

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25年 5月 7日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700349

研究課題名（和文）逃避方向を決定する後脳神経細胞の探索

研究課題名（英文）Genetic analysis of the hindbrain neurons that determine the escape direction in zebrafish

研究代表者

浅川 和秀（ASAKAWA KAZUHIDE）

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教

研究者番号：30515664

研究成果の概要（和文）：環境中を移動する動物は、環境や身体の内側から感じ取る感覚情報をたよりにしながら、適切な移動方向（ロコモーションの方向）を選択している。本研究は、モデル脊椎動物であるゼブラフィッシュが触覚刺激の位置に応じて体軸の旋回角度を変化させ、刺激から遠ざかる方向に逃避する行動をモデルに用いて、感覚刺激の位置情報を、ロコモーションの方向性に変換する神経回路の構造を理解することを目指した。後脳の転写因子 *mafb* 発現領域に、破傷風神経毒素軽鎖遺伝子を発現させて神経機能を阻害すると、逃避行動における体幹の旋回角度が増大することを見いだした。この結果は、後脳の *mafb* 陽性領域に含まれる神経細胞の働きによって逃避方向が決定されることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：An animal moving through the environment maintains or changes its direction of progression based on internal and/or external sensory information. Such directional control of locomotion must be precisely regulated in escape behaviors, which determine whether an animal can survive a predatory attack. Here, we studied the neural mechanisms underlying the directional control of escape locomotion against tactile stimulus in zebrafish. We found that, when the tetanus neurotoxin light chain was induced in a hindbrain domain that expressed the *mafb*-transcription factor gene, embryos displayed a lateral escape turn with a larger angle, thereby escaping in an abnormal direction. The increase in the lateral turn angle was observed when the touch was applied to the head, as well as tail region. These observations suggest that the *mafb*-positive domain in the hindbrain can discriminate the position of the tactile sensory stimulus and determine accordingly an angle of lateral turn to select a proper direction of escape locomotion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：ロコモーション、方向、後脳、ゼブラフィッシュ、Gal4、*mafb*

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の後脳は、感覚受容細胞からの入力を受け取って適切な運動出力を指令する運動の制御中心として機能している。このような感覚運動変換制御に必要な神経回路が整然と構築され、機能を獲得するメカニズムの多くは未知である。発生初期のゼブラフィッシュは、脊髄への出力細胞である後脳網様体脊髄路ニューロンの数が200-300個と見積もられており、脳脊髄間に数百万個もの神経繊維が走行すると言われている哺乳類に比べて著しく数が少ないことから、私は、後脳による運動制御のメカニズムを細胞レベルで理解する為のモデルとしてゼブラフィッシュを選んだ。

本研究が開始される以前には、主に、後脳領域の一部あるいは全てを外科的にアブレーションし、胴体を含む部分の運動を解析するという手法によって後脳の機能が議論されてきた。このような実験においては、アブレーションによる物理的なダメージが運動に与える影響を考慮に入れる必要があり、解析結果の明確な解釈が困難であった。この困難を克服すべく、私は、新規の神経機能解析法の開発に取り組み、脊椎動物において世界で初めてGal4トラップ法の構築に成功した。この手法を用いることで、特異的な神経細胞集団に酵母転写因子 Gal4 を発現するトランスジェニック系統を効率よく作製できるようになった。さらに、Gal4 発現細胞に破傷風神経毒素軽鎖遺伝子 TeTxLC を発現させる為の系統を樹立した (UAS-TeTxLC 系統。UAS は Gal4 転写因子の認識配列を意味する)。私は、Gal4 トラップ法を用いて、後脳の分節領域ロンボメア 2 からロンボメア 6 の cyp26c1 遺伝子陽性細胞に Gal4 を発現する系統を樹立した (cyp26c1-Gal4 系統)。cyp26c1-Gal4 系統と UAS-TeTxLC 系統を交配して cyp26c1-Gal4; UAS-TeTxLC 二重トランスジェニック胚を取得し、行動解析を実施した。野生型ゼブラフィッシュの初期胚は触覚刺激を感知すると、刺激源とは反対方向に頭部を旋回させて体幹を反らせる運動を示し (C ベンド)、刺激源から遠ざかる方向へ泳いで逃避する。ところが、cyp26c1-Gal4; UAS-TeTxLC 胚に触覚刺激を与えると、頭部を刺激源に近づく方向に旋回させ、誤った逃避方向を選択した。この結果から、後脳のロンボメア 2 から 6 にかけて存在する cyp26c1 遺伝子陽性細胞の働きによって、C ベンドの方向性が決定されていると予想された。

2. 研究の目的

本研究においては、以下の 2 点を明らかにすることで、後脳を介した機能的神経回路の構造を解明することを目指した。①ロンボメア

2 から 6 にわたる cyp26c1 遺伝子発現領域をさらに機能的に分解し、逃避方向を決定する特異的な後脳分節領域、ひいては後脳神経細胞を同定する。②触覚刺激を処理する為の脊髄-後脳神経経路を同定する。

3. 研究の方法

(1) Gal4-UAS 法と Cre-lox 組換え法を組み合わせた新しい手法を構築し、cyp26c1 遺伝子発現領域内の限られた細胞集団に、TeTxLC 発現を局限させることで、より精細な後脳の機能解析を実施する。

(2) 触覚受容細胞の単一細胞ラベリングを実施し、逃避方向を決定する後脳神経細胞と、触覚受容細胞の相互作用を形態学的に検証する。

4. 研究成果

(1) C ベンドの方向制御に必要な後脳領域を同定する為に、Gal4 トラップ法を用いて、後脳に Gal4 を発現する系統を探索した。その結果、ロンボメア 4 から 6、及び脊髄ニューロンに Gal4 を発現する系統を単離した。この系統においては、転写因子遺伝子 mafb 座位の活性に依存して Gal4 が発現していたことから、mafb-Gal4 系統と名付けた。mafb-Gal4 系統と UAS-TeTxLC 系統を掛け合わせて、mafb 陽性細胞に TeTxLC を発現させると、C ベンドの角度が野生型より増大することを見いだした (図 1)。阻害胚においては、頭部への刺激、尾部への刺激のいずれに対しても C ベンドの角度が増大することから、体表に与えられた触覚刺激は mafb 陽性領域に伝達され、C ベンドの角度が決定されると考えられた。

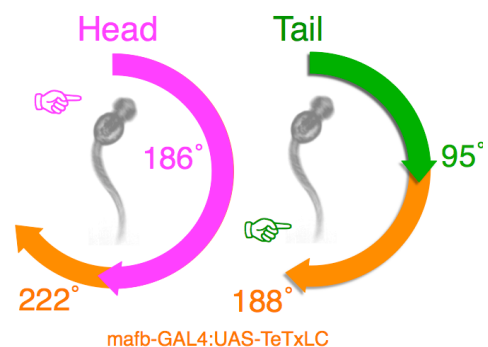


図 1 mafb-GAL4;UAS-TeTxLC 胚 (オレンジ色) においては、C ベンドの角度が増大する。

特に、C ベンドの角度が増大する表現型は興味深く、C ベンドをある一定の角度で停止させることで、逃避方向を制御している可能性が示唆された。

(2) mafb-Gal4 系統は、後脳のロンボメア 4 か

ら6の領域にかけての領域に強い Gal4 発現を示したが、脊髄ニューロンにおいても弱い Gal4 発現が観察された。mafB-Gal4;UAS-TeTxLC 胚のCベンドの角度が増大する表現型が、後脳における mafb 細胞の阻害の影響であるか否かを検証する為に、Gal4-UAS 法と Cre-lox 組換え法を組み合わせ、後脳の mafb 陽性細胞に TeTxLC 発現を限局させようと試みた。まず、後脳領域のみに Cre 遺伝子を発現させる為に、cyp26c1 遺伝子座位を含む Bacterial artificial chromosome (BAC) を改変し、cyp26c1 プロモーター/エンハンサーを利用して後脳に Cre を発現させた。次に、Gal4 と Cre の両方に依存して TeTxLC を発現する UAS-lox-TeTxLC 系統を作製した。mafB-Gal4;cyp26c1-Cre;UAS-lox-TeTxLC 三重トランスジェニック胚においては、後脳の mafb 陽性領域にのみ TeTxLC が誘導され、Cベンドの角度の増大が観察された。このことから、後脳の mafb 陽性細胞に依存して、Cベンドの角度が決定されていることが示唆された。

逃避行動において、Cベンドの角度に影響を与える細胞は未知であるため、mafB 陽性領域にそのような細胞が存在することを示唆する本研究の結果は重要である。後脳の mafb 陽性領域には分化した神経細胞がおおよそ400-500個程度存在すると見積もられている。今後は、これらのうち、触覚刺激によって活性化される細胞群をカルシウムイメージングによって同定し、同定された細胞群の機能を組織へのダメージが少ない2光子レーザーを利用したアブレーションによって検証することで、C-bendの角度に影響を与える細胞を同定する必要がある。

(3) 他グループの先行研究によって既に確立されていた、頭部への触覚刺激を感知する Trigeminal ganglion 細胞(以下TG細胞)と、体幹部および尾部への触覚刺激を感知する Rohon-Beard 細胞(以下、RB細胞)の単一細胞染色法を用いて、本研究で主に着目している受精後48時間後における、TG細胞、及びRB細胞の形態解析を実施した。受精後48時間におけるTG細胞とRB細胞の中心軸索の形態を克明に捉えることに成功した。一方、逃避方向を決定する後脳の同定に至らなかったため、TG細胞、及びRB細胞の中心軸索との相互作用の解析は実施できなかった。Cベンドの角度を制御する後脳細胞が同定された後、再検討すべき課題である。

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9件)

- ① Yamanaka, I., Miki, M., Asakawa, K.,

Kawakami, K., Oda, Y. and Hirata, H. Glycinergic transmission and postsynaptic activation of CaMKII are required for glycine receptor clustering in vivo. *Genes Cells*. 査読有り, 18:211-224, 2013. doi: 10.1111/gtc.12032.

- ② Asakawa, K., Higashijima, S., and Kawakami, K. An *mnr2b/hlxb91b* enhancer trap line that labels spinal and abducens motor neurons in zebrafish. *Dev Dyn.*, 査読有り, 241, 327-332. 2012. doi: 10.1002/dvdy.22781.

- ③ Fukui, H., Shiba, D., Asakawa, K., Kawakami, K., and Yokoyama, T. The ciliary protein Nek8/Nphp9 acts downstream of *Inv/Nphp2* during pronephros morphogenesis and left-right establishment in zebrafish. *FEBS Lett.*, 査読有り, 586, 2273-2279. 2012. doi: 10.1016/j.febslet.2012.05.064.

- ④ Pujol-Marti, J., Zecca, A., Baudoin, J.P., Faucherre, A., Asakawa, K., Kawakami, K., and Lopez-Schier, H. Neuronal birth order identifies a dimorphic sensorineural map. *J Neurosci.*, 査読有り, 32, 2976-2987. 2012. doi: 10.1523/JNEUROSCI.

- ⑤ Hirata, H., Wen, H., Kawakami, Y., Naganawa, Y., Ogino, K., Yamada, K., Saint-Amant, L., Low, S.E., Cui, W.W., Zhou, W., Sprague, SM., Asakawa, K., Muto, A., Kawakami K., Kuwada JY. Connexin 39.9 protein is necessary for coordinated activation of slow-twitch muscle and normal behavior in zebrafish. *J Biol Chem.*, 査読有り, 287, 1080-1089. 2012. doi: 10.1074/jbc.M111.308205.

- ⑥ Kishimoto N, Alfaro-Cervello C, Shimizu K, Asakawa K, Urasaki A, Nonaka S, Kawakami K, Garcia-Verdugo JM, Sawamoto K. Migration of neuronal precursors from the telencephalic ventricular zone into the olfactory bulb in adult zebrafish. *J Comp Neurol.*, 査読有り, 519, 3549-3565. 2011. doi: 10.1002/cne.22722.

- ⑦ Kawakami K, Abe G, Asada T, Asakawa K, Fukuda R, Ito A, Lal P, Mouri N, Muto A, Suster ML, Takakubo H, Urasaki A, Wada H, Yoshida M. zTrap: zebrafish gene trap and enhancer trap database. *BMC Developmental Biology*, 査読有り, 10, 105. 2010. doi: 10.1186/1471-

213X-10-105.

- ⑧ Asakawa K, Kawakami K. A transgenic zebrafish for monitoring in vivo microtubule structures. Dev Dyn., 査読有り, 239, 2695-2699. 2010. doi: 10.1002/dvdy.22400.
- ⑨ Rodríguez-Marí A, Cañestro C, Bremiller RA, Nguyen-Johnson A, Asakawa K, Kawakami K, Postlethwait JH. Sex reversal in zebrafish fanci mutants is caused by Tp53-mediated germ cell apoptosis. PLoS Genet., 査読有り, 6, e1001034. 2010. doi: 10.1371/journal.pgen.1001034.

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① Asakawa, K., Abe, G., Kawakami, K. Genetic dissection of the hindbrain by the Gal4-UAS system in zebrafish. Society for Neuroscience 2011 ポスター、2011 年 11 月 14 日、Washington DC, USA
- ② 浅川和秀, 阿部玄武, 川上浩一 ゼブラフィッシュを用いた後脳運動制御機能の遺伝学的解剖 第 34 回日本神経科学大会 2011 口頭、2011 年 9 月 17 日、横浜
- ③ Asakawa, K., Abe, G., Kawakami K. Genetic Dissection of the Hindbrain by the Gal4-UAS System. 7th European Zebrafish Meeting 2011 口頭、2011 年 7 月 6 日、Edinburgh, UK
- ④ Asakawa, K., Abe, G., Kawakami, K. Genetic dissection of the hindbrain by the Gal4-UAS system in zebrafish. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists 2011 口頭、2011 年 5 月 19 日、沖縄
- ⑤ Asakawa, K., Abe, G., Kawakami, K. Genetic dissection of the hindbrain functions by the Gal4-UAS system in zebrafish. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 ポスター、2010 年 12 月 8 日、神戸
- ⑥ 浅川和秀, 阿部玄武, 川上浩一 ゼブラフィッシュ Gal4-UAS 法を用いた後脳機能の遺伝学的解剖 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 2010 口頭、2010 年 9 月 2 日、神戸
- ⑦ Asakawa, K., Abe, G., Kawakami, K. The

functions of the hindbrain revealed by the Gal4-UAS system. 9th International Conference on Zebrafish. 2010 ポスター、2010 年 6 月 18 日、Madison, USA

〔図書〕(計 1 件)

- ① Asakawa, K. Kawakami, K. Gene trapping. Brenner's Encyclopedia of Genetics, 2nd ed, 2013, Elsevier

〔その他〕

ホームページ等

- ① <http://researchmap.jp/kazuhideasakawa/>
- ② <http://kawakami.lab.nig.ac.jp/ztrap/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅川 和秀 (ASAKAWA KAZUhide)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教
研究者番号: 30515664

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし