

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26650122

研究課題名(和文)光遺伝学と単一細胞光刺激装置を用いて、ホヤ幼生中枢神経系の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of ascidian larval nervous system with optogenetics and a single cell photo stimulation device

研究代表者

中川 将司(Nakagawa, Masashi)

兵庫県立大学・生命理学研究科・助教

研究者番号：00212085

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):脊椎動物の脳の起源はホヤ幼生の脳と考えられている。脊椎動物同様に神経管より中枢神経系を構築されている。ホヤ幼生の神経細胞は僅か200個足らずである。幼生は半透明なので、光遺伝学手法(光照射により神経細胞を興奮または抑制させることができる手法)により、無傷の状態で特定の神経を興奮することができる。我々は、一細胞レベルで特定の神経を興奮させることができる単細胞光刺激装置を作製した。その装置を用いて一つの抑制性神経を興奮させると尾部運動は停止し、その興奮を解除すると尾部を左右に振る運動が見られた。このことから、この単純な神経回路で尾を左右に振る運動を引き起こすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文):The origin of vertebrate brain is thought to be that of the ascidian (sea squirt). Indeed, the larval central nervous system is derived from the neural tube. The nervous system is composed of only about 200 neurons. Previously, we found that a simple neural circuit which is composed with 2 cholinergic neurons and 2 GABA/glycinergic neurons. We deduced that the simple circuit gave rise to tail beating behavior. We produced a novel single cell photo-stimulation device, which can excite a single target cell. We excited a single GABA/glycinergic neuron for a while. After the excitation light was off, the larval tail beating started. The result suggested that this simple neural circuit is a central pattern generator of tail beating.

研究分野：動物生理

キーワード：神経回路 光遺伝学 ホヤ幼生 神経機能 行動

1. 研究開始当初の背景

ホヤは、脊椎動物にもっとも近縁な現生無脊椎動物である。成体は、固着性で花瓶のような形態を示し、脊椎動物の体型とは大きく異なる。一方、変態前の幼生時ではオタマジャクシ様形態をもち、尾部を左右に振り遊泳する。幼生の中枢神経系は、僅か 200 個足らずの神経細胞から構成され、脊椎動物と同様、脊索の背側に形成される神経管から神経系が形成される。それ故、ホヤ幼生の中枢神経系は、脊椎動物の中枢神経系の原型だと考えられている。

我々は、神経特異的抗体を作製し、免疫染色法でホヤ幼生の光受容細胞や神経細胞を可視化してきた。一方、日下部等は、神経特異的プロモータを用いて、グルタミン酸神経やコリン作動性神経等の形態を明らかにした。Imai らは、シナプトタグミンプロモータを用いて神経細胞を可視化し、幾つかの特徴的なニューロンを同定した。我々が特に注目したのは、尾部先端に見られるコリン作動性ニューロンと GABA/グリシン作動性ニューロンからなる興味深い神経回路である。その回路(図 1)は、尾部を左右に振る運動を引き起こす、中枢パターン発生器(CPG)回路ではないかと考えていた。しかし、神経回路の機能解析は殆どなされていなかった。神経の機能解析を行う手法として、電気生理学的手法がよく用いられているが、幼生の胴部は 200 μm と小さく、体表面は被囊で覆われていて、また骨格系がないため固定することができず、生理学的研究は殆どなされていなかった。

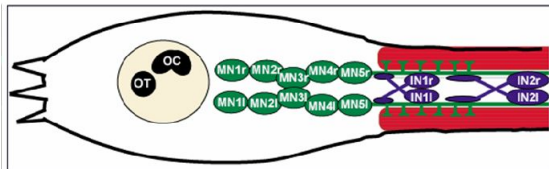


図 1 運動系ニューロン回路の模式図：
MN：コリン作動性ニューロン，IN：GABA/
グリシン作動性ニューロン，Mu：筋肉

2. 研究の目的

最近 Meinertzhagen らのグループによるコネクトーム解析によって、ホヤ幼生の神経ネットワークが明らかにされつつある。しかし、回路の機能はまだ殆ど分かっていない。本研究では、光遺伝学的手法を用いて、ホヤ幼生の神経回路における各神経の機能を調べる。

3. 研究の方法

(1) 単一細胞光刺激装置の作製

光遺伝学的手法とは、神経細胞にチャンネルロドプシンやハロロドプシンを発現させ、光を照射することによって、その神経を興奮または抑制することができる手法である。上記に述べたように、ホヤ幼生では従来の電気生理学的手法により特定の神経を興奮させる

ことは難しかったが、光遺伝学的手法を用いれば、光を照射させるだけで非侵襲的に特定の細胞を興奮させることができる。しかし特定の神経だけを発火させるには、微小ビーム光を特定の神経に照射しなければならない。そこで我々は単一細胞だけに光を照射できる装置の作製することにした。当初は、レーザー光を凸レンズで集光し、特定の神経だけに照射することを考えた。しかし、我々が設計した装置図を光学機器メーカーのシグマ光機株式会社の技術者に見せたところ、直接対物レンズにレーザー光を照射してもそのビーム径は 20 μm より小さくすることは難しいと言われた。シグマ光機の技術者の提案で、装置の設計を変更し、レーザー光を一度ガラスファイバーに入射した後、対物レンズを通すことにした。その結果、図 2 に示すように 10 μm 径のビームを得ることができた。赤色レーザーは標的となる神経を定めるために、青色レーザーはチャンネルロドプシンを活性化させるために、そして紫色レーザーは、光変換タンパク質 KikGR の蛍光色を変換させるために、それら 3 つのレーザーを搭載した。それらのレーザービームを絞り込むために長焦点距離対物レンズを用いた。しかし、集光レンズの色収差により各レーザー波長で焦点距離ずれるので、それをマイクロメータで補正し、一つの神経だけに光を照射できるようにした。

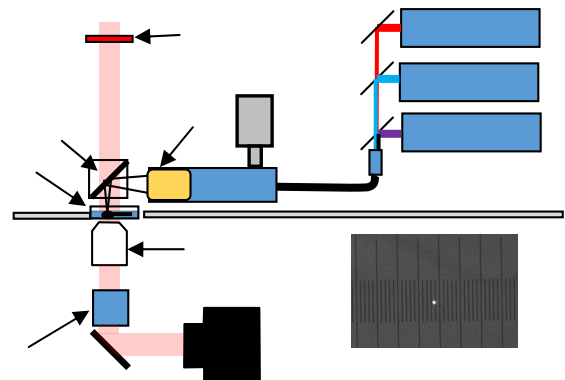


図 2 単一細胞光刺激装置

ターゲット探索用 He-Ne レーザ(634nm)
光刺激用 488nm 半導体レーザー フォトコンバージョン 405nm 半導体レーザー 赤色フィルタ
ダイクイックミラー x5LongWD 対物レンズ
ホヤ幼生 観察用対物レンズ x4/x20
蛍光フィルターユニット 高感度 CCD カメラ
マイクロメータ ビーム径

(2) チャンネルロドプシン、蛍光タンパク質の導入

特定の神経にチャンネルロドプシンを発現させるために、神経特異的プロモータの下流に、チャンネルロドプシンと mkikGR (元々は緑色蛍光タンパク質であるが、紫色の光を照射すると蛍光色が赤色に変換する蛍光タンパク質)とを連結したプラスミドを作製し、エレクトポレーション法により受精卵に導入し

た。

(3) 幼生の固定

ホヤ卵はエレクトロポレーション法でプラスミドを導入する為、予め卵膜を除去してある。卵膜を除去した幼生は体表面に被囊が形成されない。その為、ポリリジンコートしたガラスボトムチャンバーのガラス面に胴体部が付着し、固定化される。一方、尾部はフリーな状態でその運動を撮影できる。

4. 研究成果

(1) ホヤ幼生尾部運動の神経回路

図1に示すように、尾部付け根部にある2対の上行性抑制性神経 (ACIN) は後方から前方へ軸索を伸ばし、途中で左右交差して、反対側のコリン作動性運動神経の軸索にシナプス結合しているように見える。一つの ACIN 神経に光刺激を与えた後、光刺激をオフすると激しい尾部運動を引き起こした(図3)。この現象は抑制後反跳によって説明できる。光刺激した ACIN は反対側の運動神経に抑制性信号を与える。その結果、運動神経は過分極化する。過分極化した運動神経は、その閾値レベルも下がり、閾値レベルが元の静止電位より低くなる。その状態で ACIN への光刺激をオフすると、運動神経が急激に脱分極し閾値レベルを超えて活動電位が生じる。一方、同側の尾部筋肉を収縮させると同時に、反対側の ACIN を一過的に興奮させる。そうするとまた反対側の運動神経が過分極後また脱分極し、反対側の筋肉が収縮する。その繰り返しによって左右交互に尻尾を振るものと思われる。

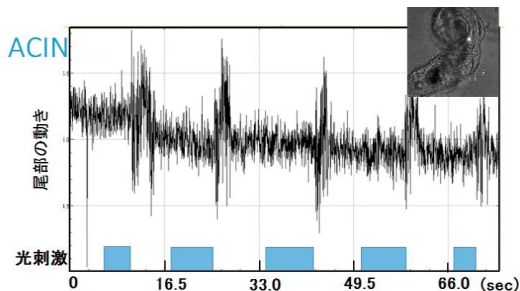


図3 尾部付け根の ACIN 神経に刺激光を照射すると尾部の運動が止まり、刺激光照射をオフすると尾部運動が発動した。青色バーは、光照射時間を示す。

(2) ホヤ幼生のマウスナー様神経の検証

マウスナー神経は魚類や両生類の後脳に見られる巨大な神経で、軸索を左右に交差して後方に伸ばし、危険を感知すると瞬時に逃避行動を引き起こす。最近 Ryan らは、コネクトーム解析からホヤ幼生にも左右の神経の軸索が交差するマウスナー神経様 ddN が存在すると報告した。この特徴的なマウスナー様形態の神経は、Stolfi らグループが先に見出したものである。彼らは、運動神経節部にある5対のコリン作動性神経を異なる転写

因子のプロモータを用いて各蛍光タンパクを発現させることで、それぞれの神経の形態を明らかにした。その結果、最も前方にある神経 (Dmbx 神経) は、位置的にも形態的にも ddN と同じ神経だと思われる。そこで我々は、Dmbx プロモータを用いてマウスナー細胞様神経にチャンネルロドプシンを発現させ、光刺激に対してどういう応答を示すか、調べた。その結果、尾部運動は光刺激に対して同調していないことが分かった(図4)。このことは、ホヤ幼生でのマウスナー様神経は、逃避行動を引き起こすトリガーになっていないと思われる。

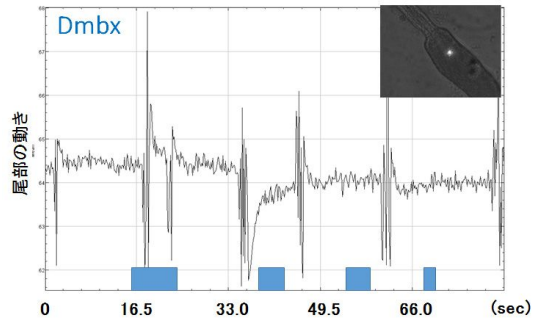


図4 ホヤ幼生のマウスナー様 ddN (Dmbx) 神経を発火させても、逃避行動を示さなかった。青色バーは、光照射時間を示す。

(3) 脳胞部の GABA/グリシン神経は逃避行動に關与する。

GABA/グリシン神経は尾部付け根部だけでなく、胴部の脳胞後方部や運動神経節部にも存在する。幼生全身に刺激光を照射すると遊泳行動を引き起こした。そこで、胴部内のどの GABA/グリシン神経が、遊泳行動を引き起こすのか調べるために、微小ビーム光を胴部全域にスキャンした。その結果、脳胞部後部に存在する GABA/グリシン神経を興奮させると遊泳行動が発動することが分かった。この脳胞後部の GABA/グリシン神経がどのような神経回路を介して、尾部運動を引き起こしているか、明らかにしていきたい。

(4) 標的神経細胞の標識

単一細胞光刺激装置(図2)は、微小レーザービームで特定の神経を活性化させるだけでなく、その後 405nm レーザを照射することでその神経細胞の蛍光色を緑色から赤色に変換できる。コリン作動性神経にチャンネルロドプシン及び光変換蛍光タンパク質 mKikGR を発現させた幼生に 10 μ m 径の 488nm レーザ光をスキャンする。尾部運動に關与する神経細胞が見つかったら、その細胞に 405nm のレーザー光を照射し、緑色蛍光を赤色蛍光に変換した。そして、その幼生はホルマリンで固定した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。尾部運動を引き起こした運動神経を赤色蛍光で標識することができた(図5)。

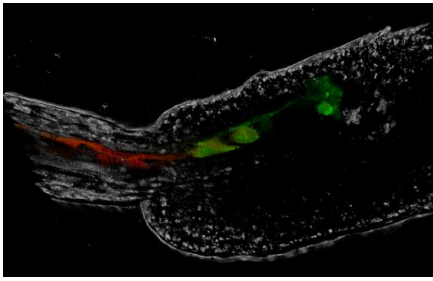


図 5 光刺激で尾部運動を引き起こしたコリン作動性神経を赤色蛍光で標識した。

参考文献

Delsuc, F. Brinkmann H., Chourrout D. and Philippe H. “Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates” *Nature* 439, 965-968 (2006)

Meinertzhagen I. A. and Okamura Y. “The larval ascidian nervous system: the chordate brain from its small beginning” *TRENDS in Neuroscience* 24, 401-410 (2001)

Horie T., Orii H. and Nakagawa M. “Structure of Photoreceptors in the Ascidian Tadpole Larva” *J. Photosci.* 19, 272-274 (2002)

Horie T., Nakagawa M. Sasakura Y., T. G. Kusakabe and Tsuda M. “ Simple Motor System of the Ascidian Larva: Neuronal Complex Comprising Putative Cholinergic and GABAergic/Glycinergic Neurons” *Zool Sci.* 27, 181-190 (2010)

Horie T., Kusakabe T. and Tsuda M. “Glutamatergic Networks in *Ciona intestinalis* Larva” *J. Comp. Neurol.* 508 249-63 (2008)

Yoshida R., Sakurai D., Horie T., Tsuda M. and Kusakabe T.G. “Identification of Neuron-Specific Promoters in *Ciona intestinalis*” *Genesis* 39, 130-140 (2004)

Imai J.H. and Meinertzhagen I. A. “Neurons of Ascidian Larval Nervous System in *Ciona intestinalis*: I. Central Nervous System” *J. Comp. Neurol.* 501, 316-334 (2007)

Ryan K., Lu Z. and Meinertzhagen I. A. “The CNS connectome of a tadpole larva of *Ciona intestinalis* (L.) highlights sidedness in the brain of a chordate sibling” *eLife* 5 e16962 (2016)

Ryan K., Lu Z., Meinertzhagen I. “Circuit Homology between Decussating Pathways in the *Ciona* Larval CNS and the Vertebrate Startle-Response Pathway” *Curr. Biol.* 27 721-8 (2017)

Stolfi A. and Levine M. “Neuronal subtype specific in the spinal cord of protovertebrate.” *Development* 138,

995-1004 (2011)

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 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 将司 (NAKAGAWA MASASHI)
 兵庫県立大学・大学院・生命理学研究科
 研究者番号：00212085

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()