

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：82675

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07022

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いた、前庭脊髄路による脊髄運動系回路制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of vestibulospinal pathways regulating spinal motor circuits using zebrafish

研究代表者

木村 有希子 (Kimura, Yukiko)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・助教)

研究者番号：70581122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物において前庭から脊髄の運動ニューロンに平衡感覚情報を伝える神経経路の詳細は分かっていない。この経路を明らかにするために、単純な神経系を持つゼブラフィッシュ仔魚を用いて研究を行った。前庭脊髄路ニューロンを蛍光タンパク質で同定可能なトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。平衡感覚刺激を与えたときに活動する前庭脊髄路ニューロン及び、各種脊髄介在ニューロンを同定するために、ゼブラフィッシュ仔魚に前庭刺激を与えながらこれらのニューロンの活動をイメージングすることのできる顕微鏡を新たに作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前庭脊髄路は、脊椎動物が前庭に存在する感覚器で感知した重力の情報に基づいて姿勢制御を行う際に重要な経路のひとつである。しかし、前庭脊髄路ニューロンがどのような脊髄ニューロンを經由して、前庭からの情報を脊髄に伝えているかは詳しくは分かっていない。本研究では、哺乳類等に比べ単純な神経回路を持つゼブラフィッシュ仔魚を用いることで、網羅的かつ、詳細な前庭脊髄路の解析を行うことのできる実験系の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：The neural pathway by which information from the vestibular system reaches the spinal cord has not been well characterized. To investigate this pathway, we used zebrafish larvae, which have a simple nervous system. We generated transgenic fish in which vestibulospinal neurons are identifiable with fluorescent proteins. To identify neurons activated by vestibular stimulation, we made new microscope systems that allow us to image activities of these neurons during vestibular stimulation.

研究分野：神経科学

キーワード：ゼブラフィッシュ 前庭脊髄路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物は運動する際、また、一定の姿勢を保持する際にも、常に平衡感覚器で重力を感知することで自分の体の傾きを測り、姿勢制御を行っている。脊椎動物においては、内耳前庭器官に存在する平衡感覚器から得られた情報に基づいて体幹や四肢の筋肉を制御し姿勢を安定させる経路として、前庭脊髄路が重要な役割を果たしていることが知られている。その重要性から、哺乳類などを用いた前庭脊髄路の研究は長い歴史があるが、前庭脊髄路による脊髄運動系神経回路の制御機構に関しては、未だに限られた情報しか得られていない。

前庭脊髄路は前庭神経核内にある脊髄投射ニューロン(前庭脊髄路ニューロン)から成る。前庭脊髄路ニューロンは運動ニューロンを直接制御することもあるが、脊髄介在ニューロンを介した多シナプス性に運動ニューロンを制御することもあると考えられている。しかし、前庭脊髄路ニューロンが脊髄に存在する様々なタイプの介在ニューロンのなかで、どのタイプのニューロンとシナプス結合をし、脊髄運動回路をどのように制御するかは、ほとんど分かっていない。

従来、上記の研究が困難であった理由としては、以下の2つが考えられる。ひとつの理由は、哺乳類など体が大きく、複雑な神経系を持つ動物を実験に用いた場合、前庭脊髄路ニューロンと脊髄ニューロンの活動を記録し、平衡感覚刺激を与える実験系が複雑であったことである。もうひとつの理由は前庭脊髄路ニューロンや、様々なタイプの脊髄介在ニューロンを同定する手法が乏しかったことである。

本研究では、ゼブラフィッシュ仔魚を材料に用いることで、上記の困難を克服できると考えた。ゼブラフィッシュ仔魚は、脊椎動物の前庭脊髄路の基本的回路を保ちながら、哺乳類に比べて単純な神経回路を持つ。ゼブラフィッシュ仔魚は既に機能する耳石器官を持ち、前庭脊髄路ニューロンは片側10個程度と少数である。この単純さにより、電気生理など、様々な神経回路解析が哺乳類に比べて容易になる。また、仔魚の体は透明で、全長が4mm程度と小型であることから、カルシウムイメージングも容易である。後述する平衡感覚刺激とイメージングの組み合わせで、従来に比べてはるかにシンプルな実験系が組める。さらに、ゼブラフィッシュ仔魚においては、様々なタイプのニューロンを遺伝学的に同定する手法が確立している。これまでの研究で我々は、脊髄及び脳幹の様々なタイプのニューロンに蛍光タンパク質や光遺伝学ツールを発現させた遺伝子組み換えゼブラフィッシュを多数作製し、その魚を電気生理学的及び光遺伝学的に解析し、運動系回路を明らかにしてきた。本研究においてもこの手法を応用し、前庭脊髄路ニューロンや、様々なタイプの脊髄介在ニューロンを同定することは容易であると考えられた。以上の背景により、研究開始当初には、ゼブラフィッシュを用いることで、未解明である前庭脊髄路による脊髄運動系神経回路の制御機構の詳細な解析を進めることができる状況にあった。

2. 研究の目的

脊椎動物が平衡感覚刺激を与えられたときに、前庭脊髄路ニューロンがどのように反応し、どのようなタイプの脊髄介在ニューロンを介して、運動ニューロンを制御して姿勢制御を行うのかを、ゼブラフィッシュ仔魚を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 平衡感覚刺激で活動する前庭脊髄路ニューロンを同定可能な遺伝子組み換え魚の作成

ゼブラフィッシュ仔魚の前庭脊髄路ニューロンを同定するために、Neurofilament, medium polypeptide a (nefma)をマーカーとして用いた。nefmaは長い軸索を持つ巨大な神経細胞に発現する傾向があり、前庭脊髄路ニューロンにも強い発現が見られる。nefmaを発現する細胞でGFPやカルシウム感受性蛍光タンパク質を発現する遺伝子組み換え魚を作成し、前庭脊髄路ニューロンを可視化した(図1)。

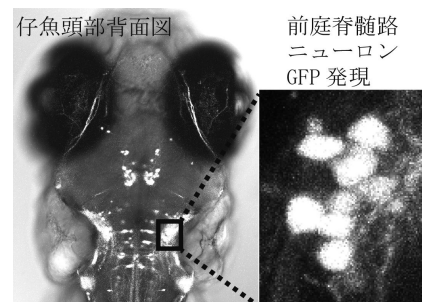


図1 前庭脊髄路ニューロンを可視化した遺伝子組み換え魚

(2) 様々な種類の脊髄ニューロンにカルシウム感受性蛍光タンパク質を発現させた遺伝子組み換え魚の作成

脊髄では、モルフォゲンの濃度勾配により、様々な転写因子の発現が背腹軸に沿ったドメイン状に生じることで、様々なタイプの介在ニューロンが生まれる。これらの転写因子発現をマーカーにして介在ニューロンの種類を同定することができる。平衡感覚刺激で活動する脊髄ニューロンの種類を調べるために、これらの転写因子の発現を利用して、各種タイプの脊髄ニューロンにカルシウム感受性蛍光タンパク質を発現させた遺伝子組み換え魚を作成した。

(3) 平衡感覚刺激中の前庭脊髄路ニューロンおよび脊髄ニューロンの活動を観察可能な顕微鏡セットの作成

研究協力者の谷本昌志博士と共同で、姿勢制御に関わるニューロン群の活動を可視化するために、平衡感覚刺激中にゼブラフィッシュ仔魚ニューロン群のカルシウムイメージングを可能にするカスタム顕微鏡の設計及び構築を行った。カスタム顕微鏡は、電動回転ステージにミラー・対物レンズ・試料保持台等の光学部品を取り付け、チューブレンズ・ニポウディスク式共焦

点スキャナユニットおよび sCMOS カメラと接続して構築し、これにより仔魚に傾斜刺激を与えながらニューロン活動を撮像することを可能にした。

4. 研究成果

(1) 平衡感覚刺激中の前庭脊髄路ニューロンおよび脊髄介在ニューロンのカルシウムイメージング解析

研究目的を達成するために、平衡感覚刺激中に活動する前庭脊髄路ニューロンと脊髄介在ニューロンをカルシウムイメージングで同定し、その後、イメージングで同定した前庭脊髄路ニューロンと脊髄介在ニューロンの結合を調べる実験を計画した。

まず、3(3)で構築した顕微鏡を用いて、3(1)で作成した魚の仔魚を回転させて平衡感覚刺激を与えた際の前庭脊髄路ニューロンの反応を明らかにした。また、同様に、3(2)で作成した魚を用いて、複数のタイプの脊髄介在ニューロンで、平衡感覚刺激を与えた際の活動変化を観察した。これらの実験により、平衡感覚刺激によるニューロンの活動変化の傾向を調べることができた。しかし、ステージの回転によって生じる光路のゆがみに伴う画像のアーティファクトの問題があり、正確な活動を捉えるには至らなかった。

この問題を解決するために、2波長分離投影装置を挿入してカルシウム指示蛍光タンパク質(緑色)とカルシウム非感受性の蛍光タンパク質(赤色)の蛍光を同時取得し、個々のニューロンにおいてそれらの比を算出することで真のカルシウム応答を可視化することに成功した。

今後は、観察対象ニューロンにカルシウム指示蛍光タンパク質とカルシウム非感受性の蛍光タンパク質を発現させた遺伝子組み換え魚を作成することで、平衡感覚刺激による前庭脊髄路ニューロンおよび、脊髄介在ニューロンの正確な活動変化を調べる計画である。

本研究の目的である前庭脊髄路ニューロンから脊髄介在ニューロンの結合パターンを明らかにすることは、本研究計画期間内には達成できなかったが、本研究では、平衡感覚刺激を与えたときのニューロンの反応を非侵襲的に捉えることのできる実験系を新たに開発できた。今後、平衡感覚刺激中に活動する前庭脊髄路ニューロンと脊髄介在ニューロンをイメージングで同定し、それらの結合パターン解析を電気生理学的手法等を用いて進めることができるようになった。また、新たに開発した顕微鏡を用いることで、前庭脊髄路のみならず、平衡感覚処理に関わるニューロンを網羅的に解析することもできると期待される。

(2) 平衡感覚刺激中の前庭脊髄路ニューロンの電気生理学的解析

3(1)で作成した *nefma* を発現する細胞で GFP を発現する遺伝子組み換え魚を用いて、前庭脊髄路ニューロンの電気生理学的解析を行う共同研究を Martha W. Bagnall 博士 (Washington University) が率いるグループと行った。この研究では、魚を可動式の台に載せながら、GFP で可視化した前庭脊髄路ニューロンから全細胞記録を行った。多方向に台を動かして、直線加速度を変化させた際に個々の前庭脊髄ニューロンが受ける興奮性シナプス後電流を調べることで、前庭からの異なる求心性入力の前庭脊髄ニューロンに収束するパターンを明らかにし、前庭からの入力がかどのようにチューニングされているかを明らかにした。この成果は bioRxiv で査読前公開した。

(3) 光変換型蛍光タンパク質を用いた単一細胞の可視化

本研究の本筋とは直接関係しないが、前庭脊髄路ニューロンの単一細胞の脊髄投射領域を調べる研究に将来的に利用するために、単一細胞の形態を簡便に調べる方法を新たに開発する共同研究に参加した。光変換型蛍光タンパク質である Dendra2 を 2 種類の光で色変換することで、従来に比べ空間精度の良い光変換を可能にする方法で、Dendra2 を発現させた多数の細胞の中から、単一細胞のみの Dendra2 色変換を行い、形態を観察することが可能になる。この方法は、汎用型の共焦点顕微鏡で実行可能であり、極めて実用性が高い。この成果は論文に発表した (Taniguchi et al., 2017)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Taniguchi Atsushi, Kimura Yukiko, Mori Ikue, Nonaka Shigenori, Higashijima Shin-ichi	4. 巻 59
2. 論文標題 Axially-confined in vivo single-cell labeling by primed conversion using blue and red lasers with conventional confocal microscopes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Development, growth & differentiation	6. 最初と最後の頁 741 ~ 748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12412	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kimura Yukiko, Higashijima Shin-ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulation of locomotor speed and selection of active sets of neurons by V1 neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41467-019-09871-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Callahan Rebecca A, Roberts Richard, Sengupta Mohini, Kimura Yukiko, Higashijima Shin-ichi, Bagnall Martha W	4. 巻 8
2. 論文標題 Spinal V2b neurons reveal a role for ipsilateral inhibition in speed control	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e47837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.7554/eLife.47837	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Satou Chie, Sugioka Takumi, Uemura Yuto, Shimazaki Takashi, Zmarz Pawel, Kimura Yukiko, Higashijima Shin-ichi	4. 巻 30
2. 論文標題 Functional Diversity of Glycinergic Commissural Inhibitory Neurons in Larval Zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3036 ~ 3050.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yukiko Kimura, Shin-ichi Higashijima
2. 発表標題 En1 positive neurons in the spinal cord shut down slow swimming circuits during fast swimming
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kimura Y, Higashijima S
2. 発表標題 Properties and function of V1 spinal neurons in motor circuits of zebrafish
3. 学会等名 The 87th meeting of Zoological Society of Japan
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	谷本 昌志 (Tanimoto Masashi)		