

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：82675

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03333

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いた前庭脊髄路神経回路の動作機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of posut 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(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター)教授

研究者番号：80270479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くの動物にとって姿勢制御は生存に重要です。姿勢が崩れると、元の姿勢に戻すような運動が引き起こされます。本研究では、ゼブラフィッシュ仔魚を用いて微細な姿勢制御メカニズムとその神経回路の解明に取り組みました。その結果、魚にも微細な姿勢制御メカニズムが存在し、魚は左右方向にわずかに傾斜すると、胴体をわずかに屈曲することで重力と浮力の作用する軸にずれが生じ、これにより傾きを立て直す方向に力のモーメントが生じて姿勢を立て直していることが明らかとなりました。また、この胴体屈曲を駆動する神経回路の詳細を明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、魚は微細な姿勢制御メカニズムを有していることを明らかにした。また、それを司る神経回路の全貌を明らかにした。特に、毛様体脊髄路の神経細胞が重要な役割を果たしていることを明瞭に示した。哺乳動物においても、毛様体脊髄路は姿勢制御に大事な役割を果たしていることが示唆されているが、その詳細は明らかでない。本研究により、今後、哺乳類における微細な姿勢制御に関わる神経回路のより詳細な解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Land-walking vertebrates maintain a desirable posture by finely controlling muscles. It is unclear whether fish also finely control posture in the water. Here, we showed that larval zebrafish have fine posture control. When roll-tilted, fish recovered their upright posture using a reflex behavior, which was a slight body bend near the swim bladder. The vestibular-induced body bend produces a misalignment between gravity and buoyancy, generating a moment of force that recovers the upright posture. We identified the neural circuits for the reflex, including the vestibular nucleus (tangential nucleus) through reticulospinal neurons (neurons in the nucleus of the medial longitudinal fasciculus) to the spinal cord, and finally to the posterior hypaxial muscles, a special class of muscles near the swim bladder. These results suggest that fish maintain a dorsal-up posture by frequently performing the body bend reflex.

研究分野：神経科学

キーワード：ゼブラフィッシュ 前庭感覚 姿勢制御 神経回路 回転顕微鏡 イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物は運動する際、また、一定の姿勢を保持する際にも、常に平衡覚器で重力を感知することで自分の体の傾きを測り、姿勢制御を行っている。脊椎動物においては、内耳前庭器官に存在する平衡覚器から得られた情報に基づいて体幹や四肢の筋肉を制御し、姿勢を安定させる。すなわち、前庭情報を受け取り、それを処理したうえで脊髄へ投射する神経経路が姿勢制御に重要な役割を果たしている。その重要性から、哺乳類を用いた前庭から脊髄への神経経路の研究は長い歴史があるが、その詳細に関しては、未だに限られた情報しか得られていない。この研究が従来困難であったのは、哺乳類を用いた実験系が複雑であったことや、この神経経路に関わるニューロン群を同定する手段が乏しかったためである。加えて、動物に前庭刺激(傾き刺激)を与えた際に神経活動をカルシウムイメージングでモニターすることがほぼ不可能であり、近年の神経科学で爆発的に用いられるようになってきたカルシウムイメージングを研究に取り入れることができなかつた点も、研究の進展を阻んできた要因としてあげられる。

2. 研究の目的

本研究では、比較的体の構造が単純で、神経回路の研究がしやすいゼブラフィッシュ幼魚を材料に用い上述の困難を克服することを企図した。具体的には、まず、体の左右非対称の傾き情報を受け、ゼブラフィッシュ仔魚がどのようにして姿勢を立て直すかを明らかにすることを第一の目的とした。そしてそれを明らかにしたうえで、どのような神経回路を用いて、前庭情報(傾き情報)が中枢神経系内のニューロン群に情報として変換され、そしていかなる脊髄投射ニューロンを介して脊髄運動ニューロンを制御して適切な姿勢制御が行われているかについて、神経回路網の全貌を明らかにすることを第二の目的とした。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュ仔魚を小さなチャンバーにいれ、そのチャンバーをロール方向に傾斜させた際の仔魚の行動を、前方と上方に設置したカメラで撮影した。すべての行動実験は可視光が存在しない状態で行い、撮影のためには赤外線照明を用いた。

傾斜時の神経活動のイメージングには、傾斜中に神経活動を計測することが可能な「対物レンズ傾斜顕微鏡」を用いた。カルシウムイメージングに用いたカルシウムインディケータとして、遺伝学的にコードされたインディケータである GCaMP や、化学的に合成されたインディケータである Cal-520 を用いた。

4. 研究成果

本研究では、まずゼブラフィッシュ仔魚をロール(右側/左側が上となる)方向に傾斜したときの魚の行動を正面と背面から観察した。背が上の状態からわずかに傾くと、わずかな胴体の屈曲を伴って、元の姿勢に戻ることが観察された(図1)。このことから、魚にも微細な姿勢制御機構が存在することが明らかとなった。粘性が高い液に魚を入れ、魚の運動をはっきり観察できるようにすると、傾斜時の胴体屈曲がより顕著に観察された。

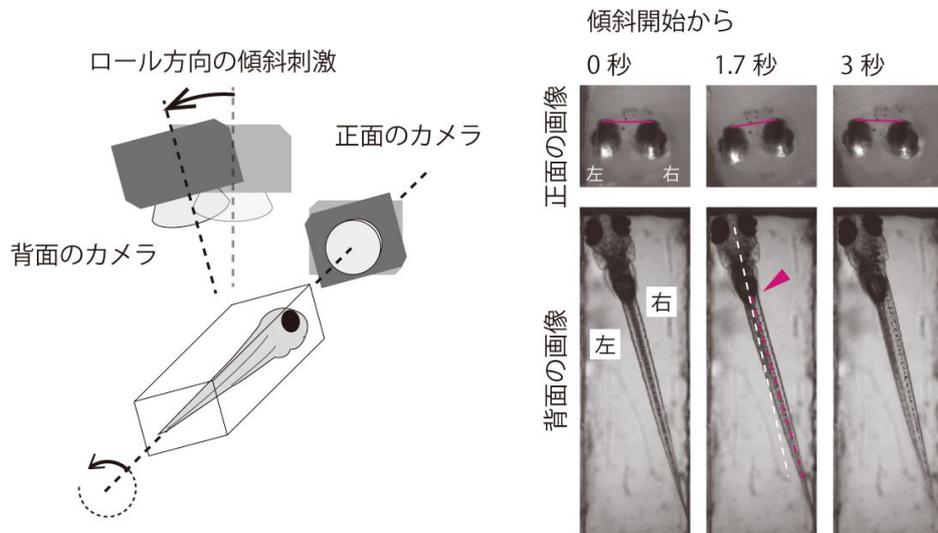


図1 行動実験の方法（左）と傾斜刺激を与えた魚の行動（右）
 魚を左側が下となるよう傾斜させると、少し傾いた後、元の姿勢に戻った。傾斜時、わずかに胴体が右側（傾斜上側）に屈曲した（赤色の三角）。

そこで、胴体の屈曲が魚の姿勢立て直しに重要な役割を担っていると考え、胴体屈曲による姿勢立て直しメカニズムのモデルを考案した。傾斜時の胴体屈曲により、魚の頭部と尾部は傾斜上側に移動し、浮き袋周辺部は傾斜下側に移動する。浮き袋の密度は、その他の部位の密度より圧倒的に小さいので、重心（重心の作用点）と浮心（浮力の作用点）の位置がズれる。これにより重力と浮力の作用する軸にずれが生じ、姿勢を立て直す方向に力のモーメントが働くことから、元の姿勢に戻るといモデルを考案した（図2）。

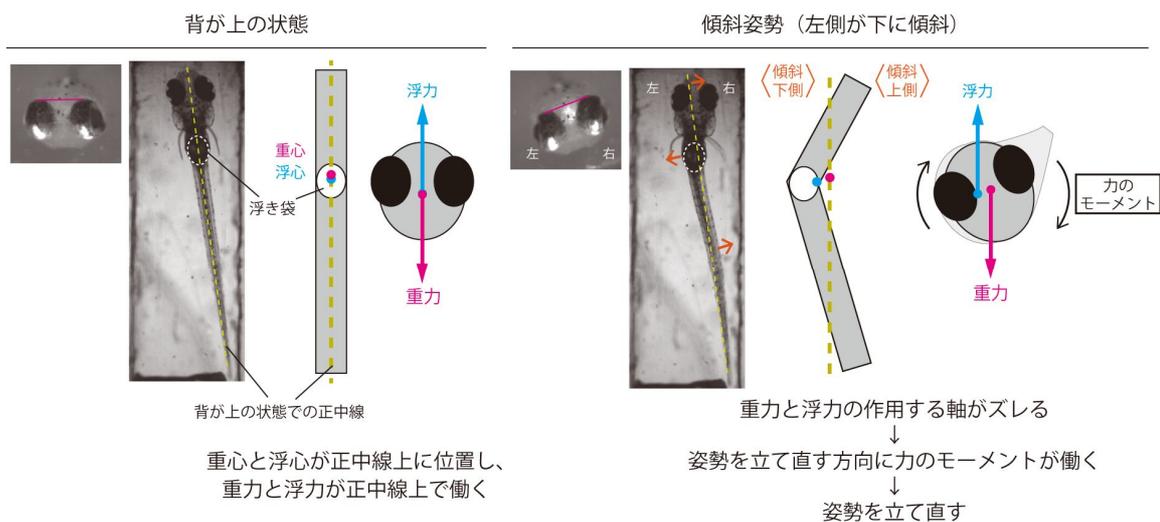


図2 胴体屈曲による姿勢立て直しのモデル

左：背が上の状態でのスナップショットと魚の模式図。この状態では重心と浮心が魚の正中線上に位置し、重力と浮力が正中線上で働き平衡を保つ。

右：傾斜姿勢時のスナップショットと魚の模式図。胴体屈曲により、頭部と尾部は傾斜上側に移動し、浮き袋周辺部は傾斜下側に移動するので、重心と浮心がズれる。これにより重力と浮力の作用する軸がズレ、姿勢を立て直す方向に力のモーメントが働く。

もしこのモデルが正しければ、浮き袋がない魚では、体の密度がほぼ均一になるので、傾斜時に胴体を屈曲させても重心と浮心の位置はズレない。そして、浮力と重力が同じ軸上で働くので、

力のモーメントは発生しないことから、姿勢を立て直すことができないと推測した（図3左）。

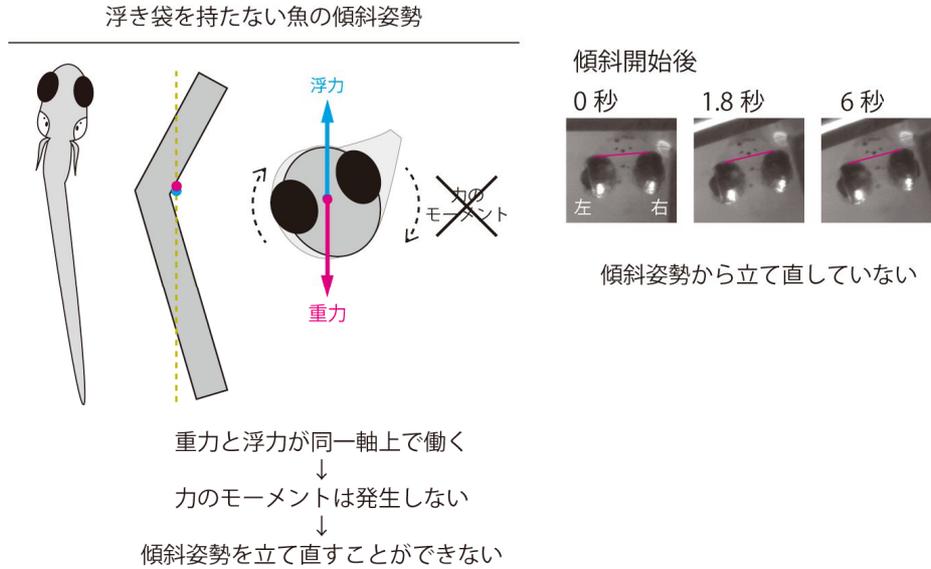


図3 モデルの検証

左：浮き袋を持たない魚の傾斜姿勢の模式図。図2のモデルが正しければ、傾斜時、胴体を屈曲しても重心と浮心の位置はズレない。これにより重力と浮力は同じ軸上で働くので力のモーメントが発生せず、傾斜姿勢から立て直すことができない。

右：浮き袋内の気体を抜いた魚のスナップショット。傾斜刺激を与えても傾斜姿勢のままであることから、図2のモデルが正しいことが強く示唆された。

次に、胴体の屈曲に関わる筋肉や神経回路を探索した。最近我々は、傾斜中に神経活動を計測することが可能な「対物レンズ傾斜顕微鏡」の開発に成功していた。この顕微鏡を使って傾斜中の細胞群の活動を活動イメージング（カルシウムイメージング）により調べた。さらに活動が観察された細胞群を破壊したときの胴体の屈曲度合いを調べることで、胴体の屈曲に必要な細胞群の特定に成功した。図4では、例としてnMLFに存在する網様体脊髄路ニューロン（運動に関わり脊髄に情報を伝達する中枢のニューロン）のカルシウムイメージングの結果を示す。

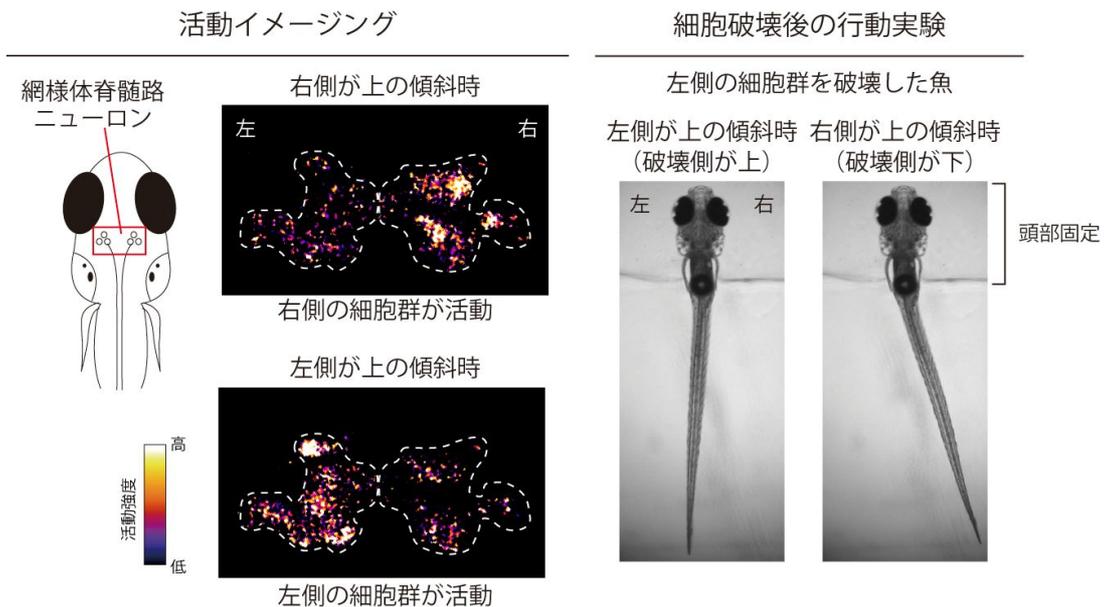


図4 nMLFに存在する網様体脊髄路ニューロンのカルシウムイメージングと細胞破壊実験

左：右側が上の傾斜時では右側の細胞群が活動し、左側が上の傾斜時では左側の細胞群が活動した。

右：左側の細胞群を破壊した魚を傾斜させると、左側が上の傾斜時の左側への屈曲角度が減少した。この結果は網様体脊髄路ニューロンが同側への胴体の屈曲に必要であることを示す。

複数の細胞群に対し、カルシウムイメージングと細胞破壊魚の行動実験を行うことで、胴体の屈曲は、『前庭神経核ニューロン（耳から傾斜情報を直接受け取るニューロン群） nMLF に存在する網様体脊髄路ニューロン（運動に関わり脊髄に情報を伝達する中枢のニューロン群）、脊髄運動ニューロン、浮き袋の脇に位置する筋肉』という神経回路と筋肉で駆動されることが明らかとなった（図5）。

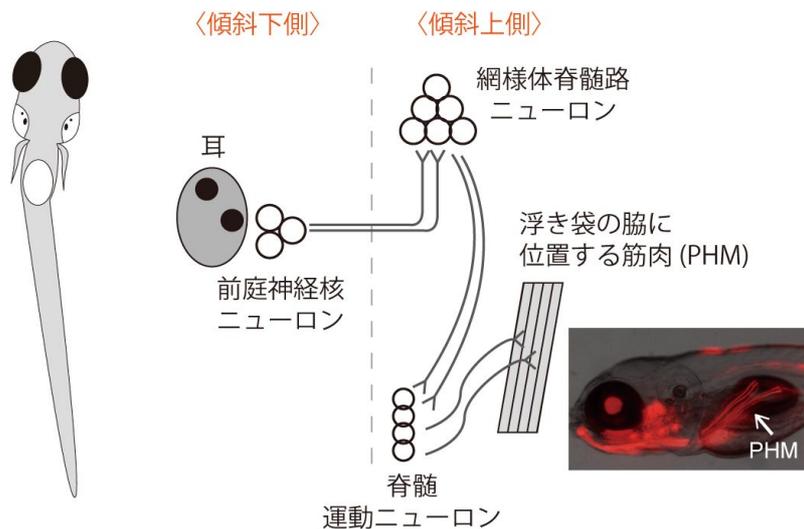


図5 胴体の屈曲に関わる神経回路

すなわち、本研究により、ロール方向の傾斜を正す際に用いられる、魚の姿勢制御神経回路の全貌が明らかとなった。

【今後の展望】

本研究により、魚はわずかに傾斜した際に、胴体屈曲による微細な姿勢制御機構を行うこと、そしてその神経回路が初めて明らかになった。この成果は魚の生理学を理解する上で重要な知見である。

前庭神経核ニューロンから網様体脊髄路ニューロンを介して脊髄運動ニューロンへ至る神経回路は哺乳類にも存在する。この神経回路は哺乳類においても姿勢制御に重要であることが近年指摘されてきていたが、本研究により、ゼブラフィッシュ仔魚においてもこの神経回路が非常に重要であることがはっきりと示された。したがって、この神経回路の重要性が脊椎動物で共通していることが示唆され、今回明らかとなったゼブラフィッシュでの神経回路の知見が、哺乳類における微細な姿勢制御に関わる神経回路のより詳細な解明に役立つことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sugioka, T., Tanimoto, M., and Higashijima, S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Biomechanics and neural circuits for vestibular-induced fine postural control in larval zebrafish.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-36682-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanimoto, M., Watakabe, I., and Higashijima, S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Tilttable objective microscope visualizes selectivity for head motion direction and dynamics in zebrafish vestibular system.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-35190-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawano, K., Kato, K., Sugioka, T., Kimura, Y., Tanimoto, M., and Higashijima, S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Long descending commissural V0v neurons ensure coordinated swimming movements along the body axis in larval zebrafish.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-08283-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki, D., Wada, H., and Higashijima, S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Generation of knock-in lampreys by CRISPR-Cas9-mediated genome engineering.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-99338-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uemura, Y., Kato, K., Kawakami, K., Kimura, Y., Oda, Y. and Higashijima, S.	4. 巻 40
2. 論文標題 Neuronal circuits that control rhythmic pectoral fin movements in zebrafish.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6678-6690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1484-20.2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	郷 康広 (Go Yasuhiro) (50377123)	大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・特任准教授) (82675)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------