

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500299

研究課題名（和文） 光遺伝学を用いたゼブラフィッシュ脳機能の解析

研究課題名（英文） Optogenetic analysis of neural functions in zebrafish

研究代表者

武藤 彩 (MUTO AKIRA)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教

研究者番号：00525991

研究成果の概要（和文）： 脳の働きを理解するうえで有効な方法の一つは、行動中の神経細胞集団の活動パターンを観察し、さらに、人為的にそれらの活動を抑制あるいは亢進させた場合の影響を調べることである。神経細胞の活動は、膜電位の変化に伴って生ずる細胞内カルシウムイオン濃度の増加を検出することによって測定できる。そこで我々は脳が透明なゼブラフィッシュの胚や稚魚を実験動物モデルとして用いて、カルシウムイメージングの手法を用いて神経細胞集団の活動を可視化する方法論の開発と、光遺伝学ツールを適用するための遺伝学的な手法の開発を行った。

研究成果の概要（英文）： To understand how the brain works, it is desirable to visualize neuronal activity in the neuronal network and to evaluate the effect of blockade or stimulation of neuronal activity. Electrical activity of the neurons can be indirectly monitored by measuring the calcium influx via voltage-dependent calcium channels. We used zebrafish larvae as a model system to visualize neuronal activity in a specific subset of neurons. Furthermore, we developed optogenetic tools that can be applied in manipulation of neuronal activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：ゼブラフィッシュ、カルシウムイメージング、GCaMP、視覚、脳、神経回路、光遺伝学、オプトジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

動物の行動がどのような神経ネットワークの活動によりコードされているかを明らかにすることは、神経科学における中心的な課題の一つである。この課題にアプローチするためには、行動中の動物の脳の活動を非侵

襲的に計測し、神経細胞の活動性を人為的に抑制したり亢進したりすることによりその神経細胞の役割の必要十分性を検討する必要がある。DNA でコードされるカルシウム蛍光タンパク質が開発されたことにより、これと特異的プロモーターと組み合わせると特異

的神経細胞のみに発現させて脳の活動を可視化（イメージング）することが可能になった。また、神経細胞の人為的制御を可能にする手法として、ハロロドプシンやチャネルロドプシンなどの光遺伝学ツールが開発され、さらにこれらの機能分子の改良が行われるなど技術革新が目覚ましく、神経科学研究のあり方を劇的に変えている。このような学術的背景から、特定の行動パターンに関与する神経細胞をカルシウムイメージングにより同定し、さらに同定された神経細胞の役割の必要十分性を光遺伝学的手法を利用して証明するという戦略が有望である。

## 2. 研究の目的

ゼブラフィッシュの稚魚の脳のサイズが小さく透明であることを利用して、感覚情報の入力から行動の出力に至る過程の神経活動を、広い脳部位にわたってカルシウムイメージングにより可視化できる系を確立する。さらに神経活動の人為的抑制・亢進実験により、行動を作り出す神経回路の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

神経機能を蛍光イメージングにより測定するために、DNA でコードされる蛍光カルシウムプローブ GCaMP を用いる。ただし、元々の GCaMP のカルシウム検出感度は神経活動を検出するのに十分ではないため、アミノ酸残基の置換を導入した改良型 GCaMP を利用して、その遺伝子導入ゼブラフィッシュを作製する。汎用性の高い発現システムを実現するために、酵母由来の転写活性因子 Gal4 とその認識配列である UAS を用いる。Gal4 の特異的発現は、Gal4 遺伝子トラップ法を用いて行う。染色体中にランダムに挿入された Gal4 遺伝子系統の中から、神経系の一部で発現するパターンを選びだし実験に用いる。また、UAS 配列の下流に改良型 GCaMP 遺伝子を融合させた DNA コンストラクトを作製し、それを用いて遺伝子導入ゼブラフィッシュの系統を樹立する。光遺伝学ツールに関しても同様に UAS の下流に配置した DNA コンストラクトを利用して遺伝子導入ゼブラフィッシュの系統を作出する。

## 4. 研究成果

Gal4-UAS を用いて部域特異的に GCaMP を発現するため、まず Gal4 遺伝子トラップ・エンハンサートラップ系統のコレクションの作出とそのデータベース化を行った (Kawakami et al., 2010 発表論文⑤; 図 1)。他方、系統改良型 GCaMP である GCaMPHS を用いて、UAS:GCaMPHS 遺伝子導入ゼブラフィッシュを作製し、系統を確立した。これと、脊髄運動

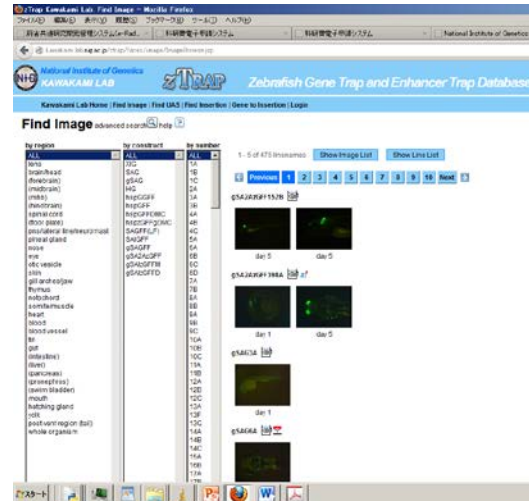


図 1. Gal4 遺伝子・エンハンサートラップ系統のデータベース

神経細胞の一部で Gal4 を発現する系統とを掛け合わせるにより、Gal4 と UAS:GCaMPHS のダブルヘテロ接合体の稚魚を得て、これを用いてカルシウムイメージングを行った。受精後 20 時間前後の自発的な筋収縮運動中の胚を観察したところ、脊髄の運動神経細胞の集団が左右交互に規則正しく活動する様子が捉えられ、運動を作り出す神経ネットワーク活動をリアルタイムで可視化することに成功した (図 2; Muto et al., 2011 発表論文③; Muto et al., 2011 発表論文④)。

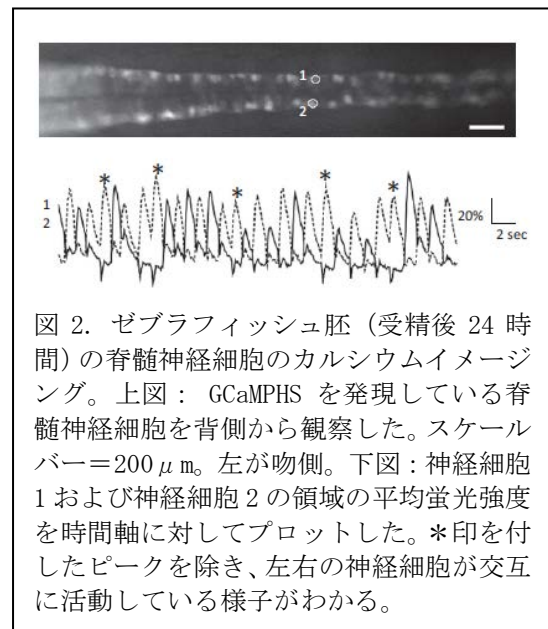


図 2. ゼブラフィッシュ胚（受精後 24 時間）の脊髄神経細胞のカルシウムイメージング。上図：GCaMPHS を発現している脊髄神経細胞を背側から観察した。スケールバー=200  $\mu$ m。左が吻側。下図：神経細胞 1 および神経細胞 2 の領域の平均蛍光強度を時間軸に対してプロットした。\*印を付したピークを除き、左右の神経細胞が交互に活動している様子がわかる。

ここで確立された手法は汎用性があるため、脳のさまざまな部位における神経細胞集団の活動の同時計測が可能になった (Hirata et al., 2011 発表論文②)。また、光遺伝学ツールであるチャネルロドプシンおよびハロロ

ドプシンに関してそれらの改良型分子の遺伝子を UAS の下流に融合させた DNA コンストラクトを用いて遺伝子導入ゼブラフィッシュ系統を確立し、これらのゼブラフィッシュの神経機能が光照射により人為的に制御できることを実証した(図 3; Umeda et al., 2013 発表論文①)。

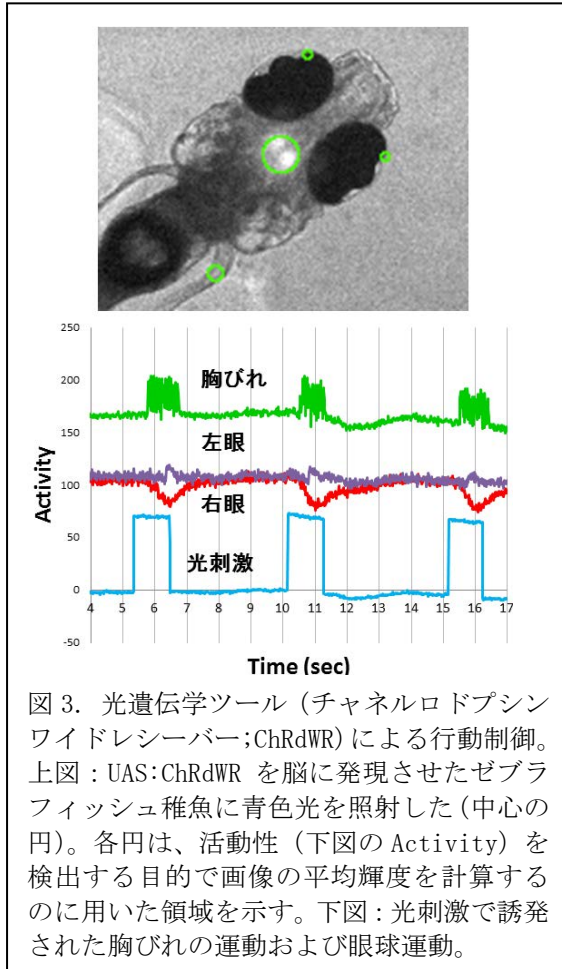


図 3. 光遺伝学ツール (チャンネルロドプシンワイドレシーバー; ChR2) による行動制御。上図: UAS:ChR2 を脳に発現させたゼブラフィッシュ稚魚に青色光を照射した (中心の円)。各円は、活動性 (下図の Activity) を検出する目的で画像の平均輝度を計算するのに用いた領域を示す。下図: 光刺激で誘発された胸びれの運動および眼球運動。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Umeda K, Shoji W, Sakai S, Muto A, Kawakami K, Ishizuka T, Yawo H. Targeted expression of a chimeric channelrhodopsin in zebrafish under regulation of Gal4-UAS system. *Neurosci Res.* 2013 Jan;75(1):69-75. doi: 10.1016/j.neures.2012.08.010. Epub 2012 Oct 5. (査読有り)
- ② Hirata H, Wen H, Kawakami Y, Naganawa Y, Ogino K, Yamada K, Saint-Amant L, Low SE, Cui WW, Zhou W, Sprague SM, Asakawa K, Muto A, Kawakami K, Kuwada JY. Connexin 39.9 protein is necessary

for coordinated activation of slow-twitch muscle and normal behavior in zebrafish. *J Biol Chem.* 2012 Jan 6;287(2):1080-9. doi: 10.1074/jbc.M111.308205. Epub 2011 Nov 10. (査読有り)

- ③ Muto A, Kawakami K. Imaging functional neural circuits in zebrafish with a new GCaMP and the Gal4FF-UAS system. *Communicative & integrative biology* 4 566-568 Sep 2011 (査読無し)
- ④ Muto A, Ohkura M, Kotani T, Higashijima S, Nakai J, and Kawakami K. Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish *PNAS* 2011 ; published ahead of print March 7, 2011, doi:10.1073/pnas.1000887108 (査読有り)
- ⑤ Kawakami K, Abe G, Asada T, Asakawa K, Fukuda R, Ito A, Lal P, Mouri N, Muto A, Suster ML, Takakubo H, Urasaki A, Wada H, Yoshida M. zTrap: zebrafish gene trap and enhancer trap database. *BMC developmental biology* 10 105 Oct 2010, doi:10.1186/1471-213X-10-105 (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Muto A, and Kawakami K. Visualization of functional neural circuits in zebrafish. Tenth International Congress of Neuroethology. College Park, MD USA. Aug 5-10, 2012.
- ② Muto A, Ohkura M, Abe G, Nakai J, Kawakami K. Real-time visualization of the neuronal activity in the brain during visual perception of a natural object. 10th International Zebrafish Genetics and Development. June 20-24, 2012 - Madison, Wisconsin, USA.
- ③ Muto A. Probing visual perception in zebrafish with the improved GCaMP. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Yokohama, Japan. Dec 13-16, 2011.
- ④ Muto A, Nakai J, and Kawakami K. Functional brain imaging with improved GCaMPs in zebrafish. Neuroscience 2011. Annual meeting of the Society for Neuroscience. Nov 12-16, 2011. Washington DC, USA.

- ⑤ Muto A, Nakai J, Kawakami K (2011)  
Calcium imaging of the zebrafish  
visual system with the GCaMP. 第34回  
日本神経科学大会 (Neuro2011) 2011年9  
月14日～16日横浜パシフィコ
- ⑥ Muto A, and Kawakami K. Calcium imaging  
of the zebrafish brain with improved  
GCaMPs. 7<sup>th</sup> European Zebraish Meeting  
July 5-9, 2011. Edinburgh, Scotland.
- ⑦ Muto A, Nakai J, Kawakami K (2010)  
Brain Imaging with Improved GCaMPs in  
Zebrafish. 第33回日本神経科学大会  
(Neuro2010) 2010年9月2日～4日神戸  
コンベンションセンター
- ⑧ Muto A, Ohkura M, Nakai J, and Kawakami  
K. Visualization of neuronal activity  
in zebrafish spinal neurons with an  
improved GCaMP. International Meeting  
on Zebrafish Genetics and Development.  
Madison, WI, USA. June 16-20, 2010.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武藤 彩 (MUTO AKIRA)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教

研究者番号：00525991

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし