで下オリーブ核ニューロンの形成に関与していると考えられる。



**図 17 Fgf シグナルは *gsx2* の発現や下オリーブ核ニューロンの形成を抑制する**

(A-D) control ( *fgf8a*<sup>+/+</sup> ) と *fgf8a*<sup>ti282a/ti282a</sup> *mafba*<sup>GFF</sup>; UAS:GFP;*gsx2*:RFP に対して、control (Ctrl) MO や *fgf3* MO をインジェクションした受精後 3 日目の仔魚において、抗 RFP 抗体 (マゼンタ) と抗 GFP 抗体 (緑) を用いて免疫染色を行った結果。

(E-H) *mafba*<sup>GFF</sup>;UAS:GFP;*gsx2*:RFP に対して、1%DMSO (E,F, *n*=4) と 200μM SU5402 (G,H, *n*=4)を受精後 6-22 時間処理した、3 日目の仔魚における免疫染色結果。

(I,J) *fgf8a*<sup>+/+</sup>; Ctrl MO (*n*=9) と *fgf8a*<sup>ti282a/ti282a</sup>; *fgf3* MO (*n*=6) の仔魚 (I)、*fgf8a*<sup>+/+</sup>や *fgf8a*<sup>ti282a/ti282a</sup> に対して 1%DMSO (*n*=4) または 200 μM SU5402 (*n*=4)を処理した仔魚での *gsx2*:RFP 陽性の後脳領域の長さ。

(K-P) control ( *fgf8a*<sup>+/+</sup> ) と *fgf8a*<sup>ti282a/ti282a</sup> 28C;UAS:GFP に対して、control (Ctrl) MO や *fgf3* MO をインジェクションした受精後 5 日目の仔魚において、抗 GFP 抗体 (緑) と抗 Pvalb7 抗体 (マゼンタ) を用いて免疫染色を行った結果。

(Q-V) 28C;UAS:GFP に対して、1%DMSO (Q-S, *n*=6) と 200 μM SU5402 (T-V, *n*=3) を受精後 6-22 時間処理した、5 日目の仔魚において抗 GFP 抗体(緑)と抗 Pvalb7 抗体 (マゼンタ) を用いて免疫染色を行った結果。

(L,O,R,U) K,N,Q,T の枠内の拡大図。(W) *fgf8a*<sup>+/+</sup>;Ctrl MO (*n*=6) と *fgf8a*<sup>ti282a/ti282a</sup>; *fgf3* MO (*n*=5)の仔魚での 28C;UAS:GFP 陽性の下オリーブ核ニューロンの細胞数。

(X) *fgf8a*<sup>+/+</sup>や *fgf8a*<sup>ti282a/ti282a</sup> に対して 1%DMSO (*n*=4) または 200 μM SU5402 (*n*=4)を処理した仔魚での 28C;UAS:GFP 陽性の下オリーブ核ニューロンの細胞数。

r5-6: 第 5-6 菱脳節。

\**P*<0.05; \*\**P*<0.01; \*\*\**P*<0.001 (Student's *t*-test, Welch's *t*-test)。

スケールバー: 100 μm (A,E)、50 μm (K,M)、20 μm (L)。

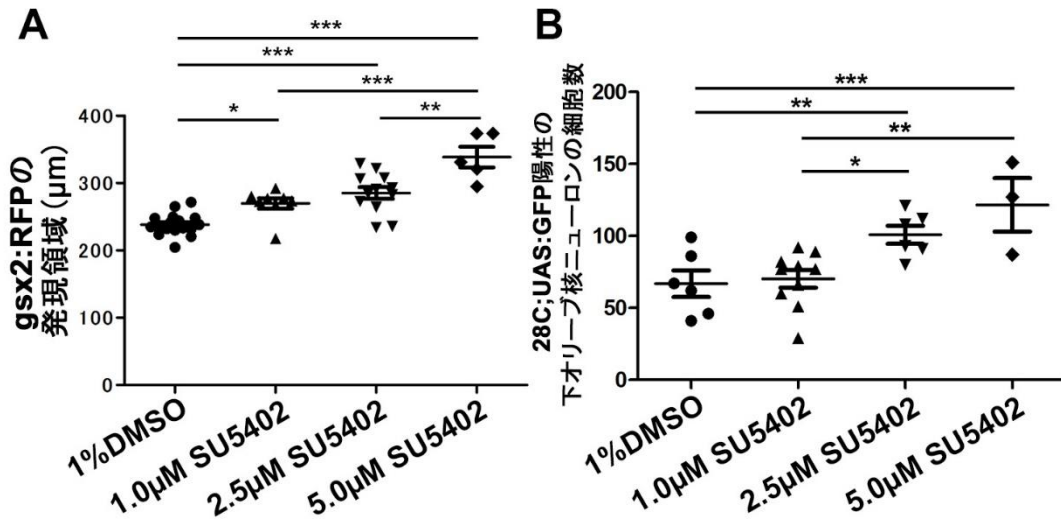


図 18 Fgf シグナルの阻害が強いほど、gsx2:RFP の発現領域が拡大し、下オリーブ核ニューロンの細胞数は増加する

(A) 1% DMSO、1.0、2.5、5.0 μM SU5402 で処理した受精後 3 日目の仔魚における gsx2:RFP 陽性の後脳領域の長さ。

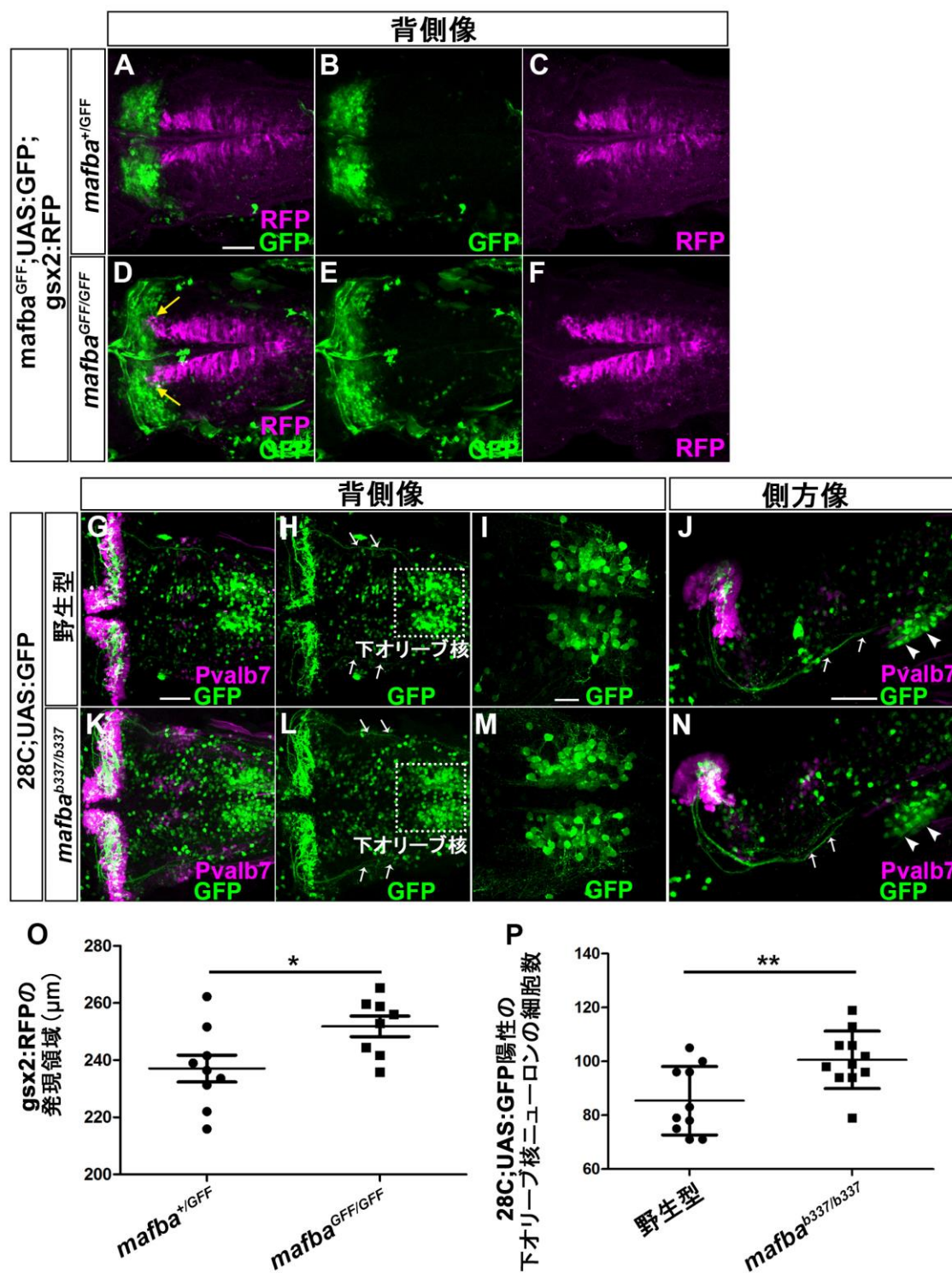
(B) 1% DMSO、1.0、2.5、5.0 μM SU5402 で処理した受精後 5 日目の仔魚における 28C;UAS:GFP 陽性の下オリーブ核ニューロンの細胞数。

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  (One way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test)。



### **Mafba** によって **gsx2** の発現は負に制御される

**mafba**<sup>GFF</sup>;UAS:GFP の GFP の発現 (第 5-6 菱脳節) は Fgf シグナルを抑制した時に縮小していた(図 17G,H)。このことから、Fgf シグナルから **Mafba** を介して **gsx2** の発現や下オリーブ核ニューロンの形成を制御している可能性を考えられた。そこで、**gsx2** の発現と下オリーブ核ニューロンの形成における **Mafba** の役割を明らかにするために、**mafba** 変異体 (**mafba**<sup>GFF</sup> や **mafba**<sup>b337</sup>)を用いて解析した (図 19)。その結果、**mafba**<sup>GFF/GFF</sup> 変異体では、吻側方向 (第 6 菱脳節方向)に **gsx2** の発現がわずかに拡大していた (図 19D-F,O)。また、28C;UAS:GFP 陽性の下オリーブ核ニューロンの細胞数も **mafba**<sup>b337/b337</sup> の仔魚ではわずかに増加していた (図 19K-N,P)。これらの結果は **mafba** が吻側方向への **gsx2** の発現を負に制御し、下オリーブ核ニューロン形成に関与することを示唆している。



**図 19 Mafba は *gsx2* の発現と下オリーブ核ニューロンの形成を制御している**

(A-F) 受精後 3 日目の *mafba*<sup>+/GFF</sup>;UAS:GFP;*gsx2*:RFP (A-C, *n*=9) または *mafba*<sup>GFF/GFF</sup>;UAS:GFP;*gsx2*:RFP (D-F, *n*=8) の仔魚において、抗 RFP 抗体 (マゼンタ) と抗 GFP 抗体 (緑) で免疫染色した結果。黄色の矢印は第 5-6 菱脳節側に伸長している *gsx2*:RFP の発現を示している。

(G-N) 受精後 5 日目の *mafba*<sup>+/+</sup>; 28C;UAS:GFP (G-J, *n*=10) と *mafba*<sup>b337/b337</sup>;28C;UAS:GFP (K-N, *n*=11)において、抗 Pvalb7 抗体 (マゼンタ) と抗 GFP 抗体 (緑) で免疫染色を行った結果。矢印と矢尻はそれぞれ、登上線維と下オリーブ核ニューロンを示している。

(O) *mafba*<sup>+/GFF</sup> と *mafba*<sup>GFF/GFF</sup> における *gsx2*:RFP 陽性の後脳領域の長さ。

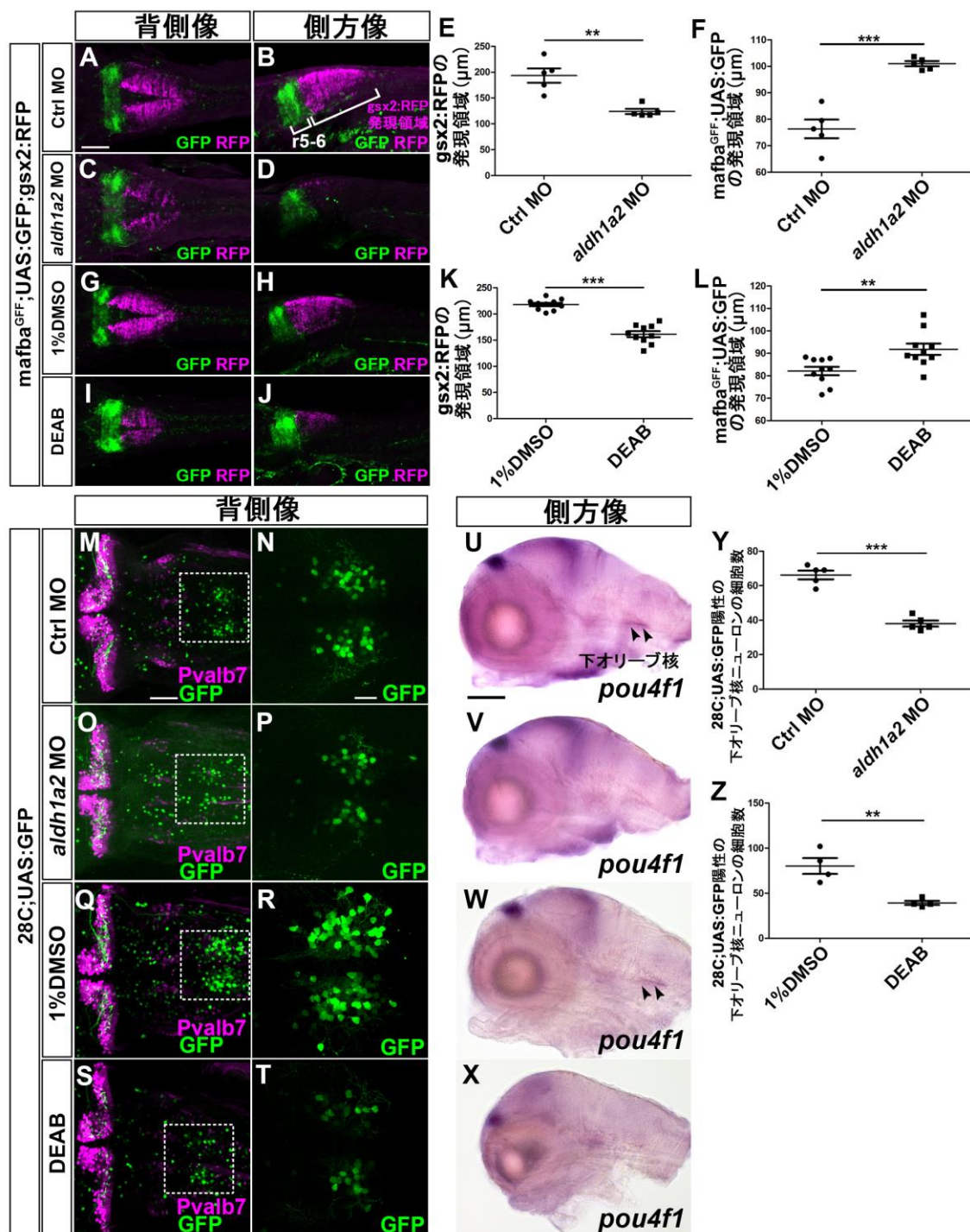
(P) 野生型と *mafba*<sup>b337/b337</sup> 変異体における 28C;UAS:GFP 陽性の 下オリーブ核ニューロンの細胞数。

\**P*<0.05; \*\**P*<0.01 (Student's *t*-test)。

スケールバー: 50 μm (A, G, J)、20 μm (I)。

### ***gsx2* の発現は RA シグナルにより正に制御される**

続いて、RA シグナルと *gsx2* の発現との関係性、下オリーブ核ニューロン形成への関与について解析した。RA シグナルを阻害するために、*aldh1a2* MO (*aldh1a2* は RA 産生に関与する酵素をコードする遺伝子) や *Aldh1a2* の阻害剤である diethylaminobezaldehyde (DEAB) [71]を用いた。今回用いた *aldh1a2* MO に関しても、*aldh1a2* の変異体と同様の表現型を示すことがすでに明らかとなっている[23]。RA シグナルの阻害実験の結果、*gsx2*:RFP の発現領域が減少していた。一方で *mafba*<sup>GFF</sup>;UAS:GFP の発現領域 (第 5-6 菱脳節、図 20A-L) は増加していた。同様に、*28C*;UAS:GFP 陽性の下オリーブ核ニューロンの細胞数 (図 20M-T,Y,Z) や下オリーブ核ニューロンのマーカーである *pou4f1* の発現も減少していた (図 20U-X)。これらの結果は RA シグナルが *gsx2* の発現を正に制御し、下オリーブ核ニューロンの形成に関与していることを示している。



**図 20 RA シグナルは *gsx2* の発現と下オリーブ核の形成を正に制御する**

(A-D) control(Ctrl) MO (A, B,  $n=5$ ) または *aldh1a2* MO (C, D,  $n=5$ ) をインジェクションした、受精後 3 日目での *mafba*<sup>GFF</sup>;*UAS*;*GFP*;*gsx2*:RFP に対して抗 RFP 抗体 (マゼンタ)、抗 GFP 抗体 (緑) で免疫染色した結果。

(E,F) control と *aldh1a2* morphant での後脳における *gsx2*:RFP と *mafba*<sup>GFF</sup>;*UAS*;*GFP* の発現領域の長さ。

(G-J) *mafba*<sup>GFF</sup>;*UAS*;*GFP*;*gsx2*:RFP に対して、1%DMSO (G,H  $n=10$ ) と DEAB (I,J  $n=4$ ) を受精後 6-22 時間処理した、3 日目の仔魚において免疫染色を行った結果。(K,L) 1%DMSO (Q, R,  $n=4$ ) または DEAB (S, T,  $n=4$ ) を処理した仔魚での *gsx2*:RFP 陽性の後脳領域の長さ。

(M-T) 28C;*UAS*;*GFP* に対して、control MO、*aldh1a2* MO をインジェクションあるいは、DMSO、DEAB で処理した仔魚において、抗 Pvalb7 抗体 (マゼンタ)、抗 GFP 抗体 (緑) で免疫染色した結果。

(N,P,R,T) M,O,Q,S の枠内の拡大図。(U-X) 受精後 5 日目の control morphant ( $n=5$ ) と *aldh1a2* morphant ( $n=5$ )、DMSO ( $n=3$ ) と DEAB ( $n=3$ ) で処理した仔魚での *pou4f1* の発現。

(Y) control morphant と *aldh1a2* morphant での 28C;*UAS*;*GFP* 陽性の下オリーブ核ニューロンの細胞数。

(Z) DMSO あるいは DEAB で処理した受精後 5 日目の仔魚の 28C;*UAS*;*GFP* 陽性の下オリーブ核ニューロンの細胞数。

**\*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$  (Student's *t*-test)。**

スケールバー: 100  $\mu\text{m}$  (A, U)、50  $\mu\text{m}$  (M)、20  $\mu\text{m}$  (N)。

## RA シグナル-Hox のカスケードにより *gsx2* の発現が正に制御される

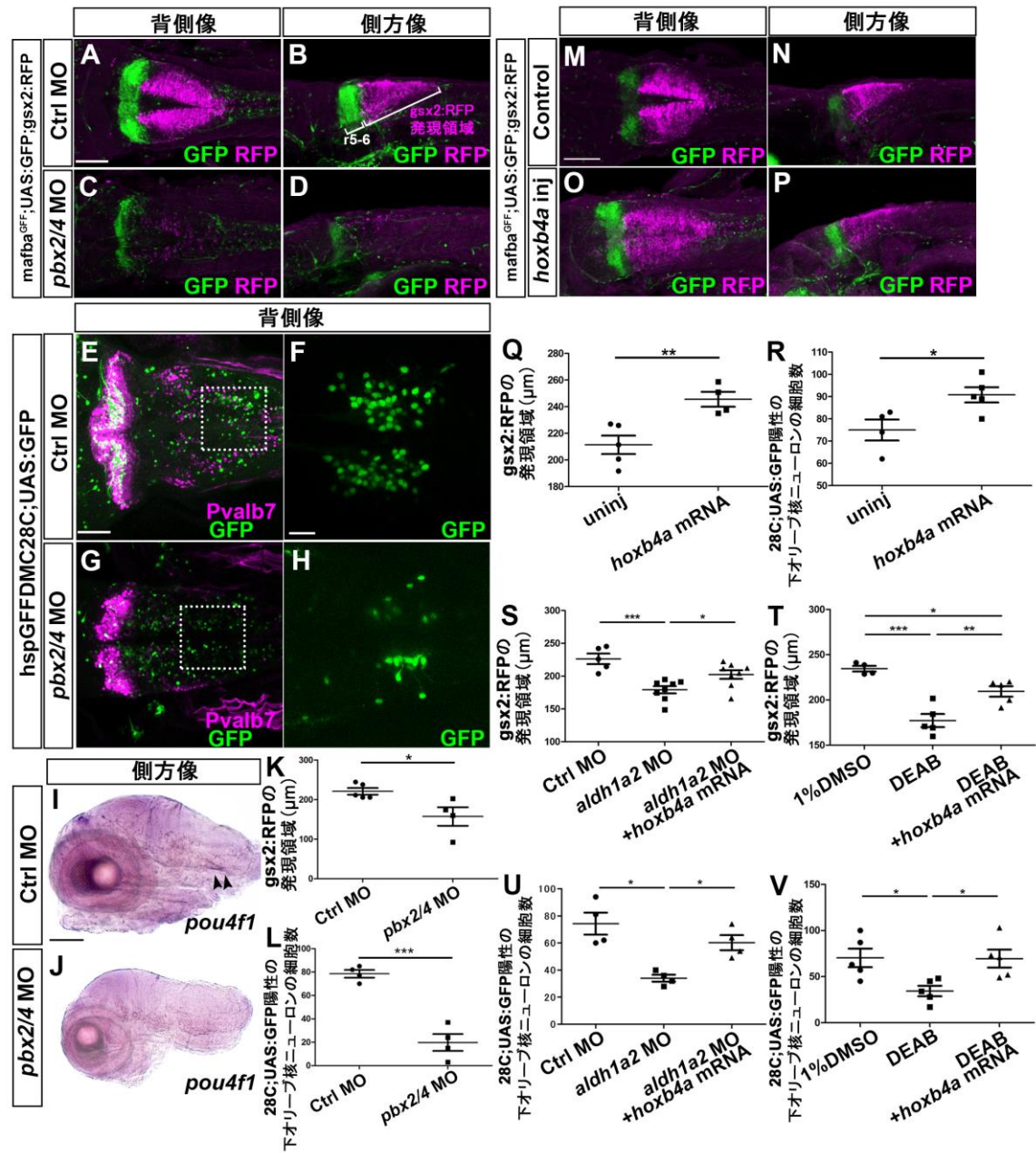
後脳後方領域において、Hox 遺伝子の発現は RA シグナルにより制御されていることが知られている[20, 72]。そのため、Hox タンパク質が *gsx2* の発現を制御している可能性が考えられた。YPWN モチーフを持つ Hox タンパク質は、Pbx2 と Pbx4 複合体を形成することで機能することが分かっており、Pbx2/4 の機能を抑えることで、後脳領域の Hox タンパク質の機能を抑えることができる[73-76]。そこで、今回、Hox タンパク質と *gsx2* の発現との関係性、下オリーブ核ニューロンの形成への関与について調べるために、*pbx2/4* の MO を用いた。*pbx2/pbx4* の MO をインジェクションした個体 (*pbx2/pbx4* morphant と表記、morphant は MO をインジェクションした個体という意味) では *pbx2* の母性変異体に *pbx4* MO をインジェクションした場合と同じ表現型を示すことが知られている。*pbx2/pbx4* morphant では後脳領域の Hox タンパク質の機能が抑えられた結果、第 2-6 菱脳節がすべて第 1 菱脳節に変化することが分かっている[77]。まず *pbx2/pbx4* morphant で、プルキンエ細胞や crest 細胞の形態を観察したところ、受精後 5 日目の *pbx2/pbx4* morphant では異所的な Pvalb7 陽性のプルキンエ細胞が観察されたが、crest 細胞は正常であった (図 21G)。一方で *pbx2/pbx4* morphant では、*gsx2*:RFP の発現領域、28C;UAS:GFP 陽性の下オリーブ核ニューロンの細胞数や下オリーブ核ニューロンのマーカー遺伝子の発現は著しく減少、消失していた (図 21C,D,G,H,J,K,L)。このことから、Hox タンパク質が *gsx2* の発現制御に関与することが明らかとなった。

さらに詳しく、Hox 遺伝子との関係性を明らかにするために、第 7 菱脳節や脊髄で発現していることが知られている *hoxb4a* の過剰発現による解析を行った。*gsx2*:RFP 系統や 28C;UAS:GFP 系統に対して *hoxb4a* mRNA をインジェクションすることで、*hoxb4a* を異所的に発現させた。その結果、*hoxb4a* を過剰発現させた仔魚では後脳後方領域において、*gsx2*:RFP の発現領域が拡大し、下オリーブ核ニューロンの細胞数が増

加していた (図 21O-R)。このことから *hoxb4a* が *gsx2* の発現を正に制御していると考えられた。

次に、RA シグナルによる *gsx2* 発現制御が、*Hoxb4a* を介しておこなわれている可能性について検証した。RA シグナルの阻害下で *hoxb4a* mRNA をインジェクションすることで *gsx2* の発現は回復するかどうか調べた。*aldh1a2* morphant や DEAB 処理し、RA シグナルを阻害した仔魚に対して、*hoxb4a* mRNA のインジェクションを行った。その結果、*gsx2* の発現や下オリーブ核ニューロンの細胞数が一部回復した (図 21S-V)。これらの結果から、RA-Hox カスケードが *gsx2* の発現制御、下オリーブ核ニューロンの形成に重要な役割を果たしていると考えられる。





**図 21 Hox 遺伝子は *gsx2* の発現や下オリーブ核ニューロンの形成に関与している**

(A-D) 受精後 3 日目の *mafba*<sup>GFF</sup>;UAS:GFP;*gsx2*:RFP の control morphant (A,B, *n*=5) と *pbx2/4* morphant (C,D, *n*=4) において抗 RFP 抗体 (マゼンタ) と抗 GFP 抗体 (緑)を用いて免疫染色を行った結果。

(E-H) 受精後 5 日目の 28C;UAS:GFP の control morphant (E,F, *n*=4) と *pbx2/4* morphant (G,H, *n*=4) において抗 Pvalb7 抗体 (マゼンタ) と抗 GFP 抗体 (緑) を用いて免疫染色を行った結果。

(I,J) 受精後 5 日目の control morphant (I) と *pbx2/4* morphant (J) における *pou4f1* の発現。下オリーブ核ニューロンでの *pou4f1* のシグナルは矢尻で示してある。

(K,L) control morphant と *pbx2/4* morphant における *gsx2*:RFP 陽性の後脳領域の長さ (K)、28C;UAS:GFP 陽性の下オリーブ核ニューロンの細胞数 (L)。

(M-P) 受精後 3 日目の control (M, N, *n*=4) と 25 pg の *hoxb4a* mRNA をインジェクションした仔魚 (O, P, *n*=4) に対して、抗 RFP 抗体 (マゼンタ) と抗 GFP 抗体 (緑) で免疫染色を行った結果。

(Q,R) control と *hoxb4a* mRNA をインジェクションした仔魚における、*gsx2*:RFP 陽性の後脳領域の長さ (Q)、および 28C;UAS:GFP 陽性の下オリーブ核ニューロンの細胞数 (R)。

(S,T) control morphant (*n*=5)、*aldh1a2* morphant (*n*=8)、*hoxb4a* mRNA をインジェクションした *aldh1a2* morphant (*n*=8) (S)、control (1% DMSO, *n*=4)、DEAB 処理 (*n*=5)、*hoxb4a* mRNA をインジェクションし、DEAB 処理した仔魚 (*n*=5) (T) における *gsx2*:RFP 陽性の後脳領域の長さ。

(U,V) control morphant (*n*=4)、*aldh1a2* morphant (*n*=4)、*hoxb4a* mRNA をインジェクションした *aldh1a2* morphant (*n*=4) (U)、control morphant (*n*=5)、*aldh1a2* morphant (*n*=5)、

*hoxb4a* mRNA をインジェクションし、DEAB 処理した仔魚 ( $n=5$ ) (V) における 28C;UAS:GFP 陽性の下オリブ核ニューロンの細胞数。

\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$  (Student's *t*-test for K,L,Q,R, and one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test for S-V)。

スケールバー: 100  $\mu\text{m}$  (A,M,I)、50  $\mu\text{m}$  (E)、20  $\mu\text{m}$  (F)。

## 3.2 考察

### Fgf シグナルによる *gsx2* の発現メカニズム

後脳後方のパターン形成に関与する Fgf3/8a シグナルを阻害した結果、*gsx2* の発現領域の拡大、下オリーブ核ニューロンの細胞数の増加が起きていた (図 17)。また、*mafba* 変異体では、*gsx2* の発現領域がわずかに拡大し、下オリーブ核ニューロンの細胞数もわずかに増加している様子が観察された (図 19)。*mafba* の発現は Fgf シグナルによって調節されることが、ニワトリとゼブラフィッシュを用いた解析から明らかになっている[20, 72]。以上のことから、後脳領域において、Fgf シグナルは *Mafba* を介して、*gsx2* の発現が吻側へ拡大することを抑えていると考えられる (図 23)。また、マウスにおいて、*MafB* によって *hoxb3* の発現が直接、活性化されることが明らかになっていることから[78]、*mafba-hoxb3* のカスケードが *gsx2* の発現抑制に関与しているのかもしれない。今回、*fgf8a* 変異体と *fgf3* MO を用いることで、Fgf3/8a シグナルを抑制した。*Fgf8a* は後脳パターン形成の他に、小脳の形成にも関与し、*fgf8a* 変異体では小脳が完全に消失する[42]。本研究においても、*fgf8a* 変異体(+ *fgf3* MO)では、下オリーブ核ニューロンは形成されていたが、プルキンエ細胞は消失していた (図 17)。興味深いことに、標的であるプルキンエ細胞がないのにも関わらず、登上線維が吻側に伸長し、視蓋の領域に投射している様子が観察された (図 17)。このことから、登上線維の軸索が伸長する際に、プルキンエ細胞による軸索誘引のメカニズムが存在すると考えられる。

### RA シグナル-Hox タンパク質カスケードによる *gsx2* 発現メカニズム

マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュにおいて、神経分化の初期段階に、*aldh1a2* が形成中の体節に発現している[23, 24, 79-81]。また、マウス胚に RA を添加すると下オリーブ核ニューロンが増加することが報告されている[82]。さらにゼブラフィッシュにおいては、RA シグナルを抑えると後脳後方の領域が消失することが分かっている[23,

24, 82, 83]。今回、本研究から RA シグナルを抑制することで *gsx2* の発現が減少し、下オリーブ核ニューロンの形成に影響を与えることが分かった (図 20)。このことから、RA シグナルは *gsx2* の発現、下オリーブ核ニューロンの形成を正に制御していると考えられる。また、Hox 遺伝子は RA シグナルの下流で発現することが報告されており [84]、ゼブラフィッシュにおいても RA シグナルを抑制すると、*hoxb4a* の発現は著しい減少、あるいは消失する [23, 24, 83, 84]。また、*hoxb4a* 発現領域で YFP を発現するゼブラフィッシュの Tg 系統を用いた細胞系譜の解析から、YFP の発現が下オリーブ核ニューロンで見られることが明らかとなっている [85, 86]。さらに、ニワトリにおいて、*hoxb4* は RA 受容体である RAR/RXR 複合体の直接的な標的となっている [87]。これらのデータは後脳後方領域において、RA シグナルが *hoxb4a* を含む、Hox 遺伝子の発現を制御し、後脳後方領域のパターン形成を制御することを示唆している。しかし、Hox 遺伝子のパラログはそれぞれ機能が重複しているので、変異体を用いて *hoxb4a* を含む個々の Hox 遺伝子の役割を明らかにすることは難しい。Pbx2 や Pbx4 は、YPWN モチーフを持っている Hox タンパク質と複合体を形成することで機能することが分かっている [74-76]。今回、Pbx2 や Pbx4 の発現を抑制した時に、*gsx2* の発現および、下オリーブ核ニューロンの細胞数が著しく減少していた (図 21)。また、*hoxb4a* の過剰発現により、*gsx2* の発現が拡大していた (図 21)。さらに、RA 産生を抑制した仔魚において、*hoxb4a* を過剰発現させると *gsx2*:RFP の発現および、28C;UAS:GFP 陽性の下オリーブ核ニューロンの形成が一部回復した (図 21)。Hoxb4a は YPWN モチーフを持っており、Pbx2/4 と複合体を形成し機能すると考えられる。これらことを合わせると、RA シグナルの直下で *hoxb4a* のような Hox 遺伝子が第 7 菱脳節で発現し、Hox タンパク質と Pbx2/4 が複合体を形成し、機能することで、*gsx2* の発現を制御し、下オリーブ核ニューロンの形成に関与すると考えられる (図 23)。

### **Mafba** や **Hox** タンパク質は **gsx2** の発現を直接、制御するのか？

今回の研究では、後脳後方領域において、**MafBa** および **Hox** タンパク質が直接、**gsx2** の発現を制御しているかどうかは明らかになっていない。これまでのところ、マウスにおいて、**Gsx2** のオープンリーディングフレームの 3'側の下流にエンハンサー領域が存在することが分かっている。このエンハンサー領域を用いることで、マウスの腹側終脳や後脳後方領域でレポーター遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなっている (隅山私信)。また、ゼブラフィッシュの **gsx2** 遺伝子においても、マウスの **Gsx2** エンハンサー領域とホモロジーが高い領域が存在することが分かっている (図 22)。このゼブラフィッシュのエンハンサー領域 (約 800 bp) には **MafBa** や **Hox** タンパク質の結合モチーフが含まれている(図 22 オレンジ、水色)。また、予備データではあるが、この 800 bp のエンハンサー配列を用いることで、後脳後方や終脳にレポーター遺伝子の発現を誘導することができている (図 22)。以上のことから、**Mafba** や **Hox** タンパク質が直接、**gsx2** の発現を制御しているのかもしれない。

```
>danRer7_phastConsElements8wayFish_lod=793 range=chr20:22467943-22468735 5'pad=0 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none
ACAAGTGACAAGTGTCCGGGGTCAGCCGTGTCATGTTTGAACACGGGAGTCAGTCCTAAAACG
GCTGCAAACTCTTTTGTGCGAGGCTCTTCTCTCTCGCACCTGCGAGGGGTGAAGTCTAATTTCG
ATTATAAGAAATTCATATATATTCATTAGGTGCCTTCCCTCGATAATATATGATCATGAAGC
GAGACGTGAAAGGAGGCCATTTATTCCTCTCTGAAAGGACCTGCGTGGGACAAAATTCACC
TGCTTCCCTCTCAATTAGGAATGTATCCCAAACCTCTGACGGAACACGAGTTAATTAAGCGTT
CGCTAATTTCTTATCACCCTCTTACGTAATCCCTCAAATTTTCAGCATGCCCCCTCAATTGGC
CCAAGTTGAAAGGTTCAAATAGTGCCTAATGAAACAGTGACTAAATCGTTTTCTCGCGCGCGGA
GAAACCTGTAGACGTCTCGTGAAGGCTTGAGCTCGCCGCGTCCGGGGTCCGCGCGCTAAA
TGCAAGTTCTTGGCAGGACAATCTAACCCTGTCAAAGCCTTTGGCCAGCTCTGCGTAGCTTTTTT
CCCTCGCTCGTATTGAGGGAATTGCTACATAAGCAACCAACGTGGGACAAAAAACTGCAATTAA
ACTCCTTTTCGGATTAACAGGGGTACAACCGTCTCTTGAAGGCGCACACAGAATAGATG
TATAATGACTATCACCTGCCCCGTGAGATACAAATCTCTCTATAGGCCTTTTGTGCCTAC
TAGGGGATATATGAGAAAAACACTG
```

マウス *Gsx2* エンハンサー配列  
と共通する配列

ゼブラフィッシュ特異的な配列

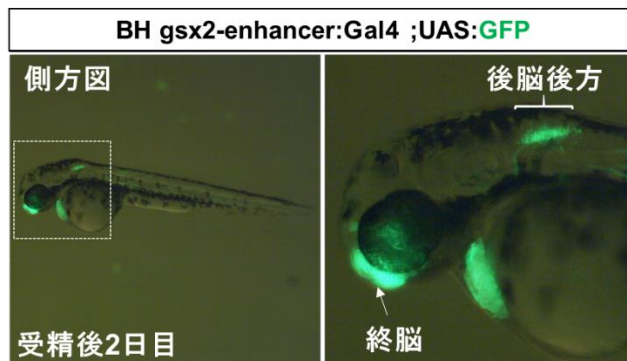


図 22 ゼブラフィッシュにおける *gsx2* のエンハンサー領域

*gsx2* のオープンリーディングフレームの 3'下流にマウスとホモロジーの高いエンハンサー領域。438 bp のゼブラフィッシュとマウスで共通のエンハンサー配列と 355 bp のゼブラフィッシュ特異的エンハンサー配列が存在している。配列中の水色の配列は MafBa の結合配列、オレンジ色の配列は Hox タンパク質の結合モチーフを示している。また、800 bp の *gsx2* のエンハンサー領域に Gal4 を繋げた Tg 系統と UAS:GFP を交配することで後脳後方や終脳で GFP が発現することが明らかとなっている。

## 第4章 本研究のまとめと今後の展望

第2章では、下オリーブ核ニューロンの形成において、ホメオボックス遺伝子である *gsx2* が下オリーブ核ニューロンの前駆細胞で発現し、下オリーブ核ニューロンの分化に重要な役割を果たすことを見出した。また、下オリーブ核ニューロンの形成においては、*Gsx2* と *Ptf1a* は互いに独立して関与し、*ptf1a* は後脳領域で神経分化に関与し、*gsx2* は下オリーブ核ニューロンの運命決定を担うと示唆された。さらに、第3章では、発生の初期段階において *Fgf* や *RA* シグナルやその下流で発現する *Mafba* や *Hox* タンパク質-*Pbx2/4* の複合体の制御を受けることによって、第7菱脳節やその後方で特異的に *gsx2* が発現することが明らかとなった。第7菱脳節で発現した *gsx2* が、*ptf1a* 陽性神経前駆細胞から下オリーブ核ニューロンへの運命決定を担うと考えられる (図23)。哺乳類からゼブラフィッシュのような真骨魚類まで小脳神経回路が保存されていることを考慮すると、哺乳類においても、同様の分子メカニズムで下オリーブ核ニューロンの分化が行われているのかもしれない。

本研究により、*ptf1a* 陽性細胞から下オリーブ核ニューロンの運命決定がなされる分子機構を解明した。しかし、同じく *ptf1a* 陽性細胞から分化する、プルキンエ細胞や *crest* 細胞の形成の分子機構に関しては、本論文では明確な答えは出せていない。*pbx2/4* を欠損させた仔魚では、ほとんどの後脳の *Hox* タンパク質の機能は失われ、第2-6菱脳節の消失を示し、第1菱脳節に変化する[73]。第3章において、*pbx2/4* を抑制した仔魚では、プルキンエ細胞の増加がわずかに見られたものの、*crest* 細胞は正常であった (図21)。このことから、プルキンエ細胞や *crest* 細胞の形成には *Hox* タンパク質が関与していない可能性が高く、別の分子機構によりこれらの細胞は形成されるのかもしれない。現在、プルキンエ細胞の形成の分子機構に関しては、当研究グループで解析を行ってい



る途中であり、今後、*ptf1a* 陽性細胞からプルキンエ細胞へ分化の分子機構の詳細が明らかになると期待される。

*Gsx2* や *Ptf1a* は転写制御因子であるが、これまでのところ、これらの転写制御因子がどのような遺伝子の発現を制御しているのかは明らかになっていない。今後の研究では抗体やビオチン化した転写制御因子を発現する Tg 系統 *Tg(UAS:gsx2BLRP-P2A-BirA-P2A- mCherry)* (図 15)を用いた ChIP-seq[88-90]、ランダム配列の核酸ライブラリーを用いる Systematic evolution of ligands by exponential enrichment 法 (SELEX 法)[91]を用いることで *Ptf1a* や *Gsx2* の結合配列の同定を試みる予定である。これらの解析により、プルキンエ細胞、*crest* 細胞、下オリーブ核ニューロンの分化における遺伝子プログラムの詳細が明らかになること期待される。

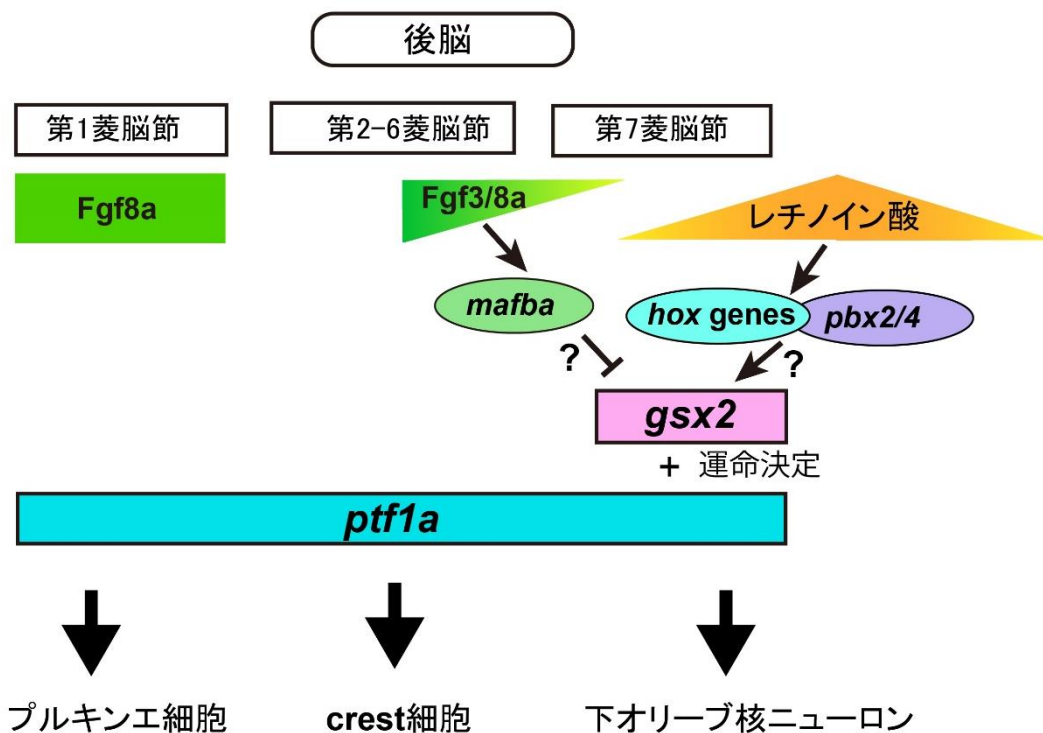


図 23 下オリーブ核ニューロンの分化の分子機構

*ptf1a* は後脳の菱脳節全体で発現し、*ptf1a* 陽性神経前駆細胞からはプルキンエ細胞、*crest* 細胞、下オリーブ核ニューロンなど様々なニューロンに分化する。第 7 菱脳節においては、Fgf3/8a やレチノイン酸シグナルの下流で、Mafba や Hox タンパク質と Pbx2/4 の複合体が働く。これらの転写因子の制御を受け、第 7 菱脳節で *gsx2* が発現し、*ptf1a* 陽性神経前駆細胞から下オリーブ核ニューロンへの運命決定を担うと考えられる。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始適切なご指導を賜りました生物機能開発利用研究センター動物器官機能学分野の日比正彦教授、清水貴史准教授、橋本寿史助教、そして実験手技やデータの扱い等、多大なご助力をしていただいた、研究員の竹内未紀さんに深く感謝いたします。

本研究に使用したトランスジェニックゼブラフィッシュ、*Tg(gsx2:loxp-DsRed-loxp-GFP)*は岡崎統合バイオサイエンスセンターの東島眞一博士より、*gSAIzGFFM35A* や *Tg(mnx2b:GFF)*は国立遺伝学研究所の川上浩一博士、浅川和秀博士より、*mafba*<sup>b337</sup> は筑波大学の小林麻己人博士より分与して頂きました。深く感謝いたします。

*gsx2* のエンハンサー領域の探索に関しては、国立研究開発法人理化学研究所 生命機能科学研究センターの隅山健太博士にご協力頂きました。深く感謝いたします。

また、副指導教官として、研究に関する多大なご助言を頂きました名古屋大学の上川内あづさ教授、田中実教授に深く感謝いたします。

実験用のゼブラフィッシュの飼育、水槽等の設備の管理には、技術補佐官の近藤 久仁代さん、塚崎 幸子さん、高柳 由美子さんにご協力していただきました。事務関連では岡根 理恵子さんにご協力していただきました。また、動物器官機能学グループの方々には実験や研究室での生活などでさまざまなご助言、指導を頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

1. Ito, M., *Control of mental activities by internal models in the cerebellum*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(4): p. 304-13.
2. Matsuda, K., et al., *Granule cells control recovery from classical conditioned fear responses in the zebrafish cerebellum*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 11865.
3. Stoodley, C.J., et al., *Altered cerebellar connectivity in autism and cerebellar-mediated rescue of autism-related behaviors in mice*. Nat Neurosci, 2017. **20**(12): p. 1744-1751.
4. Altman, J. and S. Bayer, *Development of the Cerebellar System in Relation to its Evolution, Structure, and Function*. 1997, Boca Raton, FL: CRC Press.
5. Bae, Y.K., et al., *Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development*. Dev Biol, 2009. **330**(2): p. 406-26.
6. Hashimoto, M. and M. Hibi, *Development and evolution of cerebellar neural circuits*. Dev Growth Differ, 2012. **54**(3): p. 373-89.
7. Hibi, M. and T. Shimizu, *Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits*. Dev Neurobiol, 2012. **72**(3): p. 282-301.
8. Kani, S., et al., *Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum*. Dev Biol, 2010. **343**(1-2): p. 1-17.
9. Hoshino, M., et al., *Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum*. Neuron, 2005. **47**(2): p. 201-13.
10. Ben-Arie, N., et al., *Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons*. Nature, 1997. **390**(6656): p. 169-72.
11. Butler, A.B. and W. Hodos, *Comparative Vertebrate Neuroanatomy Evolution and Adaptation*. 1996, New York: Wiley-Liss.
12. Laine, J. and H. Axelrad, *The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex*. J Comp Neurol, 1994. **339**(2): p. 159-73.
13. Florio, M., et al., *Neurogenin 2 regulates progenitor cell-cycle progression and Purkinje cell dendritogenesis in cerebellar development*. Development, 2012. **139**(13): p. 2308-20.
14. Sudarov, A., et al., *Ascl1 genetics reveals insights into cerebellum local circuit assembly*. J Neurosci, 2011. **31**(30): p. 11055-69.
15. Lundell, T.G., Q. Zhou, and M.L. Doughty, *Neurogenin1 expression in cell*

- lineages of the cerebellar cortex in embryonic and postnatal mice.* Dev Dyn, 2009. **238**(12): p. 3310-25.
16. Fujiyama, T., et al., *Inhibitory and excitatory subtypes of cochlear nucleus neurons are defined by distinct bHLH transcription factors, Ptf1a and Atoh1.* Development, 2009. **136**(12): p. 2049-58.
  17. Yamada, M., et al., *Origin of climbing fiber neurons and their developmental dependence on Ptf1a.* J Neurosci, 2007. **27**(41): p. 10924-34.
  18. Dupe, V. and A. Lumsden, *Hindbrain patterning involves graded responses to retinoic acid signalling.* Development, 2001. **128**(12): p. 2199-208.
  19. Gavalas, A. and R. Krumlauf, *Retinoid signalling and hindbrain patterning.* Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(4): p. 380-6.
  20. Marin, F. and P. Charnay, *Hindbrain patterning: FGFs regulate Krox20 and mafB/kr expression in the otic/preotic region.* Development, 2000. **127**(22): p. 4925-35.
  21. Maves, L., W. Jackman, and C.B. Kimmel, *FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain.* Development, 2002. **129**(16): p. 3825-37.
  22. Maves, L. and C.B. Kimmel, *Dynamic and sequential patterning of the zebrafish posterior hindbrain by retinoic acid.* Dev Biol, 2005. **285**(2): p. 593-605.
  23. Begemann, G., et al., *The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for raldh2 in mesodermal signals that pattern the hindbrain.* Development, 2001. **128**(16): p. 3081-94.
  24. Grandel, H., et al., *Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud.* Development, 2002. **129**(12): p. 2851-65.
  25. Niederreither, K., et al., *Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo.* Development, 2000. **127**(1): p. 75-85.
  26. Shimizu, T., Y.K. Bae, and M. Hibi, *Cdx-Hox code controls competence for responding to Fgfs and retinoic acid in zebrafish neural tissue.* Development, 2006. **133**(23): p. 4709-19.
  27. Kriks, S., et al., *Gsh2 is required for the repression of Ngn1 and specification of dorsal interneuron fate in the spinal cord.* Development,

2005. **132**(13): p. 2991-3002.
28. Mizuguchi, R., et al., *Ascl1 and Gsh1/2 control inhibitory and excitatory cell fate in spinal sensory interneurons*. Nat Neurosci, 2006. **9**(6): p. 770-8.
  29. Satou, C., et al., *Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons*. Development, 2013. **140**(18): p. 3927-31.
  30. Corbin, J.G., et al., *The Gsh2 homeodomain gene controls multiple aspects of telencephalic development*. Development, 2000. **127**(23): p. 5007-20.
  31. Hsieh-Li, H.M., et al., *Gsh-2, a murine homeobox gene expressed in the developing brain*. Mech Dev, 1995. **50**(2-3): p. 177-86.
  32. Szucsik, J.C., et al., *Altered forebrain and hindbrain development in mice mutant for the Gsh-2 homeobox gene*. Dev Biol, 1997. **191**(2): p. 230-42.
  33. Wacław, R.R., et al., *Distinct temporal requirements for the homeobox gene Gsx2 in specifying striatal and olfactory bulb neuronal fates*. Neuron, 2009. **63**(4): p. 451-65.
  34. Yun, K., et al., *Patterning of the lateral ganglionic eminence by the Gsh1 and Gsh2 homeobox genes regulates striatal and olfactory bulb histogenesis and the growth of axons through the basal ganglia*. J Comp Neurol, 2003. **461**(2): p. 151-65.
  35. Asakawa, K., et al., *Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(4): p. 1255-60.
  36. Asakawa, K., G. Abe, and K. Kawakami, *Cellular dissection of the spinal cord motor column by BAC transgenesis and gene trapping in zebrafish*. Front Neural Circuits, 2013. **7**: p. 100.
  37. Parsons, M.J., et al., *Notch-responsive cells initiate the secondary transition in larval zebrafish pancreas*. Mech Dev, 2009. **126**(10): p. 898-912.
  38. Pisharath, H., et al., *Targeted ablation of beta cells in the embryonic zebrafish pancreas using E. coli nitroreductase*. Mech Dev, 2007. **124**(3): p. 218-29.
  39. Takeuchi, M., et al., *Establishment of Gal4 transgenic zebrafish lines for analysis of development of cerebellar neural circuitry*. Dev Biol, 2015. **397**(1): p. 1-17.

40. Asakawa, K. and K. Kawakami, *Protocadherin-Mediated Cell Repulsion Controls the Central Topography and Efferent Projections of the Abducens Nucleus*. Cell Rep, 2018. **24**(6): p. 1562-1572.
41. Moens, C.B., et al., *Equivalence in the genetic control of hindbrain segmentation in fish and mouse*. Development, 1998. **125**(3): p. 381-91.
42. Reifers, F., et al., *Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis*. Development, 1998. **125**(13): p. 2381-95.
43. Westerfield, M., *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish*. 2000.
44. Hwang, W.Y., et al., *Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(3): p. 227-9.
45. Mali, P., et al., *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. Science, 2013. **339**(6121): p. 823-6.
46. Nimura, T., et al., *Role of Reelin in cell positioning in the cerebellum and the cerebellum-like structure in zebrafish*. Dev Biol, 2019. **455**(2): p. 393-408.
47. Ota, S., et al., *Efficient identification of TALEN-mediated genome modifications using heteroduplex mobility assays*. Genes Cells, 2013. **18**(6): p. 450-8.
48. Maves, L., et al., *Pbx homeodomain proteins direct Myod activity to promote fast-muscle differentiation*. Development, 2007. **134**(18): p. 3371-82.
49. Wiellette, E.L. and H. Sive, *Early requirement for fgf8 function during hindbrain pattern formation in zebrafish*. Dev Dyn, 2004. **229**(2): p. 393-9.
50. Ke, M.T., S. Fujimoto, and T. Imai, *SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction*. Nat Neurosci, 2013. **16**(8): p. 1154-61.
51. Ke, M.T. and T. Imai, *Optical Clearing of Fixed Brain Samples Using SeeDB*. Curr Protoc Neurosci, 2014. **66**: p. 2 22 1-2 22 19.
52. Akitake, C.M., et al., *Transgenerational analysis of transcriptional silencing in zebrafish*. Dev Biol, 2011. **352**(2): p. 191-201.
53. Xue, H.G., et al., *Afferent connections of the corpus cerebelli in holocentrid teleosts*. Brain Behav Evol, 2004. **64**(4): p. 242-58.

54. Haug, M.F., et al., *Phylogeny and expression divergence of metabotropic glutamate receptor genes in the brain of zebrafish (Danio rerio)*. J Comp Neurol, 2013. **521**(7): p. 1533-60.
55. Ferland, R.J., et al., *Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain*. J Comp Neurol, 2003. **460**(2): p. 266-79.
56. Fujita, H. and I. Sugihara, *FoxP2 expression in the cerebellum and inferior olive: development of the transverse stripe-shaped expression pattern in the mouse cerebellar cortex*. J Comp Neurol, 2012. **520**(3): p. 656-77.
57. Tambalo, M., R. Mitter, and D.G. Wilkinson, *A single cell transcriptome atlas of the developing zebrafish hindbrain*. Development, 2020. **147**(6).
58. Ambrosiani, J., et al., *The avian inferior olive derives from the alar neuroepithelium of the rhombomeres 7 and 8: an analysis by using chick-quail chimeric embryos*. Neuroreport, 1996. **7**(7): p. 1285-8.
59. Cambroner, F. and L. Puelles, *Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: a fate map with quail chick chimeras*. J Comp Neurol, 2000. **427**(4): p. 522-45.
60. Kawauchi, D., et al., *Direct visualization of nucleogenesis by precerebellar neurons: involvement of ventricle-directed, radial fibre-associated migration*. Development, 2006. **133**(6): p. 1113-23.
61. Kim, E.J., et al., *Ascl1 (Mash1) lineage cells contribute to discrete cell populations in CNS architecture*. Mol Cell Neurosci, 2008. **38**(4): p. 595-606.
62. Landsberg, R.L., et al., *Hindbrain rhombic lip is comprised of discrete progenitor cell populations allocated by Pax6*. Neuron, 2005. **48**(6): p. 933-47.
63. Zordan, P., et al., *Comparative analysis of proneural gene expression in the embryonic cerebellum*. Dev Dyn, 2008. **237**(6): p. 1726-35.
64. Grimaldi, P., et al., *Origins and control of the differentiation of inhibitory interneurons and glia in the cerebellum*. Dev Biol, 2009. **328**(2): p. 422-33.
65. Yamamoto, N. and H. Ito, *Fiber connections of the central nucleus of semicircular torus in cyprinids*. J Comp Neurol, 2005. **491**(3): p. 186-211.
66. Bell, C.C., V. Han, and N.B. Sawtell, *Cerebellum-like structures and their implications for cerebellar function*. Annu Rev Neurosci, 2008. **31**: p. 1-



- 24.
67. Oertel, D. and E.D. Young, *What's a cerebellar circuit doing in the auditory system?* Trends Neurosci, 2004. **27**(2): p. 104-10.
68. Toresson, H. and K. Campbell, *A role for Gsh1 in the developing striatum and olfactory bulb of Gsh2 mutant mice.* Development, 2001. **128**(23): p. 4769-80.
69. Storm, R., et al., *The bHLH transcription factor Olig3 marks the dorsal neuroepithelium of the hindbrain and is essential for the development of brainstem nuclei.* Development, 2009. **136**(2): p. 295-305.
70. Mohammadi, M., et al., *Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors.* Science, 1997. **276**(5314): p. 955-60.
71. Russo, J.E., *Inhibition of mouse and human class 1 aldehyde dehydrogenase by 4-(N,N-dialkylamino)benzaldehyde compounds.* Adv Exp Med Biol, 1997. **414**: p. 217-24.
72. Ghosh, P., J.M. Maurer, and C.G. Sagerstrom, *Analysis of novel caudal hindbrain genes reveals different regulatory logic for gene expression in rhombomere 4 versus 5/6 in embryonic zebrafish.* Neural Dev, 2018. **13**(1): p. 13.
73. Waskiewicz, A.J., H.A. Rikhof, and C.B. Moens, *Eliminating zebrafish pbx proteins reveals a hindbrain ground state.* Dev Cell, 2002. **3**(5): p. 723-33.
74. Johnson, F.B., E. Parker, and M.A. Krasnow, *Extradenticle protein is a selective cofactor for the Drosophila homeotics: role of the homeodomain and YPWM amino acid motif in the interaction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(3): p. 739-43.
75. Mann, R.S. and S.K. Chan, *Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins.* Trends Genet, 1996. **12**(7): p. 258-62.
76. Shanmugam, K., M.S. Featherstone, and H.U. Saragovi, *Residues flanking the HOX YPWM motif contribute to cooperative interactions with PBX.* J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 19081-7.
77. Maves, L., et al., *Pbx acts with Hand2 in early myocardial differentiation.* Dev Biol, 2009. **333**(2): p. 409-18.
78. Manzanares, M., et al., *Segmental regulation of Hoxb-3 by kreisler.* Nature, 1997. **387**(6629): p. 191-5.

79. Berggren, K., et al., *Differential distribution of retinoic acid synthesis in the chicken embryo as determined by immunolocalization of the retinoic acid synthetic enzyme, RALDH-2*. Dev Biol, 1999. **210**(2): p. 288-304.
80. Blentic, A., E. Gale, and M. Maden, *Retinoic acid signalling centres in the avian embryo identified by sites of expression of synthesising and catabolising enzymes*. Dev Dyn, 2003. **227**(1): p. 114-27.
81. Niederreither, K., et al., *Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development*. Mech Dev, 1997. **62**(1): p. 67-78.
82. Yamamoto, M., et al., *Retinoic acid influences the development of the inferior olivary nucleus in the rodent*. Dev Biol, 2005. **280**(2): p. 421-33.
83. Begemann, G., et al., *Beyond the neckless phenotype: influence of reduced retinoic acid signaling on motor neuron development in the zebrafish hindbrain*. Dev Biol, 2004. **271**(1): p. 119-29.
84. Nolte, C., B. De Kumar, and R. Krumlauf, *Hox genes: Downstream "effectors" of retinoic acid signaling in vertebrate embryogenesis*. Genesis, 2019. **57**(7-8): p. e23306.
85. Ma, L.H., et al., *Mosaic hoxb4a neuronal pleiotropism in zebrafish caudal hindbrain*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5944.
86. Punnamoottil, B., et al., *Enhancer detection in zebrafish permits the identification of neuronal subtypes that express Hox4 paralogs*. Dev Dyn, 2008. **237**(8): p. 2195-208.
87. Gould, A., N. Itasaki, and R. Krumlauf, *Initiation of rhombomeric Hoxb4 expression requires induction by somites and a retinoid pathway*. Neuron, 1998. **21**(1): p. 39-51.
88. Lukoseviciute, M., et al., *From Pioneer to Repressor: Bimodal foxd3 Activity Dynamically Remodels Neural Crest Regulatory Landscape In Vivo*. Dev Cell, 2018. **47**(5): p. 608-628 e6.
89. Rougeot, J., et al., *Maintenance of spatial gene expression by Polycomb-mediated repression after formation of a vertebrate body plan*. Development, 2019. **146**(19).
90. Matsuda, K., et al., *ChIP-seq analysis of genomic binding regions of five major transcription factors highlights a central role for ZIC2 in the mouse epiblast stem cell gene regulatory network*. Development, 2017. **144**(11): p. 1948-1958.
91. Jolma, A., et al., *Multiplexed massively parallel SELEX for*

*characterization of human transcription factor binding specificities.*  
Genome Res, 2010. **20**(6): p. 861-73.

## 副論文

Tsubasa Itoh, Miki Takeuchi, Marina Sakagami, Kazuhide Asakawa, Kenta Sumiyama, Koichi Kawakami, Takashi Shimizu, Masahiko Hibi Gsx2 is required for specification of neurons in the inferior olivary nuclei from Ptf1a-expressing neural progenitors in zebrafish., Development, 2020. 147, dev190603. doi:10.1242

## 参考論文

Role of Reelin in cell positioning in the cerebellum and the cerebellum-like structure in zebrafish. Takayuki Nimura, Tsubasa Itoh, Hanako Hagio, Takuto Hayashi, Vincenzo Di Donato, Miki Takeuchi, Takeaki Itoh, Fuduki Inoguchi, Yoshikatsu Sato, Naoyuki Yamamoto, Yu Katsuyama, Filippo Del Bene, Takashi Shimizu, Masahiko Hibi  
Dev Biol, 2019. 455(2):393-408.