

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：63801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23787

研究課題名(和文) 視覚情報の統合を司るゼブラフィッシュ前視蓋における階層的な神経回路基盤

研究課題名(英文) Neural circuit basis for integration of visual information in zebrafish pretectum

研究代表者

松田 光司 (Matsuda, Koji)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・特任研究員

研究者番号：40845228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：視覚情報処理を司る前視蓋ニューロン間に階層的ネットワークが存在するのかを実験的に検証するため、異なる前視蓋ニューロンを特異的に標識し、視覚刺激に対する神経活動記録と形態解析を行った。その結果、前視蓋の腹側/側方領域に高次演算を必要とする反応パターンを示す2種類のニューロン群を発見した。この領域に存在するニューロンの多くがループ状の神経突起を持ち、一部のニューロンは視蓋・小脳・縦走堤に投射していた。これらの細胞の細胞体は方向選択性の網膜入力を受ける領域の近傍に位置したことから、これらの細胞は網膜からの方向選択性シグナルを受容し、それを下流脳領域へ伝達している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物は、受容した視覚情報に応じて適切な行動をとる必要があるが、それを実現する神経回路基盤の全容は解明されていない。本研究により見出した前視蓋腹側/側方領域のニューロンは、両方の眼からの情報を統合していると考えられる。さらに、これらの前視蓋ニューロンは、運動制御に関与する下流脳領域へ視覚情報を伝達している可能性がある。今後、下流脳領域への投射様式のさらなる同定や視覚依存的行動における機能解析を行うことで、視覚情報処理から行動の発現に至る神経回路基盤の解明が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We aimed to test the hypothesis that various types of neurons in the pretectum compute behaviorally relevant information by hierarchical neural circuits. Using transgenic lines that label subsets of pretectal neurons, we examined neural activity of pretectum neurons in response to the visual stimulus as well as their morphologies at single cell level. We found that neurons located in the lateral and ventral region of the pretectum showed two prominent response types that required complex computation. Furthermore, we also found that there are at least two morphologically distinct types of neurons in this region: one type of neurons that possess a loop-like neurite that branch locally, and the other type of neurons that project to the torus longitudinalis, the optic tectum and the cerebellum. Our results offer insights into how visual information is processed in the pretectal circuits and how the pretectal circuits send the output to the premotor/motor centers.

研究分野：神経科学

キーワード：視覚 前視蓋 神経回路 ゼブラフィッシュ オプティックフロー カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む多くの動物は、外界の視覚情報に基づいて適した行動を選択している。受容した視覚情報に応じて適切な行動が生み出されるメカニズムを理解することは、神経科学において重要な課題である。例えば、動物が環境中を移動する際、自己運動に伴って視野全体の像が動く。このような「動き」の視覚情報はオプティックフローと呼ばれ、動物が自己の運動状況を知覚し、姿勢や進行方向を調節するために利用されている。オプティックフローは、視野が回転する場合(回転性)と、平行移動する場合(並進性)の2つに大別され、それぞれ異なる運動反応が惹起される。魚類において、回転性オプティックフローは眼球運動(optokinetic response, OKR)、並進性オプティックフローは遊泳運動(optomotor response, OMR)が引き起こされるが(図1)、これらの視覚情報は脳内で明確に区別される必要がある。

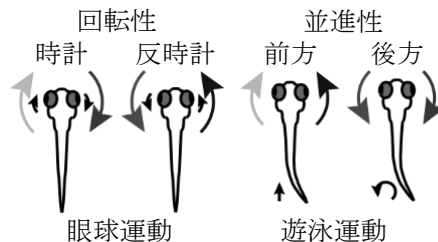


図1. 回転性・並進性オプティックフローによって生じる運動反応

これまでに、ゼブラフィッシュを用いた研究から、回転性・並進性オプティックフローを区別するための重要な脳領域として、前視蓋が同定された(Kubo et al., *Neuron*, 2014)。大規模な神経活動記録の結果、片側の眼のみからオプティックフローを受容する単眼性ニューロンと、回転性・並進性のどちらかに選択的に反応する両眼性ニューロンが存在することが分かった。興味深いことに、両眼性ニューロンは、特定の組み合わせの単眼性ニューロンから、興奮性・抑制性の入力を受けていることが示唆された。以上の結果から、前視蓋では、単眼性ニューロンが両眼性ニューロンへと階層的な神経接続を形成することにより、回転性・並進性の違いが判別されているという神経回路モデルが立てられた(図2)。しかしながら、この仮説はニューロンの反応特性のみに基づいたもので、実際に前視蓋ニューロン間で機能的因果関係があるのかは明らかとなっていない。

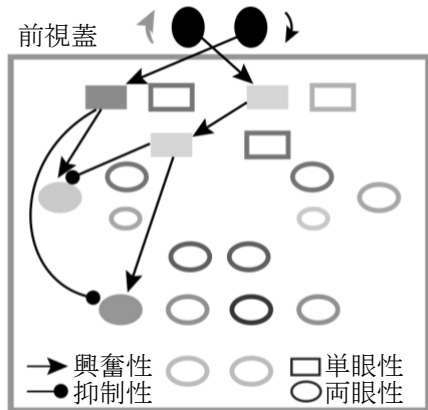


図2. 前視蓋神経回路モデル

かとなっていない。機能的因果関係を調べるには、これらの単眼性・両眼性ニューロンを区別して標識する必要があるが、これらの細胞は前視蓋内の同一の領域に混在するため、両者を領域に基づいて区別することができない。また、前視蓋ニューロンのマーカー遺伝子が知られていないため、各々を遺伝学的に標識・操作できないという問題があった。一方で、これまでの研究により、ゼブラフィッシュではジーン/エンハンサートラップ法などにより、組織特異的なGal4系統が数多く作製されてきた。受入研究室では、前視蓋領域の一部にGal4を発現していると考えられる系統を見出していた。従って、Ca²⁺イメージング技術を用いることにより、それぞれのGal4系統において標識された前視蓋ニューロンが、回転性・並進性オプティックフローに対してどのような反応を示すか調べることが可能となっていた。また、これらのGal4系統を用い、異なる反応タイプの前視蓋ニューロン機能を特異的に操作することで、オプティックフロー神経回路の仮説を実験的に検証できると考えた。

2. 研究の目的

回転性・並進性オプティックフローの2種類の視覚刺激の違いは、前視蓋領域の階層的な神経ネットワークを介して区別されていると考えられている。本研究は、この階層的ネットワークの仮説を、オプティックフローに対する反応特性の異なるニューロンを特異的にラベルすることにより、実験的に検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) オプティックフロー情報処理における前視蓋興奮性・抑制性ニューロンの神経活動記録
 本研究では、まず、興奮性と抑制性神経細胞の2種に大別し、解析を行う。興奮性ニューロンのラベルにはグルタミン酸作動性ニューロン特異的Gal4系統(*Tg(vglut2a:Gal4)*)、抑制性ニューロンのラベルにはGABA作動性ニューロン特異的Gal4系統(*Tg(gad1b:Gal4)*)を用いる。興奮性・抑制性ニューロン特異的にGal4を発現する系統と、Ca²⁺インジケーターGCaMP6sレポーター系統(*Tg(UAS:GCaMP6s)*)と掛け合わせ、受精後5-7日の仔魚においてオプティックフロー視覚刺激に対する神経活動記録を行う。具体的には、4種類の単眼性刺激(左眼/右眼、鼻方向/尾方向)と4種類の両眼性刺激(時計回り/反時計回り、前方/後方)(図3)を与え、2光子顕微鏡を用いて前視蓋領域の神経活動イメージングを行う。その後、視覚刺激に対して反応したニューロンを、256種類の仮想的な反応パターンとの相関に基づいて分類する。

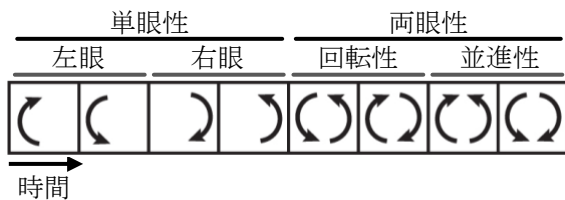


図 3. 視覚刺激プロトコル

(2) オプティックフロー視覚刺激に対する Gal4 トラップ系統の神経活動記録

これまでの研究により、前視蓋領域の一部で発現が見られる 9 種類の Gal4 トラップ系統が選抜されていた。これら候補 Gal4 系統と *Tg(UAS:GCaMP6s)* 系統と掛け合わせることで得られる仔魚を用い、オプティックフロー視覚刺激に対する神経活動記録を行う。

(3) 単一細胞標識による前視蓋ニューロンの形態解析

候補 Gal4 系統のうち、興味深い反応パターンを示した系統を用い、単一細胞標識による前視蓋ニューロンの形態解析を行う。単一細胞標識には、各 Gal4 系統の受精卵(8~16 細胞期)に、膜局在型赤色蛍光タンパク質をコードするプラスミド DNA(UAS:tdTomato-CAAX)を微量注入する方法 (Miyasaka et al., *Nat Commun*, 2014)を用いる。

(4) 標識した前視蓋ニューロンのオプティックフロー視覚刺激に対する神経活動記録

前視蓋ニューロンの細胞形態とオプティックフロー視覚刺激に対する反応性に相関関係があるかどうかを明らかにするために、単一細胞標識された前視蓋ニューロンのオプティックフロー視覚刺激に対する神経活動記録を行う。具体的には、前視蓋ニューロン Gal4 系統の制御下で UAS:GCaMP6s を発現する魚を用いて、プラスミド DNA (UAS:tdTomato-CAAX)による単一細胞標識に成功した前視蓋ニューロンに注目し、オプティックフロー視覚刺激に対する神経活動記録を行う。

4. 研究成果

(1) オプティックフロー情報処理における前視蓋興奮性・抑制性ニューロンの神経活動記録

抑制性ニューロン特異的な系統において、4 種類の単眼性の反応パターンを示すニューロンが見つかった。さらに、前視蓋の腹側/側方領域に位置するニューロンが高次の演算を必要とする反応パターンを示すことがわかった。これらのニューロンの多くは単眼性刺激に方向選択的に反応し、時計回り、反時計回りおよび前方の 3 つの両眼性刺激に対しては、細胞の方向選択性から予想される通りの反応を示した。しかしながら、後方刺激に対しては一切反応しなかったことから、これらのニューロンは後方刺激時にのみ特異的な神経抑制受けるという、複雑な演算が行われていることが明らかとなった。一方、興奮性ニューロン特異的な系統では、前視蓋の両半球をつなぐ後交連の軸索の一部が視覚刺激に対して活動していることが分かり、前視蓋領域間で興奮性相互作用が存在する可能性が考えられる。

(2) オプティックフロー視覚刺激に対する Gal4 トラップ系統の神経活動記録

前視蓋領域の一部で発現が見られる 9 種類の Gal4 トラップ系統について、オプティックフロー視覚刺激に対する神経活動記録を行った結果、2 種類の Gal4 系統は前視蓋の腹側/側方領域に位置するニューロン群を標識し、オプティックフロー視覚刺激に反応することが分かった。これらのニューロン群は、研究成果(1)で記した抑制性ニューロン特異的な系統で観察されたのと同様に高次の演算を必要とする 2 つの主要な反応パターンを示すことが分かった。

(3) 単一細胞標識による腹側/側方前視蓋ニューロンの形態観察

研究成果(2)によって得られた、前視蓋の腹側/側方領域に位置するニューロン群を標識している系統を用い、単一細胞標識による形態解析を行った。その結果、この領域に存在するニューロンの多くがループ状の特徴的な神経突起を持ち、一部のニューロンは視蓋・小脳・縦走堤に神経投射していることを発見した。また、網膜神経節細胞で GFP を発現する *Tg(is12b:GFP)* 系統と掛け合わせることで網膜神経節細胞の軸索を同時に可視化したところ、これらのニューロンの細胞体は、方向選択性の網膜入力を受ける領域の近傍に位置していることが分かった。

(4) 標識した前視蓋ニューロンのオプティックフロー視覚刺激に対する神経活動記録

本研究では、7 つの単一前視蓋ニューロンの形態観察および神経活動の同時記録に成功した。その結果、ループ状の特徴的な神経突起を持つニューロンは、主に 2 種類の反応パターンを示すことが分かった。1 つは単眼性の反応パターンを示した。もう 1 つは、(2)でも述べた高次の演算を必要とする反応パターンであった。また、7 細胞のうち 6 細胞は神経線維の分布範囲が細胞体付近に限局していたが、1 細胞は視蓋への神経投射が見られた。これらの結果から、前視蓋の腹側/側方領域に存在する前視蓋ニューロン群は、網膜からの方向選択性シグナルを受容し、それを下流脳領域へ伝達している可能性を提唱した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koji Matsuda, Koichi Kawakami, Fumi Kubo
2. 発表標題 Dissecting roles of genetically defined pretectal populations underlying integration of the optic flow in zebrafish
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Zebrafish Neural Circuits & Behavior”（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Matsuda, Koichi Kawakami, Fumi Kubo
2. 発表標題 Roles of excitatory and inhibitory neurons for binocular optic flow integration in zebrafish pretectum
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koji Matsuda and Fumi Kubo
2. 発表標題 Morphological and functional analysis of the pretectal circuits for optic flow processing
3. 学会等名 第26回 小型魚類研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------