

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82648

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2008～2013

課題番号：20115007

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いた、脊椎動物脊髄運動系神経回路の動作原理の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of neuronal circuits that generate locomotion in zebrafish

研究代表者

東島 真一(HIGASHIJIMA, Shinichi)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：80270479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 69,100,000円、(間接経費) 20,730,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の運動系神経回路の詳細は、哺乳動物においては不明な点が多い。本研究では、ゼブラフィッシュ幼魚を用い、特定のクラスの神経細胞を生きのままラベルできる利点を活かして、脊椎動物運動系神経回路の動作原理解明に向けて取り組んだ。その結果、(1) 脊髄内の特殊なクラスの交差型抑制性ニューロンが、逃避運動の方向性に重要な役割を果たすこと、(2) V0ニューロンの発生に、前駆体細胞レベルでの運命決定と、発生時間に依存したニューロン多様性形成の双方が関与していること、(3) 後脳において、転写因子Chx10を発現するニューロンが、遊泳運動の駆動に不可欠な役割を果たしていること、を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Neuronal circuits that generate locomotion in mammals are not well understood. In this study, we studied locomotor circuits in larval zebrafish, by using a number of transgenic zebrafish expressing fluorescent protein in a particular class of neurons. We have revealed the followings: (1) a specialized class of commissural inhibitory neurons play a critical role for determining the direction of an escape behavior, (2) multiple types of V0 neurons are produced by two distinct mechanisms; from heterogeneous p0 progenitors and from the same p0 progenitor, but in a time-dependent manner, (3) Chx10-expressing neurons in the hindbrain play an essential role for providing excitation to the spinal locomotor circuits during zebrafish swimming.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゼブラフィッシュ 運動 神経回路 脊髄

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物のほとんどの行動は、脊髄内介在神経細胞群が作る神経活動が最終的に運動ニューロンの活動を駆動することによって生じる。しかしながら、その脊髄運動系神経回路の詳細は、特に哺乳動物においてはほとんど分かっていない。研究対象として、より単純な脊椎動物を取り上げることにより、神経回路を実際に明らかにする可能性が生まれる。ゼブラフィッシュ幼魚は比較的単純な中枢神経系をもち、また、体が透明であるためにトランスジェニックの手法を用いて蛍光タンパク質を発現させることにより神経細胞の種類の同定をより精密なレベルで行うことができる。我々はこれまでに、トランスジェニックフィッシュを用い、脊髄内に存在する様々なクラスの神経細胞をラベルすることに成功してきた。

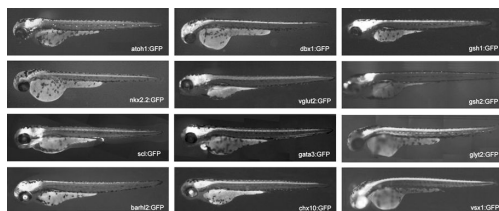
2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究では、ゼブラフィッシュ幼魚を用い、特定のクラスの神経細胞を生きたままラベルできる利点をフルに活かして、脊椎動物脊髄運動系神経回路の動作原理解明に向けて取り組んでいく。分子生物学、解剖学、イメージング、電気生理学、光遺伝学等の広範な手法を総動員して、脊椎動物脊髄運動系神経回路の動作原理解明に向けて研究を進めていく。

3. 研究の方法

(1) 脊髄運動系神経回路の解剖学的解析

脊髄において少数の細胞群で発現する転写因子が数多く見いだされてきている。これら転写因子の発現は、神経細胞の個性と密接にリンクしていると考えられている。これら転写因子に関して、蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックフィッシュを作製して、脊髄運動系神経回路の解剖学的解析を進める。共焦点顕微鏡による観察を主として研究を進める。



本研究で作製したさまざまなトランスジェニックフィッシュ

(2) 逃避運動に関与する脊髄神経回路の機能解析

幼魚の逃避運動を駆動する脊髄内神経回路を詳しく解析する。動物が危険な敵や刺激からすばやく逃げる運動は、生存にどうしても必要で、最大の効率で実現されることが求められる。それぞれの動物は、可能な限り俊敏に遠ざかるために、最適化された神経回路を獲得したと考えられる。この逃避運動を司

る神経回路を調べることで、神経回路の動作原理に迫ることを目指す。

(3) 脊髄内V0ニューロンの詳細な解析

脊椎動物脊髄発生において、転写因子 Dbx1 を発現する領域(以下、p0 ドメイン)からは、主に交叉型介在ニューロンが生じることが示されている(以下、V0 ニューロン)。交叉型介在ニューロンは左右の協調運動について重要な役割を果たすことが期待されるが、V0 ニューロンの詳しい役割は明らかにされていない。V0 ニューロンの役割を調べるために、その発生様式から機能解析までの詳しい解析を進める。

(4) Chx10 発現神経細胞 (V2a ニューロン) の機能解析

脊髄、および後脳において、転写因子 Chx10 を発現する神経細胞(以下、V2a ニューロン)は、同側投射性の興奮性ニューロンであり、遊泳運動に重要な役割を果たしていることが示唆されている。この V2a ニューロンについて、光遺伝学、電気生理学を用いて、遊泳運動に果たす役割を詳細に解析する。

4. 研究成果

(1) 脊髄運動系神経回路の解剖学的解析

研究期間全般(平成 20-24 年度)を通じて、研究の方法(1)に記載した研究について解析を進めた。すなわち発生期の脊髄において、少数の神経細胞、ないし神経前駆細胞で発現する数多くの転写因子を取りあげ、それら陽性細胞で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックフィッシュを作製した。得られたトランスジェニックフィッシュを用いて、脊髄神経回路の体系的な解析を進めた。また、神経伝達物質特性(グルタミン酸、グリシン、GABA)に密接にリンクする遺伝子(それぞれ、vglut2, glyt2, gad)に関してトランスジェニックフィッシュを作製し、上記の転写因子陽性細胞の伝達物質特性を体系的に解析した。

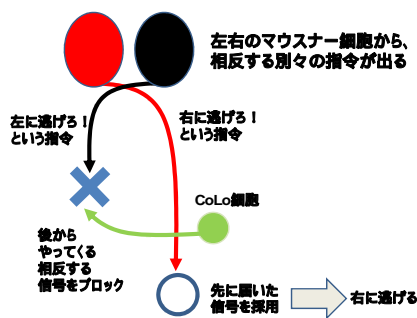
(2) 逃避運動に関与する脊髄神経回路の機能解析

平成 20 年度から 21 年度までに、研究の方法(2)に記載した研究、すなわち、逃避運動に関する神経回路の詳しい解析を進めた。ゼブラフィッシュを含めた硬骨魚類の後脳にはマウスナー細胞と呼ばれる、一対の大きな細胞が存在する。マウスナー細胞は、その軸索を反体側の脊髄にまで伸ばし、脊髄の中で運動ニューロンなどとシナプスを作っている。マウスナー細胞が発火すると、魚の逃避運動が引き起こされる。逃避運動と同時に、脊髄の反対側にはすばやい抑制がかかることが示されていた。しかし、この素早い抑制が行動レベルでどのような役割を果たすか

は明らかとなっていなかった。

我々は東京大学武田洋幸研究室と共同研究を行い、脊髄においてある種の介在神経（以下、CoLo とよぶ）が GFP で標識されているエンハンサートラップラインを見いだした。CoLo ニューロンの詳しい解析を行ったところ、これらはマウスナー細胞から電気シナプスの入力を受けてすぐさま発火する交差型抑制性ニューロンであることが分かった。すなわち、CoLo ニューロンは、逃避運動の際に反対側にすばやい抑制を送る神経細胞であったわけである。

CoLo ニューロンの行動レベルでの機能を調べるため、レーザー照射により CoLo ニューロンを除去し、その幼魚の逃避運動を調べた。音・振動刺激により逃避運動を引き起こすと、コントロール幼魚は左右どちらかへスムーズに逃避運動を行うが、CoLo を除去した幼魚は、しばしば硬直してどちらにも動けない、という表現型を示した。CoLo を除去すると同時に、左右のマウスナー細胞のどちらか一方をレーザー除去しておく、このような表現型はいっさい見られなかった。したがって、硬直の表現型が起きるときは、左右のマウスナー細胞の両方が発火していることを強く示唆している。すなわち今回の研究により、幼魚が逃避運動を行う際には、左右のマウスナー細胞の両方が発火することが起こりうる、マウスナー細胞の両方が発火してしまっても、CoLo 細胞が担う素早い抑制のおかげで、魚は左右のどちらかへ逃避運動を行うことが可能である、の2点が示された。すなわち、逃避運動の際には、脳内の情報処理のみならず、脊髄レベルでの下降性コマンドの取捨選択が非常に重要な役割を果たしていることを示すことに成功した。この結果は、J. Neuroscience に論文発表を行った (Satou et al., 2009)。

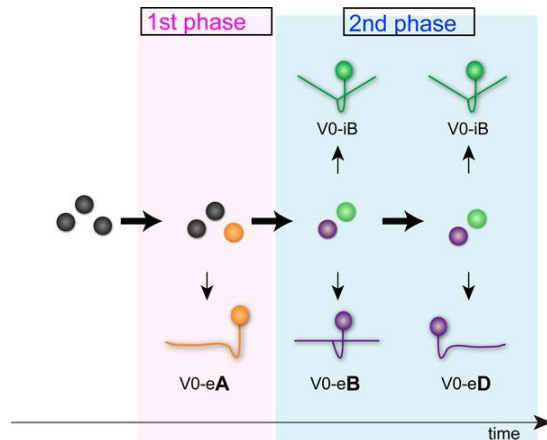


(3) 脊髄内V0ニューロンの詳細な解析

平成 21 年度から 22 年度までに、研究の方法(3)に記載した研究について解析を進めた。まず、p0 ドメインから誕生する神経細胞を、トランスジェニックフィッシュを用いて蛍光たんぱく質で可視化し、ドメイン内のサブタイプの全貌を明らかにした。その結果、3種類のグルタミン酸作動性の興奮性細胞と2種類の抑制性細胞（グリシン作動性と G A

B A 作動性の神経細胞)が誕生することを明らかにした。

次に、その多様性がどのような法則に基づいて作り出されるのかを明らかにするために、ひとつの神経前駆体細胞が生み出す神経細胞の全貌を明らかにするために、長期タイムラプスイメージングを行い、興奮性細胞と抑制性細胞は異なる前駆体細胞から誕生することを明らかにした。さらに、3種類の興奮性細胞のうち、1種類は特別な前駆体細胞から分裂を伴わず、他の細胞の分化するタイミングに先駆けて分化し、残りの2種類の興奮性細胞は同じ前駆体細胞が時間とともに異なる2種類の興奮性細胞を生み出すことを明らかにした。このように、p0 ドメイン内の神経細胞の多様性は、複数のメカニズムが複雑にからみあって多様性を作り出されていることが明らかとなった。この V0 ニューロンの発生機構に関する研究は、J. Neuroscience に論文発表を行った。(Satou et al., 2012)。

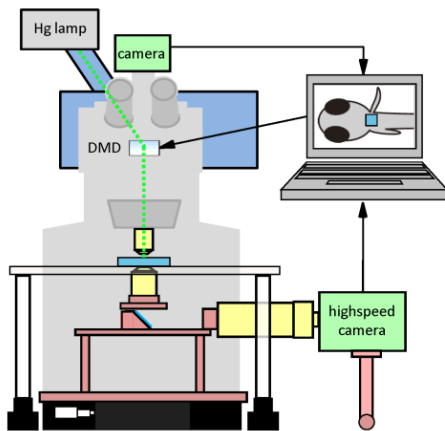


(4) Chx10 発現神経細胞 (V2a ニューロン) の機能解析

平成 22 年度から 24 年度までに、研究の方法(4)に記載した研究、すなわち、Chx10 発現神経細胞 (V2a ニューロン) の機能解析を行った。我々は以前に、脊髄 V2a ニューロンが、すべて同側下行性神経細胞であり、またグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞であることを明らかにしている。また、運動ニューロンとの2細胞同時記録を行うことにより、それらが遊泳運動中にリズム的に発火し、運動ニューロンに直接シナプス結合していることを示している。すなわち、脊髄 V2a ニューロンは、遊泳運動において、運動ニューロンの活動を cycle-by-cycle にリズム的に制御する神経細胞であることを報告している (Kimura et. al., J. Neuroscience, 2006)。

本研究では、脊髄から一続きに存在している後脳 V2a ニューロンに着目して研究を進めた。我々はまず、「後脳 V2a ニューロンは脊髄遊泳系運動神経回路全般をドライブする神経細胞群である」との仮説を立て、この仮説を、光遺伝学を用いて検証することを試

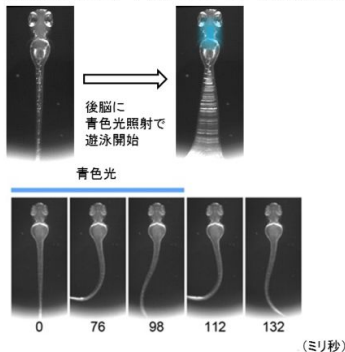
みた。この目的のため、光刺激を行うことと同時に幼魚の運動をモニターする下図の顕微鏡システムを組み上げた。



ハイスピードカメラで運動状況をモニターしながら、狙った場所へ光刺激を行い、神経活動に摂動を加える。幼魚は胸びれの部分以外は寒天へマウントする。

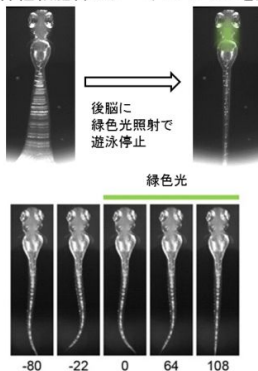
このシステムを用い、後脳 V2a 群でチャンネルロドプシンを発現する幼魚に光刺激を行ったところ、100%に近い頻度で幼魚は遊泳運動を開始した。

V2a 神経細胞群にチャンネルロドプシンを遺伝子発現させた魚



次に、後脳 V2a 群でアーキロドプシンを発現する幼魚に光刺激を行ったところ、100%に近い頻度で幼魚は遊泳運動を停止した。

V2a 神経細胞群にアーキロドプシンを遺伝子発現させた魚



これらの実験結果により、後脳 V2a ニューロン群は、脊髄遊泳系運動神経回路をドライブ

するのに必要十分な役割を果たすことを明らかにした。

また、後脳 V2a ニューロンに対して電気生理学的解析を行い、仮想遊泳運動中の発火パターンを調べた。その結果、遊泳リズムと強く関連した発火パターンを示す細胞群と、遊泳リズムと発火パターンの相関が非常に低い細胞群の双方が存在することが明らかになった。従来、V2a ニューロンと形態的に相同な網様体脊髄路ニューロンの発火パターンが遊泳リズムと相関するかについては様々な見方があった。本研究では、後脳 V2a ニューロンには多様性があり、トニックなものトリズミックなもの両方があることを示した。

この後脳 V2a ニューロンの機能解析に関する研究は、Current Biology に論文発表を行った (Kimura et al., 2013)。

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 6 件)

Kimura, Y., Satou, C., Fujioka, S., Shoji, W., Umeda, K., Ishizuka, T., Yawo, H., and Higashijima, S. (2013). Hindbrain V2a neurons in the excitation of spinal locomotor circuits during zebrafish swimming. Current Biology 査読あり

Eklöf-Ljunggren, E., Haupt, S., Ausborn, J., Dehnisch, I., Uhlén, P., Higashijima, S., and El Manira, A. (2012). Origin of excitation underlying locomotion in the spinal circuit of zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)109, 5511-5516. 査読あり

Satou, C., Kimura, Y., and Higashijima, S. (2012). Generation of multiple classes of V0 neurons in zebrafish spinal cord: progenitor heterogeneity and temporal control of neuronal diversity. J. Neuroscience 32, 1771-1783. 査読あり

Koyama, M., Kinkhabwala, A., Satou, C., Higashijima, S., and Fetcho, J.R. (2011). Mapping a sensory-motor network onto a structural and functional ground plan in the hindbrain. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 108, 1170-1175. 査読あり

Kinkhabwala, A., Riley, M., Koyama, M., Monen, J., Satou, C., Kimura, Y., Higashijima, S., and Fetcho, J.R. (2011). A structural and functional ground plan for neurons in the hindbrain of zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 108, 1164-1169. 査読あり

Satou, C., Kimura, Y., Kohashi, T.,

Horikawa, K., Takeda, H., Oda, Y., and Higashijima, S. (2009). Functional role of a specialized class of spinal commissural inhibitory neurons during fast escapes in zebrafish. J. Neuroscience 29, 6780-6793. 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

東島、木村、佐藤 “Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish” 第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日、名古屋

Higashijima, S. “Development of V2 and V0 neurons in zebrafish spinal cord” 19th biennial meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN-2012), 2012 年 1 月 13 日、ムンバイ (インド)

東島、木村、佐藤 “Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish” 第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月 13 日、横浜

東島、木村、佐藤 “Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish” 第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 15 日、横浜

Higashijima, S. “Development and function of V2 neuron in zebrafish spinal cord” 2nd Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology, 2010 年 5 月 27 日、パリ (フランス)

東島、佐藤、木村 “Development and function of spinal locomotor circuits in zebrafish” 第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16 日、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :

番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
東島 眞一
(HIGASHIJIMA, Shinichi)
大学共同利用機関自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・准教授

研究者番号 : 80270479

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :