

機関番号：63801

研究種目：国際共同研究加速基金（帰国発展研究）

研究期間：2018年度～2020年度

課題番号：17K20147

研究課題名（和文） 視覚情報処理と行動制御の基盤となる神経メカニズムの解明

研究課題名（英文） Investigation of mechanisms underlying visual processing and behavior

研究代表者

久保 郁 (KUBO, Fumi)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授

研究者番号：40786373

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）42,800,000円

研究成果の概要（和文）：

前視蓋にはオプティックフロー視覚刺激に反応する様々なタイプの神経細胞が存在し、それらが神経ネットワークを形成することにより、異なるオプティックフローのパターンが区別されている。我々は、オプティックフローに反応する前視蓋ニューロンを遺伝学的に標識することに成功し、特定のタイプの前視蓋細胞がオプティックフロー情報処理を行う神経ネットワークに寄与する手掛かりを得た。また、オプティックフロー反応細胞の形態解析により、単眼性オプティックフロー情報から両眼性オプティックフロー情報が計算されるための解剖学的基盤を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、オプティックフロー情報処理の神経ネットワークに関する機能的および解剖学的メカニズムの一端が明らかとなった。本研究成果は、感覚-運動変換の神経メカニズムに関する基本原理の解明に貢献すると言える。また、ほ乳類大脳皮質などの高次脳機能に広く共通する神経メカニズムの理解に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

The pretectum is composed of several types of neurons that respond differentially to optic flow visual stimuli. Neural network generated by these pretectal neurons forms the basis for distinguishing different optic flow patterns. We have succeeded in genetically labeling pretectal neurons that respond to optic flow and found that a specific type of optic flow-responsive neurons may contribute to the computation of optic flow. Furthermore, morphological reconstructions of optic flow-responsive neurons revealed an anatomical basis for computing binocular responses from monocular responses.

研究分野：神経科学

キーワード：視覚情報、神経回路、オプティックフロー、ゼブラフィッシュ、Ca²⁺イメージング

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

動物が空間中を正しく移動するためには、視野から得られる視覚情報を利用することが必須であること。例えば、動物が移動する際、外界の視野は自分自身の動きとは反対方向へ流れるようにして動く。このような動物自身の移動によって生じる視野の動きは「オプティックフロー」と呼ばれる。動物はオプティックフロー情報を用いることにより、自分自身の運動を推定し、それに応じて眼球や身体を適切に動かすことで、視線や姿勢を安定に保つことができる。オプティックフローは、大きく分けて、左右に回転する場合（回転、rotation）と、前後方向に並進移動する場合（並進、translation）の二つのパターンに分類される。視野が回転しているか前後移動しているかを効率よく見分けるためには、左右の眼から得られた情報を脳内で統合し、比較することが重要だと考えられている。

これまでに我々の研究グループは、ゼブラフィッシュにおいて、このような両眼からの視覚情報の統合・比較は、視覚領域である前視蓋（pretectum）で行われていることを示した（Kubo et al., *Neuron*, 2014）。我々は、前視蓋には、片眼から受け取ったオプティックフロー情報に反応する単眼性ニューロンと、両眼から受け取ったオプティックフロー情報に反応する両眼性ニューロン細胞が存在することを見出した。両眼性ニューロンは、特定の組み合わせの単眼性ニューロンからの入力を統合することにより、回転あるいは並進のどちらかのみを選択的に反応し、これによって回転性・並進性の動きが脳内で区別されているというモデルを提唱した。しかし、このモデルは単眼性ニューロン・両眼性ニューロンの神経応答特性のみに基づいて推測されたものであるため、単眼性ニューロン・両眼性ニューロンが実際に階層的な神経回路を形成しているかは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、オプティックフロー情報処理における単眼性ニューロン→両眼性ニューロンの階層的な神経ネットワークを実験的に検証することを目的とした。この問題を解明するために、まず前視蓋に存在するオプティックフロー反応細胞（単眼性ニューロンおよび両眼性ニューロン）を遺伝学的手法により標識し、細胞タイプ特異的な機能解析を行うことによって、機能的階層性を明らかにする。さらに、前視蓋オプティックフロー反応細胞の神経投射パターンおよびシナプス構造を同定することにより、神経回路の解剖学的基盤を明らかにする。以上のような遺伝学および解剖学的手法を組み合わせることによって、オプティックフロー情報処理を行うための神経回路の仮説を直接検証することとした。

3. 研究の方法

(1) 前視蓋に存在する単眼性および両眼性ニューロンがもつ機能的意義と階層的関係を調べるために、これらの異なる細胞タイプを遺伝学的に標識することができるトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を探索する。具体的には、組織特異的に転写因子 Gal4 を発現する系統群のデータベースを検索することにより、前視蓋 Gal4 系統の候補を複数同定する。さらに、これらの候補系統群を用いて、特定の前視蓋細胞タイプのオプティックフロー視覚刺激に対する反応性、さらに、オプティックフロー依存的な行動への寄与を調べる。

(2) 前視蓋神経ネットワークを形成する神経回路の解剖学的基盤を明らかにするために、ゼブラフィッシュ仔魚の脳全体から取得した大規模電子顕微鏡像データを用いてシナプス結合様式の解析を行う。約 200 のオプティックフロー反応細胞に注目し、それらが形成するシナプスを

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

網羅的に同定することで、オプティックフロー反応細胞群の相互結合性を調べ、神経ネットワーク全体としての接合様式 (connectivity) を明らかにする。

4. 研究成果

(1) オプティックフロー情報処理を司る神経ネットワークの遺伝学的解析

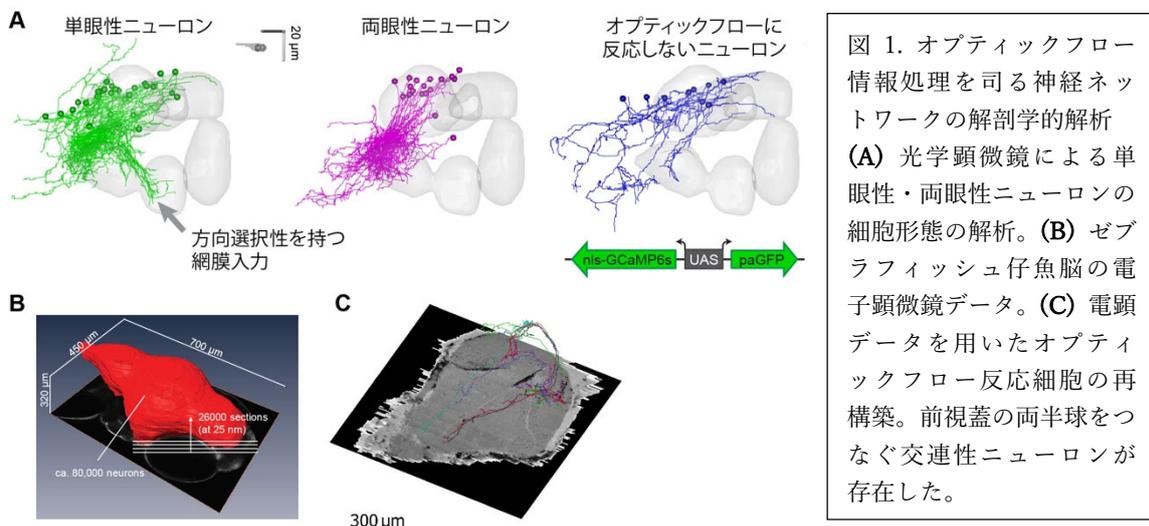
①オプティックフロー情報処理において、前視蓋に存在する単眼性および両眼性ニューロンの個々の機能および階層的關係を調べるために、異なる細胞タイプを遺伝学的に同定することができるゼブラフィッシュ系統を探索した。様々な組織や細胞タイプで特異的に転写因子 Gal4 を発現する Gal4 トラップ系統が登録されているデータベース (Z-Brain, zTrap, Zebrafish Brain Browser) を用いて、前視蓋領域の一部で Gal4 の発現が見られた系統を 9 系統選抜し、これらを手に入れた。受精後 5-7 日目の仔魚においてこれら候補系統個体で標識される前視蓋細胞を共焦点顕微鏡により確認した。

②次に、これら候補系統を用いて二光子顕微鏡による神経活動の Ca^{2+} イメージングを行った。まず、波長固定レーザー (920 nm) と二光子顕微鏡からなる顕微鏡システムを受入研究機関に新たに設置した。さらに二光子イメージングと同期的にオプティックフロー刺激を提示できる視覚刺激装置を構築した。このイメージングシステムを使用して、上記(1)-①で同定した 9 系統の候補 Gal4 系統と Ca^{2+} インディケーターレポーター系統 (UAS:GCaMP6s) を掛け合わせて得られた仔魚を用いて Ca^{2+} イメージングを行った。各系統においてオプティックフロー視覚刺激に反応する神経細胞を同定した結果、候補 Gal4 系統のうちの二系統は主に単眼性オプティックフローに反応する神経細胞を標識していることが分かった。そのうちの一系統において標識される細胞は、細胞体が前視蓋領域の腹側部に位置していたことから、最近研究代表者らが同定した新規のタイプのオプティックフロー反応細胞群と一致すると考えられた (Wu et al., *Neuron*, 2020)。本研究で同定した同系統は、オプティックフロー反応細胞のサブタイプを遺伝学的に標識する初めての例である。現在、Nitroreductase を用いた遺伝学的な細胞消失実験を行うことにより、当該細胞がオプティックフロー依存的行動に与える影響を解析している。今後、当該細胞を消失させたゼブラフィッシュ個体において、前視蓋のオプティックフロー反応細胞群の Ca^{2+} イメージングを行うことにより、両眼性ニューロンの反応性が変動するか調べ、単眼性ニューロン→両眼性ニューロンの階層性が存在するかどうか解析する。

(2) オプティックフロー情報処理を司る神経ネットワークの解剖学的解析

①第一に、前視蓋オプティックフロー反応細胞の神経投射パターンを光学顕微鏡を用いて解析した。核局在型 GCaMP による Ca^{2+} イメージングと photoactivatable GFP による細胞形態の可視化を組み合わせた FuGIMA 法 (Förster et al., *Methods*, 2018) を用いてオプティックフロー反応細胞の神経投射を調べたところ、多くのオプティックフロー反応細胞は、前視蓋の神経繊維領域において密に神経突起を伸ばすことが分かった (図 1A)。さらに、単眼性ニューロンと両眼性ニューロンは互いに異なる神経突起投射パターンを示した (Kramer et al., *Neuron*, 2019)。単眼性ニューロンの樹状突起は、方向選択的な網膜入力投射する前視蓋ニューロピル領域に到達していたことから、単眼性ニューロンは方向選択性網膜入力を受け取り、それをさらに両眼性ニューロンに伝達していることが示唆された (図 1A)。

②第二に、シナプスを介した前視蓋オプティックフロー反応細胞同士の直接的な神経接続パターンを明らかにするために、オプティックフロー反応細胞の持つ微細な神経投射パターンおよびシナプスの同定を行った。(2)-①で記した FuGIMA 法では細胞の樹状突起形態を可視化することには成功したが、軸索の形態を可視化することや、ニューロン同士のシナプス接続を検出することができなかった。この問題を克服するために、研究代表者らがすでに取得していたゼブラフィッシュ仔魚脳全体の電子顕微鏡画像データを用いた。この電子顕微鏡データは高い解像度 (x, y, z 軸上の解像度が 14 x 14 x 25 nm) で画像取得されているため、軸索投射やシナプス構造などの微細な構造が判別可能であった (図 1B)。さらに、電顕画像を取得したゼブラフィッシュ個体は、あらかじめ Ca²⁺イメージングによりオプティックフロー細胞を同定した個体であるため、オプティックフロー反応細胞そのものの神経接続を解析することが可能であった。この電顕データ解析から、多くのオプティックフロー反応細胞は交連性の軸索を持つことが明らかとなり、このような交連性連絡は前視蓋において単眼性オプティックフローシグナルから両眼性オプティックフローシグナルを生み出すための解剖学的基盤に相当すると考えられた (図 1C)。さらに、オプティックフロー反応細胞同士の間で形成されるシナプスを画像解析により網羅的に同定したところ、多くのオプティックフロー反応細胞群はシナプスを介して直接神経接続していることが明らかになった。このようなオプティックフロー反応細胞間のシナプスは、前視蓋ニューロピル領域に密に集積していたことから、この特定の前視蓋ニューロピルを介してオプティックフロー情報の統合が行われていることが初めて明らかとなった (投稿準備中)。我々の発見は、オプティックフロー細胞の相互結合性の全体像を解明する上での基礎となると言える。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Wu Y, dal Maschio M, **Kubo F***, Baier H. (2020) An Optical Illusion Pinpoints an Essential Circuit Node for Global Motion Processing. *Neuron*, 108, 722-734. 査読有 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.027>
- ② Antinucci P, Dumitrescu AS, Deleuze C, Morley HJ, Leung K, Hagley T, **Kubo F**, Baier

H, Bianco IH, Wyart C. (2020) A calibrated optogenetic toolbox of stable zebrafish opsin lines. *eLife* 2020;9:e54937. 査読有 DOI: 10.7554/eLife.54937

- ③ Kramer A, Wu Y, Baier H, **Kubo F***. (2019) Neuronal architecture of a visual center that processes optic flow. *Neuron* 103, 118-132. 査読有
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.04.018>
- ④ Kunst M, Laurell E, Mokayes N, Kramer A, **Kubo F**, Fernandes AM, Förster D, Dal Maschio M, Baier H. (2019) A Cellular-Resolution Atlas of the Larval Zebrafish Brain. *Neuron* 103, 21-38. 査読有 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.04.034>
- ⑤ Förster D, Kramer A, Baier H*, **Kubo F***. (2018) Optogenetic precision toolkit to reveal form, function and connectivity of single neurons. *Methods*, 50, 42-48. 査読有
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.08.012>

[学会発表] (計 14 件)

- ① **久保 郁**, Cracking the visual motion processing circuit using optical illusion, *Neuro Zoom* (2021) (オンライン)
- ② **久保 郁**, ゼブラフィッシュにおける錯視反応とその視覚情報処理回路、第 18 回 北海道大学脳科学研究教育センターシンポジウム (2020) (オンライン)
- ③ **久保 郁**, An optical illusion pinpoints an essential circuit node for global motion processing, *Zebrafish Neural Circuits, online seminar series* (2020) (オンライン)
- ④ **久保 郁**, 錯視反応を用いた動きの視覚情報処理を担う神経回路の解析、第 43 回 日本神経科学学会大会 (2020) (オンライン)
- ⑤ **久保 郁**, オプティックフロー情報処理に関わる神経回路の解剖学的基盤、第 42 回日本分子生物学会年会 (2019)
- ⑥ **久保 郁**, Function and connectivity of a visual circuit underlying optic flow processing in zebrafish, *The Joint Symposium on Fusion of Biomedical and Physical/Informational Sciences in Neurobiology* (2019)
- ⑦ **久保 郁**, Function and connectivity of a visual circuit underlying optic flow processing in zebrafish, 東京大学大学院理学系研究科 第 1309 回生物科学セミナー (2019)
- ⑧ **久保 郁**, オプティックフロー情報処理に関わる神経回路の解剖学的基盤、第 42 回日本神経科学大会 (2019)
- ⑨ **久保 郁**, ゼブラフィッシュにおける視覚情報処理と行動制御メカニズム、第 3 回感覚器研究イニシアチブ・シンポジウム (2019)
- ⑩ **久保 郁**, 視運動の情報処理に関わる神経ネットワークのイメージング解析、第 13 回バイオイメージングフォーラム & 基生研重点共同利用合同シンポジウム (2019)
- ⑪ **久保 郁**, Cellular composition of the optic flow processing circuit in the zebrafish pretectum 遺伝研研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」 (2018)
- ⑫ **久保 郁**, Function and connectivity of optic flow processing circuit in the zebrafish pretectum, *Cold Spring Harbor Asia Conference "Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits"* (2018)
- ⑬ **久保 郁**, Function and connectivity of optic flow processing circuit in the zebrafish pretectum, 第 24 回小型魚類研究会 (2018)

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

- ⑭ 久保 郁、Function and connectivity of optic flow processing circuit in the zebrafish pretectum、
第41回神経科学大会 (2018)

[図書] (計 1 件)

- ① 久保 郁、視覚による行動選択の神経基盤(2019)、生体の科学 特集「脳神経回路のダイナミクスから探る脳の発達・疾患・老化」、70, 53-57. 査読無

[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：
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：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等 <http://kubolab.jp/wp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者
該当なし

(2) 研究協力者
研究協力者氏名：北川 真子、カロリナ・フィアヨス・オリベロス
ローマ字氏名：KITAGAWA Mako, FIALLOS OLIVEROS Carolina