

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：82675

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2021

課題番号：18KK0215

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュを用いた脊椎動物の姿勢制御神経回路メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of neuronal circuits that control body posture using larval zebrafish

研究代表者

東島 真一（Higashijima, Shin-ichi）

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・教授

研究者番号：80270479

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：透明で生体イメージングに適したゼブラフィッシュ仔魚を対象として姿勢制御に関わる神経回路の構成と動作機構を調べた。特に、平衡感覚受容の様式の解明に重点をおいて研究を進めた。まず、360度任意の傾斜刺激を与えながら任意の神経細胞の活動をカルシウムイメージングで可視化する新規光学系を構築した。この光学系を用いて、前庭器官の有毛細胞の、ロール（左右）方向、ピッチ（前後/吻尾）方向の傾斜および振動刺激に対する応答を調べ、毛の配向に応じた応答を初めて生体内で可視化することに成功した。さらに、前庭神経節ニューロンの応答を調べ、細胞の場所に応じて異なる特徴の前庭情報をコードし伝達することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

360度任意の傾斜刺激を与えながら任意の神経細胞の活動をカルシウムイメージングで可視化する新規光学系を構築した。これは世界初の画期的成果であり、今後の前庭感覚の知覚の神経機構、および姿勢制御を司る神経機構の解明に向けて研究がスピードアップしていくことが強く期待される。その意味で、当該分野において大きな学術的意義を持つ研究成果であると考えている。

研究成果の概要（英文）：Maintaining head and body orientation relative to the Earth's vertical gravity axis is vital for survival. Vestibular organs in the inner ear play a crucial role for this task. Sensory hair cells in the otolith organs receive linear acceleration, e.g., head tilt, translation and vibration. To visualize hair cell responses to the head motion, we built a microscope in which an objective lens can tilt with a small sample 360 degree by a motorized stage during Calcium imaging. With this tiltable objective microscope, we imaged neural activity in all the utricular hair cell at the single-cell level during pitch or roll tilt/vibration in 5-day-old transgenic zebrafish larvae expressing Calcium indicator, jRCaMP7f, and red fluorescent protein, tdTomato, in the hair cells. The imaging strategy we have established here is applicable to the central nervous system, and thus it will provide deeper understanding of the vestibular processing in the brain.

研究分野：神経科学

キーワード：ゼブラフィッシュ 前庭感覚 有毛細胞 イメージング 回転顕微鏡

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

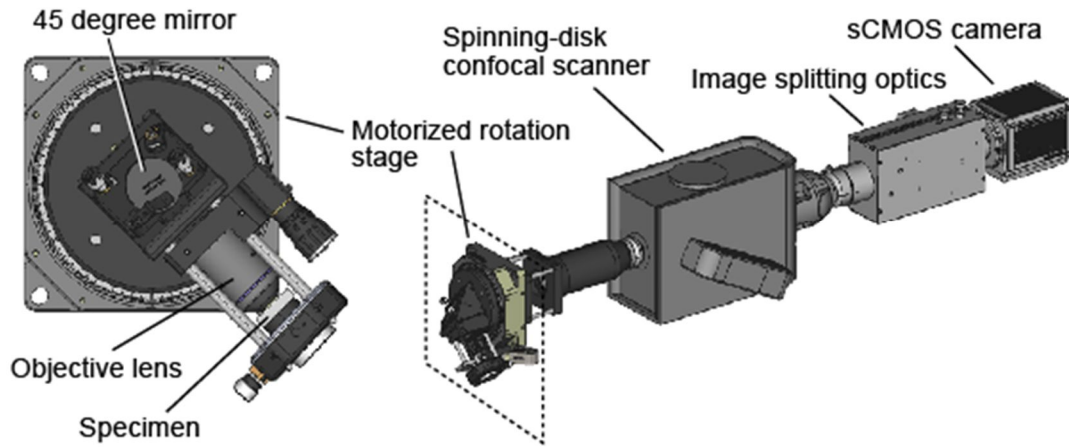
前庭情報は姿勢の制御に必須であり、自身の運動の知覚や空間位置覚に深く関わる。前庭感覚情報を適切な運動出力に変換する「姿勢制御の神経回路」が、どのようなタイプのニューロンで構成され、どのニューロンとシナプス結合して姿勢を制御するのか、体系的な理解に至っていない。この研究が従来困難であったのは、哺乳類を用いた系では、実験系が複雑であったことや、脳幹に存在して前庭情報を処理し、それを脊髄への運動コマンドとして送ることに関与する神経細胞群を同定する手段が乏しかったことがあげられる。それに加えて、動物に前庭刺激(傾き刺激)を与えた際に神経活動をカルシウムイメージングでモニターすることがほぼ不可能であり、近年の神経科学で爆発的に用いられるようになってきたカルシウムイメージングを研究に取り入れることができなかった点もあげられる。

### 2. 研究の目的

モデル脊椎動物ゼブラフィッシュ幼魚は全身が透明で、生きた個体内で全ての脳および脊髄ニューロンを観察可能であり、多種の遺伝子組換え体を利用したニューロンのタイプの同定、神経回路の可視化、活動記録、活動操作に適している。幼魚は受精後1週間以内に姿勢を保つようになり、脳幹や脊髄のニューロンの発生学的性質や回路構成は哺乳動物と相溶性が高い。しかし、ゼブラフィッシュ幼魚を用いて前庭刺激(傾き刺激)を与えた際に、前庭感覚系、および中枢神経系で起こる神経細胞の活動パターンを調べるための方法論が欠如している。本研究では、フランスソルボンヌ大学の Bormuth 博士、および、米国ジャネリアリサーチキャンパスの Koyama 博士と協力し、ゼブラフィッシュ幼魚を用い、前庭刺激(傾き刺激)を与えた際の神経細胞群の活動を調べる系の構築を目的として研究を進めた。さらに、構築された系を用い、前庭感覚情報の受容機構、および、姿勢制御の神経回路の解明を目的として研究を進めた。

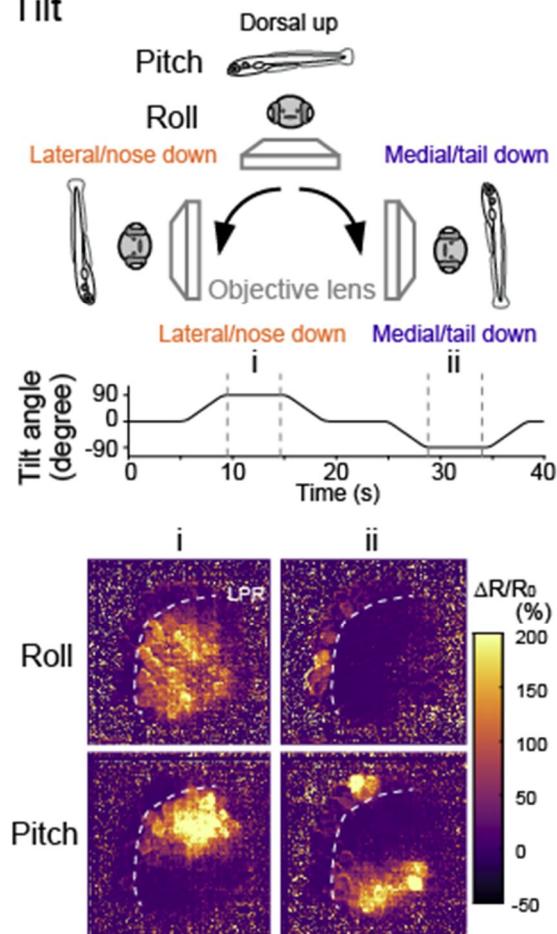
### 3. 研究の方法、および、研究成果

前庭感覚情報の受容機構、および、姿勢制御の神経回路の研究がこれまで困難であった大きな理由は、前庭刺激(傾き刺激)を与えた際に、前庭感覚系、および中枢神経系で起こる神経細胞の活動パターンを調べることができる系が存在しなかったことにある。本研究ではこれを可能にするため、対物レンズ傾斜顕微鏡を構築し、それを用いて神経活動をカルシウムイメージングでモニターできる系の構築を試みた。なお、この系においては、観察サンプルは、対物レンズの根元部から吊られたホルダーに据え付け、傾斜する対物レンズと同時に動くよう設計した。具体的には、電動回転ステージ、共焦点スキャナ、sCMOS カメラやその他の光学パーツを組み合わせでカスタム顕微鏡を組み上げた。単色によるカルシウムイメージングでは、照明ムラに主に起因する蛍光強度変化(アーティファクト)が非常に大きいことが判明したため、画像分割光学系を用いて緑色/赤色蛍光画像を同時取得し、蛍光強度比を算出することで傾斜刺激に伴って生じるアーティファクトを低減させた。これによって、360度任意の傾斜刺激を与えながら任意の神経細胞の活動を  $Ca^{2+}$  イメージングで可視化することが可能となった。以下、構築したカスタム顕微鏡の概形図を示す。

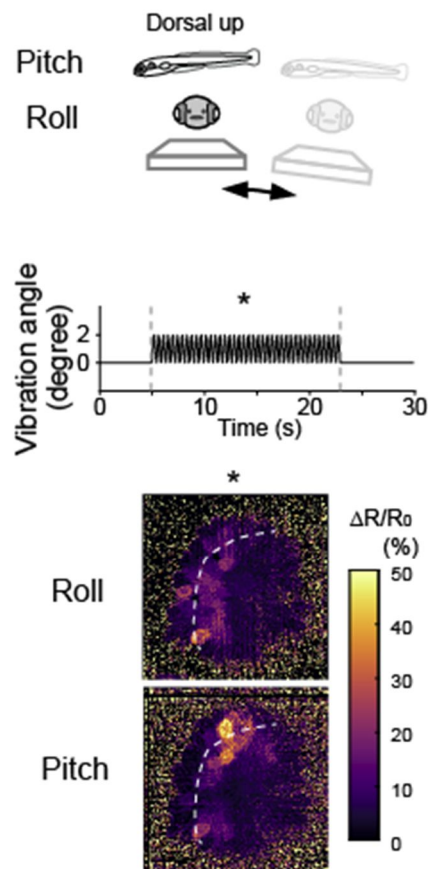


頭部の傾きや振動を受容する内耳耳石器官の卵形囊は、体平衡の保持に必要不可欠であることがゼブラフィッシュ仔魚で報告されている。感覚受容細胞である有毛細胞は、その感覚毛の配向によってどの向きの刺激に応答するかが決まるが、生体内でその活動の様子を可視化した報告例はなく、個々の細胞の機能的差異について不明な点が残されている。そこで、構築した対物レンズ傾斜可能顕微鏡を用いて、卵形囊の有毛細胞のイメージングを試みた。観察対象となる細胞群特異的に、カルシウム指示緑色蛍光タンパク質 (jRCaMP7f) および赤色蛍光タンパク質 (tdTomato) を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を作成した。6日目の仔魚を用い、ロール(左右)方向、ピッチ(前後/吻尾)方向の傾斜および振動刺激に対する有毛細胞の応答を調べた。その結果、下図に示すように、毛の配向に応じた応答を初めて生体内で可視化することに成功した。

### Tilt



### Vibration



さらに、卵形嚢に接続する前庭神経節ニューロンの活動パターンを調べた。その結果、前庭神経節ニューロンの応答は一樣ではなく、細胞の場所に応じて異なる特徴の前庭情報をコードし伝達することが明らかになった。

本研究により、ゼブラフィッシュ幼魚を用いて前庭刺激(傾き刺激)を与えた際に起こる神経細胞の活動パターンを、カルシウムイメージングによって調べることが可能となった。今後、このシステムを用いて、前庭感覚の中枢内情報処理機構、および、姿勢制御を司る神経回路の全貌を明らかにしていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Satou C, Sugioka T, Uemura Y, Shimazaki T, Zmarz P, Kimura Y, Higashijima S	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
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 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
1. 著者名 Uemura, Y., Kato, K., Kawakami, K., Kimura, Y., Oda, Y., Higashijima, S.	4. 巻 40
2. 論文標題 Neuronal circuits that control rhythmic pectoral fin movements in zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6678-6690
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.1484-20.2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu, Z., Kimura Y., Higashijima, S. Hildebrand, D.G., Morgan, J.L., Holy, T.E., Bagnall, M.W.	4. 巻 108
2. 論文標題 Central vestibular tuning arises from patterned convergence of otolith afferents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2020.08.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Bohem, U.L., Kimura, Y., Kawashima, T., Ahrens, M., Higashijima, S., Engert, F., Cohen, A.	4. 巻 110
2. 論文標題 Voltage imaging identifies spinal circuits that modulate locomotor adaptation in zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2022.01.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawano, K., Kato, K., Sugioka, T., Kimura, Y., Tanimoto, M., Higashijima, S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Long descending commissural V0v neurons ensure coordinated swimming movements along the body axis in larval zebrafish.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08283-0.	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 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 谷本昌志、東島眞一
2. 発表標題 対物レンズ傾斜顕微鏡を用いた頭部運動中のin vivoカルシウムイメージングによって可視化された、前庭末梢系における刺激の方向とモダリティ選択性の部位局在
3. 学会等名 第44回日本神経科学退会
4. 発表年 2021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
研究分担者	谷本 昌志  (Tanimoto Masashi)  (30608716)	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   (82675)	
研究分担者	木村 有希子  (Kimura Yukiko)  (70581122)	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   (82675)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	ソルボンヌ大学			
米国	Janelia Research Campus			