

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：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640010

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いた聴覚情景分析の神経回路基盤の研究

研究課題名(英文)Neural bases of auditory scene analysis in zebrafish

研究代表者

谷本 昌志(Tanimoto, Masashi)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30608716

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)：体が透明で生体内での神経回路の可視化や神経活動の光学計測に適したゼブラフィッシュと最新の光学計測法を用いることで、全脳の範囲かつ単一細胞レベルで聴覚応答を計測する実験系を立ち上げることができた。聴神経節細胞の電気生理学的記録、脳幹への聴神経投射の可視化および脳幹の神経細胞群の聴覚応答を光学計測することに成功した。今後更なる光学系の改良や詳細な計測および大規模データ解析により聴覚機能の神経回路機構が明らかにされると期待される。

研究成果の概要(英文)：Brain-wide auditory responses were recorded from transparent larval zebrafish brain by imaging neural activity. Electrophysiological recording of auditory ganglion neurons, visualization of auditory afferent nerves to the brainstem and imaging the brainstem neurons were carried out. Further improvement in optics and detailed large-scale data analysis of auditory responses will reveal neural mechanisms of auditory functions at a brain-wide scale and mechanistic level using zebrafish.

研究分野：神経科学

キーワード：ゼブラフィッシュ 聴覚

1. 研究開始当初の背景

動物が音に含まれる信号の意味を理解するためには、内耳で神経活動に符号化された周波数や強度などの特徴を聴覚系で再構成・情報処理する脳内過程が必要不可欠である。周囲を取り巻く様々な音信号から情報を分析・抽出して知覚することが聴覚の役割であり、「聴覚の情景分析」と呼ばれる。聴覚の情景分析の例に「音脈分凝 (van Noorden, 1977; Bregman, 1990)」があり、周波数の異なる複数の音を別々のまとまり(音脈)にグループ分けする知覚現象である。

このような高次聴覚機能についてはヒトをはじめとする哺乳類や鳥類が主な研究対象であったが、音の方向・位置を識別する音源定位を実現する遅延回路と同時検出器 (Konishi, 1991) など聴覚機能の神経回路機構の一端が明らかにされた一方で、膨大な数のニューロンから構成される神経回路が高次聴覚機能を実現している神経回路機構の多くは未解明であった。これらの動物においては多数の神経細胞が示す神経活動およびそれを実現する神経回路結合の構成を大規模かつ精密に計測・解析するには様々な制約があり、動物実験に適したモデル実験系を確立することが重要と考えられた。

魚類の内耳には哺乳類の蝸牛に相当する器官が無いが、耳石器官を使って音を受容する。興味深いことに、魚類も哺乳類や鳥類と同様に受容器(有毛細胞)によって音の振動を電気信号へ変換し、第 神経節を經由してその情報を中枢神経系へと伝達する。魚類も音脈分凝を行うことが生理学的に示されており (Fay, 1998)、内耳から脳幹、中脳、間脳、終脳へ至る聴覚系は哺乳動物と相同と考えられている (Echteler, 1985; McCormick, 1999; Yamamoto & Ito, 2008)。

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) はインド東方近辺に生息する熱帯魚であり、実験室内で飼育が容易、多産で胚は発生が早く、脳が比較的小さく透明で全脳イメージングが可能、遺伝子操作により光遺伝学的手法が容易に適用できる等の多数の利点がある。ゼブラフィッシュの聴覚系に関する研究は、内耳の形態発生に注目したものが主であったが、近年になって研究代表者らは胚や仔魚の内耳有毛細胞の機械受容応答特性や脳幹の聴覚受容ニューロンの聴覚応答特性の一部を電気生理学的解析により明らかにしてきた (Tanimoto *et al.*, 2009; Tanimoto *et al.*, 2011)。また、ゼブラフィッシュ仔魚の内耳に存在する卵形嚢、球形嚢と呼ばれる耳石器官のうち、吻側の卵形嚢は平衡感覚に重要な役割を果たす一方で、尾側の球形嚢は聴覚に重要な役割を果たすことを見出してきた (Inoue *et al.*, 2013)。

2. 研究の目的

本研究では、脊椎動物の聴覚情報処理のメカニズムを明らかにするための新たなモデル

としてゼブラフィッシュの多数の利点を生かした実験系を確立し、聴覚神経回路の可視化や聴覚応答の計測を通じて、聴覚の情景分析の重要な基本概念のひとつである「音脈分凝」を実現する神経回路基盤の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

観察や実験操作が容易な受精後 4 日後のゼブラフィッシュ仔魚を対象に以下の実験を行った。光学計測実験においては、脳内の主要な神経伝物質のひとつであるアセチルコリンを介するシナプス伝達を阻害することなく魚を不動化するために、カルシウムチャンネル *cacnb1* に変異をもち筋収縮を引き起こさない *relaxed* 変異体を用いた。

(1) 聴覚回路の生理・形態学的解析

聴覚情報を脳へ伝達する第 神経節細胞の細胞体は内耳の内腹側、脳の外腹側に位置しており、電気生理学的記録のための電極を設置することが容易ではない。そこでゼブラフィッシュ仔魚をシリコンディッシュ上に細いタングステンピンで固定し、脳の位置をずらして第 神経節細胞を観察しやすくし、ガラス電極をアプローチして単一神経細胞の活動電位を loose-patch clamp 法で細胞外記録する手法を確立し、音刺激に対する応答を記録した (図 1)。

図 1

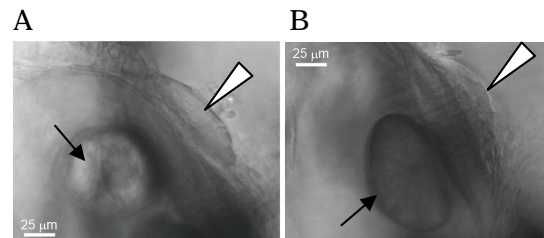


図 1. ゼブラフィッシュ仔魚の第 神経節細胞からの電気生理学的記録を可能にする標本

A 卵形嚢からの感覚情報を受け取る第 神経節 (矢じり) と卵形嚢に位置する耳石 (矢印)。 B 球形嚢からの感覚情報を受け取る第 神経節 (矢じり) と球形嚢に位置する耳石 (矢印)。

また、球形嚢から聴覚入力を受ける聴神経と、卵形嚢から入力を受ける聴神経それぞれに蛍光色素を微量注入して神経軸索投射パターンを調べた。

(2) 聴覚応答の光学計測

汎神経細胞マーカーである HuC (*e/av13*) プロモータ下流にカルシウムイオン感受性タンパク質 GCaMP6f (または GCaMP6s) をコードする配列をつないだ組換え遺伝子をもつゼブラフィッシュをアガロースに包埋し、ス

ステージに設置したスピーカーから音/振動刺激を与えて蛍光強度変化を二光子励起顕微鏡で計測した。励起光源は Spectra Physics 社のフェムト秒チタンサファイアレーザー Mai Tai で波長は 940 nm, 平均レーザー強度は 10~40 mW, 蛍光検出器には浜松ホトニクス社の GaAsP 光電面の光電子増倍管を用いた。

活動電位を高い時間分解能で光学的に計測するために、神経細胞に遺伝子コード型膜電位感受性プローブ蛍光タンパク質 Accelerated sensor of action potentials 1 (ASAP1) を発現する遺伝子組換えゼブラフィッシュを作成し、性能評価実験として運動誘発時の脊髄ニューロンの蛍光強度変化をスピンドイス式共焦点レーザー顕微鏡で計測した。励起光源には半導体青色光レーザー、共焦点光学系には横河電機社の CSU-W1、蛍光検出器には Andor 社の EM-CCD カメラを用いた。

4. 研究成果

(1) 聴覚回路の生理・形態学的解析

単一の第 1 神経節細胞の活動電位を loose-patch clamp 法で細胞外記録する手法を確立することに成功し、球形嚢から聴覚入力を受ける第 1 神経節細胞が受精後 2 日から 5 日にかけて音刺激応答を発達させ、音刺激強度に応じて発火周波数を増加させる一方で、卵形嚢から入力を受ける第 1 神経節細胞は顕著な応答を示さないことを明らかにした(図 2)。

図 2

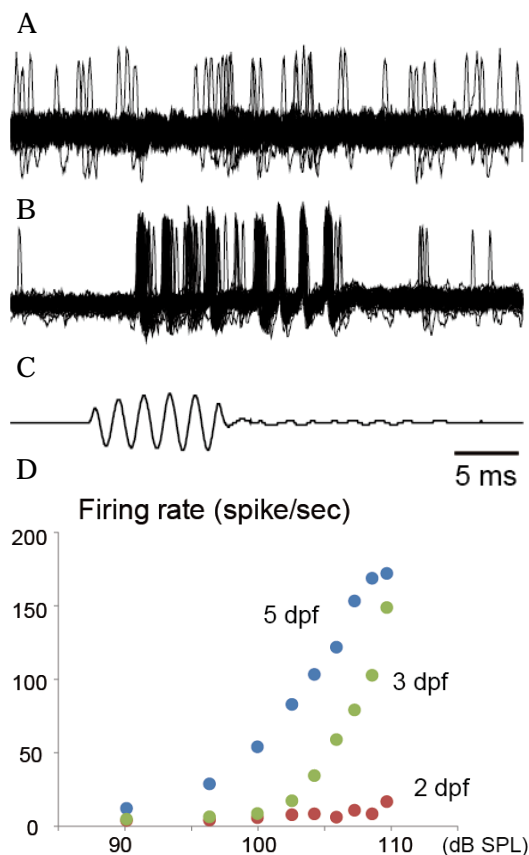


図 2. ゼブラフィッシュ仔魚の第 1 神経節細胞からの電気生理学的記録

A 卵形嚢からの感覚情報を受け取る第 1 神経節の音刺激応答. B 球形嚢からの感覚情報を受け取る第 1 神経節の音刺激応答. A と B とともに受精後 5 日の記録. C 500Hz, 5cycles, 110dB sound pressure level (SPL) の音刺激. D 球形嚢からの感覚情報を受け取る第 1 神経節の音刺激応答とその発達過程. 受精後日数 days postfertilization (dpf).

この結果は、われわれが先行研究で報告した卵形嚢・球形嚢の聴覚応答の実験結果と一致しており、卵形嚢と球形嚢 2 つの耳石器官およびそこから脳幹へ聴覚情報を伝達する求心性神経繊維がそれぞれ機能的に分化し、卵形嚢は主に平衡感覚情報を、球形嚢は聴覚情報を脳へ伝達することを示唆した。

さらに形態学的解析により、これら両者の求心性神経線維がともに菱脳背側の菱脳第 1 分節から第 7 分節の範囲に一次投射することを明らかにした。両者の投射パターンに大きな違いは見出されなかった。

(2) 聴覚応答の光学計測

短いパルス音/振動刺激(500 Hz, 2 cycles) に対して菱脳第一分節の正中線から約 40 μ m 側方の細胞群、およびそこから菱脳第 5 分節の正中線から約 20 μ m 側方を經由して後脳後部へ下降する繊維群においてカルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP6f の一過的な蛍光強度上昇が観察された。蛍光強度変化率 F/F は約 50% であり、約 1 秒後には元の蛍光強度に戻った。異なる刺激強度に対して同様の応答が再現され聴覚応答であることが示唆された。

菱脳第一分節の細胞群の細胞体の位置は、(1) で明らかとなった聴神経の投射領域とは重なっていなかったが、側方へ伸ばす樹状突起を介して直接聴神経から聴覚入力を受け取るか、あるいは一次神経核以降の経路から入力を受けて脊髄へ信号を送る下降性の神経核である可能性が示唆された。今後、単一細胞に蛍光色素を注入する方法や、様々な転写因子等の細胞種マーカーを利用してこれらの神経細胞群の性質および神経回路を明らかにする必要がある。

本研究において、遺伝子組換えゼブラフィッシュを 2 光子励起顕微鏡で観察することにより、聴覚応答を全脳の範囲で光学計測することが可能となった。カルシウムイオンの濃度変化は活動電位に比べて非常に長い時定数の応答であるため、活動電位の周波数や発火パターンを詳細に解析することは難しいが、どの細胞が活動しているのかを大規模の細胞集団から浮き彫りにする目的に適している。今後より信号ノイズ比と撮影速度の高いライトシート顕微鏡を利用することで、さらに効率よく聴覚をはじめとする感覚応答を解析することが期待される。

脊髄ニューロンに遺伝子コード型膜電位感受性プローブタンパク質 ASAP1 を発現する遺伝子組換えゼブラフィッシュの頭部に逃避遊泳運動を誘発する電気刺激を与えると、脊髄ニューロンの細胞体の細胞膜部分で約10%程度の蛍光強度の変化が記録された。記録光学系の性能の制約のため、1つの活動電位を十分な時間分解能と信号ノイズ比で光学計測データから検出できるかどうかは未知であるが、脳内の特定の細胞の神経活動を計測するための新たな有効な手法となる可能性が示唆された。

Bregman, A.S. (1990) Auditory Scene Analysis. MIT Press.

Echteler, S.M. (1985) Organization of central auditory pathways in a teleost fish, *Cyprinus carpio*. *Journal of Comparative Physiology A*, 156, 267-280.

Fay, R.R. (1998) Auditory stream segregation in goldfish (*Carassius auratus*). *Hear Res*, 120, 69-76.

Inoue, M., Tanimoto, M. & Oda, Y. (2013) The role of ear stone size in hair cell acoustic sensory transduction. *Sci Rep*, 3, 2114.

Konishi, M. (1991) Deciphering the Brain's Codes. *Neural Computation*, 3, 1-18.

Mccormick, C.A. (1999) Anatomy of the Central Auditory Pathways of Fish and Amphibians. In Fay, R.R., Popper, A.N. (eds) *Comparative Hearing: Fish and Amphibians*. Springer New York, New York, NY, pp. 155-217.

Tanimoto, M., Ota, Y., Horikawa, K. & Oda, Y. (2009) Auditory input to CNS is acquired coincidentally with development of inner ear after formation of functional afferent pathway in zebrafish. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29, 2762-2767.

Tanimoto, M., Ota, Y., Inoue, M. & Oda, Y. (2011) Origin of inner ear hair cells: morphological and functional differentiation from ciliary cells into hair cells in zebrafish inner ear. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31, 3784-3794.

van Noorden, L.P. (1977) Minimum differences of level and frequency for

perceptual fission of tone sequences ABAB. *J Acoust Soc Am*, 61, 1041-1045.

Yamamoto, N. & Ito, H. (2008) Visual, lateral line, and auditory ascending pathways to the dorsal telencephalic area through the rostromedial region of the lateral preglomerular nucleus in cyprinids. *The Journal of comparative neurology*, 508, 615-647.

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 0件)

[学会発表](計 2件)

Tanimoto M, Sugimoto A, Yokomichi S, Asakawa K, Kawakami K, Oda Y, "Optogenetic analysis of the functional role of Mauthner cell on the sound/vibration-evoked fast escapes in larval zebrafish" 第37回神経科学学会, 2014年9月13日, 横浜.

Inoue M, Tanimoto M, Oda Y, "A semi-in-vivo electrophysiological analysis of auditory nerve development in larval zebrafish" 第37回神経科学学会, 2014年9月13日, 横浜.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 昌志 (TANIMOTO, Masashi)
名古屋大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：30608716

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

小田 洋一 (ODA, Yoichi)
名古屋大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：00144444
高木 新 (TAKAGI, Shin)
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：90171420