

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830020

研究課題名(和文)ロコモーションの方向制御の神経基盤

研究課題名(英文)A study of neural mechanism for directional control of locomotion in zebrafish

研究代表者

浅川 和秀 (Asakawa, Kazuhide)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教

研究者番号：30515664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：環境中を移動する動物は、環境や身体内部からの感覚情報をたよりにしながら、適切な移動方向(ロコモーションの方向)を選択している。本研究は、ゼブラフィッシュの触覚刺激に対する逃避行動をモデルに用いて、触覚刺激によって駆動される後脳のmafB陽性領域の神経活動を、カルシウムイメージング法を用いて解析した。その結果、触覚刺激の位置に応じて活動パターンを変化させる一群のニューロン(MDL細胞)の同定に成功した。さらに、MDL細胞は軸索を脊髄に投射していることが明らかになった。このことから、MDL細胞は触覚刺激の位置情報と、逃避反射の運動パターンを対応づける働きを担うニューロンである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：An animal moving through the environment maintains or changes its direction of progression based on internal and/or external sensory information. To understand neural mechanisms underlying directional control of locomotion, we studied the tactile-mediated escape response in zebrafish larvae as a model, in which the direction of escape changes depending upon the position of the tactile stimulus on the body surface. By using two-photon calcium imaging, we monitored the neural activity evoked by the tactile stimulus in the hindbrain mafb-positive area. From this assay, we identified a group of neurons that showed different neural activities depending upon the position of tactile stimulus, which were designated as MDL cells. Furthermore, MDL cells turned out to possess the axons extending toward the spinal cord. The spatial response property and the axonal projection toward the spinal cord raise a possibility that MDL cells regulate the escape direction according to the touch position.

研究分野：神経科学、遺伝学、細胞生物学

キーワード：locomotion tactile stimulus hindbrain mafb escape MDL cell zebrafish

1. 研究開始当初の背景

環境中を移動する動物は、環境や身体内部からの感覚刺激をもとに、進行方向(ロコモーションの方向)を選択している。ゼブラフィッシュは孵化後間もない時期(受精後48時間以降)に既に、触覚刺激に反応し、刺激から遠ざかる方向へ泳いで逃避する能力を備えている。この逃避方向は、触覚刺激に反応して起こる、刺激とは反対方向への体幹の反り運動によって方向付けられる。興味深いことに、この体幹の反り運動の角度は、刺激の位置が身体の前側であるほど増大し、その結果、逃避方向はより後方へとシフトする。すなわち、体幹の反り運動の角度の変化によって、ゼブラフィッシュは刺激から最も遠ざかる逃避方向を選択しているといえる。私は、「触覚刺激の位置」と「体幹の反り運動の角度」を対応させる神経回路の構造を解明することで、ロコモーションの方向制御の神経メカニズムを理解しようと考えた。

この逃避方向の制御に重要な役割を果たすと考えられている後脳の機能を操作する為に、遺伝子トラップ法を用いて後脳のGal4システムを作製した。後脳に発現する転写因子 $mafb$ のプロモーター活性によってGal4を発現するシステムを用いて、神経毒素を発現しGal4発現領域の機能を阻害した。その結果、体幹の反り運動の角度が増大し、逃避方向が乱れることを見いだした。この結果から、後脳の $mafb$ 陽性領域には、逃避方向を制御する神経細胞が含まれると予想し本研究を開始した。

2. 研究の目的

転写因子 $mafb$ は、主に後脳の分節構造ロポメア5と6に発現する。先行研究をもとに類推したところ、本研究で着目する稚魚期には、 $mafb$ 陽性領域には、およそ500程度の分化した神経細胞が存在すると見積もられた。これらの細胞群の中から、触覚刺激によって駆動され、さらに、それによって起こる体幹の反り運動を制御する神経細胞を同定することを目指した。

3. 研究の方法

後脳領域にカルシウムインディケーターGCaMPの発現を誘導し、触覚刺激の位置に対応して駆動される後脳の活動パターンをイメージングによって検出した。特徴的な活動パターンを示す細胞の機能を、レーザーアブレーションによって阻害し、逃避行動に現れる変化を解析した。

転写因子 $mafb$ のプロモーター活性に従って、転写因子Gal4を発現する系統(Tg[$mafb$:Gal4FF])と、Gal4によってカルシウムインディケーターGCaMPが誘導される系統(Tg[UAS:GCaMP])を交配し、Tg[$mafb$:Gal4FF, UAS:GCaMP]二重トランスジェニックシステムを樹立した。二光子顕微鏡下に配置したTg[$mafb$:Gal4FF, UAS:GCaMP]稚魚の、

頭部、尾部およびその間の領域のそれぞれの体表面に、ピエゾ素子を用いて触覚刺激を与え、同時に、二光子励起顕微鏡を用いたカルシウムイメージング法によって、後脳 $mafb$ 陽性領域の神経活動を、GCaMPの蛍光変化量として検出した。

4. 研究成果

転写因子 $mafb$ 陽性細胞の中に、頭部への触覚刺激によって駆動する一群の神経細胞を同定し、Mediolateral細胞と名付けた(以下、MDL細胞と記す。図1。)。グルタミン酸作動性ニューロンを赤色蛍光色素蛋白質(DsRed)で染色するトランスジェニックマーカーの存在下で、同様のアッセイを行なったところ、MDL細胞は、後脳において前後軸にそって存在するグルタミン酸作動性ニューロン群の複数のストライプ構造の内側のストライプの一つに含まれることが分かった。MDL細胞は、尾部への触覚刺激には反応しなかった。また、MDL細胞の中には、頭部への刺激に加えて、胸部への触覚刺激によっても駆動されるものが存在した。さらに、頭部への触覚刺激によって活性化されるものの、胸部への刺激には反応しないものが存在した。このことから、グルタミン酸作動性ニューロンの内側のストライプ構造には、体性感覚地図が存在する可能性が示唆された。

さらに、尾部と頭部への刺激のいずれに対しても反応するMedial細胞を同定した(以下、MD細胞と呼ぶ)。MDL細胞の活動は一過性であるのに対し、MD細胞は、MDL細胞よりも遅れて活性化され、その活動は持続的であった。

グルタミントランスポーター $vglut2a$ のBacterial Artificial Chromosome(BAC)を用いて、Gal4システムを樹立し、少数のグルタミン酸作動性ニューロンがGal4によってラベルされる系統Tg[$vglut2a$:Gal4]を樹立した。Tg[$vglut2a$:Gal4]胚に、UAS:GFPプラスミド微量注入することにより単一のMDL細胞の細胞形態を解析した。MDL細胞は、脊髄に投射する軸索を保持していることが分かった。以上の結果から、MDL細胞が、頭部の触覚刺激依存的に大きな体幹の反りを生み出す機能を担っている可能性を示唆された。

MDL細胞は、頭部への触覚刺激によって活性化され、尾部への刺激によって活性化されない細胞として一過的に同定されるため、MDL細胞の大部分を安定かつ再現的にラベルする簡便な遺伝学的手法が存在しなかった。そこでMDL細胞の機能を解明する為に、まず、稚魚をアガロースに包埋した上で、MDL細胞を二光子顕微鏡を用いた触覚刺激アッセイによって同定し、直後に、二光子レーザーの照射によってアブレーションするという実験法の検討を行なった。このプロトコルによって得た阻害稚魚においては、触覚刺激による逃避行動の発生頻度が著しく減少するという結果を得た。このアブレーション実験に

おいては、稚魚をアガロースに包埋し、MLD細胞のアブレーションを行なって、逃避行動のアッセイが完了する為に、一時間以上を要した。今後は、MLD細胞の阻害効果を正確に評価する為には、今後のアッセイ法の洗練と、他の独立なMLD細胞の機能評価法の開発が必要であると考えられた。

以上より、頭部刺激特異的に反応し、なおかつ脊髄に軸索を投射するMDL細胞は、触覚刺激に位置に対応した、体幹の反り運動の角度、すなわち、逃避方向の制御に関与していると予想された。

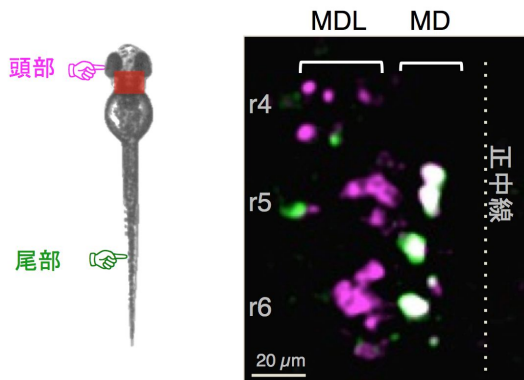


図1 左からの触覚刺激によって、後脳左半球において駆動される神経活動

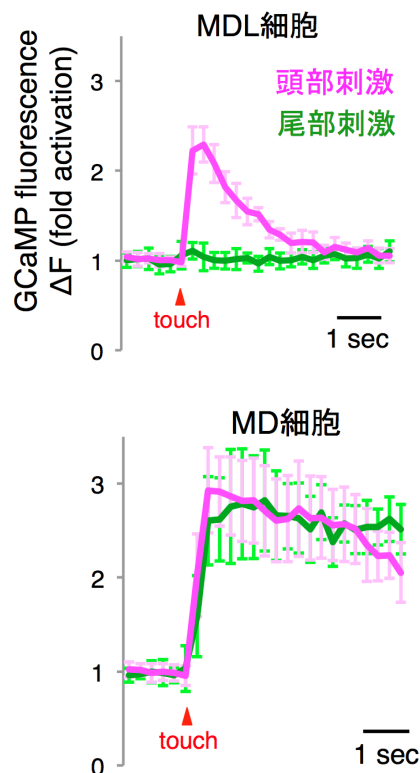


図2 MDL細胞と、MD細胞の活動パターン

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 6件)

Ogino K, Low SE, Yamada K, Saint-Amant L, Zhou W, Muto A, Asakawa K, Nakai J, Kawakami K, Kuwada JY, Hirata H. RING finger protein 121 facilitates the degradation and membrane localization of voltage-gated sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有り 2015 112:2859-2864. doi: 10.1073/pnas.1414002112.

Takeuchi M, Matsuda K, Yamaguchi S, Asakawa K, Miyasaka N, Lal P, Yoshihara Y, Koga A, Kawakami K, Shimizu T, Hibi M. Establishment of Gal4 transgenic zebrafish lines for analysis of development of cerebellar neural circuitry. *Dev Biol*. 査読有り 2015 397:1-17. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.09.030.

Kwon HB, Fukuhara S, Asakawa K, Ando K, Kashiwada T, Kawakami K, Hibi M, Kwon YG, Kim KW, Alitalo K, Mochizuki N. The parallel growth of motoneuron axons with the dorsal aorta depends on Vegfc/Vegfr3 signaling in zebrafish. *Development*. 査読有り 2013 140:4081-4090. doi: 10.1242/dev.091702.

Wada H, Ghysen A, Asakawa K, Abe G, Ishitani T, Kawakami K. Wnt/Dkk negative feedback regulates sensory organ size in zebrafish. *Curr Biol*. 査読有り 2013 23:1559-1565. doi: 10.1016/j.cub.2013.06.035.

Asakawa K, Abe G, Kawakami K. Cellular dissection of the spinal cord motor column by BAC transgenesis and gene trapping in zebrafish. *Front Neural Circuits*. 査読有り 2013 7:100. doi: 10.3389/fncir.2013.00100.

Kishimoto N, Asakawa K, Madelaine R, Blader P, Kawakami K, Sawamoto K. Interhemispheric asymmetry of olfactory input-dependent neuronal specification in the adult brain. *Nat Neurosci*. 査読有り 2013 16:884-888. doi: 10.1038/nn.3409.

〔学会発表〕(計 7件)

An early somatosensory map in the

zebrafish hindbrain as revealed by two-photon calcium imaging

Asakawa K, Kawakami K

第38回日本神経科学大会 2015年7月29日、神戸

An activity-based somatosensory map in the zebrafish hindbrain as revealed by calcium imaging

Asakawa K, Kawakami K

6th Strategic Conference of Zebrafish Investigators 2015年1月17日 Asilomar, USA

An activity-based somatosensory map in the zebrafish hindbrain as revealed by calcium imaging

Asakawa K, Kawakami K

第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日、横浜

An activity-based somatosensory map in the zebrafish hindbrain as revealed by calcium imaging

Asakawa K, Kawakami K

The 20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting 2014年9月20日、東京

Directional control of escape locomotion in zebrafish

Asakawa K, Kawakami K

第47回日本発生生物学会大会 2014年5月27日、名古屋

ゼブラフィッシュの逃避行動をモデルに用いたロコモーションの方向制御の神経基盤の研究

浅川和秀

日本発生生物学会秋季シンポジウム 2013年11月19日、神戸

Directional control of locomotion in the touch-evoked escape behavior in zebrafish

Asakawa, K., Abe, G., Muto, A., Koichi Kawakami

Neuroscience 2013 2013年11月12日、San Diego, USA

〔図書〕(計 2件)

Kawakami K, Asakawa K, Hibi M, Ito M, Muto A, Wada H. Gal4 driver transgenic zebrafish: Powerful tools to study developmental biology, organogenesis and neuroscience. Genetics, Genomics and Phenomics of Fish 95, in press

浅川和秀、「魚類遺伝学の貢献」遺伝子図鑑 p198-p199 遺伝子図鑑、悠書館、

p198-p199. 2013

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

<http://researchmap.jp/kazuhideasakawa/>

<http://kawakami.lab.nig.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅川 和秀 (ASAKAWA KAZUHIDE)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教
研究者番号: 30515664

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し