

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06756

研究課題名(和文) 運動制御・学習の発達における小脳神経回路機能モジュールの時空間光解析

研究課題名(英文) Optical recording and manipulation of cerebellum in fish navigation

研究代表者

津田 佐知子 (Tsuda, Sachiko)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：80736786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ニューロン集団からなる神経ネットワークがどのように出現し変化するのか、その理解は脳機能の解明に重要である。本研究では、稚魚期のゼブラフィッシュ小脳におけるプルキンエ細胞の集団活動について、小脳広域カルシウムイメージングと定量解析を、複数の発生ステージを対象として実施することで、これらの時空間的な特徴とその形成過程を明らかにした。さらに、多数の細胞から同時に膜電位を計測できる膜電位イメージングを小脳発達の解析に導入するため、Genetically encoded voltage indicatorであるArcLightなどを用いた膜電位イメージング解析系をゼブラフィッシュ稚魚において確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、小脳の機能ネットワークの形成メカニズムの一端を、1細胞レベルかつ小脳広域を対象として明らかにできた。これは、ニューロン集団の秩序あるネットワークの出現機構そしてその情報処理機構の解明につながる成果であり、さらに小脳疾患などの理解への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Spatiotemporal dynamics of Purkinje cell populations and its development were analyzed using zebrafish larvae by wide-field calcium imaging and quantitative analysis of neuronal populations. We visualized and characterized the spatiotemporal dynamics of clusters of relatively small Purkinje cell populations and the network structure they form. Furthermore, we experimentally demonstrated that this process could be activity dependent. We also established voltage imaging using ArcLight, a genetically encoded voltage indicator, in zebrafish larvae.

研究分野：神経発生学

キーワード：小脳 ゼブラフィッシュ カルシウムイメージング 機能モジュール 膜電位イメージング

1. 研究開始当初の背景

脳はニューロン集団による神経ネットワークからなるが、この神経ネットワークがどのように出現し変化するのか、その理解は脳機能の解明に重要である。我々は、このしくみを明らかにするため、運動学習などを担い神経回路研究に適した小脳に注目し、小型魚類ゼブラフィッシュに複数の光技術や行動実験を用い取り組んでいる。小脳は運動制御・学習などを司るが、近年小脳が多数の機能モジュールに区画化されることが知られる。しかし、これら小脳機能モジュールの形成過程には不明な点が多い。ゼブラフィッシュは、胚体が透明で小さく光技術に適し、さらに哺乳類と類似した小脳神経回路をもつ、小脳発達の研究に最適なモデル生物である。

神経活動の計測には、電気生理学やカルシウムイメージングなどが広く用いられるが、近年注目を集めているのが、多数の細胞から同時に膜電位を計測できる膜電位イメージングである。これにより、細胞の興奮に加え抑制応答についてもミリ秒単位で高速に計測でき、今後神経活動の記録法の主流となることが期待されている。現在、膜電位変化を感知する膜電位センサーの開発が進んでいるが、一方、これを用いた個体レベルでの計測、とりわけ発生現象の解析への応用は進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、発達段階での小脳機能モジュールについて、各種特徴量を形態・生理学的に抽出するとともに、その入出力経路といった神経基盤を明らかにし、小脳機能モジュールの実体を明らかにする。さらに、発達期小脳の光観察および光操作解析系を作成し、小型魚類ゼブラフィッシュに応用する。また、得られた時空間データについての解析法を確立し、発達過程におけるニューロン集団のふるまいを定量的に評価する。これらにより、発生過程において活動する小脳機能モジュールが時間的に出現、変化する仕組みを定量的に明らかにする。これにより、小脳機能を司る神経回路の発達メカニズムを細胞・個体レベルで明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、以下の2つのアプローチに取り組んだ。

(1) ゼブラフィッシュ小脳におけるプルキンエ細胞の集団活動について、これらの時空間的な特徴を明らかにするために、小脳広域カルシウムイメージングと定量解析を、小脳形成期の複数の発生ステージの稚魚において実施した。得られた時系列データについて、相関解析、ネットワーク解析などの定量解析を行い、発達過程におけるニューロン集団のふるまいについて調べた。

(2) 高時空間解像度での神経活動イメージングが可能な、新規膜電位センサー (Genetically Encoded Voltage Indicators、GEVIs) に注目し、発達期のゼブラフィッシュへの適用を行った。具体的には、GEVI 膜電位センサー ArcLight などに注目し、ArcLight を発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュ系統の作製、その発現パターンの観察、そして、脊髄および小脳において膜電位イメージングを実施した。これにより、GEVI がゼブラフィッシュのニューロンに発現するか、また活動記録が可能か、複数の脳領域を対象として検討した。

4. 研究成果

小脳の機能ネットワークの構造とそのダイナミクスを明らかにするため、小脳での情報処理で中心的な役割をもつことが知られるプルキンエ細胞の集団活動に注目した。まず、発達期のゼブラフィッシュ小脳におけるプルキンエ細胞集団の時空間的な特徴を明らかにするため、小脳広域カルシウムイメージングと定量解析を、受精後6日胚の稚魚において実施した。次に、得られた時系列データについて、プルキンエ細胞集団のネットワーク構造の可視化と定量解析の系を作成した。個々のプルキンエ細胞を同定し、それぞれの活動変化パターンについて、相関分析、ネットワーク解析などを行った結果、安静状態においてプルキンエ細胞集団が複数の比較的小さなクラスターからなるネットワークをなしてダイナミックに活動すること、このネットワーク構造が、視覚入力および発達の進行とともに変容することなどを明らかにした。以上の結果について、各種学会において発表を行い、現在論文を準備中である (Hiyoshi et al., in prep.)。さらに、フェムト秒レーザーによる光アブレーション、および Nitroreductase トランスジェニックシステムを使用した細胞死誘導を用いた、集団活動の解析系を確立した (Hiyoshi et al., 2021)。

膜電位イメージングについては、高感度・高速の GEVI である ArcLight、ASAP3b などのゼブラフィッシュへの導入を行った。ArcLight については、プルキンエ細胞特異的な発現を可能とするコンストラクトを作成し、transient 発現実験により、プルキンエ細胞における ArcLight の発現を確認した。ArcLight をニューロン特異的に発現するシステムを作成し、1日胚の脊髄において高速膜電位イメージングを行った。その結果、初期胚が繰り返し見せる屈曲運動に関連した、運動ニューロン集団の自発的な活動の詳細な光膜電位記録に初めて成功した (図 1, 2, Shiraishi et al., 2023)。

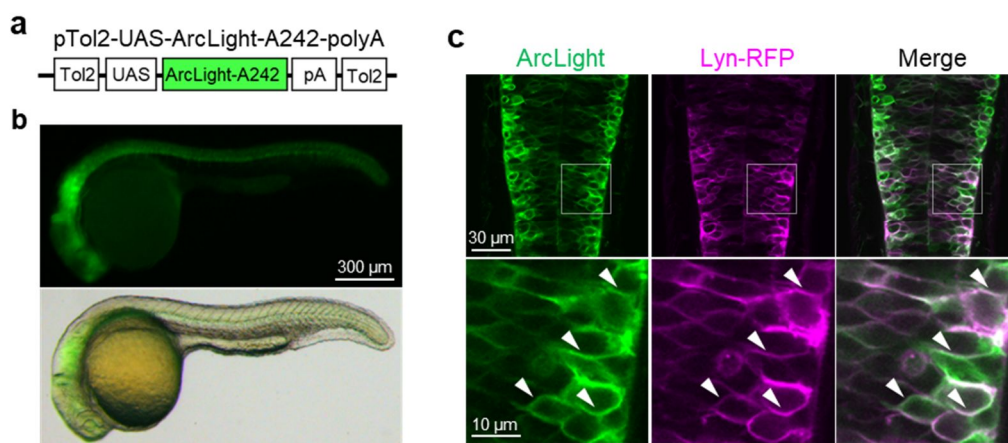


図 1 ArcLight ゼブラフィッシュシステムの作製 a: UAS-ArcLight コンストラクト, b: ArcLight は初期胚の神経管に広く発現した, c: ArcLight はニューロンの細胞膜に局在した。

さらに、小脳での情報処理で中心的な役割をもつプルキンエ細胞の膜電位イメージングの実施を目指し、プルキンエ細胞特異的エンハンサーを用いた DNA コンストラクトを作成し、ゼブラフィッシュ 1 細胞期胚への顕微注入を行った。その結果、プルキンエ細胞の細胞膜への ArcLight の局在、さらに、高速イメージングによりプルキンエ細胞に特徴的なスパイク様のシグナルの検出に成功した (Shiraiishi et al., 2023)。

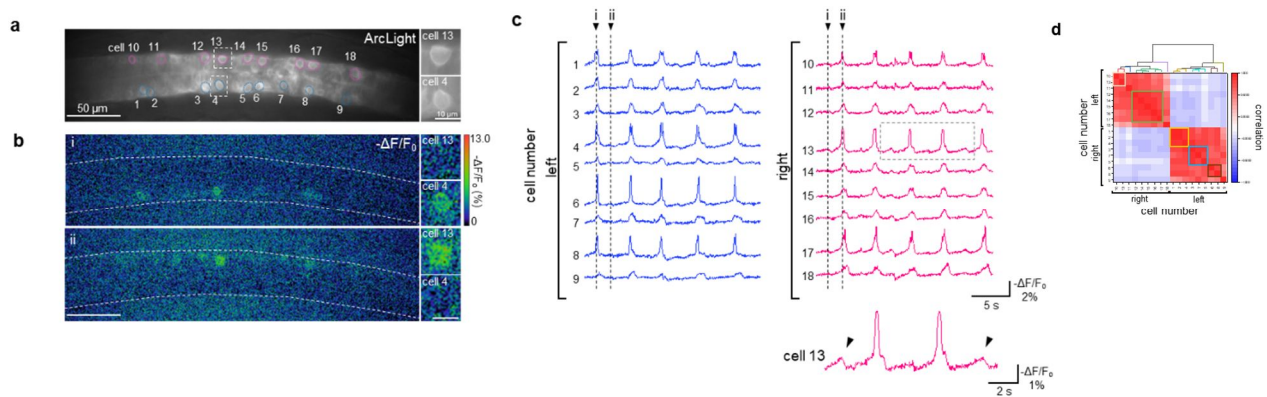


図 2 ArcLight を用いた脊髄ニューロンの膜電位イメージング a: ArcLight の発現パターン, b-d: 膜電位イメージングにより多数の脊髄ニューロンからの同時電位記録に成功した, d: 同側のニューロン集団の活動は同調する一方, 反対側集団とは高い負の相関を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Asuka Shiraishi, Ayane Hayashi, Narumi Fukuda, Mari Hishinuma, Hiroaki Miyazawa, Sachiko Tsuda	4. 巻 NA
2. 論文標題 In vivo long-term voltage imaging by genetically encoded voltage indicator reveals spatiotemporal dynamics of neuronal populations during development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.05.25.540669	査読の有無 無
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 Kanae Hiyoshi, Asuka Shiraishi, Narumi Fukuda and Sachiko Tsuda	4. 巻 63
2. 論文標題 In vivo wide-field voltage imaging in zebrafish with voltage-sensitive dye and genetically encoded voltage indicator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 417, 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12744	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 Kanae Hiyoshi, Kaito Saito, Narumi Fukuda, Takahisa Matsuzaki, Hiroshi Yoshikawa and Sachiko Tsuda	4. 巻 18
2. 論文標題 Two-photon laser ablation and in vivo wide-field imaging of inferior olive neurons revealed the recovery of olivocerebellar circuits in zebrafish.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health	6. 最初と最後の頁 8357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph18168357	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 Yuikawa Tatsuya, Ikeda Masaaki, Tsuda Sachiko, Saito Shinji, Yamasu Kyo	4. 巻 63
2. 論文標題 Involvement of Oct4 type transcription factor Pou5f3 in posterior spinal cord formation in zebrafish embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 306, 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12742	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 Takahashi Kazuki, Ito Yuki, Yoshimura Mami, Nikaido Masataka, Yuikawa Tatsuya, Kawamura Akinori, Tsuda Sachiko, Kage Daichi, Yamasu Kyo	4. 巻 472
2. 論文標題 A globin-family protein, Cytoglobin 1, is involved in the development of neural crest-derived tissues and organs in zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2020.12.016	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 Inomata Chihiro, Yuikawa Tatsuya, Nakayama-Sadakiyo Yukiko, Kobayashi Kana, Ikeda Masaaki, Chiba Mizuki, Konishi Chihiro, Ishioka Akiko, Tsuda Sachiko, Yamasu Kyo	4. 巻 457
2. 論文標題 Involvement of an Oct4-related PouV gene, pou5f3/pou2, in neurogenesis in the early neural plate of zebrafish embryos	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 30~42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2019.09.002	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 Inomata C, Yuikawa T, Nakayama-Sadakiyo Y, Kobayashi K, Ikeda M, Chiba M, Konishi C, Ishioka A, Tsuda S, Yamasu K	4. 巻 457(1)
2. 論文標題 Involvement of an Oct4-related PouV gene, pou5f3pou2, in neurogenesis in the early neural plate of zebrafish embryos.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 30 - 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2019.09.002	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 Kota Abe, Atsuko Shimada, Sayaka Tayama, Hotaka Nishikawa, Takuya Kaneko, Sachiko Tsuda, Akari Karaiwa, Takaaki Matsui, Tohru Ishitani, Hiroyuki Takeda	4. 巻 27(3)
2. 論文標題 Horizontal Boundary Cells, a Special Group of Somitic Cells, Play Crucial Roles in the Formation of Dorsoventral Compartments in Teleost Somite	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 928 - 939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.03.068	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22件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kanae Hiyoshi, Kaito Saito, Narumi Fukuda, Takahisa Matsuzaki, Hiroshi Yoshikawa, Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Optical probing of the resilience in olivocerebellar circuits by two-photon laser ablation and in vivo imaging of inferior olive neurons in zebrafish
3. 学会等名 第27回 小型魚類研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Asuka Shiraiishi, Narumi Fukuda, Mari Hishinuma, Kanae Hiyoshi, Kyo Yamasu, Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Voltage imaging in zebrafish brain by Genetically encoded voltage indicator, ArcLight
3. 学会等名 第27回 小型魚類研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Asuka Shiraiishi, Narumi Fukuda, Mari Hishinuma, Kanae Hishinuma, Kanae Hiyoshi, Kyo Yamasu, Sachiko Tsuda
2. 発表標題 膜電位センサー-ArcLightを用いたゼブラフィッシュ in vivo 神経活動イメージング
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiyoshi K, Okuda E, Fukuda N, Saito K, Yamasu K, Tsuda S
2. 発表標題 Clustered behavior of Purkinje cell populations and its changes in the developing cerebellum of zebrafish
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Optical interrogation of neural population dynamics in the zebrafish cerebellum
3. 学会等名 NIBB-Academia Sinica International Webinar of Aquatic Model Organisms for Basic Biology to Human Disease Models (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Neural population dynamics in the cerebellar circuits: Calcium and Voltage imaging in Zebrafish larvae (ニューロンの集団ダイナミクスから見る小脳)
3. 学会等名 第53回日本発生物学会 ミニシンポジウム「The Cerebellum: Evolution, Development and Neuronal Circuits」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kanae Hiyoshi, Eri Okuda, Narumi Fukuda, Kyo Yamasu, Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Purkinje cell populations form functional compartments in the cerebellum contributing to the sensorimotor integration in zebrafish larvae
3. 学会等名 第53回日本発生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eri Okuda, Kanae Hiyoshi, Kyo Yamasu, Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Quantitative analysis of the dynamics of Purkinje cell populations in the whole cerebellum in zebrafish larvae
3. 学会等名 第43回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kanae Hiyoshi, Eri Okuda, Narumi Fukuda, Kanoko Okumura, Kyo Yamasu, Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Clustered behavior of Purkinje cell populations in the zebrafish cerebellum and its change with sensorimotor integration
3. 学会等名 第43回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kanae Hiyoshi, Eri Okuda, Narumi Fukuda, Kaito Saito, Masahiko Hibi, Kyo Yamasu, Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Clustered behavior of Purkinje cell populations in sensorimotor integration in the zebrafish cerebellum
3. 学会等名 The 26th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Narumi Fukuda, Kanae Hiyoshi, Eri Okuda, Kyo Yamasu, Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Anatomical and functional analysis of Inferior Olive-Cerebellar circuits in zebrafish larvae
3. 学会等名 The 26th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Hiyoshi, N. Fukuda, K. Okumura, K. Yamasu, S. Tsuda
2. 発表標題 Identifying functional compartments in the developing cerebellum: Calcium and voltage imaging in zebrafish
3. 学会等名 第49回北米神経科学学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanae Hiyoshi, Narumi Fukuda, Kanoko Okumura, Kyo Yamasu and Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Characterization of 3D structure and function of Purkinje cell populations involved in visuomotor control in zebrafish cerebellum
3. 学会等名 第25回 小型魚類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Narumi Fukuda, Kanae Hiyoshi, Yuki Kawabe, Kyo Yamasu, Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Morphological analysis of Purkinje cell population in 3D in the cerebellum of zebrafish larvae
3. 学会等名 第25回 小型魚類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田 佐知子
2. 発表標題 眼球運動におけるプルキンエ細胞の集団活動にみる小型魚類の小脳区画と発達 -魚を用いて小脳の構築メカニズムに迫る-
3. 学会等名 第13回Motor control研究会, シンポジウム「小脳が関与する制御機能の最前線 -基礎と臨床の融合を目指して-」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanae Hiyoshi, Narumi Fukuda, Kanoko Okumura, Kyo Yamasu, Sachiko Tsuda
2. 発表標題 発達中の小脳における機能的区画の3次元的理解: ゼブラフィッシュを用いた時空間的解析
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田 佐知子
2. 発表標題 膜電位イメージングにより捉えるゼブラフィッシュ小脳の発達
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会, シンポジウム「膜電位イメージング:新展開」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田 佐知子
2. 発表標題 小型魚類ゼブラフィッシュに観る小脳神経回路とその発達
3. 学会等名 第5回小脳システム研究会セミナー(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Spatiotemporal analysis of functional compartments in the developing cerebellum by calcium and voltage imaging
3. 学会等名 The 14th International Zebrafish Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Toward understanding functional development of the cerebellar circuitry with GFP and voltage imaging
3. 学会等名 Lawrence B Cohen Symposium (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanae Hiyoshi, Narumi Fukuda, Kyo Yamasu, Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Unraveling 3D structure of functional compartments in the developing cerebellum: Spatiotemporal analysis in zebrafish
3. 学会等名 第52回日本発生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sachiko Tsuda
2. 発表標題 Toward understanding functional development of the cerebellar circuitry with GFP and voltage imaging
3. 学会等名 5th Nagoya International Symposium on Neural Circuits: A Decade after "Discovery and Development of GFP": Expansion and Expectation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Hiyoshi K, Fukuda N, Shiraishi A, Tsuda S	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 385
3. 書名 Measuring Cerebellar Function (In vivo optical detection of membrane potentials in the cerebellum: voltage imaging of zebrafish)	

1. 著者名 Sachiko Tsuda	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Elsevier, Academic Press	5. 総ページ数 614
3. 書名 Optogenetics. In: Gerlai, R.T. (Ed.), Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish	

〔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	平田 豊 (Hirata Yutaka) (30329669)	中部大学・工学部・教授 (33910)	

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