

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15906

研究課題名（和文）視覚刺激応答細胞の標識と1細胞RNA-seqによる前視蓋神経回路の形態・機能解析

研究課題名（英文）Morphological and functional analysis of pretectal neural circuit by labeling and single cell RNA-sequencing of visually responsive cells

研究代表者

松田 光司（Matsuda, Koji）

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・特任研究員

研究者番号：40845228

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々動物は、自己運動により生み出される視野全体の像の動きであるオプティックフローにより、姿勢や進行方向を調節している。オプティックフローの処理には、前視蓋という脳領域が関与しており、様々な反応パターンを示す多様なニューロンが混在していることが明らかとなっている。しかし、個々の前視蓋ニューロンを区別して標識する技術が存在しないため、前視蓋ネットワークの機能解明には至っていない。本研究では、CaMPAR12を利用した細胞標識技術と1細胞RNA-seqを組み合わせた独自技術を開発することで、オプティックフロー特異的に反応する前視蓋ニューロンで発現する遺伝子の特定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外界から受容した感覚情報を元に、状況に応じた適切な行動が生み出されるメカニズムを理解することは、神経科学において重要な課題である。本研究は、オプティックフロー視覚情報処理を担う神経細胞群を遺伝学的に標識することによって、その神経回路メカニズムの解明に貢献した。さらに、本研究によって開発した技術は、視覚以外の様々な異なる感覚系の研究にも広く応用可能であると期待される。従って、視覚以外の感覚情報処理、さらには異なる感覚間の情報統合に関する脳内メカニズムの解明にも貢献する可能性がある。

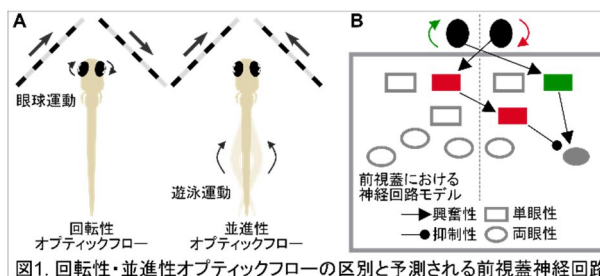
研究成果の概要（英文）：Animals adjust their posture, position and stabilize the direction of gaze by optic flow, which is the movement of the entire field of view produced by self-motion. The processing of optic flow involves a brain region called the pretectum, where various types of flow type-selective neurons are intermingled. However, its underlying circuit mechanisms are still unclear due to the lack of genetic tools that distinguish and label each type of pretectal neurons. In this study, we developed a technique that combines functional labeling using CaMPAR12 and single cell RNA-seq and have successfully identified marker genes for the optic flow-responsive pretectal cells.

研究分野：神経科学

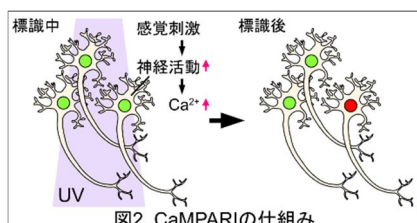
キーワード：ゼブラフィッシュ 前視蓋神経回路 刺激特異的細胞標識 1細胞RNA-seq 形態・機能解析

1. 研究開始当初の背景

外界から受容した視覚情報を元に、状況に応じた適切な行動が生み出されるメカニズムを理解することは、神経科学において重要な課題である。動物が運動している時、外界の視野は自身の動きとは逆方向へ流れるようにして動く。この視



覚情報はオブティックフローと呼ばれ、眼球や姿勢を同じ方向に調節することで、視野の安定性が維持されている。オブティックフローは、視野が回転する場合(回転性)と、平行移動する場合(並進性)の2つに大別され、それぞれ異なる運動反応が惹起される。例えば魚類において、回転性オブティックフローは眼球運動、並進性オブティックフローは遊泳運動を引き起こす(図1A)。これまでに、ゼブラフィッシュ仔魚を用いた Ca^{2+} イメージングにより、眼からの直接の投射先である前視蓋 (pretectum) が、回転性・並進性オブティックフローを区別する重要な脳領域として同定された (Kubo et al., *Neuron*, 2014)。前視蓋には視覚刺激の種類に応じて様々な反応パターンを示す多様なニューロン群が混在していることが明らかとなった。従って、回転性・並進性オブティックフロー情報はそれぞれ異なる前視蓋ニューロン群によって処理され、その信号が異なる下流運動経路へ伝達されることにより、異なる運動反応が制御されていると考えられた(図1B)。しかし、前視蓋に存在する個々のニューロンを区別して標識するのは技術的に困難なため、前視蓋神経回路ネットワークの詳細な機能解明には至っていない。



オブティックフロー反応細胞を特異的に標識するためには、その神経応答を指標にするのが現在のところ唯一の方法である。一般的に、GCaMPなどを用いた Ca^{2+} イメージングは神経活動をリアルタイムで定量的にモニターすることが可能である一方で、 Ca^{2+} インディケータの反応は一

過的であるため、活動履歴に基づいた選択的かつ長期的な細胞標識や遺伝子操作ができない。近年、活動した神経細胞を特異的かつ長期的に標識したり、それらの細胞で様々な遺伝子を発現させたりすることを可能にする技術が開発された。CaMPARI2 (Moeyaert et al., *Nat. Commun.*, 2018) は、神経活動の上昇に伴う神経細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇時に UV 光を照射すると、緑色から赤色に変わる Ca^{2+} センサータンパク質である(図2)。従って、CaMPARI2 を用いることで、オブティックフローに反応する前視蓋ニューロンを特異的に標識することは原理的には可能であると考えられた。また、シーケンス解析技術の発達に伴い、1細胞レベルでの遺伝子発現解析が可能となってきた。そこで、これらの技術を組み合わせることで、前視蓋に存在する個々のニューロンを遺伝学的に分類することができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、CaMPARI2 を利用したオブティックフロー特異的に反応する前視蓋ニューロンの標識と1細胞 RNA-seq を組み合わせる方法によって、遺伝子発現プロファイルから前視蓋ニューロンを分類することを目的とする。

3. 研究の方法

全脳の神経細胞で、核移行シグナルを付加した nlsCaMPARI2 を発現する遺伝子組換えゼブラフィッシュ系統 *Tg(HuC:nls-CaMPARI2)* を作製した。この仔魚(受精後6日)を用いて、特定の方向へ動くオプティックフロー視覚刺激(Moving 刺激)を与えると同時にUV照射を行うことで、そのオプティックフロー刺激に対して反応するニューロン群を赤色蛍光標識した。次に、蛍光標識されたニューロンのみを Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) により単離し、Chromium シングルセル遺伝子発現プラットフォーム(10x Genomics 社)により、1細胞 RNA-seq を行った。この解析では、本来着目しているオプティックフローに反応するニューロン群だけでなく、それ以外のニューロン群(例えば、自発的活動が高い細胞など)が含まれる。そこで、対照実験として、静止した縞模様の視覚刺激(Stationary 刺激)を提示し、同様に細胞標識・回収し、1細胞 RNA-seq を行った。Moving 実験において出現するが、Stationary 実験で出現しない細胞群に注目することで、本来目的とする動きに反応する細胞の解析対象を絞りこむことができると考え、解析ソフト Seurat (Stuart, Butler et al., *Cell*, 2019, Hao, Hao et al., *Cell*, 2021) を利用して、前視蓋ニューロンを含むクラスターを特定した。

4. 研究成果

Seurat を用いて、Moving 実験・Stationary 実験で得られたシーケンスデータを統合した。Stationary 刺激と比べ Moving 刺激で細胞数が多いクラスターに着目し(クラスター4, 図4A)いくつかの候補遺伝子を得た(図4B)。クラスター4に特徴的な遺伝子のうち *tcf7l2* に着目し、免疫組織化学染色を実施した。その結果、*tcf7l2* を発現する神経細胞は、オプティックフローを処理している脳領域である前視蓋領域に特異的に局在していることを見出した。さらに、ゲノム編集技術(CRISPR/Cas9)によって、*tcf7l2* 遺伝子上流に Gal4 遺伝子をノックインした *Tg(tcf7l2:Gal4)* 系統の樹立に成功した。*Tg(tcf7l2:Gal4)* 系統と *Tg(UAS:GCaMP6s)* 系統を交配して得られた仔魚を用い、8種類の単眼性・両眼性オプティックフローからなる視覚刺激を提示し、2光子顕微鏡を用いた Ca^{2+} イメージングを行った。その結果、*tcf7l2* 陽性ニューロンは、様々な種類のオプティックフローに反応することが分かった。以上の結果から、*tcf7l2* 陽性ニューロンは、前視蓋オプティックフロー反応細胞の全体を標識するマーカーとなると考えられる。次に、クラスター4に特徴的な別の候補遺伝子である *gata3*・*tal1*・*tal2* に着目した。その結果、これらの遺伝子を発現する神経細胞は、いずれも前視蓋領域の一部に位置していることが分かった。本研究では、CaMPARI2 を利用した細胞標識技術と1細胞 RNA-seq を組み合わせた独自技術を開発することで、前視蓋で発現する遺伝子の特定に成功した。

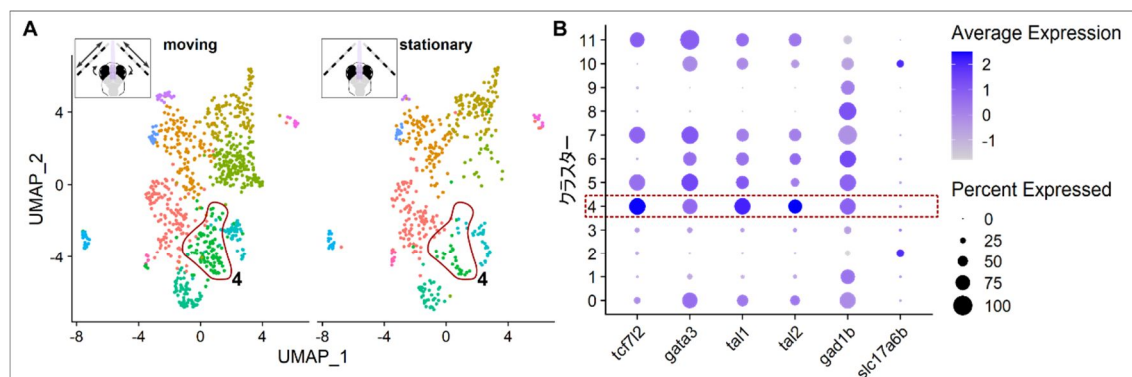


図4. 本研究により得られた前視蓋を標識することができる遺伝子群

(A) Moving刺激とStationary刺激に反応した細胞のクラスタリング結果(UMAP)。クラスター4はMoving刺激で細胞数が多い。(B) 各クラスターに特徴的な遺伝子発現。*tcf7l2*はクラスター4に特徴的な遺伝子である。クラスター4に含まれる細胞は主に*gad1b*を発現する抑制性の神経細胞であり、*slc17a6b*を発現する興奮性の神経細胞は少ないことが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuda Koji, Kubo Fumi	4. 巻 15
2. 論文標題 Circuit Organization Underlying Optic Flow Processing in Zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 709048 - 709048
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2021.709048	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Koji Matsuda and Fumi Kubo
2. 発表標題 Single cell RNA-seq analysis of functionally labelled optic flow-responsive neurons in the zebrafish pretectum
3. 学会等名 第27回 小型魚類研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Matsuda and Fumi Kubo
2. 発表標題 Molecular signature of optic flow responsive neurons identified by a technique combining functional labeling and single cell RNA-seq
3. 学会等名 第28回 小型魚類研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Matsuda, Fumi Kubo
2. 発表標題 神経活動依存的細胞標識とシングルセルRNA-seqを組み合わせた新規手法による視覚応答性ニューロンの分子識別
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------