

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830025

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ遊泳速度を制御するMLR-後脳-脊髄神経回路の解明

研究課題名(英文)Analysis of MLR-hindbrain-spinal cord pathway regulating swim speed of zebrafish

研究代表者

木村 有希子(KIMURA, Yukiko)

基礎生物学研究所・神経行動学研究部門・助教

研究者番号：70581122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の移動運動を制御する主要な経路のひとつに、中脳歩行誘発野(MLR) 後脳脊髄という経路がある。この経路は移動運動の速度制御にも関与する可能性がある。しかし、この経路がどのような種類の神経細胞により構成されているか、詳細は分かっていない。本研究では、比較的単純な神経系を持ち、分子遺伝学的な解析が容易なゼブラフィッシュを実験に用いて、この問題を解決することを試みた。しかし、結論として、事業期間内にゼブラフィッシュのMLRニューロンを特定できず、MLR 後脳 脊髄の経路を解明することはできなかった。しかし、その過程で新たなトランスジェニックフィッシュ作製方法の開発という成果を上げた。

研究成果の概要(英文)：The mesencephalic locomotor region (MLR) is a functionally defined area that is associated with the control of vertebrate locomotion. It is suggested MLR plays a role in controlling speed of locomotion. MLR neurons project to reticulospinal neurons in the hindbrain, and the reticulospinal neurons project to the spinal cord. However, it is unclear what types of neurons are making up this pathway. In this project, I planned to reveal this problem by using zebrafish because zebrafish are useful models for genetic studies and have a simple nervous system. However, we could not identify the zebrafish MLR neurons within the project period, so we could not elucidate what types of neurons constitute the MLR-hindbrain-spinal pathway. However, we were able to develop a new efficient method for transgenic fish generation during the process of this project.

研究分野：神経科学

キーワード：ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の歩行や遊泳などのロコモーションを制御する主要な経路のひとつとして、中脳歩行誘発野(MLR) 後脳 脊髄という経路はよく知られている。MLR へ電気刺激を与えると、歩行や遊泳が始まり、刺激の強さに応じてロコモーションの速度や強さが変化する。この経路は主に哺乳類やヤツメウナギなどを用いた長い研究の歴史があり、MLR から後脳腹側の脊髄投射ニューロンに直接興奮性入力があり、この後脳ニューロンが脊髄の遊泳リズム生成器(CPG)に興奮を送るとされる。しかし、後脳に存在する様々な種類の神経細胞のうち、どの細胞が MLR からの情報を受け取り、どのような処理をし、脊髄のどのような種類の細胞に情報を渡して実際にロコモーションの速度を制御しているかについては、未解明の部分が多い。本研究では、この経路の詳細を明らかにすることを目的とした。

従来、上記の研究が困難であった理由は2つある。ひとつは、上記の経路を担う特定の神経細胞群を同定し、解析する手法が乏しかったことである。しかし、近年、神経発生学研究が進展する中で、少数の神経細胞群で発現する転写因子が複数見ついている。これらの転写因子の発現は、神経細胞の個性と密接にリンクしていると考えられる。そのため、特定の転写因子の発現の有無によって、特定の機能を持つ神経細胞集団を同定できると期待される。現在、特定の神経細胞を同定するためのマーカーとなる転写因子を特定できれば、転写因子の発現制御領域を用いて、特定の機能を持つ神経細胞群を蛍光タンパク質で可視化したり、さらには、光遺伝学等で機能を操作したりすることで、その細胞の働きを詳細に解析することも可能になっている。

研究開始当初、MLR - 後脳 - 脊髄の経路を構成するニューロンを同定するためのマーカーとなる転写因子は見つかっていなかった。しかし、MLR の神経細胞や MLR からの入力を受け取る後脳神経細胞群のマーカーとなる転写因子の有力候補があり、検討が待たれた。MLR を同定するための転写因子を特定できれば、MLR の解析が飛躍的に進むと期待された。

研究を困難にしてきたもうひとつの理由は、実験系の問題である。従来 MLR の研究は主に哺乳類で行われてきたが、体の大きさや神経系の複雑さから、電気生理学的な実験操作は煩雑であり、その結果の解釈は難しかった。さらに、マウス以外の哺乳類や単純な神経系を持つことで材料とされるヤツメウナギでは、上述の分子遺伝学的な手法を容易に適用できない問題点もあった。

これらの問題点を克服するために、本研究では実験材料としてゼブラフィッシュを用

いることを計画した。ゼブラフィッシュ幼魚は、哺乳類に比べてコンパクトで単純な神経回路を持つため、電気生理学的な解析が容易である。また、発生が早く、遺伝学的な解析が容易なモデル動物である。そのため、転写因子の発現を利用した神経細胞の同定や、分子遺伝学を利用した神経細胞の解析が容易に行える。

以上の背景から、ゼブラフィッシュ幼魚を用いて、分子遺伝学的に MLR - 後脳 - 脊髄の経路を構成するニューロンを同定し、解析を行うことで、脊椎動物のロコモーションの速度を制御する経路を明らかにすることを計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ゼブラフィッシュ幼魚を持ちいて、脊椎動物のロコモーションの速度を制御する主要な経路のひとつであると考えられる MLR 後脳 脊髄という経路の詳細を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュ MLR の探索

中脳 Nkx2.2b 陽性グルタミン酸作動性ニューロンの解析

発現部位から、MLR のマーカーとなる転写因子の候補として予想した中脳の Nkx2.2b を発現するグルタミン酸作動性ニューロンが、実際に MLR のニューロンであるか調べる解析を行った。遊泳運動中の発火パターンを調べるために、イメージング、および電気生理学的解析を行った。さらに、形態解析や光遺伝学による機能解析を行った。

中脳コリン作動性ニューロンの解析

他の動物種で MLR に存在することが知られているコリン作動性ニューロンの解析を行うために、コリン作動性ニューロンを同定可能なトランスジェニックフィッシュを作製した。

(2) 後脳 Chx10 ニューロンの解析

MLR から入力を受ける可能性が高いと期待される後脳 Chx10 ニューロンが遊泳速度が変わるときに、どのような活動を示すか、イメージングにより解析した。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ MLR の探索

中脳 Nkx2.2b 陽性グルタミン酸作動性ニューロンの解析

中脳の Nkx2.2b 陽性グルタミン酸作動性ニューロンが MLR のニューロンであるか、調べる実験を行った。まず、これらのニューロンにカルシウムイメージング、および電気生理学的な解析を行い、遊泳運動中に活動することを確認した(図1)。

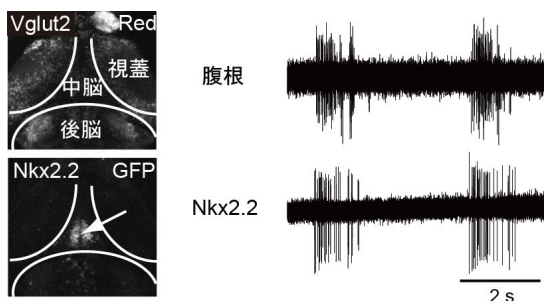


図1 中脳 nkx2.2 陽性グルタミン酸作動性ニューロン (左) Vglut2:loxP-DsRed-loxP-GFP, Nkx2.2:Cre 魚 (右) 仮想遊泳中の Nkx2.2 陽性グルタミン酸作動性ニューロンと腹根の同時記録

続いて、光遺伝学ツールであるチャンネルロドプシンをこれらのニューロンに発現する魚を作製し、光により強制的に活動させた。しかし、予想に反して、一定の条件下ではロコモーションが誘起されるものの、信頼性が低く、刺激強度と遊泳速度の関連性もなかった。さらに、これらのニューロンの形態を調べたところ、MLR からの投射を受けることが強く予想される Chx10 ニューロン群には投射せず、小脳の働きと関連の深いオリブ核のニューロン群に投射している可能性が高いことが分かった。

この結果はこれらのニューロン群は、MLR ではないことを示しており、本研究の目的であったゼブラフィッシュ幼魚の MLR 同定は成功しなかった。しかし、Nkx2.2 ニューロンの機能を研究する上では、有益な情報となる成果である。

中脳コリン作動性ニューロンの解析

哺乳類やツメウナギの MLR の解析から、MLR にはコリン作動性のニューロンが存在することが知られている。ゼブラフィッシュで中脳のコリン作動性ニューロンを解析し、MLR のニューロンを同定するために、小胞アセチルコリントランスポート (VACHT) を発現する細胞を GFP で可視化したトランスジェニックフィッシュを新たに作製した (図2)。作製には、本研究のために新しく開発した CRISPR/Cas9 法を用いたノックインフィッシュの作成法を用いた (詳細は(3))。また、コリン作動性ニューロンのイメージングや光遺伝学的解析を行うために、コリン作動性ニューロンに Gal4/UAS システムの Gal4 を発現させたトランスジェニックフィッシュを作

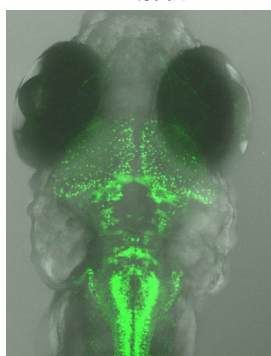


図2 コリン作動性ニューロンを可視化した魚 VACHT:GFP

製した。この魚と UAS:GCaMP6 (カルシウムインディケーター) を掛け合わせて、イメージングによる解析を始めたが、事業期間内に MLR の特定にはいたっていない。

なお、コリン作動性ニューロンを同定可能なトランスジェニックフィッシュは MLR 以外のコリン作動性ニューロンの解析にも有用であり、他の研究への応用も期待される。

(2) 後脳 Chx10 ニューロンの解析

ゼブラフィッシュの後脳 Chx10 ニューロンは遊泳時に脊髄に興奮性入力を送り、遊泳運動に必要なニューロンであることが明らかにされている。そのため、Chx10 ニューロンは MLR から入力を受ける後脳のニューロンの可能性が高いと期待される。後脳 Chx10 ニューロンに GCaMP6 を発現させ、遊泳速度の変化する遊泳における活動を調べたところ、高速遊泳と低速遊泳では異なる Chx10 ニューロン集団が活動していることが分かった。これらのニューロンが各々 MLR のニューロンとどのように結合しているかを調べるのが、今後の課題ではあるが、本研究では MLR ニューロンの特定にいたらなかったため、解析できなかった。

(3) CRISPR/Cas9 法を用いたノックインフィッシュ作成法の確立

本研究を進めるにあたって必要なトランスジェニックフィッシュを作製するために、新たなトランスジェニックフィッシュの作成方法を開発した。従来、トランスジェニックフィッシュの作製には、標的遺伝子の制御配列を含む BAC に相同組み換え法によりレポーター遺伝子を組み込み、その BAC をランダムにゲノムに挿入する方法が使われていた。しかし、この方法は時間と手間を要する上、適切な制御配列を含む BAC が存在しない場合に、トランスジェニックフィッシュが作成できないという欠点があった。そこで、本研究では、新しいゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を応用して、ノックインフィッシュを効率よく作製する方法を確立した (図3)。レポーター遺伝子の前にミニマルプロモーターとして、熱ショックプロモーターを加えることで、効率の良いノックインを実現している。

この方法を用いることで、従来に比べはるかに簡便で効率よくトランスジェニックフィッシュを作製でき、BAC ライブラリーの有無に関わらず、トランスジェニックフィッシュを作製することが可能になった。この方法について、Scientific reports 誌に論文発表を行った。

CRISPR/Cas9 によるノックインフィッシュの作製法の確立は本研究の計画当初には予想しなかった成果であり、CRISPR/Cas9 という新しい技術の登場によってもたらされた。主要目的からは少し外れた成果であるが、この方法は論文発表後、国内外の研究者から大

きな反響があり、今後のトランスジェニック動物作製方法の標準方法として多くの研究者によって使われることを期待している。自らの研究だけではなく、トランスジェニック動物を用いる数多くの研究の進展を加速させることが期待される重要な成果である。

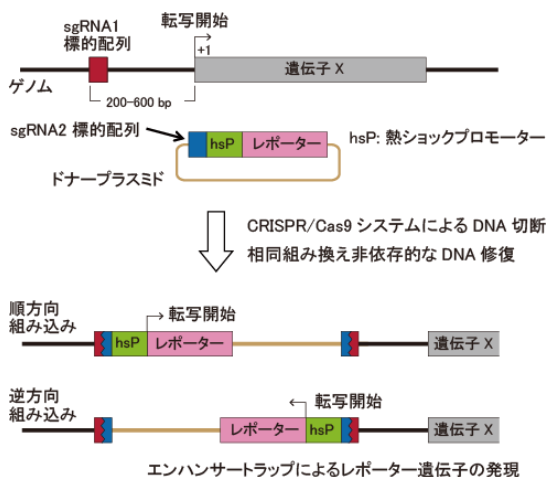


図3 CRISPR/Cas9法を用いたノックイン

(4) 研究成果のまとめ

本研究では、脊椎動物のロコモーションの速度を制御する主要な経路のひとつであると考えられる MLR 後脳 脊髄という経路の詳細を明らかにするという目的は事業期間内に達することができなかつた。しかし、本研究内で開発したツールを用いて、更なる研究を進めることで、課題の解決に至ることが期待できる。さらに、新たなトランスジェニック動物の作製方法や、Nkx2.2 ニューロンの役割の解析につながる結果など、予想せぬ重要な知見を得ることができたことは、大きな成果である。

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 1 件)

Kimura, Y., Hisano, Y., Kawahara, A. Higashijima, S. Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. Scientific reports 4, 6545 (2014). 査読有
DOI: 10.1038/srep06545

〔学会発表〕(計 3 件)

Kimura Y, Higashijima S, Properties and function of V1 spinal neurons in motor circuits of zebrafish,
The 87th meeting of Zoological Society of Japan, 2016 年 11 月 14 日~2016 年 11 月 19 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)

木村有希子, Using transgenic zebrafish to study locomotor circuits,
第 40 回日本比較内分泌学会大会日本比較生理生化学会第 37 回大会合同大会(招待講演), 2015 年 12 月 11 日~2015 年 12 月 13 日、JMS アステールプラザ(広島県・広島市)

木村有希子, 東島真一, CRISPR/Cas システムを用いたノックインゼブラフィッシュの高效率作成法,
第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11 日~2014 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/release/2014/10/crisprcas9.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 有希子 (KIMURA, Yukiko)

基礎生物学研究所・神経行動学研究部門・助教

研究者番号：70581122