

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26290013

研究課題名(和文) 左右協調運動を司る脊髄内交差型神経細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of commissural neurons in coordinated movements in zebrafish

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・教授

研究者番号：80270479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄内d6交差型抑制性介在ニューロンの機能解析を中心に研究を進めた。まず、電気生理学的解析を行ったところ、当該ニューロン群が、(1) 遊泳運動中に同側の運動ニューロンと同期して発火すること、また、(2) 反対側の運動ニューロンと直接抑制性のシナプス結合していることを見いだした。さらに、当該ニューロン群を遺伝学的に除去した魚の表現型を調べた。その結果、遊泳運動の際に、左右の運動ニューロンが同時に発火してしまうという表現型がしばしば現れることが分かった。これらの研究結果より、d6交差型抑制性介在ニューロンが遊泳運動の際に、左右の相反抑制にきわめて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We performed functional analysis of dl6 commissural inhibitory neurons during swimming in zebrafish. Electrophysiological analyses have revealed that (1) these neurons fired in phase with motoneurons located nearby during swimming, and that (2) these neurons made monosynaptic inhibitory connections onto motoneurons on the contralateral side. We further investigated functional roles of these neurons by genetically ablating the neurons. Larval fish in which dl6 commissural inhibitory neurons were absent frequently exhibited bilateral (not alternating) activities during swimming. These results indicate that dl6 commissural inhibitory neurons play a critical role during swimming by providing crossed inhibition to neurons on the contralateral side.

研究分野：神経科学

キーワード：運動 左右協調 脊髄 ゼブラフィッシュ 交差型介在ニューロン

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の運動は、左右、様々な筋肉の協調的な収縮弛緩により作り出されている。哺乳類においては、左と右の前脚、左と右の後脚、および、左の前脚と右の後脚など、様々な種類の左右の協調が必要とされる。これらの左右協調運動の生成には、共通して、脊髄内交差型介在ニューロン（脊髄内で軸索を細胞体とは反対側へ投射するニューロン）が非常に重要な役割を果たすと考えられているが、これらの交差型神経細胞が作り出す回路の詳細はよくわかっていない。研究における最大の障害は、哺乳動物脊髄内神経回路がきわめて複雑であることである。一方で、四肢を持たない魚類においても、哺乳類同様、左右の筋肉の協調的な収縮弛緩によって、遊泳行動が作り出されており、哺乳類同様、交差型神経細胞が重要な役割を果たしていると考えられている。魚類は、脊椎動物でありながらも、哺乳類より単純な神経回路を有し、神経細胞数も格段に少ないため、その回路を明らかにすることは哺乳類に比べ比較的容易である。

魚類のうち、ゼブラフィッシュ幼魚は非常に優れた研究素材である。ゼブラフィッシュを用いることにより、爆発的に進歩してきた分子生物学の知識・手法を取り込むことができる。特に、以下の2つの点が重要である。

(1) ゼブラフィッシュにおいては、脊髄神経回路研究を、脊髄神経発生の基本スキームの中に位置づけることができる。発生期には、背腹軸に沿ってドメイン状に進化的に保存された転写因子が発現し、各ドメインからは異なる、しかし、種間で共通の様式を持つ神経細胞が誕生することが知られている。つまり、ゼブラフィッシュで得られた研究成果は、魚類のみならず、哺乳類の回路中の機能を推測する上で重要な指針を与えるものとなると期待される。事実、我々が過去に明らかにした V1, V2 神経細胞の役割は、哺乳類の回路網の研究に大きな指針を与えてきた。

(2) 近年、チャネルロドプシンやハロロドプシンといった光遺伝学的ツール、あるいは、ジフテリア毒素による神経細胞除去など、特定のクラスの神経細胞の活動を人為的に操作することが可能になってきた。これにより、特定の神経細胞群の運動における機能を推測するだけでなく検証していくという、神経科学者が夢見てきた研究が可能になってきた。

我々は、各ドメインから誕生する神経細胞を可視化するトランスジェニックフィッシュを作製し、各ドメインから生じる神経細胞を体系的に明らかにしてきた (Sstou et al, Development 2013)。その結果、d6 ドメインからは運動に関与する抑制性交差型神経細胞が、V0 ドメインからは運動に関与する抑制性、興奮性双方の交差型神経細胞が誕生することをすでに明らかにしていた。

2. 研究の目的

上記の背景の元、本研究では、ゼブラフィッシュの d6 交差型抑制性介在ニューロン、および V0 交差型抑制性介在ニューロンの作動様式を電気生理学、神経細胞除去手法を駆使して明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) d6 交差型抑制性介在ニューロン、および V0 交差型抑制性介在ニューロンの解剖学的解析

Cre-loxP システムと DNA インジェクションを組み合わせた単一細胞ラベル法を用いて、d6 交差型抑制性介在ニューロン、および V0 交差型抑制性介在ニューロンの詳細な解剖学的解析を行った。

(2) d6 交差型抑制性介在ニューロン、および V0 交差型抑制性介在ニューロンの電気生理学的解析

パッチクランプ全細胞記録法を用いて、d6 交差型抑制性介在ニューロン、および V0 交差型抑制性介在ニューロンの、仮想遊泳運動中の活動パターンを調べた。仮想遊泳の運動状況は、運動神経軸索末の細胞外記録 (VR 記録) を同時に取得することによりモニターした。

(3) d6 交差型抑制性介在ニューロンの、神経細胞種除去による解析

Cre-loxP システムを用いてジフテリア毒素 A 鎖を、脊髄 d6 交差型抑制性介在ニューロンに特異的に発現させることにより、その遊泳運動に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) d6 交差型抑制性介在ニューロン、および V0 交差型抑制性介在ニューロンの解剖学的解析

単一細胞ラベル法により、それぞれの介在ニューロンの詳細な解析を行った結果、期待通り、d6 ニューロン、および V0 介在ニューロンはすべて交差型であることが明らかになった。また、V0 交差型抑制性介在ニューロンは、すべてよく似た形態を持つものに対し、d6 交差型抑制性介在ニューロンには、明確に形態の異なる3種類のニューロン群に分けられることが明らかとなった。それぞれ、TypeA, TypeB, TypeC と名付けて以降の電気生理学的解析を行った。

(2) d6 交差型抑制性介在ニューロン、および V0 交差型抑制性介在ニューロンの電気生理学的解析

電気生理学的解析の結果、d6 交差型抑制性介在ニューロン、および V0 交差型抑制性介在ニューロンは、双方ともに、仮想遊泳運動中に活動することが明らかとなった。両者（および、d6 交差型抑制性介在ニューロンす

すべてのタイプに)共通する性質として、発火する際は常に、近傍の運動ニューロンと同期して発火していた。このことは、これらの交差型抑制性介在ニューロンが、体の反対側の神経細胞の活動を抑えている可能性を強く示唆する。また、活動パターンにはタイプごとに違いが見られた。d6 交差型抑制性介在ニューロン TypeC は、逃避運動の際にのみ発火が見られた。V0 交差型抑制性介在ニューロンは、逃避運動や速い遊泳運動の際に発火する傾向が見られた。d6 交差型抑制性介在ニューロン TypeA と TypeB は、どちらも通常のスPEEDの遊泳運動で発火が見られたが、TypeA の方が、より信頼性をもって発火していた。逆に、TypeB の方は、発火がまばらに起こっていた。これらの結果は、それぞれのタイプの神経細胞が、協調しながらも、少しずつ異なった役割を果たしていることを示唆している。

(3) d6 交差型抑制性介在ニューロンの、神経細胞種除去による解析

前項の解析により、通常のスPEEDの遊泳運動においては、d6 交差型抑制性介在ニューロンが交差型抑制に対して主要な役割を果たしていることが示唆された。このことを遺伝学的に検証するため、Cre-loxP システムを用いてジフテリア毒素 A 鎖を、脊髄 d6 交差型抑制性介在ニューロンに特異的に発現させ、その幼魚の仮想遊泳運動を電気生理学的手法により調べた。その結果、遊泳運動において、しばしば、片側の運動ニューロンの活動がバースト状に起こって、それが 100ms 以上続く、という表現型が得られた。このことは、脊髄 d6 交差型抑制性介在ニューロン遊泳運動においてリズムに活動し、その活動が反対側の活動を抑制してリズムを形成に寄与している、ということを示唆する。

(4) CRISPR/Cas9 法を用いたノックインフィッシュ作成法の確立

本研究の本筋とは直接関係しないが、本研究を含めて、さまざまな研究を進めるにあたって、トランスジェニックフィッシュの作製ステップが律速段階となっていた。これを克服するため、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)。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期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。

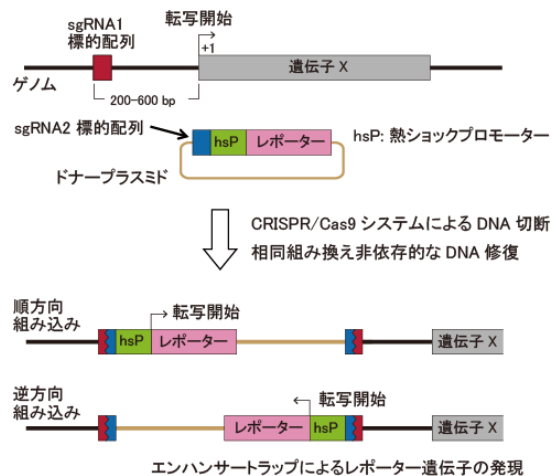


図 CRISPR/Cas9 法を用いたノックイン

(5) 研究成果のまとめ

本研究では、d6 交差型抑制性介在ニューロン、および V0 交差型抑制性介在ニューロンの双方が、協調して、左右交互の遊泳運動を作り上げていることを示唆するデータを得た。また、d6 交差型抑制性介在ニューロンの欠失により、左右交互の遊泳運動が大きく損なわれることを見いだした。これらの成果により、d6 交差型抑制性介在ニューロンの左右交互運動における機能解析は大きく進んだ。哺乳類の対応する細胞の機能を考える上で、非常に重要な研究成果であると考えられる。

上記の結果に加え、高効率な新たなトランスジェニック動物の作製方法を開発することができたことも大きな成果である。今後の研究が大きく加速していくことが期待される。

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 9件)

1) Taniguchi, A., Kimura, Y., Mori, I., Nonaka, S., and Higashijima, S. (2017). Axially-confined in vivo single-cell labeling by primed conversion using blue and red lasers with conventional confocal microscopes. *Development, Growth & Differentiation* 59, 741-748. doi: 10.1111/dgd.12412. 査読有り

2) Ratanayotha, A., Kawai, T., Higashijima, S., and Okamura, Y. (2017). Molecular and Functional Characterization of the Voltage-Gated Proton Channel in Zebrafish Neutrophils. *Physiological Reports* 15, e13345. doi: 10.14814/phy2.13345. 査読有り

3) Ota, S., Taimatsu, K., Yanagi, K., Namiki, T., Ohga, R., Higashijima, S., and Kawahara, A. (2016). Functional visualization and disruption of targeted gene using CRISPR/Cas9-mediated eGFP reporter integration in zebrafish. *Scientific Reports* 6, Article 34991. doi: 10.1038/srep34991. 査読有り

4) Chou, M-Y., Amo, R., Kinoshita, M., Cherng, B-W., Shimazaki, H., Agetsuma, M., Shiraki, T., Aoki, T., Yamazaki, M., Higashijima, S., and Okamoto, H. (2016). Social conflict resolution regulated by two dorsal habenular subregions in zebrafish. *Science* 352, 87-90. doi: 10.1126/science.aac9508. 査読有り

5) Kawamura, A., Ovara, H., Ooka, Y., Kinoshita, H., Hoshikawa, M., Nakajo, K., Yokota, D., Jujino, Y., Higashijima, S., Takada, S., and Yamasu, K. (2016). Posterior-anterior gradient of zebrafish *hes6* expression in the presomitic mesoderm is established by the combinatorial functions of the downstream enhancer and 3'UTR. *Developmental Biology* 409, 543-554. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.11.010. 査読有り

6) Marquart, G.D., Tabor, K.M., Brown, M.R., Strykowski, J.L., LaFave, M.C., Varshney, G.K., Mueller, T., Burgess, S.M., Higashijima, S., and Burgess, H.A. (2015). A 3d-searchable database of transgenic zebrafish Gal4 and Cre lines for functional neuroanatomy studies. *Frontiers in Neural Circuits* 9, Article 78. doi: 10.3389/fncir.2015.00078. 査読有り

7) Amo, R., Fredes, F., Kinoshita, M., Aoki, R., Aizawa, H., Agetsuma, M., Aoki, T., Shiraki, T., Kakinuma, H., Matsuda, M., Yamazaki, M., Takahoko, M., Tsuboi, T., Higashijima, S., Miyasaka, N., Koide, T., Yabuki, Y., Yoshihara,

Y., Fukai, T., and Okamoto H. (2014). The habenulo-raphé serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. *Neuron* 84, 1034-1048. doi: 10.1016/j.neuron.2014.10.035. 査読有り

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

9) Okigawa, S., Mizoguchi, T., Okano, M., Tanaka, H., Isoda, M., Jiang, Y., Suster, M., Higashijima, S., Kawakami, K., and Itoh, M. (2014). Different combinations of Notch ligands and receptors regulate V2 interneuron progenitor proliferation and V2a/V2b cell fate determination. *Developmental Biology* 391, 196-206. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.04.011. 査読有り

[学会発表](計 2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、東島眞一、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効率作成法、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

東島 眞一 (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・教授

研究者番号 : 80270479