

平成 2009 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18700331  
 研究課題名(和文)  
 透明なモデル動物ゼブラフィッシュを用いた右脳と左脳の情報処理機構解析  
 研究課題名(英文)  
 Processing of left-right neural information in zebrafish  
 研究代表者  
 相澤 秀紀(AIZAWA HIDENORI)  
 独立行政法人理化学研究所・発生遺伝子制御研究チーム・副チームリーダー  
 研究者番号：80391837

研究成果の概要：本研究課題では、左右非対称性を示すゼブラフィッシュ手綱核の神経活動の違いを明らかにするため、実験をおこない以下の成果を得た。1) カルシウム指示薬の局所微量導入により左右半球における神経活動同時記録に成功した。2) ゼブラフィッシュ成魚脳における安定した細胞外記録法を確立した。3) 微量色素導入により左右非対称な手綱核神経回路を解剖学的に可視化した。4) 当該分野における知見を総説として発表した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経情報処理、ゼブラフィッシュ、手綱、左右非対称、カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

それまでの脳の左右性研究では、形態学的な非対称性を示す両生類手綱核やヒト大脳皮質が知られる一方、その機能についてはfMRIなどの機能画像研究により、ヒト大脳皮質を中心とした解析が主体であった。しかし、これらの方法は血流量など神経活動の間接的な指標を測定するため時空間分解能が低く、細胞レベルでの動態を知ることはできない。本研究の特色は、時空間分解能に優れた光学的測定法と左右同時計測に適した透明な稚魚脳を組み合わせることで、左右で異なった神経情報処理過程を神経回路レベルで詳細に検討できる点にある。

研究開始当初、ゼブラフィッシュは脊椎動物脳の左右差形成に分子的洞察を与えている唯一のモデル動物である一方、それまでの研究は手綱核非対称性の発生機構に主眼をおいたものがほとんどで、手綱核における情報処理機構及びその機能については脊椎動物を通じて不明な点が多かった。本研究は神経回路における左右非対称性の生理学的基盤を検討する点で国際的にも例をみないものであった。

## 2. 研究の目的

左右差はあらゆる動物に共通してみられる神経系の特徴であるにも関わらず、モデル

動物を用いた分子生物学的検討がほとんどなされていないため、その詳細なメカニズム及び機能については不明な点が多い。左右非対称性は統合失調症や自閉性障害など精神疾患の病態との関連も指摘されており、その生理学的意義を明らかにすることは高次脳機能の神経機構を理解する上で不可欠と考えられる。

手綱核は魚類からヒトまで共通して存在する間脳の神経核で、前脳基底部に存在する大脳辺縁系から入力を受け中脳と連絡している。機能的には、哺乳動物における破壊実験から、セロトニンやドーパミン神経活動の修飾に関わる情動の高次中枢として知られる一方、下等脊椎動物でその大きさに著しい左右差を示すことから脳の左右差のモデルとして注目されている。これまで私はゼブラフィッシュを用いて、特徴的な遺伝子発現を持つ左右の手綱核亜核が、それぞれ異なる中脳標的部位（脚間核）と連絡することにより左右の神経情報を背腹軸に沿って変換する経路を示してきた。これらの結果から、左右神経システムは独立した情報処理機構を持つ、という仮説に至った。

一方、透明な脳を持つゼブラフィッシュ稚魚では、遺伝子導入技術により神経組織特異的にカルシウム感受性タンパクを発現させることができ、*in vivo* で脳活動を光学的に記録可能である。左右手綱核は 200 $\mu$ m 四方に収まる大きさで、稚魚脳は光学顕微鏡でほぼ全体を一視野の中に観察できるため、左右の神経情報を細胞レベルかつ神経回路レベルで広範囲から同時記録するのに最適と考えられる。

本研究の目的は、透明で小さなゼブラフィッシュ稚魚脳をモデルとして、右脳と左脳の神経活動の違いを明らかにするとともに、神経連絡のある終脳や中脳神経核との相関を調べることで機能的左右差のシステムの理解を得ることである。具体的にはカルシウム感受性タンパクを神経組織特異的に発現する遺伝子導入システムを用いて、手綱核-脚間核を含む領域の神経細胞活動を光学的に同時測定する。各部位で記録される細胞毎の発火頻度や同期性について解析し、これまで解剖学的に私が調べてきた回路における相関やその左右性について解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) カルシウム指示薬による左右神経活動の可視化

手綱核の自発的発火を脳活動の指標として、左右半球における光学的同時計測法の最適化を行うため、カルシウム感受性色素 Oregon Green-BAPTA-1 (OGB-1) をゼブラフィッシュ稚魚手綱核の左もしくは右に顕微注入し、神経細胞内に導入した。無麻酔でアガ

ローズに包埋した稚魚を顕微鏡下に観察し、蛍光強度の自発的変化を高速共焦点レーザー顕微鏡 ZEISS 社製 LSM5LIVE を用いて光学的に計測した。得られた信号は、画像解析処理ソフト ImageJ および信号処理ソフト MATLAB を用いて、蛍光強度の変化を検出、解析した。

#### (2) 遺伝子導入動物による神経活動の可視化

手綱核を含む広範な領域で、非侵襲的に神経活動を可視化する際に、遺伝的にコードされたカルシウム感受性タンパク質を発現する遺伝子導入動物は有用と考えられる。そこで現在入手可能なカルシウム感受性タンパク質遺伝子を発現するゼブラフィッシュ系統 Tg(huc:YC2.1) 及び Tg(huc:inverse pericam) を用いて、自発性神経活動を指標に蛍光強度変化を高速共焦点レーザー顕微鏡 ZEISS 社製 LSM5LIVE にて観察した。

#### (3) ゼブラフィッシュ脳神経活動の電気生理学的測定

光学的に測定した細胞内カルシウム濃度変化が実際の電氣的活動を反映しているかを調べるため、哺乳動物用脳定位手術装置（ナリシゲ製 SN-6）を流用し、ガラス電極及びステンレス製金属電極を用いて、ゼブラフィッシュ成魚脳の電気活動を記録した。ゼブラフィッシュ成魚は、MS222 麻酔後、ツボクラリンで無動化し、fish water で鰓を還流することで維持した。信号は、プリアンプにて増幅後、Dagan 製増幅器 (Ex-1) にて 2000 倍に増幅し、16 ビット AD コンバータ (National instruments) によりハードディスクに記録した。

#### (4) 左右非対称な手綱核神経回路の解剖学的可視化

ゼブラフィッシュ手綱核神経回路は手綱一脚間核経路において左右非対称性を示すが、下流の運動経路にどのように左右情報が伝播されるかは未解明であった。左右手綱核の入力をそれぞれ受ける背腹脚間核の遠心路を同定するため、標識物質 biocytin 及び neurobiotin をイオン泳動法にて背腹脚間核に微量注入し、組織学的にその投射標的を探索した。また、哺乳動物で明らかである内側・外側手綱核の組織構築が進化的に保存されているかを調べるため、哺乳動物外側手綱核遠心性線維の主な標的である縫線核をゼブラフィッシュにおいて同定し、標識物質を微量注入することで、逆向性に標識される手綱核細胞体の分布を組織学的に調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞内カルシウム濃度変化による左右

### 半球における手綱神経活動の光学的測定

受精後5日目のゼブラフィッシュ稚魚は、透明性を保っているため脳深部の信号を光学的に検出することが可能である。一方、カルシウム指示薬である **Calcium green**, **Oregon-green BAPTA-AM** および **rhod2-AM** 試薬は細胞外から導入することができ、神経活動に伴う細胞内カルシウム濃度変化を光信号に変換する。それぞれのカルシウム指示薬をゼブラフィッシュ受精後5日稚魚手綱核に微量圧注入し、神経細胞の標識強度を検討したところ、分布及び強度ともに **Oregon-green BAPTA-AM** 試薬が最も最適であった。本試薬を左右手綱核に顕微鏡で記録することで、一細胞レベルでの自発発火信号を左右半球で同時に記録することに成功した (図1)。

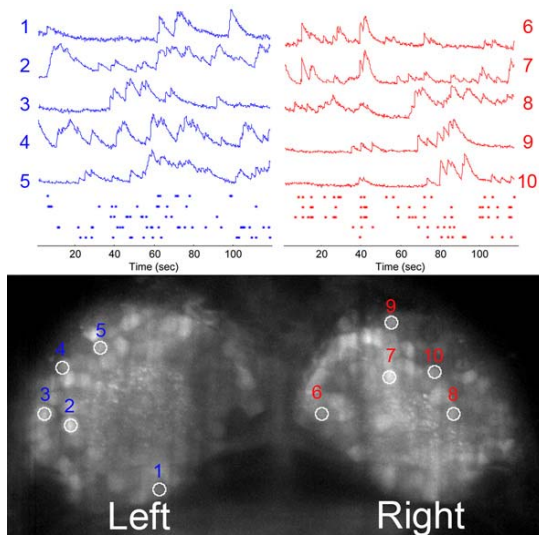


図1 Oregon-green による左右手綱核神経活動の可視化(受精後5日ゼブラフィッシュ)

得られた信号を画像解析ソフト **ImageJ** 及び信号解析ソフト **MATLAB** によりフィルタ処理及びピーク検出し、左右での発火特性について検討した。左側と比較し、右側ではより同期した細胞活動みられる傾向にあるように思われる (図1上、ラスタプロット) が、色素の分布が均一な個体が少ないため定量的解析が困難であった。今後個体数を増やし検討する必要がある。また、最近の我々の研究により手綱核神経細胞は発達過程において、左側神経細胞が右側に比べてより早期に誕生することが分かっている。手綱核神経細胞が右側に比べてより早期に誕生することが明らかとなっており、本研究の結果は左右の神経細胞集団の発達様式の違いを反映している可能性がある。

また、カルシウム感受性タンパク質遺伝子を発現するゼブラフィッシュ系統 **Tg(huc:YC2.1)** 及び **Tg(huc:inverse pericam)**

についても同様の観察を行ったが、受精後5日目の稚魚脳においては、カルシウム感受性タンパク質の蛍光強度が弱く、蛍光輝度の変化を検出するには至らなかった。転写調節領域には組織特異性があるため、今後は手綱核に強力に目的のタンパク質を発現させる転写調節領域を用いて検討する必要がある。

### (2) ゼブラフィッシュ成魚脳における細胞外記録法の確立

細胞内カルシウム濃度変化による光学的神経活動測定は、多数の神経細胞活動を同時記録する点で左右半球の比較において利点を持つ一方、神経細胞の電気活動における間接的に反映するため、実際の電気活動と解離している可能性も残されている。

そこで本研究課題では、まずゼブラフィッシュ成魚脳における電気生理的測定装置を開発した。筋弛緩薬ツボクラリンにより無動化したゼブラフィッシュ視蓋にガラス電極及びステンレス電極を挿入し、LEDライトにより反対側網膜を光刺激することで、視蓋フィールド記録上で応答を確認することができた (図2)。さらに同時記録したユニット記録からは、視覚刺激の開始及び終了に反応する視蓋神経細胞発火を見出した。

このようにして確立された細胞外記録法は、細胞内カルシウム濃度変化と神経細胞電気活動を対応付ける上で、重要な基盤になると考えられる。

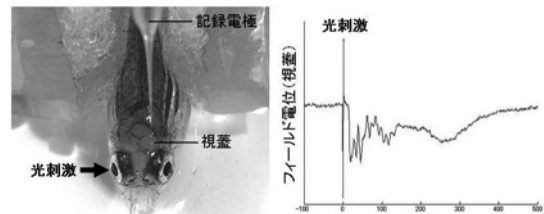


図2 フィールド記録によるゼブラフィッシュ成魚視蓋の光刺激応答

### (3) 微量色素注入法による左右非対称な手綱核神経回路の可視化

これまでの研究で明らかにしてきた、手綱核一脚間核投射の左右非対称性は、神経結合によりさらに下位の脳部位と連絡して機能を発揮していると考えられる。この問題を明らかにするため、軸索標識色素をスクリーニングし、**Biotinylated dextran amine**, **Neurobiotin** 及び **DiI** が効率よく軸索を標識することを見出した。麻酔下及び固定したゼブラフィッシュ成魚脳にイオン泳動法でこれらの色素を微量注入し、神経線維の投射パターンについて形態学的に解析した。左半球からより多くの入力を受ける背側脚間核は、背側へと軸索を伸ばし、主に中心灰白質へと

投射していた。一方、右半球からより多くの入力を受ける腹側脚間核は、後側に存在するセロトニン作動性神経細胞の豊富な縫線核に短い軸索を送っていた(図3)。哺乳動物においては、中心灰白質は本能的回避行動において中心的役割を果たすことが知られている一方で、縫線核はセロトニン作動性神経細胞を多く含みより適応的行動に関与することが知られている。本研究課題における結果は、左右手綱核が背腹脚間核を介してこれらの相反する回避行動を制御している可能性を示唆している。

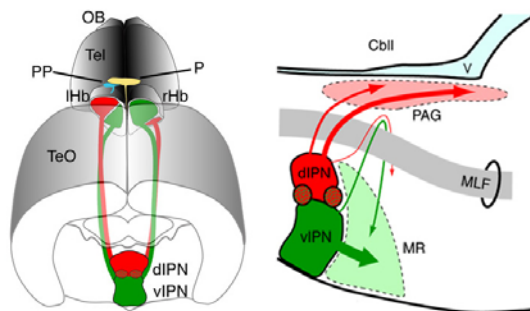


図3 ゼブラフィッシュ手綱核—脚間核における左右非対称な投射(左、背面像)と背腹脚間核遠心性投射(右、側面像、図左側が前側)の模式図

また、魚類において著明な左右非対称性を示す手綱核は、哺乳動物では内側手綱核及び外側手綱核とよばれる神経結合および細胞特性の異なる細胞集団から構成されており、全く別個の神経回路によりドーパミン作動性神経細胞及びセロトニン作動性神経細胞の制御に当たると考えられている。

左右非対称性を示すゼブラフィッシュ手綱核が、哺乳動物手綱核のどのような領域に相当するかを調べるため、哺乳動物内側手綱核の投射標的である脚間核及び哺乳動物外側手綱核の投射標的である縫線核のゼブラフィッシュ相同領域に標識物質を注入し、逆向性標識される神経細胞体の分布を組織学的に検索した。

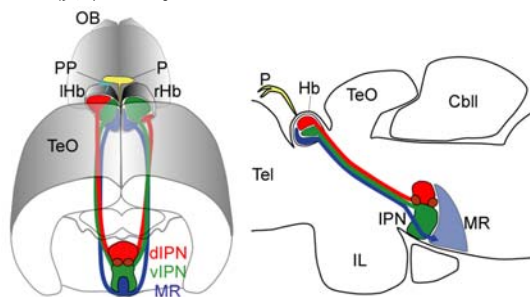


図4 ゼブラフィッシュにおける哺乳類内側手綱核相同領域(赤及び緑)と哺乳類外側手綱核相同領域(青)を背面像(左)と側面像(右)を示す模式図

解析の結果、ゼブラフィッシュ手綱核は、哺乳動物内側手綱核に相当する背側手綱核と哺乳動物外側手綱核に相当する腹側手綱核に分類され、それぞれがゼブラフィッシュ脚間核および縫線核へと特異的に投射していることが明らかとなった(図4)。

これらの結果は、モノアミン神経系を制御する哺乳類内側・外側手綱核神経回路が、進化を通じて保存されていることを示し、これら2つの神経回路の働きが脊椎動物の適応行動において重要な役割を果たしていることを示唆している。

#### (4) モデル動物を用いた脳の左右非対称性研究の現状

分子レベルでの解析が困難であった脳の左右非対称研究は、未だ不明な点が多く残されており、国内外の研究状況を概観したものが少ない。本研究課題では、当該分野の最新の知見をまとめ、国内外の雑誌の総説及び分子生物学会シンポジウムにおいて発表した。

#### 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5件)

- ① Hitoshi Okamoto, Tomomi Sato and Hidenori Aizawa  
Transgenic technology for visualization and manipulation of the neural circuits controlling behavior in zebrafish. Development, Growth and Differentiation vol. 50, S167-75, (2008), 査読有り
- ② 岡本仁、相澤秀紀  
“手綱核”  
分子精神医学 8, No. 2, pp.134-138、(2008年)、査読無し
- ③ 相澤秀紀、岡本仁  
ゼブラフィッシュ脳の左右非対称性とその発生機構  
細胞工学、第27巻、p576-582、(2008年)、査読無し
- ④ 相澤秀紀、岡本仁  
ゼブラフィッシュを使って明らかになってきた脳の神経回路の左右差  
Medical Bio 第4巻、第6号、p. 82-88、(2007年)、査読無し
- ⑤ 相澤秀紀、岡本仁  
透明な魚で探る脳の左右非対称性  
細胞工学、25巻、7号、p780-784、(2006年)、査読無し

[学会発表] (計5件)

- ① Agetsuma M., Aizawa H., Aoki T.,

Takahoko M., Nakayama R., Shiraki T., Goto M., Kawakami K., Higashijima S. and Okamoto H.

Genetic inactivation of the asymmetric habenulo-interpeduncular projection enhances the conditioned fear response in zebrafish

Cold Spring Harbor Meeting on Synapses: From Molecules to Circuits Behavior, 2009年4月、Cold Spring Harbor, USA

- ② 相澤秀紀、天羽龍之介、鷹架美賀子、岡本仁

脳の左右非対称性とその発生メカニズム

第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009年3月、岡山

- ③ 相澤秀紀、揚妻正和、鷹架美賀子、後藤翠、天羽龍之介、岡本仁

ゼブラフィッシュ脳の左右非対称性発達メカニズム

第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 (BMB2008)、2008年12月、神戸

- ④ 鷹架美賀子、相澤秀紀、青木田鶴、後藤翠、白木利幸、揚妻正和、岡本仁

GeneChip 解析 および BAC transgenesis による左右非対称なゼブラフィッシュ手綱核神経回路の同定

第31回日本神経科学大会 (Neuroscience 2008)、2008年7月、東京

- ⑤ 相澤秀紀、後藤翠、岡本仁

脚間核を介した手綱核の左右非対称な神経伝導路

第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学会大会・第17回日本神経回路学会大会 (Neuro2007)、2007年9月、横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

相澤 秀紀 (AIZAWA HIDENORI)

独立行政法人理化学研究所・発生遺伝子制御研究チーム・副チームリーダー

研究者番号：80391837