

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20907

研究課題名(和文) 光遺伝学を用いた小脳神経回路における区画構築の統合的解析

研究課題名(英文) The mechanism of compartmentalization of the cerebellar circuitry: an optogenetic approach using zebrafish

研究代表者

津田 佐知子 (TSUDA, Sachiko)

埼玉大学・研究企画推進室・助教

研究者番号：80736786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物において近年小脳は形態・機能的な区画を成し、知覚や運動情報の処理を行うことが示唆されている。我々は、ゼブラフィッシュに光技術(神経活動イメージング、光遺伝学)と行動実験(視覚・触覚)を組合せた実験系を作成し、これを用いた解析により、小脳発生における機能的区画の一部を同定した。また、小脳区画の3次元性、発生の進行に伴う変遷について、その一端を明らかにした。さらに、神経活動の直接的かつ高速観察が可能となる膜電位イメージングについて、新規膜電位センサーASAP1がゼブラフィッシュ脳において活動記録に使用可能であることを初めて示した。

研究成果の概要(英文)：Although the general anatomical organization of the cerebellar neural circuitries is well defined, their functional development is still unresolved. To address this issue, especially focusing on cerebellar compartmentalization, we have applied optical approaches and behavior analysis to zebrafish. We conducted high-speed calcium imaging of neural activities of cerebellar Purkinje cells, which was combined with behavioral tests, such as optokinetic response (OKR) test and tactile stimulation. Specific populations of Purkinje cells were found to be activated during these tests, and their distribution patterns tend to differ along D-V axis. Furthermore, OKR was repressed by optogenetic stimulation targeting the activated regions. These findings suggest the structure and roles of the functional compartments in the developing cerebellum. We have also succeeded in detecting neuronal activities in zebrafish brain by using newly-developed voltage sensors, ASAP1.

研究分野：神経発生学

キーワード：小脳神経回路 区画形成 ゼブラフィッシュ 活動イメージング 光遺伝学 膜電位センサー

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物において小脳は外界からの様々な知覚入力を処理し、行動を精緻に制御している。近年、小脳が形態・機能的な区画を成しており、これが小脳の機能単位(モジュール)として、その高速かつ精緻な感覚運動統合に重要な役割を持つことが示唆されている。

一方、小脳区画の神経回路レベルでの知見は未だ限られており、また区画の機能やその構築機構も未解明である。そこで、小脳区画の神経基盤やその形成メカニズムを明らかにすることを目的とし、小型魚類ゼブラフィッシュを用いて光技術・行動実験などを組合せた研究を実施する。

2. 研究の目的

本研究では、光技術や生理学的解析に適したゼブラフィッシュを用い、小脳における区画構築の神経基盤を明らかにすることを目的とする。

これまでに開発した、光遺伝学と神経活動イメージングを組み合わせ、ニューロン集団の活動制御と記録を光を用いて行う実験システムや、細胞レベルでの *in vivo* イメージングに加え、行動実験、生理学的手法を駆使することにより、小脳区画研究のための強力な解析系を得る。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュ小脳における区画の解剖学・生理学的同定

視覚刺激・触刺激に伴う神経活動によって生じる機能的区画を、*in vivo* 神経活動イメージング(カルシウムイメージング)などにより可視化する実験系を作成した。視覚刺激においては、ストライプパターンをスクリーンに照射してゼブラフィッシュ胚に提示し、これに伴う眼球の運動を赤外光高速観察により観察した(Optokinetic Response テスト)。また、触刺激においては、ガラス電極を用い体幹部において電気刺激を行った。これらの実験系を組み合わせ、発生中のゼブラフィッシュにおける小脳区画を観察した。

(2) 新規膜電位センサーのゼブラフィッシュ脳における利用の検討

新たに作成された膜電位センサー (Genetically encoded voltage sensor) 2 種について (Accelerated Sensor of Action Potentials 1 (ASAP1), Quality superior to Arch(QuasAr2))、ゼブラフィッシュ UAS 系統を作成した。これを用いて、ニューロンにおいて各膜電位センサーが細胞膜に分布するのか、共焦点顕微鏡観察により検討した。さらに、これを用いた神経活動の記録がゼブラフィッシュにおいて可能かを明らかにするため、生理学的解析を行った。

(3) 小脳区画の形成過程の解析

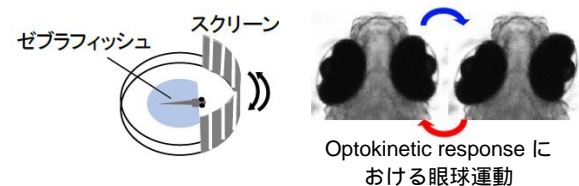
上において同定された小脳区画に注目し、発生段階に沿って 4 次元的に解析、比較した。

さらに、パターン照明を可能とする Digital Micromirror Device を用いた光遺伝学刺激を行動実験と同時にを行い、特定のプルキンエ細胞集団の役割について検討した。

4. 研究成果

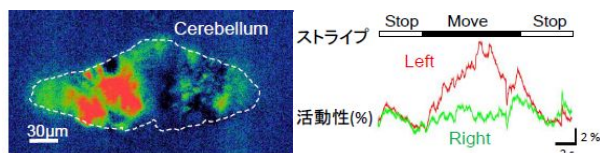
(1) ゼブラフィッシュ小脳における区画の解剖学・生理学的同定

小型魚類ゼブラフィッシュに、複数の光技術(神経活動イメージング、光遺伝学)と行動実験を組み合わせた解析システムを作成した。小脳へ入力する知覚情報としてまず視覚刺激(ストライプをゼブラフィッシュ稚魚に提示)を用いた Optokinetic Response 行動実験を用いた(下図)。さらに、体幹部における電気刺激による触刺激実験系も作成し用いた。



これらに伴い活動上昇を示す小脳領域を同定するため、小脳プルキンエ細胞特異的にカルシウムセンサー (GCaMP6) を発現するゼブラフィッシュ系統を用いた高速イメージングを行動実験と同時に行った。その結果、視覚・触刺激によりそれぞれ特定のプルキンエ細胞集団が応答していた(下図)。さらに、細胞レベルでの解析により、応答を示したプル

キンエ細胞集団には、応答パターンの異なる複数の集団が存在することを見出した。



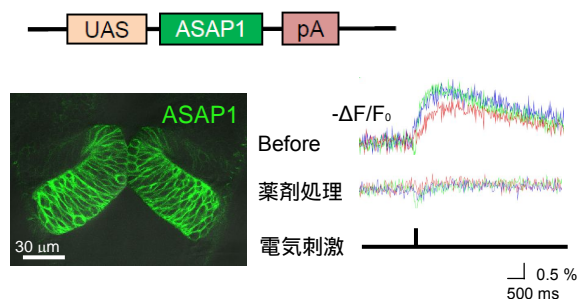
(2) 新規膜電位センサーのゼブラフィッシュ小脳における利用の検討

神経活動の高速かつ直接的な観察が可能な膜電位イメージングを、ゼブラフィッシュ小脳に用いることを目指し、新規に開発された膜電位センサー 2 種 (ASAP1, QuasAr2) について、遺伝子組換えゼブラフィッシュ系統を作成した (UAS:ASAP1, UAS:QuasAr2)。

Gal4-UAS 遺伝子発現系を用い、全ニューロンや小脳の特定ニューロンに ASAP1 を発現させた結果、ASAP1 がニューロンの細胞膜へ局在することが確認された。

さらに、小脳における電気刺激と高速イメージングを組合せた解析により、電気刺激に伴い刺激電極付近の小脳領域において蛍光強度変化が見出された。この応答は、神経活動を阻害する薬剤処理により消失したことから、ASAP1 を用いた高速イメージングにより、ゼブラフィッシュ胚における神経活動の検出が可能であると結論した (下図)。

一方、QuasAr2 については、UAS:QuasAr2 遺伝子組換え系統の作成には成功したが、この系統を用いた複数の観察により、QuasAr2 の細胞膜への局在が観察されなかった。



(3) 小脳区画の形成過程の解析

視覚刺激実験において応答を示すプルキンエ細胞集団について、その分布パターンと活

動性を、3 次元のかつ異なる発生段階について比較した。その結果、応答を示すプルキンエ細胞は、小脳においてクラスターを成し 3 次元的に分布すること、またこの分布パターンは発生段階の進行と共に変化するという傾向を見出した。

さらに、光遺伝学を用いたプルキンエ細胞の活動制御実験により、視覚入力に伴い活動上昇を示すプルキンエ細胞集団が、Optokinetic response に特徴的な眼球運動に重要であることを示した。

これらの結果は、ゼブラフィッシュ小脳において、形成段階にある小脳区画の生理学的、また構造的な特徴を見出したものと考えられ、小脳区画の神経基盤とその形成メカニズムの一端を明らかにしたものといえる。

また、新規膜電位センサー ASAP1 を用いた活動イメージングについては、ゼブラフィッシュ小脳において神経活動の記録に成功した初めての例である。今後は、これらの複数の光技術を応用し、小脳の神経ネットワーク形成の 4 次元解析を進める予定である。

本研究の成果の一部は、現在、下記論文としてまとめられ、投稿中である。

Optical interrogation of zebrafish cerebellar circuitry by genetically encoded voltage sensors.

Hiroaki Miyazawa, Kazuhiro Maruyama, Kyo Yamasu, Sachiko Tsuda

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 1 件)

[1] Anupom Mondal, Kouhei Koyama, Takashi Mikami, Taichi Horita, Shota Takemi, Sachiko Tsuda, Ichiro Sakata, Takafumi Sakai, Underlying mechanism of the cyclic migrating motor complex in *Suncus murinus*: a change in gastrointestinal pH is the key regulator. *Physiological Reports*, Vol. 5 (1) e13105, 2017.

[学会発表] (計 6 件)

(口頭発表、国際)

[1] Tsuda S, Dynamic migration of cell populations and functional compartmentalization in cerebellar development: 4D imaging in zebrafish, 7th Asia Oceania Zebrafish Meeting, Singapore, 2016.

[2] Tsuda S, Functional organization of cerebellar circuitry and its development, 第22回国際動物学会第87回日本動物学会大会合同大会, 沖縄, 2016年。(招待講演)

(口頭発表、国内)

[3] Tsuda S, Kinno R, Miyazawa H, Yamasu K, Structural and functional compartmentalization in cerebellar circuitry development: 4D imaging in zebrafish, 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016年.

[4] Tsuda S, Yamasu K, Probing the developmental process of functional circuitry in the cerebellum: an all-optogenetic approach in zebrafish, 第38回日本神経科学大会, 神戸, 2015年.

[5] Tsuda S, Yamasu K, Dynamic migratory behaviors of gbx2-expressing cells during brain compartmentalization -4D imaging in zebrafish embryos-, 第48回日本発生生物学会年会, つくば, 2015年.

(ポスター発表、国内)

[1] Tsuda S, Hiyoshi K, Maruyama K, Miyazawa H, Kinno R, Yamasu K, Morphological and functional analysis of compartmentalization in cerebellar development, 第22回小型魚類研究会, 岡崎, 2016年.

(図書)(計1件)

[1] Ryuichi Nakajima, Sachiko Tsuda, Jinsook Kim, George Augustine, Optogenetics Enables Selective Control of Cellular Electrical Activity. "Molecular Neuroendocrinology: From Genome to Physiology", Wiley-Blackwell, 488 (275-300), 2016.

(その他)

ホームページ等

<http://www.saitama-u.ac.jp/iron/tt/researchers/%E6%B4%A5%E7%94%B0-%E4%BD%90%E7%9F%A5%E5%AD%90>

6. 研究組織

(1)研究代表者

津田 佐知子 (TSUDA, Sachiko)
埼玉大学・研究企画推進室・助教
研究者番号: 80736786

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし