

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22300126

研究課題名(和文)聴覚の獲得メカニズムに関する生理学的・分子生物学的解析

研究課題名(英文)Physiological and molecular biological studies on acquisition of auditory responsiveness in zebrafish

研究代表者

小田 洋一(Oda, Yoichi)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00144444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円、(間接経費) 3,840,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュの胚や仔魚を用いて、聴覚獲得過程における内耳の有毛細胞の発生と耳石の役割および聴覚中枢ニューロンの興奮性の発達メカニズムを調べた。発生初期に胚の内耳原基(耳胞)に生まれ先端に耳石を形成するテザー細胞が、頂上に感覚毛を形成し機械受容チャネルを発現し、最初の有毛細胞になることを示した。また、本来音を感知しない卵形嚢の有毛細胞も耳石を大きくすると音受容することから、音受容に果たす耳石の役割を明らかにした。聴覚入力を直接受ける後脳ニューロンの中でマウスナー細胞だけが特殊な興奮性を示すのは、発達過程で低閾値型カリウムチャネルを特異的に発現するためであることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The developmental origin of inner ear hair cells, role of ear stone size on acoustic sensitivity and molecular mechanisms underlying developmental change in firing properties of hindbrain neurons were studied in vivo in zebrafish embryos and larvae. We demonstrated first that tether cells, a few ciliated cells associated with an ear stone (otolith) in the embryonic inner ear, morphologically and functionally differentiate into first hair cells. Second, the sacculle inner ear organ containing a large otolith is necessary to detect sound, whereas the utricle containing a small otolith is not. But, utricle hair cells with experimentally enlarged otoliths acquired the sense of sound, suggesting that otolith size is crucial to sense sound. Third, unique firing properties of Mauthner cells among the hindbrain reticulospinal neurons receiving auditory nerve inputs are acquired during early development and coexpression of Kv beta subunits with low-threshold Kv1 subunits is required for them.

研究分野：総合生物学

科研費の分科・細目：神経科学、神経生理学・神経科学一般

キーワード：内耳 有毛細胞 耳石 球形嚢 卵形嚢 マウスナー細胞 カリウムチャネル ゼブラフィッシュ

## 1. 研究開始当初の背景

聴覚の本質的な過程は、我々をとりまく空気や水のわずかな振動である音を感知し、その信号から必要な情報を抽出することである。本研究は、我々が発達段階で聴覚を獲得するメカニズムを理解することを目的とした。聴覚の研究には長い歴史があり、1961年のノーベル生理学・医学賞に輝いた Georg von Békésy が示した蝸牛の基底膜での周波数表現や、Albert James Hudspeth による有毛細胞の音受容機構など、聴覚の実体に迫ったインパクトの大きな研究成果が得られている。教科書にはヒトの聴覚の仕組みは「耳介でとらえられた音が鼓膜を振動させ、最終的に内耳の有毛細胞の感覚毛を揺らし、感覚毛の先端にある機械受容チャネルが開いて、有毛細胞を興奮させる。有毛細胞の興奮は聴神経を経て脳に伝えられ情報が抽出される」と記述されている。ところが、肝心の音を電気信号に変換する有毛細胞の機械受容チャネルですら、昨年(2013年)にようやく有力な候補分子が提案されたもののいまだに同定されていない。また、内耳が頭蓋骨の奥深くにあって、直接アプローチすることが難しく、内耳から取り出して単離した有毛細胞でしか研究できなかったために、本質的な問題も残っている。我々の内耳はサブナノメートルの微弱な振動をとらえる想像を超えた感度を持つが、それを実現するためには感覚受容細胞である有毛細胞だけでなく振動を有効に伝える細胞外組織も重要である。

我々は聴覚系の発達を生体内で解析するために、脊椎動物のモデルとして注目されている熱帯魚のゼブラフィッシュを活用して、音を感知する特殊な有毛細胞の起源と微弱な音をとらえる物理的な要因を理解しようとした。サカナの中でもゼブラフィッシュなどの硬骨魚は音に敏感で、基

本的には哺乳類や鳥類と同じ内耳を持っている。しかも、ゼブラフィッシュの胚や仔魚は体が透明で、内耳の構造が外から直接観察でき、加えて発生・発達が早いことから、器官の形成過程を観察するのに適している。さらに多様な変異体や豊富な遺伝情報やさまざまな細胞に蛍光タンパクを発現するトランスジェニックシステムを活用すれば、発達過程でいつどのように有毛細胞が分化し、感覚器の構造が出来上がり、音をとらえるかを調べる上で非常に有用な系であると考えた。

内耳で電気信号に変換された聴覚情報は中枢で特徴抽出される。ゼブラフィッシュやキンギョなどでは、後脳に存在する網様体脊髄路ニューロン群(Reticulospinal Neurons, RSNs)が聴神経から直接入力を受けることが知られている。興味深いことに、RSNs のなかでマウスナー細胞(Mauthner cell, M細胞)は聴覚入力の最初のみ単発発火して音の開始をコードするのに対して、M細胞と同じ時期に生まれ同じ形態的特徴をもつ相同ニューロン(MiD2cm, MiD3cm)は音の強さをコードし、音の強さに応じた周波数で連続発火することが知られている(Nakayama and Oda, 2004)。本研究では、聴覚の獲得に関して、内耳での音の受容と聴覚中枢で特徴抽出を行うためにニューロンの興奮性が個性化するメカニズムを理解しようとした。

## 2. 研究の目的

音の振動を電気信号に変換する内耳の有毛細胞は感覚毛(stereocilia)の先端に機械受容チャネルを発現する特殊な細胞である。ゼブラフィッシュの発生・発達過程で有毛細胞ができる過程と、有毛細胞が音の微弱な振動に応じるために必要な細胞外組織(耳石)の役割を明らかにすることを第1の目的とした。内耳で変換された聴覚信号は聴神経を経て後

脳の M 細胞とその相同ニューロンに直接入力する。それらのニューロンが大きく異なる興奮性を獲得するメカニズムを見出すことを第 2 の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 有毛細胞の起源と聴覚受容における耳石の役割: ゼブラフィッシュの胚・仔魚を対象にして、有毛細胞の発生と感覚毛の形成をライブイメージングや免疫組織学的手法で調べ、さらに電気生理学的に有毛細胞の応答を記録して、有毛細胞のでき方を形態と機能の両面から解析した。また、耳石の形成が有毛細胞の音受容に果たす役割を、耳石の顕微操作と電気生理学的記録を組み合わせる調べた。

(2) M 細胞と相同ニューロンの異なる特徴抽出機構の獲得過程: 発達に伴う M 細胞および相同ニューロンの興奮性の変化を調べ、その興奮性を左右する電位依存性カリウムチャネル(Kv チャネル)に焦点をあて。Kv チャネルの発現と発火特性における役割を *in situ* hybridization、チャネルの特異的阻害剤の効果やアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた再構成系で解析した。

### 4. 研究成果

(1) 有毛細胞の起源と聴覚受容における耳石の役割

ゼブラフィッシュ仔魚の内耳には、卵形嚢 (Utricle, U) と球形嚢 (Saccule, S) と呼ばれる 2 つの耳石器官が存在する。耳石器官は、炭酸カルシウムでできた耳石と、感

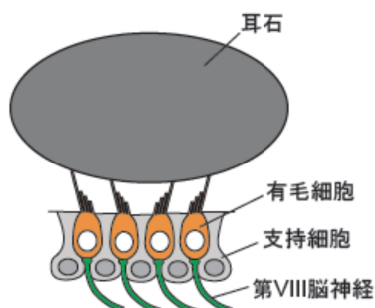


図 1: 耳石器官の模式図

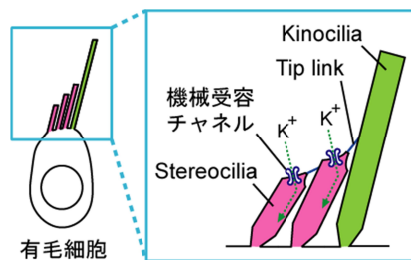


図 2: 有毛細胞での機械受容の仕組み

覚毛の動きを電気信号に変換する有毛細胞から構成される (図 1)。階段状に並び感覚毛 (Stereocilia) が音や頭の傾きによって長い毛の方向に倒れると、先端に存在する機械受容チャネルが開いて陽イオンが流入し、有毛細胞は脱分極する (機械受容、図 2)。有毛細胞の起源については、発達初期のゼブラフィッシュの耳胞 (耳の原基) に存在し、先端に耳石を形成するテザー細胞 (Tether cell) が最初の有毛細胞に分化すると予想されてきたが、実証はなく機能的に分化する過程は未解明であった。

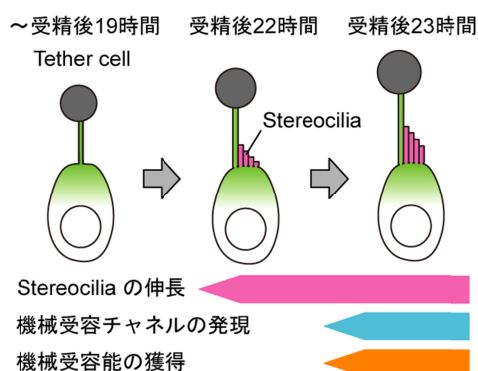
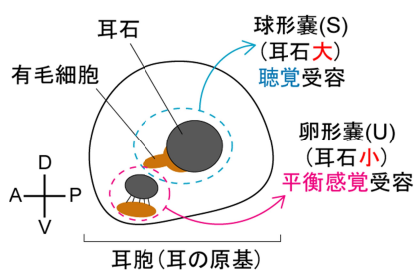


図 3: 機械刺激受容能の獲得過程

Stereocilia の抗体染色や、有毛細胞のライブイメージング、生体胚の有毛細胞の機械受容応答 (マイクロフォン電位) の記録により、受精後 22 時間からテザー細胞上に Stereocilia が現れ、そこから 1 時間という短い間に Stereocilia が伸長し、機械受容チャネルが発現して、機械受容能が獲得されることを初めて見出した (図 3. Tanimoto et al. *J. Neurosci*, 2011)。

聴覚と平衡感覚の受容における耳石の役割を検討するために、*in vivo* での耳石の微

細操作法を確立し、U と S の耳石をそれぞれ有毛細胞から外して、ゼブラフィッシュの行動や音刺激で誘発される有毛細胞のマイクロフォン電位に対する影響を調べた。その結果、U の有毛細胞が体の傾き、S の有毛細胞が音を受容することを明らかにした (Inoue et al. *Sci. Rep.* 2013)。有毛細胞が音や体の傾きを受容するには、刺激による耳石と有毛細胞の動きの間にずれが生じるためと理解されている。我々は、音を検知する S の耳石が平衡感覚に必要な U の耳石より大きいことに着目し、耳石の大きさが感覚受容に及ぼす影響を解析した。顕微操作で U の耳石を数倍大きくすると、本来音に反応しない U の有毛細胞も音に反応することを見出した (図 4)。有毛細胞外の構造変化と音刺激に対する反応の関係を生きた動物内で明確に関連付けた例はこれまでになく、本研究は聴覚の受容機構の解明に新たなアプローチを提示した (Inoue et al., *Sci. Rep.* 2013)。



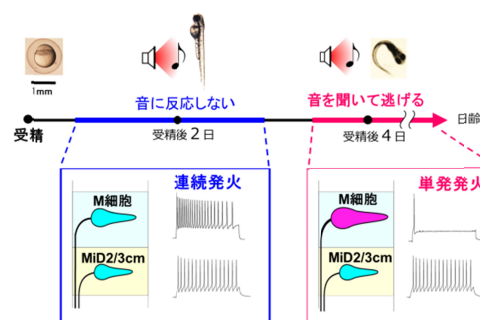
**図 4：耳石の大きさと機能分化の関係**

(2) M 細胞と相同ニューロンの異なる特徴抽出機構の獲得過程

感覚を正しく知覚するには、感覚器における刺激の受容に加え、その信号が中枢で適切に情報処理される必要がある。ゼブラフィッシュの後脳に存在する網様体脊髄路ニューロン群(RSNs)の一つであるマウスナー(M)細胞とその相同ニューロンの MiD2/3cm は聴覚入力を直接受けて、脊髄に直接出力を送り、音刺激に対するサカナの行動を制御している(Kohashi and Oda *J*

*Neurosci.* 2008; Kohashi et al. *J Neurosci.* 2012; Neki et al. *J Neurosci.* 2014)。ところが、M 細胞と MiD2/3cm は全く異なる発火特性を示す。MiD2/3cm は他の多くの RSNs と同様に脱分極入力の大きさに比例した発火頻度で連続発火するのに対して、M 細胞は大きな脱分極入力の開始時のみに単発の活動電位を発生するという特別な単発発火特性を示す。どのようにしてこれらニューロン群の中で M 細胞だけが異なる発火特性を獲得したのか、またその違いを決める分子基盤はこれまでに明らかにされていなかった。

本研究では M 細胞で緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを利用して、*in vivo* ホールセル記録法によって M 細胞の発火特性の発達過程を解析した。興味深いことに M 細胞の発火特性は、発達初期の胚から孵化するまでは隣接する相同ニューロン MiD2/3cm と同じように連続発火を示すが、発達のわずかな間に変化し受精後 4 日で単発発火特性を獲得することを見出した (図 5)。薬理学



**図 5：ゼブラフィッシュの発達過程における M 細胞と相同ニューロンの発火パターンの変化**

的実験から、この単発発火特性には低閾値型電位依存性カリウムチャンネルが必要であることを示した。そのチャンネルを形成する Kva1 サブユニットと、このチャンネルに結合する細胞内補助サブユニット Kvβ に着目し、その発現解析、機能解析、遺伝子ノックダウン実験を行った結果、ゼブラフィッシュの M 細胞と MiD2/3cm は共通に Kv1.1

チャネルを発現させているが、Kv1.1 チャネルの膜表出を促進すると考えられる Kv $\beta$ 2 サブユニットが受精後 4 日以降の M 細胞だけ発現して、M 細胞固有の単発発火特性が獲得されることを明らかにした (Watanabe et al. *J. Neurophys.*, 2014) (図 6)。

脳の隣接する分節に重複するように生まれ同じ入力を受けながら、全く異なる興奮性を獲得する過程は、音情報の特徴抽出のために多様な特性を獲得するメカニズムとして興味深いだけでなく、脳ニューロンの機能的分化に関する重要な示唆を与えるのではないかと考える。

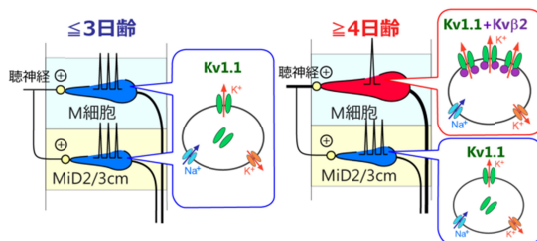


図 6 : 発達に伴い単発発火特性を獲得する M 細胞の分子基盤

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

Watanabe T, Shimazaki T, Mishiro A, Suzuki T, Hirata H, **Tanimoto M, Oda Y.** Coexpression of auxiliary Kv $\beta$ 2 subunits with Kv1.1 channels is required for developmental acquisition of unique firing properties of zebrafish Mauthner cells. *J Neurophysiol.* 111(6): 1153-64. DOI: 10.1152/jn00596. 2013. 査読有, (2014)

Neki D, Nakayama H, Fujii T, Matsui-Furusho H, **Oda Y.** Functional motifs composed of morphologically homologous neurons repeated in the hindbrain segments. *J Neurosci.* 34(9): 3291-3302. DOI:10.1523/JNEUROSCI.4610-13. 査読有, (2014)

Suzuki M, Toyoda N, **Takagi S.** Pulsed Irradiation Improves Target Selectivity of Infrared Laser-Evoked Gene Operator for Single-Cell Gene Induction in the Nematode *C. elegans*. *PLoS ONE* 9(1): e85783. DOI: 10.1371/journal.pone.0085783. 査読有, (2014)

Sudo Y, Okazaki A, Ono H, Yagasaki J, Sugo S, Kamiya M, Reissig L, Inoue K, Ihara K, Kandori H, **Takagi S,** Hayashi S, Hirata H. A blue-shifted

light-driven proton pump for neural silencing. *J Biol Chem.* 288: 20624-20632. DOI: 10.1074/jbc.M113.475533. 査読有, (2013)

Suzuki M, Toyoda N, Shimojyou M, **Takagi S.** IR Laser-induced gene expression in targeted single cells of *C. elegans*. *Development, Growth and Differentiation.* ;55(4):454-61. DOI: 10.1111/dgd.12061. 査読有, (2013)

Sasakura H, Tsukada Y, **Takagi S,** Mori I. Japanese studies on neural circuits and behavior of *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Neural Circuits* 7: 187. DOI: 10.3389/fncir.2013.00187. 査読有, (2013)

Inoue M, **Tanimoto M, Oda Y.** The role of ear stone size in hair cell acoustic sensory transduction. *Scientific Reports* 3: 2114. DOI: 10.1038/srep02114. 査読有, (2013)

Yamanaka I, Miki M, Asakawa K, Kawakami K, **Oda Y,** Hirata H. Glycinergic transmission and postsynaptic activation of CaMKII are required for glycine receptor clustering in vivo. *Genes Cells* 18(3): 211-224. DOI:10.1111/gtc.12032. 査読有, (2013)

Okazaki A, **Takagi S.** An optogenetic application of proton pump ArchT to *C. elegans* cells. *Neurosci Res.* 75(1): 29-34. DOI:10.1016/j.neures. 査読有, (2013)

Okazaki A, Sudo Y, **Takagi S.** Optical Silencing of *C. elegans* Cells with Arch Proton Pump. *PLoS ONE* 7(5): e35370. DOI:10.1371/journal.pone.0035370. 査読有, (2012)

Kohashi T, Nakata N, **Oda Y.** Effective sensory modality activating an escape triggering neuron switches during early development in zebrafish. *J Neurosci.* 32(17):5810-20. DOI:10.1523/JNEUROSCI.6169-11. 査読有, (2012)

Takeuchi Y, Hori M., **Oda Y.** Lateralized kinematics of predation behavior in a Lake Tanganyika scale-eating cichlid fish. *PLoS ONE* 7(1): e29272. DOI: 10.1371/journal.pone.0029272. 査読有, (2012)

Nukazuka A, Tamaki S, Matsumoto K, **Oda Y,** Fujisawa H, **Takagi S.** A shift of the TOR adaptor from Rictor towards Raptor by semaphorin in *C. elegans*. *Nat Commun.* 2: 484. DOI: 1038/ncomms1495 査読有, (2011)

**Tanimoto M,** Ota Y, Inoue M, **Oda Y.** Origin of inner ear hair cells: morphological and functional differentiation from ciliary cells into hair cells in zebrafish inner ear. *J Neurosci.* 31(10): 3784-94. DOI:10.1523/JNEUROSCI.5554-10. 査読有, (2011)



Nakano 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* 137(10): 1689-98. DOI:10.1242/dev.047464. 査読有, (2010)

〔学会発表〕(計 79 件)

Tsunehiko Kohashi, Natsuyo Nakata, **Yoichi Oda**. Effective sensory modality activating the Mauthner cell switches from tactile to acoustic/vestibular input in triggering escape behavior in developing zebrafish. *Neuroscience* 2010, 2010/11/13, San Diego Convention Center (San Diego, USA)

**Masashi Tanimoto**, Maya Inoue, **Yoichi Oda**. Ciliary tether cells morphologically and functionally differentiate into the first hair cells in zebrafish inner ear. *Neuroscience* 2011 Society for Neuroscience, 2011/11/14, Washington Convention Center (Washington, DC, USA)

**Masashi Tanimoto**, Maya Inoue, **Yoichi Oda**. Developmental acquisition of auditory responsiveness in zebrafish. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, 2011/7/16, Fortezza da Basso (Florence, Italy)

**Masashi Tanimoto**, Yukiko Ota, Maya Inoue, **Yoichi Oda**. Origin of Inner Ear Hair Cells: Morphological and Functional Differentiation from Ciliary Cells into Hair Cells in Zebrafish Inner Ear. 7th European Zebrafish Meeting, 2011/7/8, EICC(Edinburgh, Scotland)

Hiroki Tanaka, Masaki Shimojou, **Shin Takagi**. Synaptotagmin and Stonin2 is required for efficient EGL-17/FGF secretion by epidermal cells in *C. elegans*. 5th East Asia *C. elegans* meeting, 2012/6/27, Chientan Youth Activity Center (Taipei, Taiwan)

Ayako Okazaki, **Shin Takagi**. Light driven proton pump Arch is effective for optical silencing of *C.elegans*. EMBO conference, 2012/6/14, EMBL (Heidelberg, Germany)

Yuichi Takeuchi, Michio Hori, **Yoichi Oda**. Mechanism of lateralized predation behavior in a Lake Tanganyika scale-eating cichlid fish. The 14th International Behavioral Ecology Congress, 2012/8/15, Lund University (Lund, Sweden)

Maya Inoue, **Masashi Tanimoto**, **Yoichi Oda**. Large-otolith-mediated mechanotransduction and afferent neural transmission in saccular pathway underlie auditory perception

in larval zebrafish. *Neuroscience* 2012, 2012/10/13, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, USA)

Takaki Watanabe, Takashi Shimazaki, **Yoichi Oda**. The molecular basis for the developmental acquisition of the unique firing properties of the Mauthner cell in zebrafish. *Neuroscience* 2012, 2012/10/13, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, USA)

**Yoichi Oda**. Acquisition of the sense of hearing during development. Albert Einstein University Department of Neuroscience Seminar, 2012/10/19, Kennedy Center (New York, USA)

**Yoichi Oda**. Electrophysiological approaches to study brain functions in zebrafish. IBRO School of Neuroscience 2012 (招待講演), 2012/11/20, Monash University (Sunway, Malaysia)

**Yoichi Oda**. Functional architecture of zebrafish hindbrain network revealed by calcium imaging during behavior. IBRO School of Neuroscience 2012 (招待講演), 2012/11/22, Monash University (Sunway, Malaysia)

〔図書〕(計 2 件)

白尾智明(監訳), 小田洋一他, 丸善出版株式会社, イラストレイテッド神経科学, 2013, 466

ゼブラフィッシュの発達過程における聴覚獲得の仕組み 小田洋一, 生物科学 65(2): 90-94, 2013

〔その他〕

ホームページ情報

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 M7 研究室

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~m7home/>

報道関連情報

中日新聞, 2011 年 9 月 28 日

中日新聞, 2012 年 1 月 7 日

中日新聞夕刊, 2013 年 7 月 2 日

科学新聞, 2013 年 7 月 26 日

マイナビニュースサイト他, 2014 年 3 月 6 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

小田 洋一 (Yoichi Oda)

研究者番号: 00144444

(2) 研究分担者

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

高木 新 (Shin Takagi)

研究者番号: 90171420

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

谷本 昌志 (Masashi Tanimoto)

研究者番号: 30608716