

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82648

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700408

研究課題名(和文) 光遺伝学を用いたゼブラフィッシュ脊髄運動系神経回路機能の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the spinal motor circuits in zebrafish using optogenetics

## 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(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特別協力  
研究員

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、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、新技術である光遺伝学を用いて、ゼブラフィッシュの遊泳行動に関わる脊髄神経回路の機能を解明することであった。研究開始当初、光遺伝学を個体の行動解析に使用する方法は発展途上であったが、本研究ではゼブラフィッシュを用いて、遺伝学的に同定した神経細胞集団を光により任意に制御する実験系を確立することに成功した。しかし、遊泳行動に関わる脊髄神経回路の解析は、標的とした神経細胞の特性が理由で、困難であった。代わりに、確立した実験系を用いて、脊髄ではなく後脳で遊泳行動に必要な神経細胞を光遺伝学的解析で同定した。これは、脊椎動物のロコモーションに関わる神経回路を解明する上で、重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Optogenetics is a innovative technique which allows us to control neural activity of specific neurons by light. In this research, I planned to apply optogenetics to analyzing function of the spinal motor circuits in zebrafish. First, I succeeded in generating several transgenic zebrafish expressing optogenetic molecules in specific neurons. Next, I tried to analyze the function of several spinal interneurons by using of these transgenic fish. However, this analysis was difficult to perform due to some technical limitations. Instead of the spinal cord, I analyzed specific neurons in the hindbrain using optogenetics. I identified a group of neurons which is indispensable to swimming behavior. This results is important for understanding the neural circuits controlling locomotion in vertebrates.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：光遺伝学 ゼブラフィッシュ ロコモーション

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物のロコモーションにおいて、脊髄神経回路は反射やリズム生成などに重要な役割を果たすことが知られていて、長い研究の歴史がある。しかし、脊髄にどのような種類の神経細胞が存在し、各種の細胞が機能的回路の中でどのような役割を担っているかについては、意外にも未解明の部分が多い。最近までこれらの研究が困難であった理由は、特定の機能を持つ神経細胞群を生きたまま同定する手法が乏しかったためである。

ところが近年、発生初期に特定の神経細胞で発現する転写因子の発現制御領域を利用することで、特定の機能を持つ神経細胞集団を蛍光タンパク質等でラベルし、生きたまま同定する手法が用いられるようになった。研究代表者らは他の研究グループに先駆けて、転写因子 Chx10 を発現する脊髄神経細胞の性質と機能的回路における活動をゼブラフィッシュを用いて調べた (Kimura et al. J. Neurosci. 2006)。方法としては、発生途上で Chx10 を発現する神経細胞を GFP により可視化し、形態学的、電気生理学的な解析を行った。これらの結果から、Chx10 ニューロンは遊泳行動において同側の運動ニューロンのフェジックな活動を直接制御する、CPG (central pattern generator) の主要な要素であると強く予想できた。しかし、この予想の正しさを決定的に証明することは今まで出来ていなかった。従来手法では、個々のニューロンの活動を調べることは可能でも、特定の性質を持つニューロン集団の活動を変化させることで、その働きを直接検証することは困難であったためである。

しかし、最近の光遺伝学の技術発達は、光により非侵襲的に任意の場所の神経細胞の活動を正確なタイミングで制御することを可能にした (Gradinaru et al. Cell 2010)。光遺伝学を用いれば、Chx10 陽性ニューロンなど、特定の性質を持つニューロン集団の活動を、光照射により任意に変化させることが可能となる。これにより、特定の性質を持つニューロン集団の機能的回路における働きを直接検討することができると予想された。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュを材料に、光遺伝学のツールを Chx10 細胞特異的に発現させ、脊髄 Chx10 ニューロン集団としての活動を任意に制御した結果、予想されるロコモーションの変化が起こることを示し、Chx10 ニューロンが CPG の主要な要素であることを証明することを目指した。さらに、Chx10 ニューロンだけでなく、その他の転写因子を発現する別のタイプの脊髄介在ニューロンにも光遺伝学を用いた同様な解析を行い、ロコモーションにおける役割を示すことも目指した。特定種類の脊髄ニューロンの個々の性質から集団としての機能発現までを統合して、脊椎動物脊髄運動系神経回路の

理解を深めることが第一の目的であった。

第二の目的は、本研究で光遺伝学を神経回路解析に適用するための優れた実験系を立ち上げることであった。ゼブラフィッシュ胚は透明であり、個体に光遺伝学を用いる際の光照射が容易であるため、光遺伝学の材料として非常に適している。ゼブラフィッシュ幼魚は哺乳類よりシンプルな神経系を持つので、解析や結果の解釈も容易である。転写因子の発現パターンは脊椎動物で保存されているので、得られた結果は哺乳類の神経回路とも対応させやすい。研究開始時点では、ゼブラフィッシュにおける光遺伝学的解析は確立された手法となっておらず、本研究により、光遺伝学を用いた神経回路解析手法が改良されれば、他の神経細胞解析にもこの手法を適用することができ、応用性が非常に高いと考えた。

## 3. 研究の方法

(1) 特定のニューロンに光遺伝学のツールを発現させたトランスジェニック魚の作成

光遺伝学のツールとして、神経細胞の活動を高めるためには、光活性化型カチオンチャンネルであるチャンネルロドプシン (ChR)、活動を低下させるためには光駆動性クロライドポンプであるハロロドプシン (Halo) と光駆動性プロトンポンプであるアーキロドプシン (Arch) を用いる。Chx10 などの転写因子を発現する特定種類のニューロンに光遺伝学ツールを発現するトランスジェニック魚を作製する。

(2) 脊髄 Chx10 ニューロン集団のロコモーションにおける役割の解析

光遺伝学のツールを Chx10 ニューロンに発現させたトランスジェニック魚を用いて、脊髄に任意の光照射を行い、脊髄 Chx10 ニューロン集団の活動を制御する。その結果生じる行動変化を観察し、脊髄 Chx10 ニューロンが CPG の主要な要素であるとの仮説を直接的に証明する。

(3) 脊髄 Sim1 ニューロン集団のロコモーションにおける役割の解析

Sim1 を発現する脊髄の興奮性介在ニューロンはロコモーション中の活動パターンを調べる予備実験から、自発的な遊泳行動の維持に働くと推測された。この仮説を検証するために、Chx10 ニューロンと同様な解析を行う。光遺伝学のツールを Sim1 ニューロンに発現させたトランスジェニック魚を用いて、脊髄に任意の光照射を行い、脊髄 Sim1 ニューロン集団の活動を制御する。その結果生じる行動変化を観察する。

## 4. 研究成果

(1) 特定のニューロンに光遺伝学のツールを発現させたトランスジェニック魚の作成

特定のニューロンに光遺伝学ツールを発

現するトランスジェニックフィッシュを作製するために、当初は転写因子の制御配列に直接光遺伝学ツールの配列をつなぐ方法をとった。しかし、この方法では、光遺伝学ツール分子の十分な発現量が達成できなかった。そこで、発現の増幅が期待できるGal4-UASシステムを用いることにした。この方法により、ニューロンを光制御するために十分な発現量の光遺伝学ツールを目的ニューロンで発現するトランスジェニックフィッシュを作製することに成功した。

### (2) 脊髄 Chx10 ニューロン集団のロコモーションにおける役割の解析

Chx10 ニューロンに光遺伝学ツールを発現させるために、Chx10:Gal4 トランスジェニックを作製した。しかし、Gal4-UAS システムは、発現レベルの増幅という長所と共に、本来低レベルの発現も増幅してしまう短所がある。用いる制御配列によっては、非特異発現が増える場合がある。Chx10:Gal4 トランスジェニックフィッシュは脊髄の後方部分で、運動ニューロンなどにレポーター遺伝子の非特異的発現を生じた。そのため、Chx10:Gal4 を用いて光遺伝学ツールを発現させた魚では、脊髄に光照射を行い、脊髄 Chx10 ニューロン集団の活動を制御する実験は、非特異的発現のない脊髄前方のごく限られた領域でしか行うことができず、解析を断念した。

### (3) 後脳 Chx10 ニューロン集団のロコモーションにおける役割の解析

Chx10:Gal4 トランスジェニックフィッシュは脊髄では非特異的発現が見られたが、後脳では Chx10 ニューロンに特異的な発現が見られた(図1)。

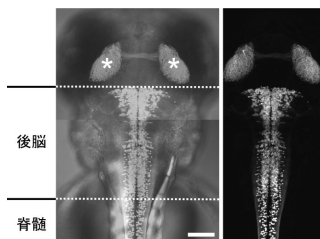


図1  
Chx10:Gal4,  
UAS:GFP 魚

後脳の Chx10 ニューロンの解析は、当初の研究計画にはなかったが、ゼブラフィッシュ胚で、特定のニューロン群に光遺伝学的解析を行う系を確立するという第二の目的を達成するために、解析を行うことにした。後脳 Chx10 ニューロンはグルタミン酸作動性で、少なくとも一部のニューロンは脊髄に軸索をのぼすことが知られていた。そのため、後脳 Chx10 ニューロンはゼブラフィッシュ遊泳行動の際に、興奮性入力を脊髄 CPG に送る主要なニューロン群であると、予想された。この仮説が正しければ、後脳 Chx10 ニューロンを強制的に活動させれば、遊泳が起こり、活動を抑制すれば、遊泳が停止するはずである。実際、Chx10:Gal4, UAS:ChR トランスジェニ

ックフィッシュの後脳に光照射を行い、後脳 Chx10 ニューロンをチャンネルロドプシンで強制活動させると遊泳が生じた(図2)。また、Chx10:Gal4, UAS:Arch トランスジェニックフィッシュの後脳に光照射を行い、後脳 Chx10 ニューロンの活動をアーキロドプシンで抑制すると遊泳が停止した(図3)。ハロドプシンで抑制した場合も、同様の結果を得た。これらの結果は、後脳 Chx10 ニューロンがゼブラフィッシュ幼魚の遊泳行動に必要な十分なニューロン群であることを示した。同時にこの研究は、ゼブラフィッシュ幼魚が光遺伝学的解析に適した優れた実験系であることも示している。この結果は Current Biology に発表した。

Chx10:Gal4, UAS:ChR (チャンネルロドプシン)

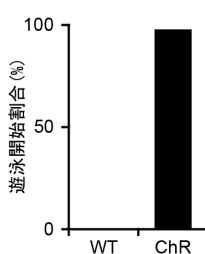
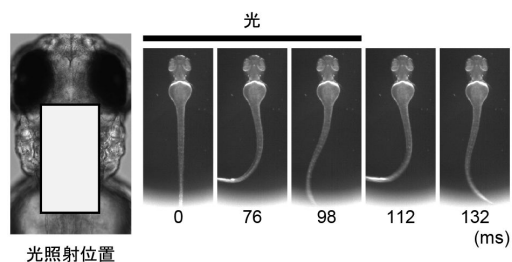


図2  
Chx10:Gal4,  
UAS:ChR 魚の後脳に光照射を行い、後脳 Chx10 ニューロンを強制活動させると遊泳行動が誘起された。

Chx10:Gal4, UAS:Arch (アーキロドプシン)

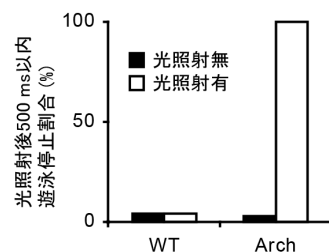
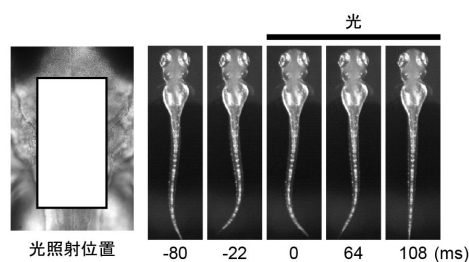


図3  
Chx10:Gal4,  
UAS:Arch 魚の後脳に光照射を行い、後脳 Chx10 ニューロンを抑制すると遊泳行動が停止した。

### (4) 脊髄 Sim1 ニューロン集団のロコモーションにおける役割の解析

予備実験から、脊髄 Sim1 ニューロンは自発的な遊泳行動の維持に働くと予想され、その仮説の検証を行った。しかし、Sim1 ニューロンにチャンネルロドプシンを発現させ、脊髄に光照射を行ったが、遊泳行動は誘起されなかった。また、光遺伝学的に Sim1 ニューロンを抑制する実験を行う前に、二光子顕微鏡を使って、脊髄 Sim1 ニューロンを殺す実験を行ったが、遊泳行動に変化は見られなかった。現在のところ、予想に反して、脊髄 Sim1 ニューロンは脊髄運動系神経回路の主要な構成要素ではない可能性が高い。しかし、脊髄 Sim1 ニューロンは遊泳行動に一致したタイミングで活動を行うことから、少なくとも何らかの補助的な役割はしていると考えている。現在の解析系で観察できていない遊泳行動の違いがあるのかもしれない、さらに解析が必要である。

#### (5)まとめ

第一の目的であった脊髄運動系神経回路の機能解明という目的は達成できなかったが、第二の目的であるゼブラフィッシュで特定の神経細胞の活動を光遺伝学的に操作する系の確立ができたことは大きな成果である。また、副次的ではあったが、後脳に存在する遊泳行動に必要なニューロン群を同定したことは、脊椎動物のロコモーションに関わる神経回路を解明する上で、重要な成果である。

#### 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 4 件)

木村有希子、東島眞一、  
光遺伝学ツールを用いたゼブラフィッシュの行動制御  
細胞工学、33(3)、255-259、2014、査読無

Satou C, Kimura Y, Hirata H, Suster ML, Kawakami K, Higashijima S.  
Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons.,  
Development, 140(18), 3927-3931, 2013, 査読有  
DOI: 10.1242/dev.099531.

Yukiko Kimura, Chie Satou, Shunji Fujioka, Wataru Shoji, Keiko Umeda, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, Shin-ichi Higashijima,  
Hindbrain V2a neurons in the excitation of spinal locomotor circuits during zebrafish swimming,  
Current Biology, 23(10), 843-849, 2013, 査読有  
DOI: 10.1016/j.cub.2013.03.066

東島眞一・木村有希子、  
オプトジェネティックツールを用いたゼブラフィッシュ運動系神経回路の解析  
実験医学、30(16)、2588-2589、2012、査読無

〔学会発表〕(計 3 件)

Kimura Y, Satou C, Fujioka S, Shoji W, Umeda K, Ishizuka T, Yawo H, Higashijima S,  
Hindbrain V2a neurons play critical roles in providing excitations to zebrafish spinal locomotor circuits during swimming  
JSCPB2013, 2013 年 07 月 13 日~2013 年 07 月 15 日 兵庫県 イーグレひめじ

Kimura Y, Satou C, Higashijima S,  
Chx10-positive neurons in the hindbrain play essential roles during swimming in zebrafish,  
第 35 回日本神経科学大会、2012 年 09 月 18 日~2012 年 09 月 21 日、愛知県 名古屋国際会議場

木村有希子、東島眞一、  
ゼブラフィッシュ遊泳行動における後脳 Chx10 ニューロンの機能解析  
日本動物学会第 83 回大会、2012 年 09 月 13 日~2012 年 09 月 15 日、大阪府 大阪大学

#### 6. 研究組織

##### (1)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  
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特別協力研究員  
研究者番号: 70581122