

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 特定領域研究  
 研究期間： 2005 ～ 2009  
 課題番号： 17023029  
 研究課題名（和文） 後脳の分節構造にもとづいて構築された機能回路  
 研究課題名（英文） Functional organization of segmentally homologous neurons in hindbrain

研究代表者  
 小田 洋一 (ODA YOICHI)  
 名古屋大学・大学院理学研究科・教授  
 研究者番号： 00144444

研究成果の概要（和文）：ゼブラフィッシュの後脳の隣り合う分節に繰り返して発現する網様体脊髄路(Reticulospinal, RS)ニューロン群の活動を光学的に計測した結果、第4分節に左右一対存在するマウスナー(Mauthner, M)細胞は、聴覚によって逃避運動を駆動するときに活動し、第5, 6分節に存在しM細胞と形態学的に相同なRSニューロンは触覚による逃避運動において活動することを見出した。これは分節構造にしたがって配置された相同なニューロン群の機能的な分化を示している。

研究成果の概要（英文）：Functional organization of segmentally homologous neurons in hindbrain

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	16,900,000	0	16,900,000
2006年度	13,800,000	0	13,800,000
2007年度	11,800,000	0	11,800,000
2008年度	8,400,000	0	8,400,000
2009年度	8,500,000	0	8,500,000
総計	59,400,000	0	59,400,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経筋肉生理学

キーワード：マウスナー細胞，後脳，分節，網様体脊髄路ニューロン，逃避運動，ゼブラフィッシュ

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の脳は、外胚葉由来の神経上皮から形成された神経管が、吻尾軸方向に前脳胞・中脳胞・後脳胞に領域化され、さらにいくつかの分節に分かれて出来上がっていく。分節にはそれぞれ特異的な形態形成因子が発現し、特異的なニューロンが分化し回路を形成し、脳の基

本的な単位の一つを構成すると考えられている。分節構造は脳回路が機能を

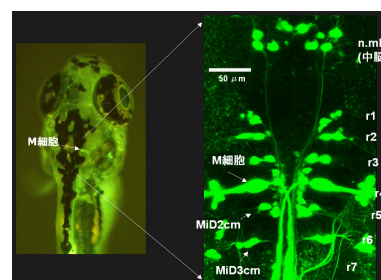


図1. ゼブラフィッシュの後脳網様体脊髄路(RS)ニューロン群

発揮する上でどのように反映されているだろうか？我々は、脳の分節構造にしたがって発現するニューロンがそれぞれどのように機能的に分化し、相互に関連して働くかを理解しようとした。硬骨魚のゼブラフィッシュやキンギョの後脳の網様体脊髄路(Reticulospinal, RS)ニューロン群は7つの分節にそれぞれ発現し、成魚になっても分節構造を保って配置されている(図1)。ゼブラフィッシュやキンギョでは、後脳 RS ニューロン群は、約 30 種のニューロンがすべて形態学的に同定されている。興味深いことに、隣接する分節に存在する RS ニューロンは、細胞体の位置や樹状突起の形状および軸索の走行などの形態学的特徴に共通点を持つ(図2)。隣り合う分節に同じようなニューロンが繰り返されることから、形態学的に相同なニューロンは分節間の重複と変異の産物であると考えられている。そのような相同ニューロンにも密接な関係があれば、分節という脳の基本構造にもとづいて複数のニューロンが生まれ、それぞれ機能分化した上で、新しい機能回路をつくって、システムとして脳がはたらく原理を理解できるのではないかと考えた。

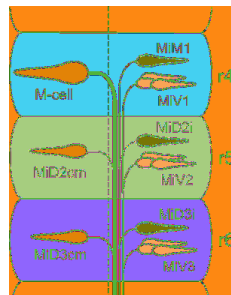


図2. 後脳分節に繰り返される形態学的相同 RS ニューロン群

第4分節(r4)に左右1対存在する巨大なRSニューロンはマウスナー (M)細胞と呼ばれ、古くからサカナの逃避運動(Zottoli, 1977; Oda et al. *Nature* 1998)をトリガーするニューロンとして知られている。隣接した第5, 6分節(r5, r6)にはM細胞と同じ形態学的特徴を持った MiD2cm と MiD3cm が左右1対存在し、M細胞とあわせて**マウスナー・シリーズ**と呼ばれる。M細胞は、一次感覚神経からの入力を側方樹状突起に受け、軸索を反対側の背髄に伸ばして胴筋を支配する運動ニューロンを直接興奮させる(Faber and Korn, 1978)。この単純明快な回路構成から、「刺激を受けてからできるだけ素早く、反対側へ逃げる運動を開始する」というM細胞の機能が明瞭に説明される。実際に、遊泳中のキンギョからM細胞の電場電位を記録すると、反対側への逃避運動の開始に先行してM細胞が発火することが報告されている(Zottoli, 1977; Eaton et al., 1981)。逃避運動におけるM細胞の役割がこのように際立っているゆえに、Mシリーズの他のニューロンとの機能の差異を調べることができる(Nakayama and Oda, 2004)。

一方、M細胞の重要性が強調されていながら、M細胞を破壊されたサカナも侵害刺激から逃げられる(Eaton et al., 1982; Zottoli et al., 1999)。このときの逃避運動はM細胞以外のRSニューロンが引き起こすと考えられ、なかでもMシリー

ズ・ニューロンは、イメージング(O'Malley et al., 1996)や破壊の効果(Liu and Fetcho, 1999)から、最有力候補にあげられている。しかし、そもそも逃避運動中のRSニューロンの活動は、M細胞以外に記録されていなかった。また、それぞれのニューロンが逃避運動において果たす役割あるいは相互の関係については多くが不明であった。本研究では、逃避運動中のMシリーズの活動をカルシウムイメージングで計測した。

ゼブラフィッシュやキンギョのもっとも早い逃避運動は聴覚によって誘導される。霊長類やげっ歯類、鳥類などの高等脊椎動物は内耳の蝸牛器官を介して音を感知し、カエルやサカナなどの下等脊椎動物は内耳の耳石器官で音を感知する。その基本メカニズムは、音という媒質の微小な振動が内耳の有毛細胞で電気信号に変換され(Hudspeth, 1989)、聴神経を経由して中枢神経系へと伝えられてはじめて「音」として知覚される。発生・発達過程でこれらの神経回路がどのように構築され機能するのか、という問題は、動物が音を聴くメカニズムをあきらかにするための重要なポイントである。聴神経は第4分節のM細胞に投射する。発達段階における聴覚の獲得は、M細胞を介した聴覚性逃避運動の発現にとって重大なステップであることは間違い無い。

高等脊椎動物においては、音を電気信号に変換する機械刺激受容チャネルはいまだ未同定のままであること(Corey et al., 2004; Kwan et al., 2006)や、胚の中枢神経細胞への電気生理学的アプローチが困難であることから、発達初期の聴覚神経回路がどのように構築され機能するのかを調べるのは容易ではなかった。ゼブラフィッシュは、以下に示した長所から、聴覚回路の発生・発達研究に適したモデル脊椎動物であろう:(a) 内耳の耳石器官を介して数百~数千 Hzの音情報を感知する(Popper and Fay, 1993)。(b) 発生が早い発達過程を調べるのに適している。(c) 胚や稚魚は透明なため細胞や神経回路を *in vivo* 標本で可視化できる。(d) TRP (Transient Receptor Potential) チャネルファミリーの1つである TRPN1 (NOMPC)をはじめ聴覚に必要な遺伝子が同定されてきている(Nicolson, 2005)。(e) プラスミドや BAC を用いたトランスジェニック動物の作成やモルフオリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた遺伝子ノックアウト実験が容易に行える。本研究では脊椎動物のモデルとしてゼブラフィッシュを用いて、発達初期の聴覚の獲得過程を *in vivo* 標本において解析した。

## 2. 研究の目的

本研究では、脊椎動物の基本構造の一つである分節に組み込まれたニューロンが

如何に機能的に分化し、相互に関係して機能的な回路を構築しているかを理解することを目的とした。対象としたのは動物の生存にとって重要な逃避運動を制御する後脳の網様体脊髄路(RS)ニューロン群で、後脳の分節に繰り返して存在する。それらのニューロンが逃避運動においてどのように働き、役割分担をするかを、サカナの逃避運動にとって最も重要なM細胞とその形態学的相同ニューロンを対象に調べ、分節構造にもとづいた回路構成を明らかにすることを旨とした。

さらに、分節ごとに発生したニューロンが機能的に分化するメカニズムの一つとして、各分節に特有の感覚入力の獲得に着目した。特にここでは最も早い逃避運動に必要なM細胞の聴覚入力の発達について調べ、聴覚の獲得がいつどのように起こるかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

逃避運動中のMシリーズ(M細胞, MiD2cm, MiD3cm)の活動を解析するために、ゼブラフィッシュの後脳RSニューロンを*in vivo*カルシウムイメージングしながら、尾の動きを同時に計測するシステムを作製した(図3)。実験では、RSニューロンをカルシウム感受性色素で逆行性標識した稚魚(受精後120~200時間)の頭部を拘束し、尾は自由に動く標本を用いた。標本の頭部に水流を与え、誘発されたRSニューロンの活動を共焦点レーザー顕微鏡でカルシウムイメージングすると同時に、尾の屈曲応答を高速度カメラで撮影した。さらに、高速で焦点深度を変えて、異なる深さにある複数ニューロンの活動をも同時にイメージング可能とした。この計測システムを用いて逃避運動中のM細胞と非M細胞の活動を調べた。また、M細胞や非M細胞を駆動する感覚入力の寄与については、入力の影響効果を調べた。

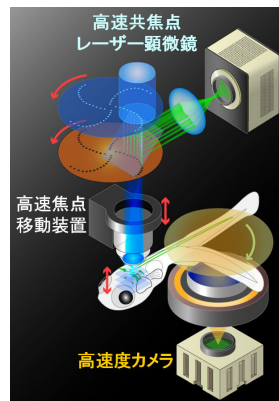


図3. 逃避運動とニューロン活動の同時計測システム

さらに、M細胞を最も強力に駆動する聴覚入力の発達を、特定のニューロンに緑色蛍光タンパク(GFP)を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュを活用した*in vivo* whole-cell記録や*in vivo*イメージングで調べた。

さらに、M細胞を最も強力に駆動する聴覚入力の発達を、特定のニューロンに緑色蛍光タンパク(GFP)を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュを活用した*in vivo* whole-cell記録や*in vivo*イメージングで調べた。

### 4. 研究成果

逃避運動中のゼブラフィッシュ稚魚の後脳RSニューロンのM細胞とその相同RSニューロンの活動を光学計測し、逃避運動を引き起こす感覚入力を調べた結果、ゼブラフィッシュには異なる感覚入力によって駆動される2種類の逃避運動回路があることを見出した(Kohashi and Oda, 2008)。

#### (1) M細胞を介するM型逃避と介さない非M型逃避

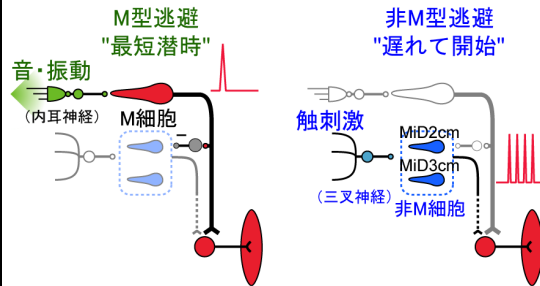


図4. 音・振動刺激で駆動されるM型逃避回路(左)と触刺激で駆動される非M型逃避回路(右)

#### M型逃避

耳胞(内耳の原基)に水流を与えてから短潜時(6ミリ秒以下)で開始した逃避運動は、必ずM細胞の単発発火を伴った(M型逃避)。ところが、M細胞の発火を伴わない非M型逃避も一部見出された。非M型逃避はM型逃避より約5ミリ秒遅れて開始する以外は、M型逃避と見分けのつかない運動軌跡を示した。M細胞を破壊しても確かに逃避運動は誘導されるが、潜時は6ミリ秒以下にはならなかった。M細胞以外では、MiD2cmとMiD3cmでも逃避運動に伴うカルシウム応答が見出された。すなわち、最も早い逃避運動にはM細胞の発火活動が必要である。一方、M細胞の発火を伴わない非M型逃避ではM細胞の相同RSニューロンが大きな活動を示す。これらの相同RSニューロンはM型逃避中には活動が抑えられている。

#### (2) 二型の逃避運動を駆動する感覚入力

M型逃避と非M型逃避はどのように使い分けられるのだろうか？我々は逃避運動を引き起こす感覚入力に注目した。両者を引き起こした耳胞への水流刺激は、内耳神経を介する聴覚・前庭感覚や三叉神経を介する触覚と、側線神経を介する側線感覚を刺激する。そこで、それぞれの感覚系を阻害して逃避運動への影響を調べた。聴覚・前庭感覚に必要な耳胞の耳石を破壊除去すると、潜時が長く相同ニューロンが複数発火する非M型逃避しか起こらなくなった。一方、触覚を伝える三叉神経節ニューロンを破壊

すると、M 型逃避は誘発されても非 M 型逃避の頻度は大幅に下がった。これらの結果から、「音や振動は内耳神経を介して M 細胞を発火させ、最短潜時で逃避運動を駆動する。一方、頭部への触刺激は三叉神経を介して相同ニューロンを複数発火させて非 M 型逃避を駆動する」と結論した(図4)。

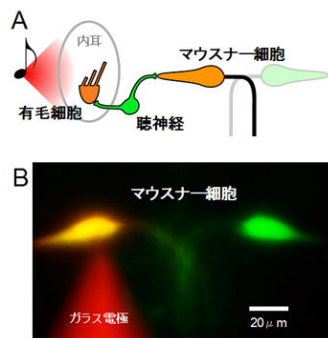


図5. 内耳有毛細胞から M 細胞までの聴覚回路(A)の機能的発達を、GFPを発現する M 細胞から *in vivo* ホールセル記録(B)で調べる

### (3) M 細胞の聴覚獲得過程

M 細胞はいつ音刺激に応じるようになるのだろうか? ゼブラフィッシュの M 細胞は、内耳の有毛細胞から聴神経を経て直接聴覚入力を受けている(図5)。聴覚路の3つの細胞それぞれに GFP を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュを用いて、聴覚回路の形成過程を生体胚で観察したところ、有毛細胞から M 細胞に至る形態学的投射は受精後 27 時間 (hours postfertilization, hpf) 以前に形成されていた(図6)。さらに、有毛細胞から聴神経および聴神経から M 細胞へのシナプス結合も出来ていて、シナプス伝達が可能であることもあきらかにされた(Tanimoto et al., 2009)。

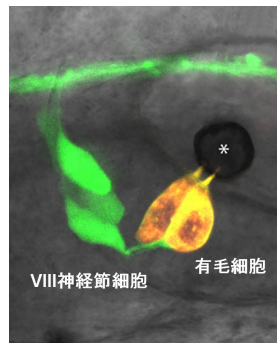


図6. ゼブラフィッシュ胚の内耳有毛細胞から VIII 神経を経て、後脳に至る神経回路

M 細胞から *in vivo* ホールセル記録を行って音刺激による応答の発達を調べたところ、音刺激に対して M 細胞で記録されるシナプス後電流は、受精後 40 時間から見られ始めた(図7)。その後、発達に伴って応答の潜時は短く、振幅は大きく、周波数特性は高音域へ広がった。さらに、音刺激に対する内耳有毛細胞の活動の指標となるマイクロフォン電位を発達初期段階において記録することにも成功した。注目すべきことに、音刺激に対する有毛細胞と M 細胞の応答の出現・

発達過程には非常に強い相関があり、いずれも受精後 40 時間頃から獲得され、それ以降発達に伴って成熟する(Tanimoto et al., 2009)。さらに、この時間経過は、音刺激受容に必要だと考えられている

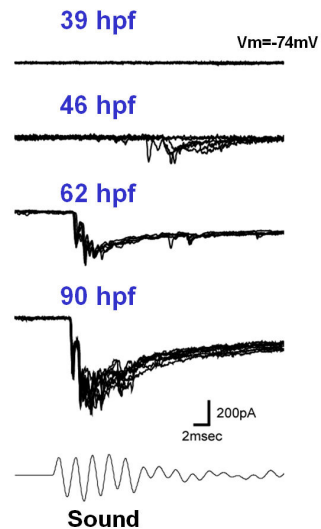


図7. M 細胞の聴覚応答の発達

*trpn1 (nompC)* 遺伝子が内耳有毛細胞に発現する時期とも一致している(Sidi et al., 2003)。

### まとめ

M 細胞は古くから逃避運動をトリガーするニューロンとして確立していた一方で、M 細胞を破壊されたサカナでも逃避運動ができるというパラドックスがあった。本研究によって、ゼブラフィッシュの M 細胞とその形態学的相同ニューロンが相補的に働くことが示され、長年の問題に決着がついた。しかも、M 細胞と非 M 細胞は異なる感覚入力によって駆動されるという新たな知見も得られた。

ゼブラフィッシュの M 細胞の活動にとって、きわめて重要な感覚入力である聴覚入力の発達について、M 細胞や感覚神経に GFP を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュを活用して、電気生理学的・形態学的に調べた結果、M 細胞が音に応答するずっと前に、機能的な聴覚回路は形成されていて、内耳の有毛細胞が音による振動を電気信号に変換する過程が、M 細胞の聴覚獲得の時期を決めることを見出した。有毛細胞の音感受性の獲得には、有毛細胞の不動毛(stereocilia)の先端に存在するとされる機械受容チャネルの発現や tip link などの細胞装置の形成が必要と考えられる。脊椎動物ではまだそのメカニズムは明らかにされていない。本研究が聴覚獲得のメカニズムの解明につながることを期待する。

以上の研究成果は、同じ運動が脳の隣り合う分節に繰り返される良く似たニューロンによって制御されることと、重複してできた運動

制御回路が感覚入力のモードによって“使い分けられる”という、脳ニューロンの生まれとはたらしきの間の興味深い関係を示唆する。最も早い逃避運動には M 細胞の活動が必要で、M 細胞を発火させるためには聴覚入力が最も有効である。M 細胞は後脳分節のなかで、聴神経の進入部である第 4 分節に位置し、M 細胞の側方樹状突起は、聴神経を迎えるように伸びている。したがって、後脳の分節に繰り返される RS ニューロンのなかで、聴神経と結合しやすかった M 細胞が、聴覚による逃避運動にもっとも強く関与するようになったと推定でき、分節に繰り返されるニューロンが、分節に対応して機能的に分化するという一つの例を示しているのではないだろうか。

#### 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 20 件)

①Nakano Y, Fujita M, Ogino K, Saint-Amant L, Kinoshita T, Oda Y, Hirata H Biogenesis of GPI-anchored proteins is essential for surface expression of sodium channels in zebrafish Rohon-Beard neurons to respond to mechanosensory stimulation. *Development*. 査読有 137: 1689-98, 2010

②Satou C, Kimura Y, Kohashi T, Horikawa K, Takeda H, Oda Y, Higashijima S Functional role of a specialized class of spinal commissural inhibitory neurons during fast escapes in zebrafish. *J. Neurosci*. 査読有 29: 6780-93, 2009

③Kamei Y, Suzuki M, Watanabe K, Fujimori K, Kawasaki T, Deguchi T, Yoneda Y, Todo T, Takagi S, Funatsu T, Yuba S Links Infrared laser-mediated gene induction in targeted single cells *in vivo*. *Nature Method* 査読有 6: 79-81, 2009

④Tanimoto M, Ota Y, Horikawa K, Oda Y Auditory input to CNS is acquired coincidentally with development of inner ear after formation of functional afferent pathway in zebrafish. *J. Neurosci*. 査読有 29: 2762-67, 2009

⑤Kohashi T, Oda Y Initiation of Mauthner- or non-Mauthner-mediated fast

escape evoked by different modes of sensory input. *J. Neurosci*. 査読有 28: 10641-53, 2008

⑥Nukazuka A, Fujisawa H, Inada T, Oda Y, Takagi S Semaphorin controls epidermal morphogenesis by stimulating mRNA translation via eIF2 $\alpha$  in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*. 査読有 22: 1025-36, 2008

⑦Hirata H, Saint-Amant L, Downes GB, Cui WW, Zhou W, Granato M, Kuwada JY Zebrafish bandoneon mutants display behavioral defects due to a mutation in the glycine receptor  $\beta$ -subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有 102: 8345-50, 2005

他 13 件

[学会発表](計 42 件)

①Tanimoto M, Ota Y, Horikawa K, Oda Y Auditory Input to Brain Is Acquired Coincidentally with Development of Inner Ear After Formation of Neural Circuit in zebrafish. 11th EMBL International PhD Symposium 2009/10/30 Heidelberg

②Tanimoto M, Ota Y, Horikawa K, Oda Y Auditory input to CNS is acquired coincidentally with development of inner ear after formation of functional afferent pathway in zebrafish. The 39th annual meeting of the Society for Neuroscience 2009/10/18 Chicago

③Kohashi T, Nakata N and Oda Y Functional development of hindbrain escape networks in zebrafish. The 36th congress of the international union of physiological sciences 2009/7/28 Kyoto

④Hirata H, Nakano Y and Oda Y Characterization of zebrafish motility mutant defective in voltage-gated sodium channel. The 36th International Congress of Physiological Sciences 2009/7/28 Kyoto

⑤Kohashi T, Oda Y Initiation of Mauthner- or non-Mauthner-mediated fast escape evoked by different modes of sensory input in zebrafish. The 38th annual meeting of the Society for Neuroscience 2008/11/15 Washington

⑥Kohashi T, Oda Y Functional segregation of segmentally homologous reticulospinal neurons in hindbrain for

control of fast escape in zebrafish.  
International seminar: Evolutionary  
Studies in Behavioral Neuroscience  
2008/6/25 Hayama

⑦Nukazuka A, Chikuma M, Fujisawa H,  
Inada T, Oda Y, Takagi S Semaphorin -  
Plexin signal controls epidermal ray  
morphogenesis by stimulating mRNA  
translation via eIF2 $\alpha$  in *C. elegans*.  
The 16th international *C. elegans* Meeting  
2007/6/27 Los Angeles

⑧Suzuki M, KameiY, Oda Y, Yuba S,  
Takagi S

Efficient laser-induced gene expression in  
*C. elegans*. The 16th international *C.*  
*elegans* Meeting 2007/6/27 Los Angeles

他 34 件

[図書] (計 3 件)

①小田洋一 共立出版 後脳分節に構築された  
逃避運動回路  
蛋白質核酸酵素 53(4) 2008 506-511

②小田洋一 日本神経精神薬理学会 後脳の  
分節構造にもとづいて構築されたニューロンの  
はたらき: 硬骨魚の逃避運動制御回路  
日本神経精神薬理学雑誌 28 2008 506-511

③平田普三, 小橋常彦, 小田洋一 羊土社 硬  
骨魚類の逃避運動制御メカニズム  
実験医学 26(12) 2008 110-117

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

プレス発表

朝日新聞 (2008 年 10 月 15 日夕刊, 10 面)  
「危ない! 耳・皮膚使い分け逃避<神経細胞  
の違い 魚で解明>」

中日新聞 (2008 年 10 月 15 日夕刊, 12 面)  
「複数の脳細胞が「逃げろ」 魚の細胞 補  
完や分担」

日刊工業新聞 (2008 年 10 月 16 日, 24 面)  
「触覚刺激で「逃避」指令」

NHKTV「おはよう日本」(2008 年 10 月 15  
日)

NHK ラジオ「ラジオ朝一番」(2008 年 10 月

15 日)

朝日新聞 (2009 年 3 月 4 日夕刊, 9 面)  
「聴覚生まれる仕組み解明」

中日新聞 (2009 年 3 月 4 日夕刊, 3 面)  
「魚の聴覚形成解明」

日刊工業新聞 (2009 年 3 月 5 日, 24 面)  
「聴覚回路胚段階で形成 ふ化時点で機  
能獲得」

読売新聞 (2009 年 3 月 5 日朝刊, 31 面)  
「聴覚の形成過程解明」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 洋一 (ODA YOICHI)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 00144444

(2) 研究分担者

高木 新 (TAKAGI SHIN)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 90171420

平田 普三 (HIRATA HIROMI)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 90171420