

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650165

研究課題名(和文)単一ニューロン遺伝子発現誘導法による行動の多様性と可塑性を生み出す神経基盤の解析

研究課題名(英文)Analysis of neural plasticity and behavioral diversity by the inducible method of single neuron gene expression

研究代表者

谷本 昌志(Tanimoto, Masashi)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30608716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、音や振動に対するゼブラフィッシュ仔魚の逃避運動を駆動する神経回路の構成と個々のニューロンの役割を行動学的に調べ、マウスナー(M)細胞と呼ばれる延髄に存在する一対の網様体脊髄路ニューロンが決定的な役割を担うこと、M細胞が失われてもなお左右への運動出力を決定し、逃避運動を駆動する多重な神経回路が存在することを明らかにした。また、熱ショック応答により緑色蛍光タンパク質を発現する遺伝子組換えゼブラフィッシュ胚および仔魚を実験モデルとして、先端を加工した光ファイバから脳内に近赤外レーザーを照射し、照射条件に従って単一細胞あるいは細胞集団に組み換え遺伝子の発現を誘導する方法の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：Behavioral analysis on sound/vibration-evoked fast escapes in larval zebrafish showed that Mauthner (M-) cell played a crucial role in the initiation of the escapes. In the absence of the M-cell, non-M circuits could trigger the fast escapes to the left or right, while larvae sometimes exhibit ed aberrant escapes. By using transgenic lines that drive heat-inducible expression of green fluorescent protein (GFP), edge-processed optical fibers and infrared laser, we succeeded in inducing GFP in targeted single or multiple neurons in embryonic and larval zebrafish brain.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：遺伝子発現誘導 神経細胞 近赤外レーザー 光ファイバ

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳は膨大な数のニューロンから構成される複雑な神経回路網により情報処理を行い、運動出力により行動を制御する。動物の行動には多数のニューロン群が関わっており、単一のニューロンレベルの神経回路機能の解明は容易ではない。

硬骨魚が突然の音や振動を察知して俊敏に逃げる逃避運動の駆動には、マウスナー(M)細胞と呼ばれる延髄に存在する一对の網様体脊髄路ニューロン(Reticulospinal neurons, RSNs)が決定的な役割を担う(図1. Zottoli, 1977; Kohashi and Oda, 2008)。音や振動は内耳の有毛細胞で受容、電気信号に変換され、聴神経節細胞を介してM細胞を含むニューロン群へ伝達される。M細胞は軸索を細胞体と反対側の脊髄へ投射しており、活動電位を発生すると反対側の脊髄運動神経系を興奮させ、胴筋を収縮させることで短潜時のすばい逃避運動を開始すると考えられている。感覚受容器から中枢神経系、そして筋への運動出力までの神経回路が1細胞ずつ個別に同定できるため、逃避運動回路は神経回路機能と行動を1:1に結びつけて動作原理を抽出可能な独創的なモデル実験系である。

一方で、M細胞の活動を伴わない長潜時のゆっくりした逃避運動も音や振動によって引き起こされることが報告されている(Burgess and Granato, 2007)。それでは逃避運動回路はどのようにして異なる運動出力を生み出すのだろうか。我々は、発生が早く遺伝子操作や生体観察に適した熱帯魚ゼブラフィッシュの仔魚を用いて、逃避運動を駆動する神経回路が多様な運動出力を生み出す仕組みを理解しようとした。

(2) 脳神経回路の情報処理原理を解くために有用な方法の一つは、神経回路の構成を明らかにしたうえで個々のニューロン活動を活性化あるいは抑制し、神経回路の活動動態や動物の行動への影響を解析することである。近年では、神経細胞に光感受性イオンチャネル/ポンプを発現させて光で神経活動を制御する光遺伝学的手法を用いた研究が国内外で盛んに行われているが、単一細胞レベルの神経回路の技術的な課題が存在する。例えば、組織/細胞特異的プロモーターで光感受性イオンチャネル/ポンプなどの組換え遺伝子を発現させる方法は、時空間的に十分な精度で標的細胞に遺伝子発現を誘導することが困難な場合がある。また、従来から用いられているエレクトロポレーションやウイルスベクターを利用した遺伝子導入法は確率的にランダムに細胞へ取り込まれるため、標的とする細胞のみに特異的に遺伝子発現を誘導することは依然として困難である。

近赤外線レーザーを標的細胞に照射して熱ショックプロモーターを活性化し、組換え遺伝子の発現を誘導する方法(Infrared

Laser-Evoked Gene Operator (IR-LEGO), Kamei et al., 2009)は、任意の時期に標的細胞を狙って遺伝子発現を操作可能なため、この問題を打開する有効な手法だと期待される(図2)。しかし、脊椎動物の脳研究にこの手法を適用した前例は無く、活用できるか否かは未知であった。また、対物レンズで近赤外レーザーを集光する従来法では、光が焦点上の標的細胞に到達するまでの光路上の水分子に光が吸収されて標的外の細胞も過熱してしまうため、生体組織の表面近傍の細胞にしか適用することができなかった。

2. 研究の目的

(1) 音や振動に対する逃避運動を駆動する神経回路の構成と個々のニューロンの役割を明らかにし、神経回路機能を行動と結びつけて理解することを第一の目的とした。具体的には、M細胞を含むRSNsの逃避運動の駆動における役割を明らかにすることを目的とした。

(2) IR-LEGO法に改良を加えて脊椎動物の脳に適用し、「任意の単一細胞に」「任意の時期に」「任意の遺伝子の」発現を誘導して神経回路機能を解析する手法を確立することを第二の目的とした。具体的には、ゼブラフィッシュ胚のM細胞を含むRSNsや中脳視蓋の細胞を標的とし、先端を加工した光ファイバを脳内に刺入して近赤外光を直接標的細胞に照射する新たな手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) M細胞やその他のRSNsに緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein, GFP)を発現する遺伝子組換えゼブラフィッシュ系統や、蛍光色素標識によってRSNsを可視化したゼブラフィッシュ仔魚を用いて、微小ガラス針やレーザー照射によってRSNsを選択的に破壊し、逃避運動の駆動への影響を行動学的に解析した。

(2)

熱ショック応答によりGFPを発現する遺伝子組換えゼブラフィッシュ胚および仔魚を用いた。近赤外線レーザーを脳内に照射するために先端を円錐状に加工した光ファイバを設計した。脳内に近赤外レーザーを照射し、GFPの発現を観察することで照射条件に従って単一細胞あるいは細胞集団に組換え遺伝子の発現を誘導する条件検討を行った。さらに、恒常的な遺伝子発現誘導を目的として、熱ショック応答によってCre/loxP部位特異的遺伝子組換えが起こり、組換えの起こった細胞選択的に恒常的に目的遺伝子を発現する遺伝子組換えシステムを利用した。

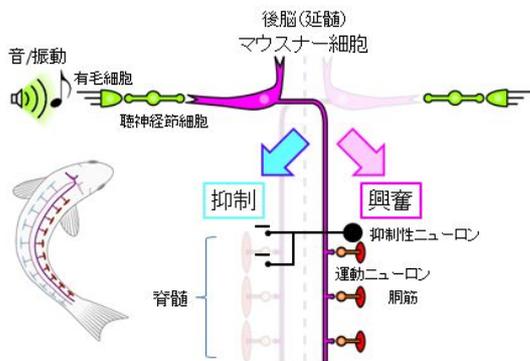


図1. 音/振動刺激に対する逃避運動回路。マウスナー細胞は聴覚入力を受けて活動し、反対側の脊髄運動神経系を活動させる一方で同側を抑制し、片側の胸筋のみを収縮させて逃避運動を駆動する。

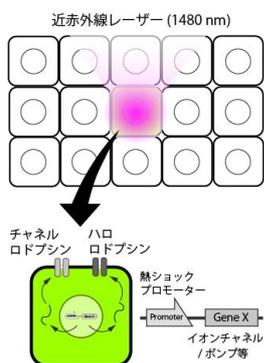


図2. 近赤外線レーザーを用いて単一細胞レベルで熱ショックプロモーターを活性化し“任意の細胞で”、“任意の時期に”遺伝子発現を誘導する手法

4. 研究成果

(1) 音/振動で誘発される逃避運動におけるM細胞の役割

M細胞をもつ仔魚の逃避運動の潜時分布の最頻値は5ミリ秒であった。これに対してM細胞を破壊した仔魚では潜時は長く、最頻値は10~12ミリ秒であった。したがって最短潜時の逃避を駆動するにはM細胞が必要であることが確認された。その一方で、M細胞を破壊してもなお、音/振動刺激に対してわずかに潜時が長い逃避運動が駆動されることが新たに明らかになった。

また、M細胞が消失した仔魚はすばやい逃避運動を起こす確率が低く、長潜時のゆっくりした逃避運動を起こす割合が増加した。すなわち、M細胞は逃避運動を効率的に駆動し、行動閾値を下げるはたらきをもつことが示唆された。

さらにM細胞を破壊した仔魚は、逃避方向を迷うかのように最初に浅く曲がった方向とは反対側への逃避や、尾を先に曲げ頭が遅れて屈曲する逃避、体をS字に曲げる異常

な逃避が観察された。これらの結果はM細胞が逃避方向を確実に決定するために必要であることを示唆する。また、M細胞以外の逃避運動回路も多くの場合、左右へ逃げる方向を迅速に決定できるということが明らかになり、それを実現する神経回路メカニズムの実体は興味深い。

M細胞以外のRSNsについても聴覚入力を受けている細胞に注目して同様に破壊実験を行ったが、現時点では明確な機能は見出されていない。一つひとつのニューロンが失われても運動出力に大きな欠陥があらわれないように、感覚運動回路が多重に構築されていることを示唆する。

M細胞が最短潜時の逃避運動を駆動する仕組みには、脱分極から短い時間で活動電位を発生すること、軸索の伝導速度が極めて速いこと、直接脊髄運動ニューロンや脊髄興奮性介在ニューロンを興奮させることが重要と考えられる。また、M細胞は脊髄の交連性抑制性介在ニューロンを介して、反対側の脊髄回路を強く抑制する働きも担う (Satou et al., 2009)。したがってM細胞は反対側を興奮、同側を抑制するという左右非対称の運動指令を瞬時に脊髄へ送ることで迅速かつ全身の調和のとれた正確な運動を実現させると理解される (図1)。行動に対して決定的な役割をもつM細胞を中心として逃避運動回路を理解することは、動物の感覚運動制御における神経回路機能を解明する良いモデルであり、今後の研究の進展が期待される。

(2) 光ファイバを用いた IR-LEGO 法の開発

先端を加工した光ファイバから赤外線レーザー照射時の生体脳内の温度の空間分布温度上昇により GFP 蛍光強度が減少する (1 上昇するごとに約1%の減少 (Kamei et al., 2009)) ことを利用して、赤外線レーザー照射時の脳内の温度の空間分布を計測した。光ファイバ IR-LEGO で脳神経細胞に GFP を発現する遺伝子組換えゼブラフィッシュ胚の中脳視蓋領域に照射を行った結果、20mW の連続照射ではファイバ先端に位置する細胞において約32%蛍光強度が減少した。しかし、先端から150 μ m先でも約12%蛍光強度が減少し、0.13 μ mの熱の拡散が見積もられた。そのため、熱の拡散を抑えるために断続的に光を照射するパルス照射 (Churgin et al., 2013) を行うと、蛍光強度の減少は50 μ m先で1.7%となり、熱の広がりを0.4 μ mまで限局させることに成功した。

熱ショックによる組換え遺伝子の発現誘導

熱ショック応答により GFP を発現する遺伝子組換えゼブラフィッシュ胚および仔魚の脳内に光ファイバ先端を刺入して近赤外線レーザー照射を行い、中脳の視蓋領域や RSNs など、脳内部の標的細胞で GFP 発現を誘導することに成功した。GFP の発現は時間が経つごとに減少した。照射条件を変えることによ

り GFP を発現する細胞数、発現強度が変化し、RSNs のひとつであるマウスナー細胞単一細胞で、または RSNs のひとつである MiD3cm 細胞を含む細胞群での GFP 発現誘導に成功した。

部位特異的の遺伝子組み換えを利用した長期的な遺伝子発現誘導

熱ショックプロモーターによる GFP 発現は一過的であったため、長期的な発現誘導を目指して部位特異的の遺伝子組み換えを利用した。全身熱ショックおよび光ファイバ IR-LEGO を用いた熱ショックにより、遺伝子組換えによって発現した GFP は、熱ショック後 8 日後においても強く発現していた。

本研究で開発に成功した光ファイバを用いた新たな IR-LEGO 法は、生体内組織/細胞での遺伝子発現誘導に有用であり、今後さらなる技術の確立と様々な研究分野における応用が期待される。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Sugimoto A, Yokomichi S, Tanimoto M, Oda Y, Reexamination of functional roles of Mauthner cell in acoustically evoked C-starts of zebrafish, 19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2013 年 9 月 20 日, Sendai.

Tanimoto M, Yokomichi S, Sugimoto A, Oda Y, Sound/vibration-evoked fast escapes triggered by Mauthner circuits or non-Mauthner circuits in zebrafish, Neuro2013, 2013 年 6 月 21 日 Kyoto.

Takahashi M, Tanimoto M, Oda Y, Mauthner cell activity associated with initiation and modification of fast escape behavior in zebrafish larva, Neuro2013, 2013 年 6 月 22 日 Kyoto.

[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/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 昌志 (Masashi Tanimoto)
名古屋大学 大学院理学研究科 助教
研究者番号 : 30608716

(2) 研究分担者

小田 洋一 (Yoichi Oda)
名古屋大学 大学院理学研究科 助教
研究者番号 : 00144444

高木 新 (Shin Takagi)
名古屋大学 大学院理学研究科 准教授
研究者番号 : 90171420

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :