

自己評価報告書

平成23年4月15日現在

機関番号：82648

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20115007

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュを用いた、脊椎動物脊髄運動系神経回路の動作原理の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of spinal locomotor circuits using embryonic/larval zebrafish preparation.

研究代表者

東島 真一 (HIGASHIJIMA SHIN-ICHI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・

岡崎統合バイオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：80270479

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：ゼブラフィッシュ，運動，神経回路，トランスジェニック，脊髄

1. 研究計画の概要

脊椎動物のほとんどの行動は、脊髄内介在神経細胞群が作る神経活動が最終的に運動ニューロンの活動を駆動することによって生じる。しかしながら、その脊髄運動系神経回路の詳細は、特に哺乳動物においてはほとんど分かっていない。本研究では、透明なゼブラフィッシュ幼魚を用い、トランスジェニック技術により特定のクラスの神経細胞を生きのままラベルできる利点をフルに活かして、脊椎動物脊髄運動系神経回路の動作原理解明に向けて取り組んでいく。得られる結果は、ゼブラフィッシュのみならず、脊椎動物全般に通用する概念を与える。本研究課題は、分子生物学、解剖学、イメージング、電気生理学等の広範な知識、技術が必要となるが、申請者はそれらを習得しており、本研究課題を円滑に進めていくことができる。具体的には以下の研究課題を進める。(i)脊髄・後脳運動系神経回路の詳細な解剖学的解析を行う；(ii)介在ニューロンの活動はどの程度運動特異的なかを問う；(iii)さまざまなクラスの神経細胞の、運動に果たす役割を、チャンネルロドプシンやハロロドプシン等の光遺伝学ツールを用いて明らかにする；(iv)運動が生み出される機構のモデリングを進める。

2. 研究の進捗状況

(1) 脊髄内神経回路の解剖学的記載：BAC トランスジェニック法により、多くのトランスジェニックフィッシュを作製した。各トラン

スジェニックフィッシュに関して、蛍光タンパク質陽性細胞の解剖学的記載を体系的に進めた。また、発生学的な解析も同時並行で進め、脊髄内で p2 と呼ばれる神経前駆体領域からは、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンが再現的に非対称分裂によって生じることを明らかにした (Kimura et al, 2008 Development)。

(2) 逃避運動にきわめて重要な役割を果たす特殊なタイプの交差型抑制性ニューロンの解析：脊髄内の非常に少数の神経細胞で GFP を発現するエンハンサートラップライン To1056 を用い、To1056 で GFP を発現する神経細胞 (以下、CoLo ニューロンとよぶ) の機能を解析した。その結果、脊髄内に各体節に 1 つずつ存在する CoLo ニューロンは、魚の逃避運動時にみに活動し、逃避運動の方向性にきわめて重要な役割を果たしていることを明らかにした (Satou et al, 2009 J. Neuroscience)。

(3) 光遺伝学ツールの活用：チャンネルロドプシン (ChR2)、ハロロドプシン (NpHR) などの光遺伝学ツールを用い、特定のクラスの神経細胞の活動を光により制御して、神経回路の機能解析を進める研究を開始した。現在、この系を用いて、chx10 陽性細胞の光遺伝学ツールによる詳しい解析を進めている。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

すでに多くのトランスジェニックフィッシ

を製作がすんでおり、また、共同研究として複数のエンハンサートラップラインを入手している。これらを用いた解剖学的解析は順調に進んでいる。介在ニューロンの活動がどの程度行動特異的なのかを問う命題に対しては大きな進展が見られた。前ページで記したように、CoLo ニューロンと名付けた脊髄内神経細胞は、逃避運動のみに発火し、逃避運動にきわめて重要な役割を果たしていることを示した。光遺伝学ツールによって神経活動を改変させることによる、神経回路の機能解析も研究が軌道に乗ってきており特段の問題点は生じていない。

4. 今後の研究の推進方策

- (1) 脊髄・後脳運動系神経回路の解剖学的解析：順調に進んでいる脊髄運動系神経回路の解剖学的解析をさらに進めるとともに、新たに後脳後半部も研究対象に加える。
- (2) 運動の強さが変化する際の、介在神経細胞群の活動変化の仕組みの解析：特に遊泳行動に焦点を絞り、運動の強さが変化する際に、介在神経細胞群の活動がどのような仕組みによって変化していくかを調べる。手法的には、電気生理学的解析と、集団としての神経活動をモニターするカルシウムイメージングを並行して行う。
- (3) 光遺伝学を用いた神経機能活性化、不活性化による神経回路機能の解析：光遺伝学ツールを特定のクラスの神経細胞で発現するトランスジェニックフィッシュを用いて、神経細胞の発火パターンを人為的に制御する。表現型（動物の運動）を見ることで、当該神経細胞の機能を追求する。
- (4) 遊泳運動開始シグナルの理論的解析：後脳 Chx10 神経細胞の集団発火と遊泳開始行動との関係を、理論面から解析する。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕（計 16 件）

- ① Koyama, M., Kinkhabwala, A., Satou, C., Higashijima, S., and Fetcho, J.R. (2011). Mapping a sensory-motor network onto a structural and functional ground plan in the hindbrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 108, 1170-1175. 査読有

- ② Kinkhabwara, A., Riley, M., Koyama, M., Monen, J., Satou, C., Kimura, Y., Higashijima, S., and Fetcho, J.R. (2011). A structural and functional ground plan for neurons in the hindbrain of zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 108, 1164-1169. 査読有
- ③ Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., Sassa, T., Amo, R., Shiraki, T., Kawakami, K., Hosoya, T., Higashijima, S., and Okamoto, H. (2010). The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nature Neuroscience* 13, 1354-1356. 査読有
- ④ Satou, C., Kimura, Y., Kohashi, T., Horikawa, K., Takeda, H., Oda, Y., and Higashijima, S. (2009). Functional role of a specialized class of spinal commissural inhibitory neurons during fast escapes in zebrafish. *J. Neuroscience* 29, 6780-6793. 査読有
- ⑤ Kimura, Y., Satou, C., and Higashijima, S. (2008). V2a and V2b neurons are generated by the final divisions of pair-producing progenitors in the zebrafish spinal cord. *Development* 135, 3001-3005. 査読有

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① S Higashijima, Y Kimura, C Satou (2009.7) Development and function of spinal locomotor circuits in zebrafish: IUPS2009 (Kyoto Japan)
- ② S Higashijima, C Satou, Y Kimura (2009.9) Development and function of spinal locomotor circuits in zebrafish: The 32th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Nagoya, Japan)
- ③ S Higashijima (2009.10) Development and function of spinal locomotor circuits in zebrafish: 3rd Viktor Hamburger Symposium (Chicago, USA)