

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21700370

研究課題名（和文） 透明なゼブラフィッシュ脳を用いた右脳・左脳神経活動の発達様式

研究課題名（英文） Developmental analysis of the neural activity in the left and right hemispheres using 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・客員主管研究員

研究者番号：80391837

研究成果の概要（和文）：

左右脳半球の神経回路およびその活動を解析するため、ゼブラフィッシュ手綱核神経回路に注目し、遺伝子導入動物を用いた解剖生理学的解析を行った。その結果、1) 発達中の左右手綱核細胞のカルシウムスパイクの可視化、2) これまで未解明であったゼブラフィッシュ内側及び外側手綱核相同領域の同定及び3) 左右非対称な手綱核投射を受ける脚間核の出力路（中心灰白質との結合）の解明に成功した。

研究成果の概要（英文）：

We focused on the zebrafish habenular circuit showing the left-right asymmetry in the projection pattern to study the difference in neural connectivity and its activity between left and right hemispheres. Through the analyses, we were able to 1) visualize the difference in the activity of the cells in the left and right habenula with calcium imaging, 2) identify the fish homologue of mammalian medial and lateral habenulae by the hodological and gene expression analyses and 3) identify the output pathway of the interpeduncular nucleus which receives asymmetric projection from the dorsal habenula.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：左右差、非対称性、手綱核、ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

手綱核は魚類からヒトまで共通して存在するモノアミン神経系の高次中枢であり、多くの動物で大きさや神経構築に著しい左右

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。申請者は透明な脳を持つゼブラフィッシュを用いて、特徴的な遺伝子発現を持つ2種類の神経細胞が手綱核亜核

に左右異なった割合で存在し、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報告してきた。

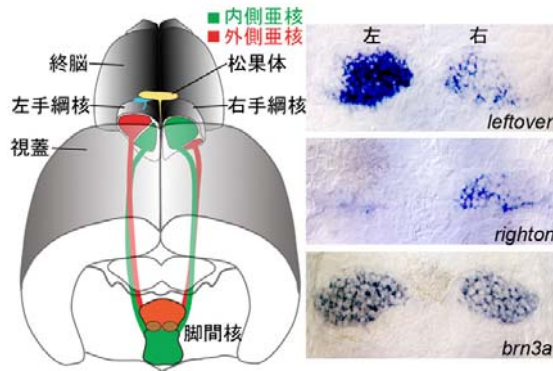


図1 手網核神経回路の左右非対称性

左側でより大きな外側亜核は発生早期に左側でより多く誕生し、右側でより大きな内側亜核は、発生後期に右側でより多く誕生する。このようにゼブラフィッシュ手網核は遺伝的制御のもとに左右異なった発生パターンを示すため、「左脳・右脳神経活動は異なった発達様式を示し、独立した情報処理機構を持つ」という仮説を検証するのに最適な実験系と考えられる。

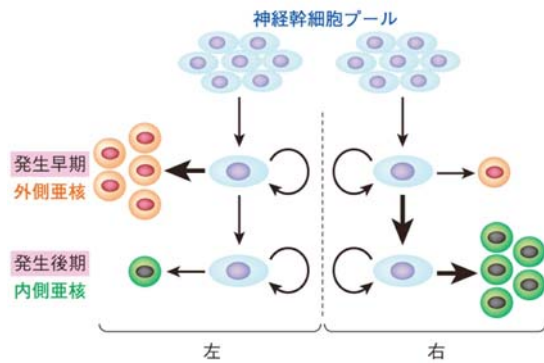


図2 手網核の左右非対称的な発生

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細胞レベルでの検討がほとんどなされていないため、その詳細な機能については不明な点が多い。脳の左右非対称性は、ヒトに利き手があり、言語機能が左大脳皮質に主に局在することから、長い間ヒトに特有の現象と考えられてきた。しかし、近年の研究成果により、脳の左右差は魚からヒトまで脊椎動物脳を通じて共通して見られる神経系の特徴であることが明らかとなっており、遺伝的に決定される著明な左右非対称性を示すゼブラフィッシュ手網核神経回路は、分子・細胞レベルでの洞察を与えている

唯一のモデルである。同神経回路を用いて左右差を示す神経回路の構造・機能・発達機構を明らかにする事は、広く脊椎動物神経機能の理解を深めるものと考えられる。

本研究の目的は、透明で微小なゼブラフィッシュ稚魚脳をモデルとして、右脳と左脳における神経結合や神経活動の違いを解剖生理学的に検討し、脳の機能的左右差を明らかにすることである。ゼブラフィッシュは発達過程でほとんどの組織が透明性を保つため、神経回路や神経活動の可視化に適しており、確立された遺伝子導入技術や豊富な突然変異体を背景に遺伝学的実験が容易に行える動物である。これまでの研究から神経細胞の分化タイミングの制御により左右非対称性が生み出される事が明らかとなっており、発達過程における手網核神経細胞活動の可視化技術開発が急務である。本研究では、新たな遺伝子導入法や軸索標識法を開発する事により、1) 発達中の左右手網核からの同時記録法の確立、2) 左右差を示すゼブラフィッシュ手網核の亜領域の同定、3) 非対称な手網核神経回路の出力経路の解析を行う。

3. 研究の方法

これまでの申請者らの研究により、左手網核がより早期に分化し、右手網核はより長く未成熟な状態に保たれる。未成熟な神経細胞は、網膜や大脳皮質で知られるように、近接する細胞と同期した周期性の発火パターンを示すことが知られており、このような発達時期に一過性にみられる自発的神経活動が神経回路形成に重要な働きをしていると考えられている。手網核にみられる左右非対称な神経細胞発生パターンは、右手網核が同期性神経活動をより長く維持するのに対し、左手網核がより早期に成熟した脱同期的神経活動パターンに移行する可能性を示唆しており、その発達における左右性は感覚刺激への応答やシナプス伝達効率の違いへと反映されていくと予想される。

本研究では、まず遺伝学的及び解剖学的手法で手網核神経回路の左右差を詳細に検討した上で、カルシウム感受性色素の導入により、左右手網核の神経細胞活動を高速共焦点レーザー顕微鏡により光学的に同時測定する。また、手網核神経回路は哺乳類で解剖学的に詳しく調べられており、哺乳類手網核は内側手網核と外側手網核という神経伝達物質や神経結合において全く異なった2つの領域から構成されていることが明らかとなっている。ゼブラフィッシュにおいて左右非対称性を認める手網核領域が哺乳類手網核のどの領域に対応するのかを明らかにする事は、脳の非対称の持つ生理的意義を明らかにする上で必須と考えられる。この問題を解

決するため、遺伝子発現解析と遺伝学的軸索標識実験を組み合わせる事で、魚類における哺乳類内側及び外側手綱核相同領域の同定を行う。

さらに主に手綱核神経細胞軸索の投射を受ける脚間核がどのように非対称な情報を伝達するかを調べるため、左右の手綱核は、脚間核の異なる亜領域に投射するが、それがどのようにして動物行動を制御するかを明らかにする上で軸索標識実験を行った。

4. 研究成果

平成21年度に行った研究は、左右脳半球の神経活動を可視化するために必要な遺伝子及びカルシウム指示薬の導入方法と得られる神経活動データの数値解析手法の最適化である。遺伝子導入によるカルシウム指示タンパクの遺伝子導入を行うために、一細胞顕微注入法及び電気穿孔法を試みた。成魚ゼブラフィッシュ脳における電気穿孔法による遺伝子導入方法を最適化するため、以下の設定について検討した。1) 脳室内に注入する pCS2-lynGFP (CMV promoter 制御下に膜移行型 GFP を発現するプラスミド) の濃度、2) 導入時の電極、3) 導入時の電流値および長さ、4) 導入操作後の生存期間。その結果、脳室内に 1 mg/ml の導入遺伝子を導入後、両側手綱核を挟むようにタングステン及びステンレス電極により 30 V, 1 msec の電流を 1-5 回程度与え、2-5 日間生理的食塩水で回復させたところ、腹側手綱核神経細胞に目的遺伝子を効果的に導入することに成功した。この新しい方法で、哺乳類外側手綱核が主に投射する縫線核との神経結合を調べたところ、魚類縫線核へ投射する神経細胞が手綱核腹内側部 (魚類腹側手綱核) に密集している事が明らかとなった。また魚類手綱核に特異的に発現する遺伝子を同定する網羅的遺伝子発現解析の結果、哺乳類外側手綱核特異的遺伝子発現をする Protocadherin10 遺伝子が魚類腹側手綱核にも特異的に発現している事が確認された。これらの研究結果は、魚類腹側手綱核が哺乳類外側手綱核の相同領域である事を示唆しており、内側および外側手綱核神経回路は系統発生を通じて保存されていることが明らかとなった。またこの事実は著明な左右非対称性を示す魚類手綱核領域が哺乳類内側手綱核と相同な領域である事を示している。

一方で、哺乳類外側多手綱核相同領域である魚類腹側手綱核は成体においては哺乳類内側手綱核相同領域である背側手綱核の腹内側に位置している。これは、一見魚類一哺乳類間で手綱核亜領域の内-外位置関係が逆転しているように見える。そこで、これらの手綱核亜領域の発達を遺伝子マーカーと導入遺伝子を指標に詳細に検討したところ、

胎仔期においては外側手綱核相同領域は魚類においても外側に位置しており、その後内側手綱核相同領域の発達に伴い腹内側へと押し込まれていく様子が明らかとなった。以上の結果はモノアミン制御中枢である手綱核の亜領域の進化を明らかにするものであり 2010 年に *Journal of Neuroscience* 誌に発表した。

我々はゼブラフィッシュ成魚の手綱核—脚間核間の神経結合に著明な左右非対称性がみられることを報告してきた。即ち、左側でより大きく発達した手綱核外側亜核が背側脚間核へと投射するのに対して、右側でより大きく発達した手綱核内側亜核は腹側脚間核へと投射している。しかし、この非対称な回路の出力路を形成する脚間核が、脳のどの領域を介して行動制御に至るかについては全く不明であった。そこで、脳深部に位置する脚間核の遠心性線維を可視化するため、ゼブラフィッシュ脚間核へ脳定位固定的に軸索標識物質を微量注入する実験系を確立し、イオン泳動法により左手綱核より主に入力を受ける背側脚間核もしくは右手綱核より主に入力を受ける腹側脚間核からの遠心性線維を特異的に標識することに成功した。その結果、背側及び腹側脚間核はそれぞれ主に恐怖反応制御に関わるとされる中心灰白質と適応行動制御に関わる縫線核へと連絡していた。本研究は、未解明であった左右非対称な神経回路と行動制御を結ぶ脳領域を同定したものであり、以前の研究結果とともに *Nature Neuroscience* 誌に発表した。

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 Aizawa H, Amo R, Okamoto H. Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. *Front. Neurosci.* 5:138. doi: 10.3389/fnins.2011.00138, 2011. (査読有)

② 相澤秀紀, 岡本仁. 手綱核の左右差と行動. *Clinical Neuroscience*, 第 29 巻, 第 6 号, p663-665, 2011 年 (査読無)

③ Okamoto H, Agetsuma M, Aizawa H. Genetic dissection of the zebrafish habenula, a possible switching board for selection of behavioral strategy to cope with fear and anxiety. *Dev Neurobiol.* May 12. doi: 10.1002/dneu.20913, 2011. (査読有)

④ Agetsuma A, Aizawa H, Aoki T, Nakayama R, Takahoko M, Goto M, Sassa T, Amo R, Shiraki T, Kawakami K, Hosoya T,

Higashijima S and Okamoto H. The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. Nat Neurosci. 2010, Nov;13(11):1354-6. (査読有)

⑤ Amo R*, Aizawa H*, Takahoko M, Kobayashi M, Takahashi R, Aoki T, Okamoto H. Identification of the zebrafish ventral habenula as a homolog of the mammalian lateral habenula. J Neurosci. 30(4):1566-74, 2010. *Co-first authors (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

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・客員主管研究員

研究者番号：80391837