

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06866

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュ仔魚をモデルとした左右の前庭入力を統合演算する脳幹回路の研究

研究課題名（英文）Research on brainstem circuits that integrate binaural vestibular inputs in larval zebrafish as a model system

研究代表者

谷本 昌志 (Tanimoto, Masashi)

基礎生物学研究所・神経行動学研究部門・助教

研究者番号：30608716

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）：本研究では、頭部の静的傾斜や振動刺激中に単一細胞レベルでニューロン群の活動イメージングすることが可能な顕微鏡を構築し、ゼブラフィッシュ仔魚の神経細胞群の活動をCa²⁺イメージングで計測して個々の神経細胞の方向選択性を明らかにした。また、ロール方向の静的傾斜に対して仔魚が胴体吻側部を屈曲させることを見出し、この行動によって背側を上向きに保持する姿勢保持運動の生物力学メカニズムおよび神経回路を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築した頭部の加速度刺激時の神経活動を可視化できる顕微鏡システムは、平衡感覚や運動制御の基礎的理解に貢献する。また、得られた知見は脊椎動物の姿勢制御の神経回路についての基礎的知見を生みだした。本研究成果は、水中での微細な姿勢制御法として機械制御などの技術応用にもつながる基礎知見を提供するほか、平衡障害の病態解明や乗り物酔いなどの症状発症メカニズムの解明、治療法開発など福祉・医療分野の発展につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we constructed a microscope that is capable of imaging the activity of neuronal populations at the single-cell level during static head tilts and vibration stimuli. We measured the activity of neural cell populations in zebrafish larvae by Ca²⁺ imaging and elucidated the direction selectivity of individual neurons. We also found that the larvae exhibit rostral trunk bending in response to static roll tilt, and clarified the biomechanics and neural circuitry underlying this postural control behavior that maintains an upward dorsal orientation.

研究分野：神経科学

キーワード：前庭 内耳 耳石器官 前庭神経核 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

身体の平衡や運動中の視線保持、能動/受動的な動きの識別、正確な方向の知覚や空間学習・記憶のためには、外環境に対する自身の態勢・位置をモニターする必要がある。これらの神経情報処理基盤のひとつである前庭感覚情報は、内耳の前庭器官〔回転加速度は三半規管、頭部の傾きや直線加速度は耳石器官（卵形嚢と球形嚢）〕で受容され、脳幹の前庭神経核を経て外眼運動系や脊髄へ出力して前庭眼反射・頸脊髄反射を生み出し、また視覚や体性感覚など他の感覚情報と統合される。脊椎動物の耳石器官（卵形嚢、球形嚢）には、感覚毛の配向によって規定される方向選好性の異なる有毛細胞が多数存在し、分水嶺(Striola)付近を境界として方向選好性が逆向きになっており、1つの器官内に様々な向きの方角選好性の有毛細胞集団が存在する(Inoue et al., Sci. Rep., 2013)。耳石器官からの前庭入力の神経情報処理機構は主に電気生理学的に解析されてきた(Goldberg et al., J. Neurophysiol., 1990)。しかし、膨大な数の神経細胞から構成される神経回路の解析は容易ではなく、遺伝子発現によって規定される神経細胞の種類や性質と情報処理機能、神経回路構成の系統的な理解には至っていない。脊椎動物のモデルとして研究に用いられるゼブラフィッシュは多数の遺伝子組換え体が可能で、受精後5日ごろ（体長わずか4mm程度）の仔魚は頭部や体が透明なため特定の種類の神経細胞を可視化し生体内観察することが容易である。この発達時期の仔魚の三半規管は未成熟であり、耳石器官（主に卵形嚢）によって背側を上に向ける直立姿勢を保持する(Riley and Moorman, J. Neurobiol., 2000)。これまでに前庭動眼反射の神経回路(Bianco et al., Curr. Biol., 2012)や、全脳領域の神経細胞における前庭情報処理の系統的な機能解析が行われてきた(Favre-Bulle et al., Curr. Biol., 2018; Migault et al., Curr. Biol., 2018)。一方、実験装置の制約により、任意の角度の傾斜刺激中の神経活動をイメージングすることは困難であった。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュ仔魚を対象として、前庭神経回路構成ニューロンが、どの耳石器官の、どの方向選好性を持つ有毛細胞群に由来する入力を受け、どのような神経回路を構成して機能を発現するのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

傾斜や振動刺激中にイメージングが可能な新規顕微鏡を構築し、Ca²⁺イメージングで神経細胞の活動を計測して個々の神経細胞がどの方向選好性を示すのかを調べた。傾斜中の仔魚の行動も記録・解析し、耳石器官からの前庭入力がどのような神経回路によって姿勢制御行動を生み出すのかを調べた。

4. 研究成果

まず、傾斜や振動などの前庭感覚刺激を与えながらニューロン群の活動を1細胞レベルで観察するために、対物レンズ、電動回転ステージ、共焦点スキャナ、デジタルカメラやその他の光学部品を組み合わせた独自のカスタム顕微鏡、「対物レンズ傾斜顕微鏡」を構築した(図1)。頭部を傾けたり振動させた際の細胞活動をカルシウムイメージング（細胞内カルシウムイオン濃度の増減を光学的に測定）によって可視化し定量化した。有毛細胞や神経細胞に発現させたカルシウム指示緑色蛍光タンパク質(jGCaMP7f)および赤色蛍光タンパク質(tdTomato)の

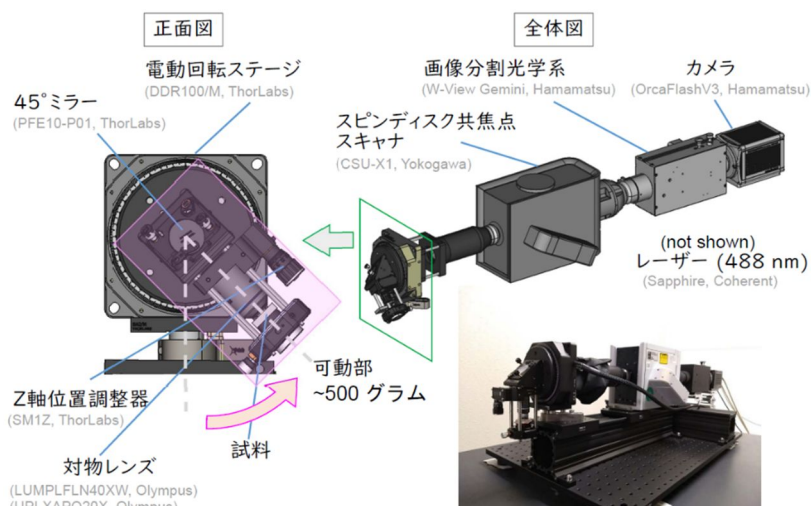


図1 対物レンズ傾斜顕微鏡

の蛍光を画像分割光学系を用いて緑色/赤色蛍光画像を同時取得し、蛍光強度比を算出することで励起光の不均一分布や傾斜に伴う光学系の歪みによって生じる人工的な蛍光強度変化（アーティファクト）の影響を低減させた。この顕微鏡は既存の顕微鏡と比較して、360度任意の角度の静的傾斜刺激や振動刺激を与えられる点で優れており、今後の前庭感覚研究に貢献すると期待される(Tanimoto et al., Nat. Commun., 2022)。

構築した顕微鏡を用いて、ロール(左右)方向、ピッチ(前後/吻尾)方向の頭部傾斜および振動刺激に対する細胞の活動動態および個々の細胞の機能的差異を生体内で可視化することに成功した。また、ロール方向のわずかな傾斜時の前庭入力によって微細に胴体屈曲を制御し、直立姿勢を回復する姿勢保持行動の生物力学・神経回路機構を明らかにした。受精後 5-6 日のゼブラフィッシュ仔魚において以下のことが明らかになった。

(1) 耳石器官(卵形囊)の有毛細胞

ロール、ピッチ方向の静的傾斜刺激に対して、有毛細胞は耳石器官内の場所(分水嶺および分水嶺外)ごとに異なる応答性を示し、静的傾斜刺激に対しては分水嶺外の有毛細胞がより大きな応答を示し、振動刺激に対しては分水嶺の有毛細胞がより大きな応答を示した(図2、Tanimoto et al., Nat. Commun., 2022)。応答の方向選好性は形態学的に調べられていた感覚毛の極性(Inoue et al., Sci. Rep., 2013)と合致していた。

(2) 前庭神経節ニューロン

カルシウムイメージングの結果、ロール方向の静的傾斜刺激時に下側の前庭神経節ニューロンの一部で活動が見られ、傾斜時上側のニューロンでは顕著な活動は観察されなかった。ピッチ方向の静的傾斜刺激に対しては、Nose down に応答するニューロン群が吻側に見られ、Nose up に応答するニューロン群が尾側に見られ、細胞体の存在場所に応じて異なる方向の傾斜情報をコードし脳幹へ伝達することが明らかになった。また、振動刺激に応答するニューロンも少数ながら見られた(Tanimoto et al., Nat. Commun., 2022)。これらの結果は同時期に報告された形態学的解析(Liu et al., Nat. Commun., 2022)の結果とよく合致しており、電気生理学的に推定された前庭神経節ニューロンの方向選好性とも概ね合致していた(Liu et al., Neuron, 2020)。本研究結果はこれらの異なる研究アプローチに基づく研究報告と相補的であり、形態データには表れない神経活動動態を明らかにした点や全ての前庭神経節ニューロンの活動を解析した点で意義のある成果である。

(3) Tangential nucleus(TAN)ニューロン

前庭神経核のひとつである Tangential nucleus(TAN)の多くのニューロンに転写因子 *evx2* が発現していることを見出し、それらの多くがグルタミン酸作動性ニューロンであることや形態学的に反対側の動眼・滑車神経核および内側縦束核(nucleus of the medial longitudinal fascicles, nMLF)へ軸索を投射するニューロンを含むことが明らかになった。また、TAN ニューロンの少なくとも一部は *hoxb3a* 陽性かつグルタミン酸作動性(*vglut2a* 陽性)のニューロンの中に含まれる可能性が示唆された。さらに、前庭神経節ニューロンの応答と同様に、ロール方向の静的傾斜刺激に対して、傾斜時下側の TAN ニューロン群で活動が見られ、傾斜時上側では顕著な活動は観察されなかった(図3、Sugioka et al., Nat. Commun., 2023)。

(4) 内側縦束核(nMLF)ニューロン

TAN ニューロンの一部の交連性軸索が nMLF を含む神経核へ投射することと合致して、ロール方向の静的傾斜刺激に対して傾斜時上側の nMLF ニューロン群の一部で活動が見られた。左右片側の nMLF ニューロン群を光遺伝学的に活性化すると、仔魚は同側の胴体吻側腹側部に位置する posterior hypaxial muscle (PHM) という筋を収縮させて屈曲することが報告されていた(Thiele et al., Neuron, 2014)ため、TAN ニューロンから nMLF ニューロンを経由する神経回路がロール方向の静的傾斜刺激に対する行動(図3および下記参照)を駆動することが示唆された。

(5) ロール方向の傾斜に対する直立姿勢保持行動
仔魚はロール方向の静的傾斜刺激に対して、傾斜時に上側になる体側面の胴体吻側部を屈曲させることを発見し、この屈曲に伴って傾斜姿勢から直立姿勢へ回復することが明らかになった(図3)。この行動はロール方向の静的傾斜刺激時に必ず観察され、暗黒中でも起こることから前庭入力によって起こる姿勢制御反射と考えられ、vestibular-induced bend reflex (VBR) と呼称することにした。魚に作用する力に関して単純化した力学モデルを考

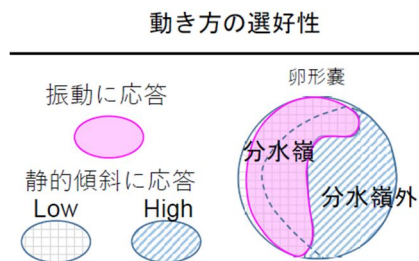


図2 耳石器官(卵形囊)の有毛細胞の応答選好性

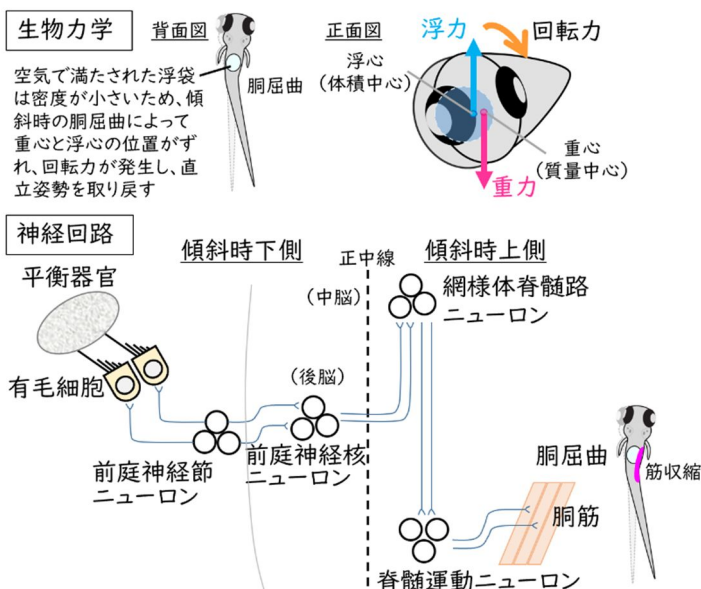


図3. ロール方向の微細な姿勢制御行動の生物力学と神経回路

案し、気体で満たされた浮袋の密度が極めて小さいために、VBR によって浮力と重力の作用軸がズレることによって体の回転が生じ、傾斜した姿勢から直立姿勢へ回復するという仮説を立てた(図3)。もし仮に浮袋が無ければ、VBR によって浮力と重力の作用軸は同一直線状に位置し続けるため、体の回転は生じずに傾斜姿勢から回復できないと予想された。予想通り、浮袋の気体を取り除いた仔魚は、静的傾斜刺激に対して VBR をし続けたが、傾斜姿勢から回復することはできなくなり、仮説を支持する結果が得られた。さらに、TAN, nMLF, PHM を介する経路が VBR を駆動する神経回路および筋であることを、カルシウムイメージングや細胞破壊実験、光遺伝学的活動操作によって明らかにした(図3、Sugioka et al., Nat. Commun., 2023)。本研究は、姿勢制御行動の神経回路を感覚系から運動系・筋まで細胞レベルで明らかにした点で画期的である。また、前庭脊髄路ニューロンを介して直接脊髄運動系へ出力する経路ではなく、網様体脊髄路ニューロン群(nMLFニューロンが含まれる)を介して間接的に脊髄運動系へ出力する経路が静的傾斜時の姿勢制御において重要な役割を担うことを示した点で意義があると考えられる。以上、本研究で構築した新たな実験系によって細胞レベルの活動イメージングから個体の行動まで定量解析が可能となり、今後ゼブラフィッシュ仔魚をモデルとして前庭情報処理の神経回路を詳細に明らかにすることへ繋がると期待される。

<引用文献>

- Inoue, M., Tanimoto, M. & Oda, Y. The role of ear stone size in hair cell acoustic sensory transduction. *Sci. Rep.* 3, 2114, 2013.
- ② Goldberg, J. M., Desmadryl, G., Baird, R. A. & Fernandez, C. The vestibular nerve of the chinchilla. V. Relation between afferent discharge properties and peripheral innervation patterns in the utricular macula. *J. Neurophysiol.* 63, 791–804, 1990.
- Riley BB, Moorman SJ. Development of utricular otoliths, but not saccular otoliths, is necessary for vestibular function and survival in zebrafish. *J. Neurobiol.* 43, 329–37, 2000.
- Bianco IH, Ma LH, Schoppik D, Robson DN, Orger MB, Beck JC, Li JM, Schier AF, Engert F, Baker R. The tangential nucleus controls a gravito-inertial vestibulo-ocular reflex. *Curr. Biol.* 22, 1285–95, 2012.
- Favre-Bulle IA, Vanwallegheem G, Taylor MA, Rubinsztein-Dunlop H, Scott EK. Cellular-Resolution Imaging of Vestibular Processing across the Larval Zebrafish Brain. *Curr. Biol.* 28,3711–3722, 2018.
- Migault G, van der Plas TL, Trentesaux H, Panier T, Candelier R, Proville R, Englitz B, Debrégeas G, Bormuth V. Whole-Brain Calcium Imaging during Physiological Vestibular Stimulation in Larval Zebrafish. *Curr. Biol.* 28, 3723–3735, 2018.
- Tanimoto, M., Watakabe, I. & Higashijima, S. Tilttable objective microscope visualizes selectivity for head motion direction and dynamics in zebrafish vestibular system. *Nat. Commun.* 13, 7622, 2022.
- Liu Z, Hildebrand DGC, Morgan JL, Jia Y, Slimmon N, Bagnall MW. Organization of the gravity-sensing system in zebrafish. *Nat Commun.* 13, 5060, 2022.
- Liu Z, Kimura Y, Higashijima SI, Hildebrand DGC, Morgan JL, Bagnall MW. Central Vestibular Tuning Arises from Patterned Convergence of Otolith Afferents. *Neuron* 108, 748–762, 2020.
- Sugioka, T., Tanimoto, M. & Higashijima, S. Biomechanics and neural circuits for vestibular-induced fine postural control in larval zebrafish. *Nat. Commun.* 14, 1217 2023.
- Thiele TR, Donovan JC, Baier H. Descending control of swim posture by a midbrain nucleus in zebrafish. *Neuron.* 83, 679–91, 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanimoto Masashi、Watakabe Ikuko、Higashijima Shin-ichi	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 Sugioka Takumi、Tanimoto Masashi、Higashijima Shin-ichi	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 谷本昌志
2. 発表標題 小さな魚の生体イメージングから探る脊椎動物の内耳感覚受容機構
3. 学会等名 鶴舞耳鼻科会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 谷本昌志
2. 発表標題 脊椎動物の内耳感覚受容・姿勢制御機構をゼブラフィッシュ仔魚の生体イメージングから探る
3. 学会等名 第598回日本動物学会北海道支部講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masashi Tanimoto, Takumi Sugioka, Ikuko Watakabe, Shin-ichi Higashijima
2. 発表標題 Tilttable objective microscope elucidates sensory transduction of head movement and neural/behavioral mechanisms for a fine postural control in larval zebrafish
3. 学会等名 Imaging Structure and Function of the Zebrafish Brain Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takumi Sugioka, Masashi Tanimoto, Shin-ichi Higashijima
2. 発表標題 Kinetics and neural circuit mechanisms of a fine postural control in larval zebrafish
3. 学会等名 Neuro2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masashi Tanimoto, Ikuko Watakabe, Shin-ichi Higashijima
2. 発表標題 Striolar and extrastriolar utricular hair cells preferentially transduce head vibration and static tilt respectively
3. 学会等名 Neuro2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷本昌志
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ仔魚を用いた前庭神経回路のイメージング解析
3. 学会等名 JST CREST「空間識の幾何による重力覚解明と感覚拡張世界創出」第1回 シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masashi Tanimoto, Shin-ichi Higashijima
2. 発表標題 In vivo Ca ²⁺ imaging during head movement with a Tilttable Objective Microscope visualizes topographic organization of response selectivity for stimulus direction and modality in the vestibular periphery
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷本昌志, 東島眞一
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた脊椎動物の姿勢制御メカニズムの機能イメージング解析
3. 学会等名 第3回 ExCELLSシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>対物レンズ傾斜顕微鏡によって頭部の傾斜・運動中の神経活動の可視化に成功 https://www.nibb.ac.jp/press/2022/12/21.html 魚の微細な姿勢制御メカニズムとその神経回路が明らかに https://www.nibb.ac.jp/press/2023/03/10.html</p>
--

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