

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：82675

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06897

研究課題名(和文)速度依存的移動運動パターン変化を制御する後脳・脊髄神経回路の小型魚類を用いた解明

研究課題名(英文) Analysis of the hindbrain and spinal circuits controlling the speed-dependent change of locomotor patterns using small fish

研究代表者

木村 有希子 (Kimura, Yukiko)

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・助教)

研究者番号：70581122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：速度依存的に変化する運動を制御する脊髄神経回路の動作原理の解明を目的に、実験操作が容易なゼブラフィッシュ仔魚を用いて、速度特異的な運動生成に関わる複数種の脊髄ニューロンが様々な速度の運動で受ける入力を調べた。その結果、速度依存的なニューロン活動パターンの変化制御には、速度依存的な興奮性入力と抑制性入力の変化が重要であるが、入力変化パターンとその調節機構は細胞の種類毎に異なることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、速度依存的な運動を制御する脊髄神経回路の理解を進展させたことである。ゼブラフィッシュ仔魚の小型で単純な神経回路を遺伝学的解析と電気生理学的解析を組み合わせることで、哺乳類など大型の脊椎動物では容易ではない解析を行えた。また社会的意義として、本研究による脊髄の運動系神経回路の動作原理の解明は、脊椎・脊髄疾患の理解や治療法の開発に将来的につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify how spinal circuits control the change of locomotor patterns depending on speed by using zebrafish larvae. In order to clear the mechanism, revealing the speed-dependent change of synaptic inputs is critical. In this study, recordings of the synaptic inputs received by different types of spinal neurons showing speed-dependent firing patterns revealed that the balance of excitatory and inhibitory inputs changed depending on swimming speed. The changing patterns of synaptic inputs and the mechanisms regulating them were variables between cell types.

研究分野：神経科学

キーワード：ゼブラフィッシュ 遊泳運動

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の移動運動は様々な速度で行われる。その際、速度に応じて動きのパターンを変化させる動物は多い。例えば、ウマは移動速度の増加に伴って、ウォーク、トロット、ギャロップと足の運び方のパターンを変える。移動運動の速度を制御する高次中枢としては、中脳歩行誘発野が知られているが、このような歩容の切り替えが高次中枢下流の神経系によってどのように制御されているのか、具体的な回路構成はほとんど分かっていない。脊椎動物の移動運動の基本的なパターンを作り出す神経回路(CPG, central pattern generator)は、脊髄に存在すると考えられている。従来、CPGの作動メカニズムの解明はCPGを構成するニューロンが多種多様であることから困難であった。しかし、近年、発生初期に発現する転写因子をマーカーとして、脊髄ニューロンの種類を同定することが可能になり、各ニューロンが担う機能が分かってきた。マウスでは、特定の種類の脊髄介在ニューロンを遺伝学的に除去すると、特定の速度での歩容が変化することが知られている。また、ゼブラフィッシュの運動ニューロン、及びある種の脊髄介在ニューロンには、高速遊泳のみで発火する細胞群と低速遊泳のみで発火するニューロン群が存在する。これらの結果から、脊髄のCPGには複数のモジュールがあり、異なるスピードにおける運動パターンは、異なる脊髄のマイクロサーキットに制御されているという仮説もある。しかし、特定の速度で、選択的に特定のマイクロサーキットが活動するメカニズムの詳細は分かっていない。このメカニズムの解明には、まず、特定の速度で特定の種類の脊髄ニューロンが選択的に活動するメカニズムを知る必要があるが、その具体的なメカニズムも不明な部分が多かった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、特定の速度で、特定の運動パターンを制御する脊髄のマイクロサーキットが選択的に活動する神経回路機構を明らかにすることである。そのために、ゼブラフィッシュ仔魚を用いて、特定の運動パターン生成に重要な脊髄ニューロンが速度依存的な発火パターンを示すために、どのような入力を受けているかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

近年、遺伝学的な解析のしやすいマウスを用いて、特定の種類の脊髄ニューロン集団を除去することで、それらが特定の速度での歩容生成に必要であることが示されている。しかし、巨大で複雑な神経回路を持つ哺乳類では、様々な速度の運動をさせながら、特定の脊髄ニューロンから電位固定記録をすることは容易ではない。そのため、実際の運動の中で、特定の歩容の生成に必要なニューロンが、どの種類のニューロンからどのようなタイミングと強さで速度依存的な入力を受けているかを簡単には調べることができない。これが、速度依存的な活動を作り出す実際のネットワーク構成の研究が遅れている理由である。ゼブラフィッシュ仔魚は全長約4 mmと小型で、単純な神経系を持つため、電気生理学的解析が比較的容易である。さらに、遺伝学的操作がしやすいという特徴もある。本研究では、ゼブラフィッシュ仔魚の上記の利点を活かして、遺伝学的解析と電気生理学的解析を組み合わせ、特定の運動パターン生成に重要な脊髄ニューロンが速度依存的な発火パターンを示すために、どこからどのような入力を受けているかを明らかにする研究を行った。速度依存的な発火パターンを示すニューロンとして、後述の複数ニューロンを解析対象とした。

4. 研究成果

(1) 体幹筋肉に投射する運動ニューロンの速度依存的な発火パターンの制御メカニズムの解明
ゼブラフィッシュ仔魚の遊泳運動において体幹の筋肉に投射する運動ニューロンとその上流の脊髄介在ニューロンの中には速度依存的な発火をするニューロンがあることが知られていた。これらのニューロンの中には、高速遊泳時のみに発火するものや低速遊泳時のみに発火するものなどがある。本研究では、低速遊泳時に発火する運動ニューロンが、高速遊泳で発火しないメカニズムを調べた。従来の研究から、低速遊泳時に発火する運動ニューロンは、高速遊泳時に強い抑制性入力を受けていることが明らかになっていた。以上の背景から、この抑制性入力に低速遊泳発火型の運動ニューロンの速度依存的な発火パターンを作るために必要であることが予想された。さらにこの抑制性入力のタイミングと従来の報告や予備的実験により得られている様々な脊髄ニューロンの発火タイミングを比較すると、この抑制性入力に脊髄V1ニューロンに由来することが期待された。

この仮説を証明するため、転写因子En1を発現する脊髄V1ニューロンを遺伝学的に除去した魚を作製し、初期の仔魚(受精後3日目)で電気生理学的な解析を行った。その結果、高速遊泳が起こる状況で低速遊泳発火型の運動ニューロンが受ける抑制性入力が増加し、興奮性入力は増加した。その結果、低速遊泳発火型の運動ニューロンが、高速遊泳が起こる状況でも活動するようになった。また、低速遊泳で発火するV2aニューロン(運動ニューロン上流の興奮性ニューロンの一種)もV1ニューロンの除去により、高速遊泳が起こる状況で活動するようになった。これが、低速発火型運動ニューロンが受ける興奮性入力の増加の理由のひとつであると考えられ

る。以上の結果から、脊髄 V1 ニューロンは低速遊泳発火型の運動ニューロンの活動を高速遊泳時に直接及び間接的に抑制し、停止させる働きを持つことを明らかにした。なお、低速遊泳発火型の運動ニューロンは遅筋に投射する。野生型の仔魚は高速遊泳時に主に速筋を使って遊泳し、遅筋の活動は減少する。一方、V1 ニューロンを除去した仔魚では、高速遊泳が起こる状況で速筋と遅筋が同時に強い活動を示すようになった。脊髄 V1 ニューロンは、高速遊泳時に低速発火型運動ニューロンの活動を抑えて、結果として遅筋の活動を低下させ、スムーズな高速遊泳を可能にする働きを持つことが期待される。この研究によって、速度依存的な速筋と遅筋の切り替えメカニズムの神経基盤も明らかになった。

なお、哺乳類にも V1 ニューロンは存在し、高速歩行のリズム形成に必要なニューロンであることが知られている。本研究での V1 ニューロンを除去した魚の解析からも、ゼブラフィッシュ仔魚の V1 ニューロンは(おそらく、高速発火型のニューロンに結合し、)遊泳周波数を増加させるために必要なニューロンであることを上記とは別に示している。一方、V1 ニューロンが、低速運動発火型のニューロンの高速運動での発火抑制を担っているとの報告は、本研究による初めて明らかにされた概念である。哺乳類でも同様の働きをする可能性があり、将来の研究が期待される。本研究成果は論文に発表した (Kimura and Higashijima, 2019)。

(2) 仔魚後期の低速遊泳で活動する興奮性脊髄介在ニューロンの役割と発火パターン制御メカニズムの解析

ゼブラフィッシュ仔魚の遊泳パターンは、発生が進むにつれて変化する。ゼブラフィッシュ仔魚の後期(受精後 4 日目以降)の遊泳では、高速遊泳に比べて、低速遊泳で頭部が進行方向に安定した泳ぎを示すようになり、速度の違いによる運動パターンの違いがより明瞭化する。仔魚後期の低速遊泳で重要な役割を果たしていると考えられていたニューロンの一つに MCoD と呼ばれる脊髄介在ニューロンがある。MCoD は転写因子 *Evx2* を発現する興奮性 V0 ニューロンのサブタイプの中で、比較的後期に誕生する興奮性ニューロンである。MCoD は、受精後 4 日目以降の低速遊泳で主に発火することが知られていた。このニューロンの速度依存発火パターンを作り出すメカニズムを調べるために MCoD が受ける入力を電位固定法で調べた。その結果、興奮性入力は高速遊泳より低速遊泳で強いが、抑制性入力は高速遊泳と低速遊泳で大きく変わらないことが分かった。本研究で調べた入力パターンから、MCoD の高速遊泳時の発火率低下のメカニズムは、高速遊泳時の興奮性入力が比較的小さいこと、各遊泳周期で抑制性入力と興奮性入力を受けるタイミングの差が高速遊泳と低速遊泳で異なることなどが考えられる。MCoD のシナプス前ニューロンを同定するために、主要な抑制性脊髄介在ニューロンのいくつかを除去する実験を行ったが、本研究の期限内に、MCoD の発火パターンを作り出している抑制性入力のソースとなる介在ニューロンを見つけることができなかった。興奮性入力に関しては、一部が後脳の脊髄投射ニューロンから来ることは報告されているが、脊髄を切り離した実験を行い、脊髄からのリズムミミックな入力もあることを確認した。MCoD の速度依存発火パターンを決めるメカニズムを完全に理解するためには、将来、本研究で確認した介在ニューロン以外の MCoD への結合検討を行い、興奮性及び抑制性入力のソースを明らかにする必要がある。なお、本研究において、(1)で示した低速発火型運動ニューロンの高速遊泳での発火を抑制する V1 ニューロンを除去しても、高速遊泳が起こる状況での抑制性入力の減少は見られず、MCoD が活動するようになることはないことが分かった。この結果から、MCoD の低速遊泳選択的な発火パターンの制御メカニズムは、低速発火型の運動ニューロンや V2a ニューロンとは異なることが明らかになった。

また、本研究の目的とは異なるが、本研究で得られた MCoD の電気生理学的記録は MCoD の低速遊泳における役割を明らかにする研究にも活用した。この研究では、MCoD が低速遊泳時に頭部が揺れないように筋肉の活動を体幹の対角線上(前方の左と後方の右など)で協調させる働きを持つことを明らかにした。この研究成果は論文発表した (Kawano, 2022)。

(3) 胸びれ運動を制御する運動ニューロンの高速遊泳時の発火制御のメカニズムの解析

ゼブラフィッシュ仔魚は低速遊泳では左右の胸びれを交互に動かすが、高速遊泳では胸びれを閉じる。高速遊泳時に胸びれが閉じる運動は、胸びれの外転筋を制御する運動ニューロンが活動せず、内転筋を制御する運動ニューロンが活動することで生じている。これらの運動ニューロンの速度依存発火パターンを制御するメカニズムを調べるために、2 種類の胸びれ運動ニューロンが受ける入力を電位固定法で調べた。その結果、外転筋運動ニューロンは高速遊泳時に低速遊泳時に比べて強い抑制性入力を受ける傾向があるが、内転筋運動ニューロンが高速遊泳時に受ける抑制性入力は弱い傾向があった。現在、複数種類の抑制性ニューロンを除去した魚で、外転筋運動ニューロンが高速遊泳時に受ける抑制性入力のソースを調べている。胸びれ運動ニューロンの研究に関しては、研究期間内に十分な例数を集めきれていない。今後、研究を継続し、統計的に有意なデータを集める予定である。

以上(1)~(3)の研究成果から、遊泳運動や胸びれ運動を制御するニューロンの中で、速度変化に伴い活動パターンの変わる複数種類のニューロンについて、どのような入力パターンが速度変化依存的な活動パターンを作り出しているかを調べた。その結果、速度依存的な活動パターンの変化制御には、速度依存的な興奮性入力と抑制性入力の変化が重要であると考えられるが、それを作り出すメカニズムは細胞のタイプ毎に異なることが明らかになった。また、脊髄 V1 ニュー

ーロンが複数種類のニューロンにおいて速度依存的なニューロンの発火に重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの成果は、特定の速度で、特定の運動パターンを制御する脊髄のマイクロサーキットが選択的に活動する神経回路機構の一端を明らかにした。

脊髄回路における速度依存的なニューロンの発火メカニズム制御について、詳細に調べた研究は国内外で数少なく、本研究は運動系神経回路の作動機構解析分野の進展に大きく寄与した。しかし、速度依存的な脊髄ニューロンの発火メカニズムについては、本研究では調べ切れなかった部分も数多く、本研究を土台に今後の研究を更に進める必要がある。また、本研究で用いた転写因子の発現パターンは脊椎動物間で保存されており、ゼブラフィッシュで得られた成果は哺乳類の相同ニューロンとの比較が容易である。本研究は、速度変化に伴う移動運動パターン変化を制御する哺乳類の神経機構の解明を目指す解析の糸口となることも期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Uemura Yuto, Kato Kagayaki, Kawakami Koichi, Kimura Yukiko, Oda Yoichi, Higashijima Shin-ichi	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 The 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 -
1. 著者名 Kimura Yukiko, Higashijima Shin-ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulation of locomotor speed and selection of active sets of neurons by V1 neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09871-x	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 Satou Chie, Sugioka Takumi, Uemura Yuto, Shimazaki Takashi, Zmarz Pawel, Kimura Yukiko, Higashijima Shin-ichi	4. 巻 30
2. 論文標題 Functional Diversity of Glycinergic Commissural Inhibitory Neurons in Larval Zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3036 ~ 3050.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.02.015	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 該当する
1. 著者名 Callahan Rebecca A, Roberts Richard, Sengupta Mohini, Kimura Yukiko, Higashijima Shin-ichi, Bagnall Martha W	4. 巻 8
2. 論文標題 Spinal V2b neurons reveal a role for ipsilateral inhibition in speed control	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e47837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.47837	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 該当する

1. 著者名 Kawano Kohei, Kato Kagayaki, Sugioka Takumi, Kimura Yukiko, Tanimoto Masashi, Higashijima Shin-ichi	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------