

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06708

研究課題名(和文) 脳神経活動の自発性同期リズム振動を生む後脳オシレータの神経回路基盤と生理的意義

研究課題名(英文) Neural circuits and biological roles of spontaneous, synchronous and rhythmic activity in zebrafish hindbrain

研究代表者

谷本 昌志 (Tanimoto, Masashi)

名古屋大学・理学研究科・客員研究員

研究者番号：30608716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳神経活動の「自発性同期リズム振動」は、感覚情報の脳内表現や学習記憶、知覚などの脳内情報処理に重要な役割を果たし、その異常な状態は病態と関連すると考えられている。しかし、関与する神経回路ネットワークが一般的に大規模であり、実験上の多くの制約のためにリズム振動を生成する神経回路機構と脳機能への関与メカニズムの多くは未解明である。本研究では、透明で生きたまま全ての脳細胞の観察が可能等多くの利点を有するモデル脊椎動物ゼブラフィッシュ仔魚を対象にして、脳神経細胞の新たな活動計測法や機能阻害方法の開発改良に貢献し、後脳のニューロン群が自発的なリズム活動を生み出す神経回路の構成や機能の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たな脳神経細胞の活動計測法や機能阻害方法の開発改良に成功したことや、透明で生きたまま全ての脳細胞の観察が可能等多くの利点を有するモデル脊椎動物ゼブラフィッシュ仔魚の脳内で、自発的なリズム活動を生み出す神経回路の構成や機能の一端を明らかにしたことは、今後より複雑な神経回路により生み出される脳機能の発現や破綻の理解に資する。

研究成果の概要(英文)：Spontaneous, synchronous and rhythmic neural activity is believed to play an important role in higher order brain functions such as sensory representation, learning, memory and perception. Disruption of those activity is thought to correlate with disease conditions. Neural circuits underlying those activity, however, consist of a large number of neurons. Because of this, difficulties in experiments prevent our understanding of composition of the neural circuits and their contribution to brain functions. Here, we used transparent larval zebrafish, a model vertebrate in which all the brain cells can be observed in a living animal. We developed new volumetric functional imaging and cell-perturbation techniques at single-cell resolution. With these, our study contributed to a better understanding of neuronal composition and functional roles of hindbrain neurons that produce spontaneous, synchronous and rhythmic activity.

研究分野：神経生理学

キーワード：脳幹 カルシウムイメージング ゼブラフィッシュ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳は周期的な同期リズム活動を自発的に生成しており、海馬や大脳皮質の 0.05Hz ~ 数百 Hz のリズム活動、脳幹の呼吸リズムなどが知られている。興味深いことに、脳神経活動の同期リズム振動は脳機能発現に重要な働きをもつと考えられており、例えば海馬の 4 ~ 10 Hz のシータ波は場所細胞の空間表現 (O'Keefe & Recce, 1993) に、皮質の数 Hz ~ 数百 Hz の活動振動は予測と誤差検知 (Arnal et al., 2011) や意識的知覚 (Melloni et al., 2007) にそれぞれ関わり、徐波睡眠中の皮質の 1Hz 以下の活動振動は陳述記憶の固定を亢進する (Marshall et al., 2006)。さらに、異常な活動振動は知覚障害などの病態と関連することも知られている (Buzsáki et al., 2013; Başar, 2013)。このような脳神経活動の「自発性同期リズム振動」は、感覚情報の脳内表現や学習記憶、知覚などの脳内情報処理に重要な役割を果たし、その異常な状態は病態と関連すると考えられている。しかし、関与する神経回路ネットワークが一般的に大規模であり、実験上の多くの制約のためにリズム振動を生成する神経回路機構と脳機能への関与メカニズムの多くは未解明である。モデル脊椎動物ゼブラフィッシュ仔魚は透明で、生きたまま全脳細胞の観察が可能であり、多種の遺伝子組換え体を利用した遺伝子・分子マーカーに基づく細胞の同定や、生体内での神経回路の可視化、活動記録、活動操作に適している。ゼブラフィッシュ仔魚の全脳カルシウムイメージングによる 1 細胞レベルのリアルタイム機能解析により、後脳吻側の左右わずか 20 ~ 30 個程度の細胞群「hindbrain oscillator (後脳オシレータ) (図 1)」が無刺激環境下で約 0.05Hz の周波数で左右交互に自発性同期リズム振動活動することが報告された (Ahrens et al., Nat. Methods, 2013)。しかし、その神経回路ネットワークの構成、動作原理および生理学的意義は未解明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、脊椎動物脳の前発性同期リズム振動の神経回路基盤を明らかにするための新たなモデルとして、ゼブラフィッシュ後脳オシレータ回路の実験系を確立し、後脳オシレータ回路神経回路の構成、自発性同期リズム振動を生み出す動作原理、生理的機能を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞レベルの高速機能イメージング法の開発

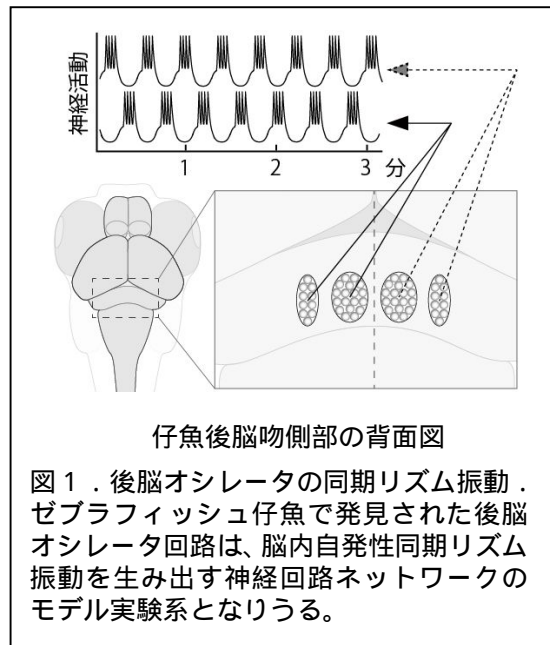
脳の異なる深さに散在するニューロンの活動を光学計測するためには、通常、対物レンズの焦点面を変えて画像取得を繰り返す必要がある。そのため、多数のニューロンの活動計測には時間がかかり、各細胞から得られる情報が少なくなってしまう。そこで、2 光子励起カスタム顕微鏡の励起光路上に、円錐形レンズを含む光学モジュールを組み込み、生成したリング状のベッセル光により焦点の 2 光子励起領域を深さ方向に伸張し、任意の厚みの組織内の異なる深さに散在する細胞を、対物レンズを動かすことなく可視化する手法の開発を行った。

#### (2) 遺伝子組換えシステムを用いた後脳オシレータ構成細胞の特徴の抽出

後脳オシレータ構成細胞で任意の組換え遺伝子の発現を可能にするために、後脳の一部のニューロン集団が転写因子 Gal4 を発現する約 40 のエンハンサートラップシステム (Marquart et al., 2015) を共焦点顕微鏡観察してスクリーニングを試みた。後脳には吻尾軸方向にストライプ状の転写因子群の発現が見られ (Higashijima et al., 2004; Kinkhabwala et al., 2011) 後脳オシレータ構成細胞の細胞体の位置情報を考慮すると、内側部の細胞群は転写因子 chx10 陽性の同側投射型グルタミン酸作動性ニューロン群、外側部は転写因子 dbx1b 陽性の GABA 作動性ニューロン群ではないかと推測された。この可能性を、転写因子陽性細胞が Gal4 やレポーター蛍光タンパク質を発現する遺伝子組換えシステム、神経細胞にカルシウム指示蛍光タンパク質を発現するシステムを利用したカルシウムイメージングにより検証した。また、電気穿孔法で蛍光色素を一細胞に注入、あるいは Gal4-UAS 遺伝子発現システムを用いて転写因子陽性細胞に膜局在レポーター蛍光タンパク質を発現させて、軸索の投射を観察した。さらに、2 光子励起顕微鏡の光源のフェムト秒パルスレーザーを用いて、仔魚脳の任意の細胞を 1 細胞ずつ破壊して、細胞機能を調べる手法の確立を行った。

#### (3) 行動出力決定における後脳オシレータの役割

後脳オシレータは左右交互に活動するため、脳内情報処理に左右のバイアスを与える役割が考えられる。これを検証するため、感覚入力を受けて脊髄へ運動出力指令を送る網様体脊髄路二



仔魚後脳吻側部の背面図

図 1. 後脳オシレータの同期リズム振動。ゼブラフィッシュ仔魚で発見された後脳オシレータ回路は、脳内自発性同期リズム振動を生み出す神経回路ネットワークのモデル実験系となりうる。

ニューロン群に注目し、一对のマウスナー細胞が駆動する聴覚誘導性逃避運動 (Satou et al., 2009) において、ニューロン活動と行動の同時イメージング法 (Kohashi & Oda, 2008) により、後脳オシレータの活動と行動の左右の偏りとの相関を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 共同研究によりベッセル光モジュールを組み立て、2光子励起光学系のカスタム顕微鏡に組み込み、単一焦点面を観察する通常の2光子励起観察から光路を切り替えることで、厚みのある組織内の異なる深さに散在する細胞を高速イメージングする手法を開発した。この過程で、モジュール内のリレーレンズ位置をずらすことで、2光子励起の起こる深さ方向の幅をおよそ10~100マイクロメートルへと任意かつ簡便に設定できることを見出し、異なる深さに散在する後脳オシレータおよび網様体脊髄路ニューロン群の活動を高速計測することに成功したほか、空間光変調器を用いたベッセル光生成モジュールの実証実験にも貢献した(発表論文、 )

(2) Gal4 系統のスクリーニングでは、後脳オシレータを選択的に標識する系統は見出されなかった。一方、網様体脊髄路ニューロン群の部分集団を標識する系統が20系統以上見出された。後脳オシレータの内側部と合致する位置に存在する転写因子 chx10 陽性細胞が、後脳オシレータと同様の活動を示したことから、後脳オシレータの内側部の細胞は chx10 陽性細胞であると考えられた。これらのニューロンの軸索は腹側へ下行し、網様体脊髄路ニューロンの内腹側の細胞近傍へ投射した。この内腹側の網様体脊髄路ニューロンの軸索は、腹側の内側縦束を脊髄へ下行し、脊髄運動ニューロンの細胞体近傍へ軸索終末を分布させることを見出した。この結果は、後脳オシレータの内側部の細胞がグルタミン酸作動性であり、軸索は同側かつ腹側へ下降して網様体脊髄路ニューロンの内腹側の細胞近傍へ投射することを示した報告(引用文献 )と一致した。またこの報告は、後脳オシレータの外側部は交連性の GABA 作動性ニューロンを含むことも示した。短パルスレーザーを用いて細胞に傷害を与えて機能障害する方法は簡便であり、特に透明度の高いゼブラフィッシュ仔魚では非常に有効な方法である。仔魚脳の任意の単一ニューロンに、2光子励起顕微鏡の光源のフェムト秒パルスレーザーを数ミリ秒間照射して機能を乱す方法において、レーザー照射された細胞の活動電位の発生が抑制されることを電気生理学的に示し、機能障害方法の確立に貢献した(発表論文 )

(3) 後脳オシレータの活動は、左あるいは右へ曲がって泳ぐ運動を制御すること(引用文献 )さらに、左右への眼球運動や、それと同調する体幹の左右へのターン運動と相関することが報告された(引用文献 )。一方、マウスナー細胞によって駆動される、すばやい逃避運動の方向との相関は見出されなかった。反対に、マウスナー細胞を人工的に発火させて仮想逃避運動を引き起こした場合に、後脳オシレータの一部の細胞でカルシウム応答が観察され、眼球運動などの逃避運動に伴う運動との関連が示唆された。

これらの結果および関連する研究報告(引用文献、 )を合わせると、後脳オシレータは反対側を抑制する回路によって左右交互の活動を示すこと、運動を制御する網様体脊髄路ニューロンの一部を介して体幹の左右への旋回運動を制御すること、また、遊泳と同調して起こる眼球運動の制御にも関わることが明らかとなった。

#### < 引用文献 (一部抜粋) >

Timothy W Dunn, Yu Mu, Sujatha Narayan, Owen Randlett, Eva A Naumann, Chao-Tsung Yang, Alexander F Schier, Jeremy Freeman, Florian Engert, Misha B Ahrens, "Brain-wide mapping of neural activity controlling zebrafish exploratory locomotion", eLife 2016;5:e12741 (2016)

DOI: 10.7554/eLife.12741

S. Wolf, A. Dubreuil, T. Bertoni, U.L. Böhm, V. Bormuth, R. Candelier, S. Karpenko, D.G.C. Hildebrand, I. H. Bianco, R. Monasson, G. Debrégeas, "Sensorimotor computation underlying phototaxis in zebrafish", Nature Communication, 8, Article number: 651 (2017)

<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00310-3>

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Shimazaki T, **Tanimoto M**, Oda Y, Higashijima S, "Behavioral role of the reciprocal inhibition between a pair of Mauthner cells during fast escapes in zebrafish", The Journal of Neuroscience, 39(7) 1182-1194, 2019 (査読有り)

DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1964-18.2018>

Vladimirov N, Wang C, Höckendorf B, Pujala A, **Tanimoto M**, Mu Y, Yang C, Wittenbach J, Freeman J, Preibisch S, Koyama M, Keller PJ, Ahrens MB, "Brain-wide circuit

interrogation at the cellular level guided by online analysis of neuronal function”  
Nature Methods, 15(12):1117-1125, 2018 (査読有り)  
doi: <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0221-x>

Lu R#, **Tanimoto M**#, Koyama M, Ji N, “50 Hz volumetric functional imaging with continuously adjustable depth of focus”, Biomedical Optics Express, vol. 9, issue 4, pp 1964-1976, 2018 (査読有り)  
#: equally contributing authors  
doi: <https://doi.org/10.1101/240069>

Lu R, Sun W, Liang Y, Kerlin A, Bierfeld J, Seelig J, Wilson D, Scholl B, Mohar B, **Tanimoto M**, Koyama M, Fitzpatrick D, Orger M, and Ji N, “Video-rate volumetric functional imaging of the brain at synaptic resolution”, Nature Neuroscience, vol. 20, pp 620-628, 2017 (査読有り)  
doi:10.1038/nn.4516

〔学会発表〕(計 2 件)

**Tanimoto M**, Lu R, Pujala A, Ji N, Koyama, M, “Fast volumetric functional imaging with axicon-based Bessel beam reveals neural birth timing-related recruitment pattern among brainstem descending neurons in larval zebrafish”, Oral presentation, Neuroscience 2018 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan, 2018

**Tanimoto M**, Pujala A, Koyama M, “Birthtime-related hierarchical organization among descending neurons in larval zebrafish”, Poster, Neuroscience 2017 Society for Neuroscience Annual Meeting, Washington DC, USA, Nov. 2017

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。